รูปแบบและองค์ประกอบรายงานโครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์

(สำหรับโครงการวิจัย)

หน้าปก

ปกใน/ปกรอง

คำปรารภ (Foreword หรือ Preface)

สารบัญ หน้า

กิตติกรรมประกาศ..... x

ผู้วิจัย x

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ x

บทนำ..... x

บทคัดย่อ..... x

1. ชื่อกิจกรรมงานวิจัย 1 x
2. ชื่อกิจกรรมงานวิจัย 2 x

บทสรุปและข้อเสนอแนะ..... x

บรรณานุกรม..... x

ภาคผนวก x

รายงานโครงการวิจัย

การค้นหาและศึกษาหน้าที่ของยีนที่มีประโยชน์ทางการเกษตร

Gene Discovery and Functional Studies of useful Genes in Agriculture

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย

(นายพยุงศักดิ์ รวยอารี)

(Mr.Payungsak Rauyaree)

ปี พ.ศ. (2558)

รายงานโครงการวิจัย

การค้นหาและศึกษาหน้าที่ของยีนที่มีประโยชน์ทางการเกษตร

Gene Discovery and Functional Studies of useful Genes in Agriculture

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย

(นายพยุงศักดิ์ รวยอารี)

(Mr.Payungsak Rauyaree)

ปี พ.ศ. (2558)

คำปรารภ

รายงานโครงการวิจัยฉบับเรื่องการค้นหาและศึกษาหน้าที่ของยีนที่มีประโยชน์ทางการเกษตร จัดทำขึ้นจากการรวบรวมเอกสารรายงานวิจัยเรื่องเต็มของนักวิจัยภายใต้โครงการวิจัยฯตั้งแต่ปี พ.ศ.2554 ถึง ปีพ.ศ.2558 วัตถุประสงคในการเขียนเอกสารวิชาการฉบับนี้เพื่อใช้สรุปเป็นภาพรวมของชุดโครงการวิจัยของกลุ่มติดตามและประเมินผล กองแผนงานและวิชาการ กรมวิชาการเกษตร และเพื่อใช้เป็นเอกสารผยแพร่ทางวิชาการได้ต่อไป

(นายพยุงศักดิ์ รวยอารี)
หัวหน้าโครงการวิจัยฯ
23 มีนาคม พ.ศ. 2559

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	1
ผู้วิจัย	2
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	3
บทนำ.....	4
บทคัดย่อ.....	7

การทดลองที่ 1 การศึกษาหายีนทนแล้งเพื่อเตรียมไว้สำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืชทนแล้ง

การทดลองที่ 1.1 การค้นหายีนและกลุ่มยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำ

การทดลองที่ 1.2 การศึกษาการแสดงออกของกลุ่มยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำในระดับอาร์เอ็นเอในข้าวโพดพันธุ์ทนแล้งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ

การทดลองที่ 1.3 การโคลนยีนที่ทนต่อสภาวะขาดน้ำในข้าวโพดพันธุ์ทนแล้ง

การทดลองที่ 2 การโคลนยีน Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H) จากอัญชันและพิทูเนีย

การทดลองที่ 3 การศึกษายีนและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์น้ำตาล

การทดลองที่ 3.1 การโคลนยีน Sucrose Synthase ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์น้ำตาลในอ้อย

การทดลองที่ 3.2 การถ่ายยีน Sucrose Synthase ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์น้ำตาลและการตรวจสอบการปรากฏของยีนในพืชต้นแบบ

การทดลองที่ 4 การศึกษาและยับยั้งการแสดงออกของยีน Deoxyhypusine Synthase (DHS) โดยใช้เทคนิค RNAi

การทดลองที่ 5 การโคลนยีนเรืองแสงจากเห็ดเรืองแสง

การทดลองที่ 6 การศึกษาและค้นหายีนที่ตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NSW3) โดยอาศัยเทคนิค PCR

บทสรุปและข้อเสนอแนะ.....	174
บรรณานุกรม.....	174

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยฉบับสมบูรณ์เรื่องการค้นหาและศึกษาหน้าที่ของยีนที่มีประโยชน์ทางการเกษตร สำเร็จได้ เนื่องจาก นักวิชาการภายใต้โครงการฯ ที่ปฏิบัติงานวิจัย ผู้อำนวยการกลุ่มเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร (กทก.) ผู้เชี่ยวชาญด้านเทคโนโลยีชีวภาพ คณะผู้เชี่ยว ชาญ ผู้จัดการโครงการวิจัย และผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ได้กรุณาช่วยเหลือให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะและข้อแนะนำ ความคิดเห็นและกำลังใจ

ขอขอบคุณนักวิจัยทุกท่านภายใต้โครงการวิจัยฯ ที่ให้ความร่วมมือในการให้ข้อมูล เพื่อใช้เป็นข้อมูลที่ทำให้รายงานโครงการการวิจัยฉบับสมบูรณ์สำเร็จลุล่วง

ท้ายสุดนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ นักวิจัยทุกท่านคนที่ช่วยส่งเสริมสนับสนุนและเป็นกำลังใจให้ผู้เขียนจัดทำรายงานโครงการการวิจัยฉบับสมบูรณ์เสร็จสมบูรณ์ในครั้งนี้

นายพยุงศักดิ์ รวยอารี

วันที่ 23 เดือนมีนาคม พ.ศ. 2559

ผู้วิจัย

1.	นายพยุงศักดิ์	รวยอารี	นักวิชาการเกษตรชำนาญการ
2.	นางสุภาวดี	ง้อเหรียญ	นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ
3.	นางสาวกุหลาบ	คงทอง	นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ
4.	นางภุมรินทร์	วณิชชนานันท์	นักวิชาการเกษตรชำนาญการ
5.	นางสาวอรุโณทัย	ซาววา	นักวิชาการเกษตรชำนาญการ
6.	นางสาวมัลลิกา	แก้ววิเศษ	นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ
7.	นางหทัยรัตน์	อุไรรงค์	ผู้เชี่ยวชาญด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

1. cDNA = complementary deoxynucleic acid
2. Total RNA = Total ribonucleic acid
3. RT-PCR = Reverse transcriptase polymerase chain reaction
4. DHS = Deoxyhypusine Synthase
5. DsRNA = double stranded RNA
6. F3' 5'H = Flavonoid 3',5' hydroxylase
7. IAA = Indole acetic acid
8. mg/l = milligram per litre
9. CRD = Completely Randomized Design
10. MS media = murashige and skoog media
11. NCBI = National Center for Biotechnology Information

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของโครงการวิจัย

ปัจจุบัน การศึกษาให้ได้มาซึ่งยีนที่มีประโยชน์ทางการเกษตร ส่วนใหญ่ล้วนมีสิทธิบัตรยีน หรือโลกกำลังประสบปัญหาภาวะโลกร้อน ภาวะภัยแล้ง เป็นต้น ดังนั้น การนำยีนที่มีประโยชน์มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะตามต้องการอาจมีปัญหาเรื่องการละเมิดสิทธิบัตรได้ อย่างไรก็ตาม จากการที่เทคโนโลยีชีวภาพมีความก้าวหน้าไปมากทั้งในด้านข้อมูลและเทคนิค ดังนั้น โครงการวิจัยการค้นหาและศึกษาหน้าที่ของยีนที่มีประโยชน์ทางการเกษตรนี้ จึงได้ทำการรวบรวมข้อมูลผลการวิจัยเกี่ยวกับ การพัฒนาสีดอกไม้เพื่ อเพิ่มมูลค่า การศึกษาหายีนเรืองแสง การปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีปริมาณน้ำตาลให้สูงขึ้น โดยอาศัยเทคนิคทั้งการโคลนยีนและการถ่ายฝากยีนนั้น มาใช้ในการตอบโจทย์ปัญหาของนักวิจัย เพื่อให้ได้มาซึ่งข้อมูลยีนที่เป็นประโยชน์มากยิ่งขึ้น สามารถนำยีนไปใช้ต่อยอดในเชิงวิจัยต่อไปได้

พืชมีการปรับตัวทางสรีระวิทยาให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เพื่อให้ตัวมันเองมีความอยู่รอดในสภาวะแวดล้อมนั้นๆ เช่น ขาดน้ำหรือแห้งแล้งเป็นต้น การปรับตัวของพืชให้มีการพัฒนาหรือให้เป็นไปตามปกติหรือคงทนอยู่ในสภาวะแวดล้อมดังกล่าวนั้น ต้องมีการแสดงอ อกของยีนบางชนิด ซึ่งอาจเป็นยีนเดียวหรือกลุ่มยีน (ยีนหลายๆ ชนิดพร้อมกันในสภาวะเดียวกัน) จึงจะทำให้พืชมีการดำรงอยู่ในสภาวะนั้นๆ ได้หรือเกิดความเสียหายน้อยที่สุด ที่ผ่านมานักวิจัยได้ศึกษาหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกในพืช เพื่อให้พืชเกิดการปรับตัวให้ คงทนอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี ในปัจจุบันข้อมูลยีนหรือกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกในสภาวะขาดน้ำหรือแห้งแล้งที่ได้จากค้นคว้าวิจัยมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้การนำข้อมูลที่ได้มาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะทนแล้งโดยอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพนั้นมีความเป็นไปได้มากขึ้น อีกทั้ง จากการศึกษาที่ผ่านมา มีข้อมูลที่แสดงให้เห็นชัดแล้วว่า อุณหภูมิของโลกมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกๆ ปี และพบว่าพืชมีการแสดงออกของยีนที่จำเพาะบางชนิด เพื่อที่จะตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมเช่นขาดน้ำหรื อแห้งแล้งได้ เทคโนโลยีชีวภาพจึงเป็นอีกหนทางหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้สามารถทนทานแล้งได้ ทั้งนี้ การศึกษาในเบื้องต้นเพื่อได้มาซึ่งยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมจึงมีความจำเป็นและเพื่อสามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางการเกษตรและพัฒนาต่อยอดงานวิจัยต่อไปได้ในอนาคต

การโคลนยีนลักษณะต่างๆ เช่น ยีนสี ยีนที่ต้านทานต่อโรค แมลง ยาปราบศัตรูพืช และสภาวะที่ไม่เหมาะสม เป็นงานวิจัยที่มีความสำคัญมาก โดยนำยีนที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีการถ่ายฝากยีน (Gene transfer) ไม่ว่าจะเป็นการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* หรือโดยการใช้เทคนิค RNAi (RNA interference) คือ กระบวนการในการควบคุมการแสดงออกของลักษณะทางพันธุกรรมอย่างหนึ่ง ซึ่งพบทั้งในพืช สัตว์ และมนุษย์ โดยอาศัยการทำงานของชิ้นส่วน double stranded RNA (dsRNA) ซึ่งเมื่อผ่านกระบวนการต่างๆ แล้ว จะมีผลไปยับยั้งการทำงานของ messenger RNA (mRNA) ทำให้ยีนนั้นๆ ถูกยับยั้งและไม่แสดงออกได้เข้าสู่พืชทำให้พืชมีคุณสมบัติพิเศษต่างๆ ที่ต้องการ วัตถุประสงค์ของการถ่ายยีนเข้าสู่พืช ประการแรกคือ เพื่อต้องการนำยีน

ที่ควบคุมลักษณะบางอย่างที่เป็นประโยชน์เข้าสู่โครโมโซมพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ หรือเพื่อปรับปรุงพันธุ์ให้เป็นพืชที่มีลักษณะดีตามความต้องการของเกษตรกรและผู้บริโภค ทั้ง พืชไร่ พืชสวน และไม้ดอกไม้ประดับ ประการที่สอง เพื่อศึกษาให้เกิดความเข้าใจในกลไก หรือการทำงานของยีน (Gene functions) หรือกระบวนการต่างๆ ในทางชีววิทยา (Biological process) โดยเมื่อถ่ายยีนเข้าสู่พืชแล้วและยีนดังกล่าวมีการแสดงออกในต้นพืช ก็จะสามารถอธิบายหรือแสดงให้เห็นถึงบทบาทของยีนและกระบวนการที่เกิดขึ้นในพืชได้ระดับหนึ่ง ทั้งนี้ รวมถึงการศึกษาในด้านปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชกับเชื้อโรคหรือจุลินทรีย์ดินด้วย

นอกจากนี้ การนำพืชที่มีความสำคัญ เช่น อ้อย ไม้ดอก มาใช้ในการวิจัยเพื่อศึกษาหายีนที่มีประโยชน์ เช่น Sucrose Synthase ที่เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครส และ Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์รงควัตถุกลุ่มฟลาโวนอยด์จากอัญชัน พิทูเนีย และแวววยุรา ซึ่งยีน นี้สามารถนำไปใช้ปรับปรุงสีของดอกไม้ให้มีความหลากหลายมากขึ้น รวมทั้ง Deoxyhypusine Synthase (DHS) ซึ่งเป็นเอนไซม์เริ่มต้นในการสร้าง hypusine ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพและส่งเสริมการตายของเซลล์ ซึ่งจะพบมากในช่วงการเสื่อมสภาพของพืช เมื่อมีปริมาณของ Deoxyhypusine Synthase เพิ่มขึ้นจะกระตุ้นให้พืชเกิดการแก่และทำให้เซลล์เสื่อมสภาพแล้วตายในที่สุด ดังนั้น การยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ Deoxyhypusine Synthase ในพืชจะช่วยยืดระยะการแก่ การหลุดร่วง หรือการเสื่อมสภาพของพืชได้ ทำให้พืชมีอายุยืน มีอายุการเก็บรักษาที่นานขึ้น อีกทั้ง ยังส่งผลให้ผลผลิตที่ได้มีคุณภาพเพิ่มขึ้นได้

นอกจากการนำพืชมาใช้ในการศึกษาหายีนที่มีประโยชน์ทางการเกษตรแล้ว การโคลนยีนจากเห็ดก็สามารถกระทำได้เช่นกัน ยกตัวอย่างเช่น ยีน GFP ซึ่งมีสีเขียวเมื่อผ่านแสงอุตราไวโอเล็ตและใช้ในการติดตามการแสดงออกของยีน ในประเทศไทยมีการพบสิ่งมีชีวิตเรืองแสงและจุลินทรีย์เรืองแสง เช่นหิ่งห้อย เห็ดเรืองแสง แบคทีเรียเรืองแสง แต่ที่มีรายงานการศึกษาคือในแบคทีเรียเรืองแสง *Vibrio cambelli* เห็ดเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะใกล้เคียงกับพืช ดังนั้น การสกัดยีนจากเห็ด จึงเป็นยีนที่น่าจะปลอดภัยต่อสิ่งมีชีวิตมากกว่ายีนที่สกัดได้จากเชื้อแบคทีเรีย เมื่อได้ยีนเรืองแสงจากเห็ดแล้ว มีความเป็นไปได้ว่าจะมีการนำยีนนี้มาใช้ประโยชน์ในทางการเกษตรต่อไป

2. วัตถุประสงค์

1.เพื่อค้นหาและศึกษาหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับสภาวะขาดน้ำในข้าวโพดโดยวิธีการโมเลกุลชีววิทยาและเพื่อนำยีนที่คาดว่าตอบสนองในสภาวะขาดน้ำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชชนิดอื่นด้วยวิธีการถ่ายฝากยีนหรือนำมาประยุกต์ใช้เป็นโมเลกุลเครื่องหมายเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืชต่อไป

2.เพื่อโคลนยีนที่เป็นประโยชน์ทางการเกษตร เช่น Sucrose Synthase ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์น้ำตาลในอ้อย ยีน Deoxyhypusine Synthase (DHS) ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพของพืชโดยใช้เทคนิค RNAi ยีนเรืองแสงจากเห็ดเรืองแสง และยีนสี Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H)

จากอัญชันและพิทูเนีย เพื่อนำยีนที่ได้ไปถ่ายฝากเข้าสู่พืชโมเดลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีคุณสมบัติตามต้องการต่อไป

3.สรุปและวิเคราะห์ผลที่ได้กับรายงานเปรียบเทียบกับงานวิจัยจากต่างประเทศเพื่อให้ได้ข้อมูลล่าสุดและเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชต่อไปในอนาคต

3.วิธีการวิจัยในแต่ละการทดลอง ประกอบด้วย วิธีการต่างๆ ดังต่อไปนี้

3.1 สืบค้นและวิเคราะห์ยีนจากฐานข้อมูล NCBI และออกแบบไพรเมอร์ บริเวณที่มีความเหมือนกันมากที่สุด เช่น สืบค้นและวิเคราะห์ยีนที่ทนต่อสภาวะขาดน้ำจากพืชในฐานข้อมูล NCBI สืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกี่ยวข้องกับยีน F3'5'H ออกแบบและสังเคราะห์ไพรเมอร์ เพื่อเพิ่มปริมาณยีน F3'5'H จากcDNA ดอกพิทูเนีย สืบค้น และวิเคราะห์ข้อมูลยีน Sucrose Synthase ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์น้ำตาล สืบค้น รวบรวมลำดับเบสของยีน Deoxyhypusine Synthase (DHS) จากพืชชนิดต่างๆ ใน NCBI การสร้าง การโคลนนิ่ง cDNA library และการถ่ายฝากยีนด้วยวิธีการอะโกรแบคทีเรียมทรานส์ฟอร์เมชั่น เป็นต้น

3.2การสกัดกรดนิวคลิอิกจากพืชหรือสิ่งที่สนใจโดยใช้วิธีการโมเลกุลชีววิทยาต่างๆ

3.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

3.3 การตรวจสอบยีนที่ได้รับการถ่ายฝากด้วยวิธี PCR

บทคัดย่อ

ปัจจุบัน ยีนที่มีประโยชน์ทางการเกษตร ต่างมีสิทธิบัตรยีน การนำยีนต่างๆเหล่านั้นมาใช้ให้เกิดประโยชน์ทางการเกษตรได้นั้น จำเป็นต้องได้รับการอนุญาตหรือได้รับความยินยอมจากเจ้าของสิทธิบัตรยีน ดังนั้น การศึกษา ค้นคว้า หายีนที่มีประโยชน์ใหม่ๆ และเพื่อนำมาใช้ต่อยอด จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการเกษตร โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษายีนที่มีประโยชน์ทางการเกษตรกับพืชต่างๆ งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ การศึกษาหายีนทนแล้งจากข้าว โพดทนแล้งในสภาวะขาดน้ำเพื่อพัฒนาพันธุ์พืชทนแล้งโดยการโคลนยีนและการสร้าง cDNA library การโคลนยีน *F3'5'H* จากดอกอัญชันและพิทูเนียสีน้ำเงิน และถ่ายฝากลงในยาสูบเพื่อพัฒนาพันธุ์พืชให้มีสีดอกที่ต้องการ การโคลนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์น้ำตาลในอ้อย สำหรับนำไปใช้ในการพัฒนาพันธุ์พืชให้มีศักยภาพในการผลิตน้ำตาลให้สูงขึ้น การโคลนยีนเรืองแสงจากเห็ดเรืองแสง รวมทั้ง การนำเทคนิคการถ่ายฝากยีนมาใช้เพื่อศึกษาการถ่ายฝากยีน Sucrose Synthase เพื่อปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีปริมาณสูงขึ้นและการนำเทคนิค RNAi เพื่อศึกษาการยับยั้งการแสดงออกของยีน *Deoxyhypusine Synthase* (*DHS*) ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพของเบญจมาศในพืชต้นแบบ

จากผลการศึกษาพบว่า โครงการวิจัยนี้ได้ผลผลิตโครงการเป็นยีนทนแล้งจากข้าวโพดทนแล้ง เช่น ยีน DREB, dhn1, Dr4, SINA และ SINAT3 เป็นต้น ยีน *F3'5'H* จากดอกอัญชันและพิทูเนีย ยีน Sucrose Synthase ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์น้ำตาล การถ่ายฝากยีน Sucrose Synthase และการนำเทคนิค RNAi เพื่อศึกษาการยับยั้งการแสดงออกของยีน *Deoxyhypusine Synthase* (*DHS*) ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพของเบญจมาศในพืชต้นแบบ ส่วนยีนเรืองแสงไม่สามารถโคลนได้ ได้เพียงแต่ชิ้นส่วนของโปรตีนที่ยังไม่สามารถจำแนกได้ คาดว่ายีนเรืองแสงของเห็ดเรืองแสงน่าจะเกิดจากการทำปฏิกิริยาของยีนหลายยีนด้วยกัน ดังนั้นการหายีนเรืองแสงเดี่ยวๆ จึงอาจมีความยุ่งยากในการที่จะสามารถหาได้

ดังนั้น การวิจัยภายใต้โครงการวิจัยนี้ สามารถเพิ่มข้อมูลเชิงวิทยาศาสตร์ได้ ในแง่ของยีนที่มีประโยชน์ทางการเกษตร สามารถนำไปใช้กับพืชชนิดอื่นๆหรือตอบโจทย์ ปัญหาทางการเกษตรได้อีกหากนำไปประยุกต์ใช้

Abstract

Presently, most of the genes identified useful in agriculture are gene patented. The process for utilizing of those genes used in agriculture must be permitted by ownership rights. Thus, gene discovery for new useful genes in agriculture will be very important and shall then be used or applied for further research. This research project aims to study of those new genes beneficial to agriculture. The related research are corresponded with the study of plant genes under drought stress for plant genetic improvements using cDNA library cloning approach, gene cloning and genetic transformation method, cloning and genetic transformation of *F3'5'H* genes from Butterfly Pea and Petunia, cloning of Sucrose synthase gene for sugar metabolism genetic improvement, and luminescence mushroom gene cloning. Also provided with the gene suppression methodology of *Deoxyhypusine Synthase* (*DHS*) aims to suppress DHS gene related to senescence of chrysanthemum in plant model, tobacco.

The results revealed that the research project output are drought related genes from drought tolerance corn such as DREB, Dhn1, Dr4, SINA และ SINAT3, *F3'5'H* gene from and butterfly pea and petunia, Sucrose synthase gene cloning and transformation for sugar metabolism, and gene *DHS* suppression for chrysanthemum in model plant, tobacco. For luminescence mushroom gene, the results showed the partial unidentified gene. This could be from the fact that luminescence mushroom gene functions are from the different ones.

Finally the results of this study might provide the novel genes beneficial for various aspects of Thailand agricultural researches in the future.

การทดลองที่ 1 การศึกษาหายีนส์ทนแล้งเพื่อเตรียมไว้สำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืชทนแล้ง

การทดลองที่ 1.1 การค้นหายีนและกลุ่มยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำ

Discovery of drought tolerant genes in Maize for the drought tolerant genetic improvement

หัวหน้าการทดลอง : นายพยุงศักดิ์ รวยอารี

ผู้ร่วมงาน : นางสุภาวดี ง้อเหรียญ

: นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์

หน่วยงานต้นสังกัด : สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

คำสำคัญ: ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสมพันธุ์นครสวรรค์ 3, In Fusion cDNA Library construction

บทคัดย่อ : ในประเทศไทย ข้าวโพดนับเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งที่ทำรายได้ให้กับประเทศเป็นอย่างมากรวมทั้งข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ทนแล้งพันธุ์นครสวรรค์ 3 ที่พัฒนาโดยนักวิชาการกรมวิชาการเกษตร เมื่อพืชอยู่ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ขาดน้ำ พืชมีกลไกการปรับตัวให้สามารถคงทนอยู่ในสภาวะแวดล้อมนั้นได้ โดยให้มีการแสดงออกของยีนหรือกลุ่มยีนส์เพื่อตอบสนองต่อสภาวะดังกล่าว ซึ่งอาจเป็นยีนเดียวหรือหลายๆยีนพร้อมกันก็ได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการปรากฏของยีนทนแล้งในข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 โดยวิธีการ LD PCR และโดยวิธีการสร้าง In Fusion Smarter cDNA Library จากใบข้าวโพดอายุ 54 วัน ในสภาวะขาดน้ำนาน 1 เดือน ศึกษาในระหว่างเดือนตุลาคม 2554 – กันยายน 2556 ทำการออกแบบไพรเมอร์จากยีนทนแล้งจากฐานข้อมูลชีวภาพสากลและทำปฏิกิริยา PCR เพื่อให้ได้แอมพลิคอนยีนและสร้างซีดีเอ็นเอโคลนจากซีดีเอ็นเอไลบรารี่ (cDNA Library) หาลำดับเบสและนำลำดับเบสไปเทียบกับฐานข้อมูลชีวภาพสากล ผลการทดลองในเบื้องต้นพบยีนทนแล้งที่ได้มีการศึกษาจากพืชชนิดต่างๆปรากฏในจีโนมข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์นครสวรรค์ 3 จำนวน 5 ชนิดยีน ส่วนยีนที่ได้จากโคลน cDNA จะเป็นตัวบ่งบอกการแสดงออกของยีนในระยะขาดน้ำได้ การศึกษาหน้าที่ของยีนต่างๆ ในระดับอาร์เอ็นเอต่อไปจะเป็นประโยชน์อย่างดียิ่งในการนำมาใช้เป็นข้อมูลในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีคุณลักษณะทนแล้งต่อไป

Abstract : Maize is considered as one of the most important crops in Thailand including. Nakhon Sawan 3, a drought tolerant hybrid Maize (*Zea Mays* L.). developed by Nakhon Sawan Field Crops Research Centre. Under drought

stress, plant has defense mechanisms against abiotic stresss such as water depletion in order to be survival in such environments. These include the expression of a gene or a group of genes in a certain period amount of times. The objective of this study is to observe the presence of drought tolerant genes in Nakhon Sawan 3 by LD PCR-In Fusion Smarter cDNA construction from 54 days old maize leaves after 30 days water depletion and PCR cloning of drought tolerant from database during October 2011 to September 2013. The primary screenings of such methods were matched to 5 drought tolerant genes compared to the database. The further study of expression of genes and putative functions of those genes in water stress condition might be useful as plant genetic improvement for drought tolerant characteristics.

Keywords: Hybrid Maize Nakhon Sawan 3, In Fusion cDNA Library construction

บทนำ

: พืชมีการปรับตัวทางสรีระวิทยาให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เพื่อให้ตัวมันเองมีความอยู่รอดในสภาวะแวดล้อมนั้นๆ เช่น ขาดน้ำหรือแห้งแล้ง เป็นต้น การปรับตัวของพืชให้มีการพัฒนาหรือให้เป็นไปตามปกติหรือคงทนอยู่ในสภาวะแวดล้อมดังกล่าวนั้น พืชต้องมีการแสดงออกของยีนบางชนิด ซึ่งอาจเป็นยีนเดียวหรือกลุ่มยีนส์ (ยีนหลายๆ ชนิดแสดงออกพร้อมกันในสภาวะแวดล้อมเดียวกัน นอกเหนือจากยีนที่แสดงออกทั่วไปทุกสภาวะ) จึงจะทำให้พืชมีการดำรงอยู่ในสภาวะนั้นๆ ได้หรือเกิดความเสียหายน้อยที่สุด

ที่ผ่านมา นักวิจัยได้ศึกษาหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกในพืช เพื่อให้พืชเกิดการปรับตัวให้คงทนอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี ในปัจจุบัน ข้อมูลยีนหรือกลุ่มยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกในสภาวะขาดน้ำหรือแห้งแล้งที่ได้จากค้นคว้าวิจัยมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้การนำข้อมูลที่ได้มาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะทนแล้งโดยอาศัยวิธีการเทคโนโลยีชีวภาพนั้นมีความเป็นไปได้มากขึ้น อีกทั้ง จากการศึกษาที่ผ่านมา มีข้อมูลที่แสดงให้เห็นชัดแล้วว่า อุณหภูมิของโลกมีแนวโน้ มเพิ่มสูงขึ้นทุกๆ ปี และพบว่าพืชมีการแสดงออกของยีนที่จำเพาะบางชนิด เพื่อที่จะตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมเช่นขาดน้ำหรือแห้งแล้งได้

ข้าวโพด (*Zea mays* Linn.) เป็นธัญพืชที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลกและของคนไทยที่นิยมรับประทานกันมาก นอกเหนือจากนำมาใช้เป็นอา หารที่รับประทานทั่วไปแล้ว พันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์หรือพันธุ์ข้าวโพดไร่ นั้น นับว่า เป็นพืชอาหารที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์เป็นอย่างดี ที่สามารถนำมาใช้เป็นธัญพืชเลี้ยงสัตว์ให้เกิดการส่งออกในรูปเนื้อสัตว์ ส่งผลให้มีมูลค่าเพิ่มมากกว่าการส่งออกในรูปของเมล็ดข้าวโพดโดยตรง ทำให้ข้าวโพดเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่ง ทว่า ความต้องการใช้ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ในประเทศมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นมากหลังจากมีการขยายอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2535 ส่งผลให้การส่งออกเนื้อสัตว์ลดลงตามลำดับ ปัจจุบั น การผลิตข้าวโพดเลี้ยงสัตว์มีความต้องการเพิ่มขึ้นเทียบกับปริมาณความต้องการที่ต้องการใช้อยู่ภายในประเทศและมีปริมาณไม่แน่นอนเนื่องจากการผลิตขึ้นกับสภาพดินฟ้าอากาศ ทำให้มีความเสี่ยงต่อความเสียหายจากความแห้งแล้งมากและพื้นที่ปลูกต้องแข่งขันกับพืชเศรษฐกิจอื่นๆ ที่ให้ผลตอบแทนที่ดีกว่า โดยในระยะ 4-5 ปี ที่ผ่านมาประเทศไทยจำเป็นต้องนำเข้าเพื่อให้เพียงพอกับความต้องการใช้ภายใน ทั้ง ๆ ที่ในอดีต ประเทศไทยเคยเป็นประเทศผู้ส่งออกรายใหญ่รายหนึ่งของโลกและมีศักยภาพด้านการผลิตการตลาดที่สามารถแข่งขันกับต่างประเทศได้ ดังนั้น ประเทศไทยจึงควรเร่งรัดการผลิตข้าวโพดภายในประเทศให้เพิ่มขึ้นทันกับความต้องการใช้และมีเหลือส่งออก (เข้าถึงข้อมูลทางระบบอินเทอร์เนตเรื่อง “ข้าวโพด” http://www.doae.go.th/plant/corn.htm)

อย่างไรก็ตามเมื่อไม่นานนี้ พันธุ์ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่มีลักษณะทนต่อความแล้ง (สภาวะขาดน้ำ) และให้ปริมาณผลผลิตสูงถึง 1,147 กิโลกรัมต่อไร่ (1,147 kg/rai) ได้รับการพัฒนาโดยนักวิชาการปรับปรุงพันธุ์พืชจากกรมวิชาการเกษตรเป็นพันธุ์ใหม่ที่มีชื่อว่า “ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3” (เข้าถึงข้อมูลทางระบบอินเทอร์เนต http://www.foodresources.org/news/view.php?id=2646) โดยกรมวิชาการเกษตรคาดว่าภายในปีพ.ศ. 2552 สามารถผลิตเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดลูกผสมพันธุ์นครสรรค์ 3 ได้ประมาณ 350 ตัน และนำไปส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกได้ประมาณ 10,000 ไร่ และสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรได้เป็นอย่างดี

ในปัจจุบัน ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับยีนส์ที่บ่งบอกถึงลักษณะหรือแสดงออกในสภาวะทนแล้งในพืชชนิดต่างๆ เช่น ยีนดีไฮดริน (dehydrins) (Labhilili et al., 1995; Cellier 1998; Giordani 1999), ไซโคลฟิลิน (cyclophilins) (Gasser et al., 1990), dehrydration responsive element binding (DREB) protein (Skinner et al., 2005; Latini, et al., 2007) , dehydration responsive factor 1 (DRF1) (Latini et al., 2013), เตรฮาโลส (trehalose) (Djilianov et al., 2005) และเบตาอีนอัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (betaine aldehyde dehydrogenase) (Iba, 2002; Djilianov et al., 2005) เป็นต้น รวมทั้ง ยีนโปรโมเตอร์ที่แสดงออกอย่างสูงในสภาวะขาดน้ำ (Yi et al., 2010) ทว่า ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทนแล้งหรือทนต่อสภาวะขาดน้ำดังกล่าวในข้าวโพดพันธุ์ทนแล้งนครสวรรค์ 3 ของไทย

ในประเทศไทย ข้าวโพดนับเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งที่ทำรายได้ให้กับประเทศเป็นอย่างมากและพบข้าวโพดพันธุ์ทนแล้งในประเทศอีกด้วย นับเป็นฐานพัน ธุกรรมในเชิงวิจัยได้เป็นอย่างดีรวมทั้งข้าวโพด ซึ่งเป็นพืชที่มีประโยชน์ทั้งด้านบริโภคและด้านงานวิจัย อีกทั้งจีโนมของข้าวโพดก็ได้ผ่านการศึกษาโดยสมบูรณ์ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึง มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตยีนหรือกลุ่มยีนส์ที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำจากข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์นครสวรรค์ 3 โดยอาศัยวิธีการทางชีววิทยาโมเลกุลจากซีดีเอ็นเอโคลนของข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์ทนแล้ง “นครสวรรค์ 3” เพื่อนำข้อมูลที่ได้นั้นมาต่อยอดหรือประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีคุณลักษณะทนแล้งได้ต่อไป

1. วิธีดำเนินการ :

- อุปกรณ์

1. ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์นครสวรรค์ 3 (ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์, กรมวิชาการเกษตร)
2. ถุงพลาสติกสีดำขนาด 10" x 10" x 10" (กว้าง x ยาว x ลึก)
3. ดินและปุ๋ยตราลำดวน
4. ไนโตรเจนเหลวและโกร่งสำหรับใช้บดใบข้าวโพดตัวอย่าง
5. ชุดสกัด RNA (Trizol Reagent®, Invitrogen, USA)
6. เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge; Labnet/Spectrafuge16M, National, USA)
7. เครื่องดูดสารปริมาณน้อย (ไมโครไปเปต) ขนาด 10, 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
8. อ่างน้ำปรับอุณหภูมิอัตโนมัติ 65°C
9. ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ 4°C (LAWCHAIN LC203LD ยี่ห้อ CHILLED รุ่น PT-30 Series)
10. ตู้แช่แข็ง -20°C (Thermo Scientific Puffer Hubbard Refrigerator)
11. ตู้แช่แข็ง -80°C (SANYO ULTRA LOW FREEZER, SANY0, USA)
12. 10x TAE Buffer
13. GelStar Solution (Lonza, Rockland, ME, USA)
14. เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA (Gene Amp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA)
15. สารละลาย GTE (4M Guanidine Isothiocyanate, 25 mM NaCitrate pH 7.0, 0.5% Lauryl Sarcosine และ 0.1 M Beta-Mercaptoethanol)

16. เครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้าแนวนอนพร้อม Power supply
17. เครื่องส่องดูแถบสารพันธุกรรมภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต (UV) GelDoc Transluminator (BIORAD, USA)
18. ชุดถ่ายภาพพร้อมเครื่องมือวิเคราะห์สารพันธุกรรม (GELDOC BIORAD, USA)
19. In-Fusion® SMARTer® Directional cDNA Library Construction Kit. (Clontech, USA/Canada, Cat No. 634933)
20. CloneMiner™ II cDNA Library Construction Kit. (Clonetech, USA, Cat No. A11180)
21. ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (Plasmid DNA) (QIAprep spin miniprep kit, Qiagen, Valencia, USA)
22. เครื่องหาลำดับเบสแบบอัตโนมัติ ABI PRISM® 377 DNA Sequencer (Perkin-Elmer, CA, USA)
23. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
24. ช้อนตักสาร กระดาษชั่งสาร และเครื่องชั่งสาร

- <u>วิธีการที่ 1</u> การสร้าง In-Fusion cDNA Library จากใบข้าวโพดด้วยวิธีการ In-Fusion (Clonetech, USA)

แบ่งขั้นตอนการศึกษาออกเป็น 7 ขั้นตอน ดังนี้

1. เตรียมพืชทดลอง โดยการปลูกข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 ในถุงพลาสติกสีดำขนาด 10 นิ้ว x 10 นิ้ว x 10 นิ้ว ที่ประกอบด้วยดินตราลำดวน ประมาณ 5 เมล็ดต่อถุง ในโรงเรือน ให้น้ำจนเมล็ดงอกมีอายุ 45 วัน จากนั้น งดให้น้ำเป็นเวลา 7 วัน และ 14 วัน
2. สกัด RNA จากใบข้าวโพดและตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ RNA ที่สกัดได้โดยวิธีเจลอิเลคโตรฟอเรซิส
3. สังเคราะห์ cDNA สายแรกโดย LD-PCR
4. สังเคราะห์ cDNA สายที่สองโดยใช้เอ็นไซม์ Advantage 2 Polymerase
5. การทำ cDNA ให้บริสุทธิ์และแยกขนาด cDNA ด้วยการใช้คอลัมน์
6. การโคลน cDNA เข้าสู่ pSMART2IFD Linearized Vector ด้วยวิธีการ In-Fusion
7. การทำการถ่ายฝาก cDNA เข้าสู่ *E. coli* competent cell, การประเมินและขยายปริมาณโคโลนีจาก cDNA ที่ได้ (Titration and Amplications) และการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (plasmid DNA isolation) จากโคโลนีแบคทีเรียโดยวิธี Alkaline lysis (Birnboim and Doly, 1979; Birnboim, 1983) ตามคำแนะนำจากบริษัทคู่มือผู้ผลิต

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมพืชทดลอง

ปลูกเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์นครสวรรค์ 3 ในถุงพลาสติกดำขนาด 10 นิ้ว x 10 นิ้ว 10 นิ้วที่ใส่ดินและปุ๋ยไว้เรียบร้อยแล้ว ให้น้ำทุกวันเป็นเวลา 14 วัน ก่อนงดให้น้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงเก็บใบเพื่อสกัดสารพันธุกรรม (Total RNA) ส่วน control plant ให้น้ำตามปกติ

ขั้นตอนที่ 2 การสกัดสารพันธุกรรม Total RNA จากใบข้าวโพดตัวอย่าง

2.1 ตัดใบข้าวโพดตัวอย่างมาเก็บไว้ที่ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ -80 °C ก่อนสกัดด้วยสาร TRIzol® Reagent 2.2 ชั่งน้ำหนักใบพืชตัวอย่างละประมาณ 100 มิลลิกรัม และเติมสาร TRIzol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บดตัวอย่างใบให้ละเอียดโดยการใช้โกร่งและในสภาพไนโตรเจนเหลว ตักตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หรือในหลอดโพลิโพรพิลีนขนาด 15 มิลลิลิตร (Greiner Bio-one Inc, USA)

2.3 บ่มสารละลายที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที

2.4 เติมสารละลายคลอโรฟอร์ม 200 มิลลิลิตร เขย่าหลอดให้ทั่ว นาน 15 วินาที และบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 2 – 3 นาที

2.5 ปั่นหลอดที่อุณหภูมิ 4°C ที่ความเร็ว 12,000 g นาน 15 นาที ดูดสารละลายใส (supernatant) ลงในหลอดใหม่ และเหวี่ยงหลอดด้วยความเร็วสูงซ้ำอีกครั้งนาน 5 นาที ที่ 10,000 rpm ดูดสารละลายใสลงในหลอดใหม่

2.4 ตกตะกอน RNA ด้วยการเติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 100 ไมโครลิตร (สำหรับหลอดขนาดเล็ก)
และ 1 มิลลิลิตร (สำหรับหลอดขนาดใหญ่) ผสมให้เข้ากัน เหวี่ยงหลอดด้วยความเร็วสูงนาน 15 นาที ที่ความเร็ว 5,000 g ใช้ไปเปตดูดสารละลายใสทิ้งไป ล้าง RNA ที่ได้ด้วย 70% เอทานอล จากนั้นดูดเอทานอลทิ้งไปปั่นเหวี่ยงหลอดซ้ำอีกครั้ง ดูดเอทานอลที่เหลือออกซ้ำอีกครั้งด้วยไปเปต

2.5 เติมบัฟเฟอร์ GTE ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ละลาย RNA ให้เข้ากัน เก็บรักษา RNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C (ระยะสั้น และที่ -80°C ในระยะยาว)

2.6 วิเคราะห์ RNA ที่สกัดได้โดยนำมาแยกผ่านเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel electrophoresis) ขนาด 80 โวลต์ นาน 30 – 45 นาที โดยใช้ 1.2 เปอร์เซ็นต์ Agarose Gel เป็นตัวกลาง จากนั้นนำ Agarose Gel มาย้อมด้วยสาร Ethidium bromine นาน 1 ถึง 2 นาที ล้างเจลด้วยน้ำกลั่นนานประมาณ 1 นาที และบันทึกภาพด้วยเครื่องส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง Ultraviolet (Geldoc transluminator) วัดปริมาณและคุณภาพของปริมาณ RNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) เก็บรักษา RNA ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -80°C (ในระยะยาว)

<u>ขั้นตอนที่ 3</u> วิธีการสังเคราะห์สาย cDNA (first-strand cDNA synthesis)

1. ในแต่ละตัวอย่างปฏิกิริยาในหนึ่งหลอด ประกอบด้วยองค์ประกอบดังต่อไปนี้

1. RNA ตัวอย่าง (50 ng – 1 µg)	1-3.5	ไมโครลิตร
2. CDS A (12 µM)	1	ไมโครลิตร
3. dH_2O	x	ไมโครลิตร
รวมปริมาตร	4.5	ไมโครลิตร

สำหรับปฏิกิริยาควบคุม (positive control) เติม 1 ไมโครลิตรของ Total RNA จากตับหนู

2. ผสมให้เข้ากันและปั่นหลอดเบาๆ ในเครื่องปั่นเหวี่ยง

บ่มหลอดที่อุณหภูมิ 72°C ในเครื่อง Thermocycler นาน 3 นาที จากนั้นที่อุณหภูมิห้อง (ถึง 42 °C) นาน 2 นาที

3. เตรียม master mix ที่อุณหภูมิห้องด้วยการเติมสารละลายต่อไปนี้ ตามลำดับ

1. 5x First-strand buffer	2	ไมโครลิตร
2. DTT (100 mM)	0.25	ไมโครลิตร
3. dNTP Mix (10 mM)	1	ไมโครลิตร
4. Oligonucleotide (12 µM)	1	ไมโครลิตร
5. RNase Inhibitor	0.25	ไมโครลิตร
6. Reverse Transcriptase (100U)	1	ไมโครลิตร
รวมปริมาตร	5.5	ไมโครลิตร

4. เติม master mix (5.5 ไมโครลิตร) จากข้อ 4 ลงในแต่ละหลอดปฏิกิริยา ผสมให้เข้ากัน ปั่นเบาๆ
5. บ่มหลอดที่ 42°C นาน 90 นาที
6. บ่มหลอดให้ร้อนที่อุณหภูมิ 68 °C นาน 10 นาที เพื่อขจัด cDNA สายแรก
7. เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่ -20 °C

<u>ขั้นตอนที่ 4</u> การสังเคราะห์สาย cDNA สายสอง (Second-strand cDNA synthesis) โดย LD-PCR ด้วยการใช้เอ็นไซม์ Advantage 2 Polymerase

1. ทำเครื่อง Thermocycler ให้ร้อน ที่ 95 °C (preheated)
2. เตรียมปฏิกิริยา PCR สองหลอดปฏิกิริยา ด้วยการรวมสารละลายดังต่อไปนี้

cDNA สายแรก	2 ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	80 ไมโครลิตร

10X Advantage 2 PCR buffer	10 ไมโครลิตร
50X dNTP Mix (10 mM)	2 ไมโครลิตร
5’ PCR primer (10 µM)	2 ไมโครลิตร
SMARTer PCR primer (12 µM)	2 ไมโครลิตร
50X Advantage 2 Polymerase Mix	2 ไมโครลิตร
รวมปริมาตร	100 ไมโครลิตร

3. ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่า (vortexer) และปั่นหลอดเบาๆในเครื่องเหวี่ยงปั่น
4. นำหลอดมาใส่ในเครื่อง Thermocycler ที่ตั้งความร้อนที่ 95°C
5. ทำปฏิกิริยา PCR ดังต่อไปนี้

95 °C	1 นาที
จำนวนรอบ (ปรับตามผลที่ได้)	x
95 °C	15 วินาที
65 °C	30 วินาที
68 °C	6 นาที

จากนั้น ปรับตามสภาพปฏิกิริยา (PCR conditions) จนกระทั่งได้ PCR products

6. นำ 5 ไมโครลิตรที่ได้จากปฏิกิริยา PCR มาผ่านเครื่องแยกด้วยกระแสไฟฟ้า เทียบกับ 1kb DNA ladder บน 1.2% อะกาโลสเจล ใน TAE/TBE บัฟเฟอร์ ก่อนย้อมด้วย GelStar
7. แบ่งดีเอ็นเอหลอดละ 85 ไมโครลิตร เพื่อทำการแยกด้วยคอลัมน์และเก็บรักษาดีเอ็นเอที่เหลือไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

<u>ขั้นตอนที่ 5</u> การทำ cDNA ให้บริสุทธิ์ และ แยก cDNA ด้วยคอลัมน์

1. เตรียมคอลัมน์ (ดังอธิบายไว้ในคู่มือ) โดยการเขย่าคอลัมน์ไปมาเบาๆ เพื่อผสมเรซิน
2. ติดคอลัมน์เข้ากับขาตั้งที่ยึด (stand)
3. ดูดบัฟเฟอร์ลงบนคอลัมน์จนกระทั่งสังเกตเห็นเม็ดเจล (gel bed)
4. ปล่อยให้บัฟเฟอร์ไหลออกมา ค่อยเติมบัฟเฟอร์ไปให้ถึงส่วนบนสุดของคอลัมน์
5. หยด 85 ไมโครลิตร ของผลผลิต PCR (PCR products) ที่ได้ลงบนคอลัมน์
6. เก็บบัฟเฟอร์ที่ไหลออกมาทีละหยด (ประมาณ 16 หยด)
7. รวม cDNA ที่ได้ ประมาณ 4-5 หยด และตกตะกอนด้วยสารละลายต่อไปนี้

1/10 Sodium acetate	(3M; pH 4.8)
Glycogen	1.3 ไมโครลิตร
2.5 ปริมาตร 95% ethanol	(-20°C)

ขั้นตอนที่ 6 การโคลน cDNA เข้าสู่แบคทีเรียเวคเตอร์ pSMART2IFD Linearized Vector

1. เตรียมปฏิกิริยาโคลนนิ่งตามคำแนะนำจากคู่มือบริษัทผู้ผลิต (Clontech Laboratories, Takara, Japan)
2. ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากันเบาๆ และเหวี่ยงหลอดโดยใช้เวลาเล็กน้อยในเครื่องเหวี่ยงปั่น
3. บ่มปฏิกิริยานาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 50°C
4. เติม TE และ QuickClean Resin ปริมาตร 90 ไมโครลิตรและ 10ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงในแต่ละปฏิกิริยา เขย่าให้เข้ากันนาน 1 นาที จึงเหวี่ยงปั่นหลอดและดูดสารละลายใสลงในหลอดใหม่
5. เติมไกลโคลเจนปริมาตร 1.2 ไมโครลิตรในแต่ละปฏิกิริยา ผสมให้เข้ากัน ก่อนเติม 100% ปริมาตร 280 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าเบาๆ
6. วางหลอดลงในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70°C นานข้ามคืน
7. เหวี่ยงปั่นหลอดทดลองที่ความเร็ว 14,000 rpm นาน 20 นาที และดูดเอาเอทานอลออก
8. ตากเพลเลตให้แห้งในตู้บ่มเชื้อก่อนละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 10 ไมโครลิตร

ขั้นตอนที่ 7 เตรียมปฏิกิริยาในขั้นตอนถ่ายฝากเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (Recombinant plasmid transformation) ขั้นตอนการไตเตรต (Plasmid library titration) และขั้นตอนการเพิ่มจำนวนไลบรารี่ (Library amplification) ตามคำแนะนำจากคู่มือผู้ผลิต

วิธีการที่ 2 การสร้าง cDNA ไลบรารี่จากใบข้าวโพดโดยไม่ใช้เทคนิคการโคลนด้วย Restriction enzyme (CloneMinerII^{TM} cDNA, Clonetech, USA)

ขั้นตอนที่ 1

1. เติมไพรเมอร์ Biotin-*att*B2(Oligo(dT) ความเข้มข้น 30 pmol/µl (priming reaction) ลงในตัวอย่าง RNA ที่ปรับความเข้มข้นไว้แล้ว
2. ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากันโดยการไปเปตและปั่นเหวี่ยงนาน 2 วินาที และวางบนน้ำแข็งก่อนการใช้ในขั้นตอนถัดไป

3. บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที ก่อนปล่อยตัวอย่างให้เย็นที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 15-30 นาที
4. เติมสารต่างๆ ต่อไปนี้ลงในหลอดใหม่ ตามปริมาตรดังต่อไปนี้

สาร	นาโน	มาตรฐาน
5x First-strand buffer	2 µl	4 µl
0.1M DTT	1 µl	2 µl
10mM (dNTPs) แต่ละชนิด	0.5 µl	1 µl

5. ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากันโดยการไปเปตขึ้นลงเบาๆ 2 วินาที ก่อนวางลงบนน้ำแข็ง
6. เติมสารในขั้นตอนที่ 5 ลงในหลอดปฏิกิริยาที่เติมไพรเมอร์ที่อุณหภูมิลดลงที่ 45 องศาเซลเซียส (ขั้นตอนที่ 1) ตามปริมาตรที่ปรับให้เหมาะสม
7. บ่มหลอดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที
8. บ่มหลอดในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมก่อนเติมเอ็นไซม์ SuperScriptIII® RT ตามคำแนะนำในคู่มือผู้ผลิต
9. ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากันเบาๆ อย่าให้เกิดฟอง
10. ตั้งปฏิกิริยา PCR ตามโปรแกรมดังต่อไปนี้

45°C	20 นาที
50°C	20 นาที
55°C	20 นาที

<u>ขั้นตอนที่ 2</u> การสังเคราะห์ cDNA สายสอง

1. วาง cDNA สายแรกลงบนน้ำแข็ง และเติมสารต่างๆ ดังต่อไปนี้ลงในหลอดทดลอง

สาร	นาโน	มาตรฐาน
DEPC-treated water	45.5 µl	90 µl
5x second strand buffer	15 µl	30 µl
10 mM dNTPs แต่ละชนิด	1.5 µl	3 µl

สาร	นาโน	มาตรฐาน
E. coli DNA ligase (10U/µl)	0.5 µl	1 µl
E. coli polymerase (10U/µl)	2 µl	4 µl
E. coli RNaseH (2U/µl)	0.5 µl	1 µl

2. ผสมปฏิกิริยาเบาๆ ให้เข้ากันและเหวี่ยงปั่นหลอดนาน 2 วินาที
3. บ่มปฏิกิริยาที่อุฯหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง
4. เติมเอ็นไซม์ T4 DNA polymerase เพื่อสร้าง cDNA ปลายทู่ (blunt-ended)
5. บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 16°C นาน 5 นาที
6. เติม 0.5M EDTA pH 8.0 เพื่อหยุดปฏิกิริยา

<u>ขั้นตอนที่ 3</u> การสกัดด้วย phenol:chloroform:isoamylalcohol

1. เติม phenol:chloroform:isoamylalcohol และเขย่าด้วยมือให้ทั่วนาน 30 วินาที โดยประมาณ
2. ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm นาน 5 นาที และดูดสารละลายส่วนบนลงในหลอดใหม่ทันที
3. ตกตะกอนด้วยเอทานอลด้วยการเติมสารต่างๆ ดังต่อไปนี้

สาร	นาโน	มาตรฐาน
ไกลโคเจน	80 µl	160 µl
7.5M แอมโมเนียมอะซิเตท	40 µl	80 µl
100% เอทานอล	300 µl	600µl

4. วางหลอดในตู้ลบ 80 องศาเซลเซียส 10 นาที ก่อนปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 rpm (อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) นาน 30 นาที
5. ทำหลอด cDNA ให้แห้งโดยการวางหลอดที่อุณหภูมิห้องนาน 2-3 นาที
6. ละลาย cDNA โดยการเติม DEPC-water 11-22 µl
7. ปั่นเหวี่ยงหลอดนาน 2 วินาที ก่อนวางลงบนน้ำแข็ง

<u>ขั้นตอนที่ 4</u> การเชื่อมต่อสาร cDNA กับ *att*B1 adapter (Ligation)

1. นำ cDNA สายคู่ที่ได้จากขั้นตอนที่ 3 มาวางลงบนน้ำแข็ง ก่อนเติมด้วยสารต่างๆ ดังต่อไปนี้

สาร	นาโน	มาตรฐาน
5x adapter buffer	5 µl	10 µl
AttB1 Adapter	2 µl	4 µl
0.1M DTT	4 µl	8 µl
T4 DNA ligase	3 µl	6 µl
5x adapter buffer	5 µl	10 µl
AttB1 Adapter	2 µl	4 µl
0.1M DTT	4 µl	8 µl
T4 DNA ligase	3 µl	6 µl

2. ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากันเบาๆ โดยการไปเปต และบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 16-24 ชั่วโมง

<u>ขั้นตอนที่ 5</u> การแยกขนาด cDNA ด้วยการใช้คอลัมน์ Size Fractionation Column

1. เตรียมคอลัมน์โดยการวางหรือเสียบคอลัมน์ที่ให้มาโดยบริษัทผู้ผลิตลงบนขาตั้ง (stand)
2. เปิดฝาด้านบน ตามด้วยฝาด้านล่าง และเติมสารละลาย TEN 0.8 มิลลิลิตรเพื่อชะคอลัมน์
3. ชะคอลัมน์ซ้ำอีก 3 ครั้ง โดยการเติม TEN ครั้งละ 0.8 มิลลิลิตร
4. เตรียมหลอดสะอาดจำนวน 3 หลอด ให้หมายเลขบนฝา 1, 2 และ 3 วางหลอดบนที่วางหลอด (rack)
5. เติม 100 µl สารละลาย TEN ลงใน cDNA ปริมาตร 50 µl ผสมให้เข้ากันเบาๆ และเหวี่ยงปั่น นาน 2 วินาที
6. หยอดสารละลายทั้งหมดลงในคอลัมน์ และปล่อยให้หยดลงมาลงในหลอดที่ 1
7. เติมสารละลาย TEN อีกครั้งที่ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บหลอดที่ 1 ไว้

8. เลื่อนหลอดที่ 2 มาไว้ที่ฐานที่ตั้งคอลัมน์ เติมสารละลาย TEN ปริมาตร 240 ไมโครลิตร ปล่อยให้สารละลายไหลและหยดลงในหลอดที่ 2 จนหมด
9. เลื่อนหลอดที่ 3 มาไว้ที่ฐานที่ตั้งคอลัมน์ เติมสารละลาย TEN ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ปล่อยให้สารละลายไหลและหยดลงในหลอดที่ 3 จนหมด
10. นำหลอดที่ 2 มาตกตะกอนด้วยเอทานอล

<u>ขั้นตอนที่ 6</u> การตกตะกอน cDNA ที่แยกได้จากคอลัมน์ด้วยเอทานอล

1. เติมสารละลายต่างๆ ต่อไปนี้ลงในตัวอย่าง cDNA

สาร	ปริมาณ
ไกลโคเจน 20µg/µl	1 µl
7.5M แอมโมเนียมอะซิเตท	ปริมาตร 0.5 เท่าของตัวอย่าง
100% เอทานอล	ปริมาตร 2.5 เท่าของตัวอย่าง

2. เก็บหลอดไว้ที่อุณหภูมิลบ 80 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที ก่อนปั่นเหวี่ยงหลอดที่ 14,000 rpm นาน 30 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
3. ดูดสารละลายใสออก ก่อนเติมด้วย 70% เอทานอล
4. ปั่นเหวี่ยงหลอดที่ 14,000 rpm นาน 2 นาที ดูดสารละลายส่วนบนออก และทำซ้ำอีกหนึ่งครั้ง
5. วางตัวอย่าง cDNA ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องนาน 5-10 นาที
6. ละลาย cDNA ด้วยสารละลาย TE โดยการดูดขึ้นลงเบาๆ 30-40 ครั้ง
7. ดูดตัวอย่างลงในหลอดใหม่

<u>ขั้นตอนที่ 7</u> การทำปฏิกิริยา BP recombination

1. เติมสารละลายต่างๆ ต่อไปนี้ลงในหลอด 1.5 มิลลิลิตร

สาร	นาโน	มาตรฐาน
ตัวอย่าง cDNA (*att*B-flanked)	X µl	X µl
pDON™ 222 (150ng/µl)	1 µl	2 µl
สารละลาย TE	7 µl	7 µl

2. เตรียมปฏิกิริยาควบคุม (control reaction) ดังที่ระบุไว้ในคู่มือผู้ผลิต
3. ละลายเอ็นไซม์ BP clonase™ II บนน้ำแข็ง
4. เหวี่ยงปั่นสองครั้งๆ 2 วินาที
5. เติมเอ็นไซม์ BP clonase™ II ลงในแต่ละตัวอย่าง ดูดตัวอย่างขึ้นลงเบาๆ และเหวี่ยงปั่นหลอดนาน 2 วินาที
6. บ่มปฏิกิริยาที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 16 – 20 ชั่วโมง
7. เตรียมปฏิกิริยาควบคุม (control reaction) ดังที่ระบุไว้ในคู่มือผู้ผลิต
8. ละลายเอ็นไซม์ BP clonase™ II บนน้ำแข็ง
9. เหวี่ยงปั่นสองครั้งๆ 2 วินาที
10. เติมเอ็นไซม์ BP clonase™ II ลงในแต่ละตัวอย่าง ดูดตัวอย่างขึ้นลงเบาๆ และเหวี่ยงปั่นหลอดนาน 2 วินาที
11. บ่มปฏิกิริยาที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 16 – 20 ชั่วโมง
12. เตรียมปฏิกิริยาควบคุม (control reaction) ดังที่ระบุไว้ในคู่มือผู้ผลิต
13. ละลายเอ็นไซม์ BP clonase™ II บนน้ำแข็ง
14. เหวี่ยงปั่นสองครั้งๆ 2 วินาที
15. เติมเอ็นไซม์ BP clonase™ II ลงในแต่ละตัวอย่าง ดูดตัวอย่างขึ้นลงเบาๆ และเหวี่ยงปั่นหลอดนาน 2 วินาที
16. บ่มปฏิกิริยาที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 16 – 20 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 8 การทำปฏิกิริยาการถ่ายฝากเข้าสู่ DH10B™ Phage resistant cell

1. ทำปฏิกิริยาการถ่ายฝากตามคำแนะนำในคู่มือผู้ผลิต ยกเว้นการเขย่าเชื้อจาก 1 ชั่วโมง (ตามคำแนะนำจากคู่มือผู้ผลิต) เป็นเวลานาน 6 ชั่วโมง (เพื่อให้เชื้อโตเพียงพอที่จะสร้างโคโลนี)
2. สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ ตามคำแนะนำโดยคู่มือผู้ผลิต (NucleoSpinPlasmid® Macherey-Nagel, Germany)

ขั้นตอนที่ 9 การตรวจสอบขนาดอินเสิร์ทของ cDNA สอดแทรก (inserted cDNA)

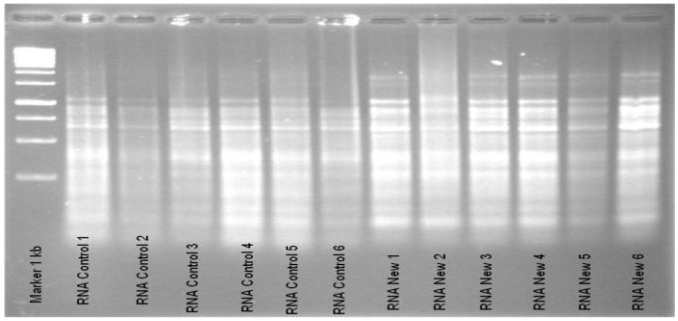
วิธีการที่ 1 ใช้ไพรเมอร์ M13 forward primer และ M13 reverse primer

วิธีการที่ 2 ตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ B*sr*GI

ผลการวิจัย

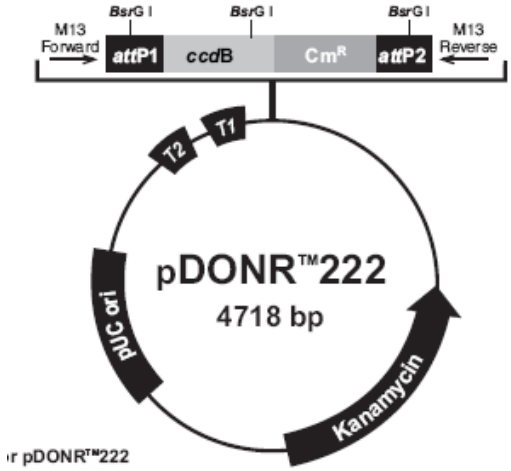
1. ได้อาร์เอ็นเอบริสุทธิ์จากใบข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 ในสภาวะขาดน้ำที่กำหนด โดยสังเกตได้จากการนำอาร์เอ็นเอมาแยกผ่านกระแสไฟฟ้าภายใต้สภาวะที่กำหนดและใช้ Formaldehyde gel electrophoresis ในการแยก (รูปที่ 1) เพื่อป้องกันการ degrade ของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้
2. ในแต่ละขั้นตอนย่อยในการสร้างซีดีเอ็นเอกระทั่งได้โคโลนีหรือซีดีเอ็นเอโคลน (cDNA clone) เมื่อเทียบกับชุดคิทได้ผลตามที่ได้ระบุไว้ในคู่มือผู้ผลิต เช่น ซีดีเอ็นเอสายสอง (รูปที่ 2)
3. รูปที่ 3 แสดงเวคเตอร์ pDONR™222 ที่ใช้ในการโคลนไลบรารี่
4. รูปที่ 4 แสดงตัวอย่างการตัดตัวอย่างซีดีเอ็นเอโคลนจากไลบรารี่ตามคำแนะนำจากบริษัทคู่มือผู้ผลิต
5. cDNA clone ที่สกัดได้หรือพลาสมิดดีเอ็นเอ (plasmid DNA) มีคุณภาพและความเข้มข้นดีและเพียงพอต่อการนำไปหาขนาดอินเสิร์ทและลำดับเบส หลังนำ cDNA clone มาผ่านการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (รูปที่ 5)
6. ยีนที่ได้จะได้นำไปเทียบกับฐานข้อมูลชีวภาพสากลเพื่อหาความเป็นไปได้ของยีนที่แสดงออกต่อไป

รูปที่ 1 แสดง Total RNA ที่สกัดได้จากใบพืชข้าวโพดตัวอย่างที่สภาวะต่างๆ

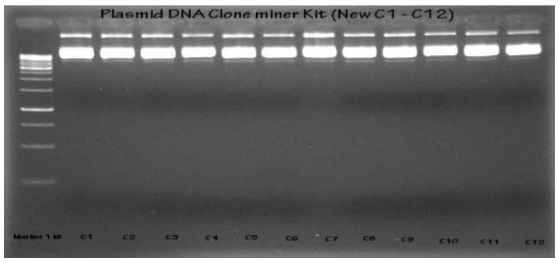


Control = ให้น้ำปกติ
New = งดน้ำ 24 ชั่วโมง

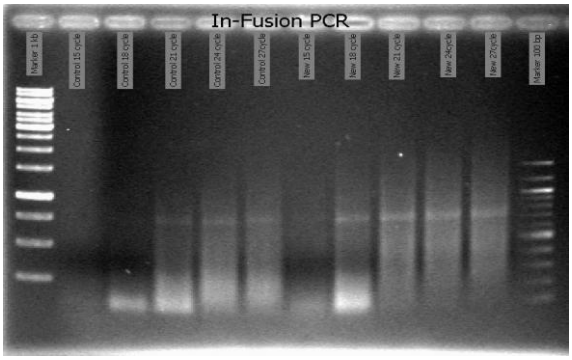
รูปที่ 2 แผนที่และลักษณะของเวคเตอร์ pDONR^{TM}222



รูปที่ 3 แสดงตัวอย่างพลาสมิดดีเอ็นเอจำนวน 12 โคโลนีที่สกัดได้จากไลบรารี่ข้าวโพด และ 1kb DNA ladder ในเลนซ้ายมือสุด



รูปที่ 4 รูปแสดง PCR products ที่ได้จากการสังเคราะห์ SMARter cDNA โดยวิธีการ LD-PCR



สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สร้าง cDNA ไลบรารี่จากส่วนใบข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 ที่เป็นข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสมพันธุ์ทนแล้งที่ปรับปรุงโดยนักวิชาการนักปรับปรุงพันธุ์กรมวิชาการเกษตร พลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากไลบรารี่จะถูกนำไปหาลำดับเบสในลำดับต่อไปและนำลำดับเบสที่ได้ไปเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูลชีวภาพสากล พบยีนที่ปรากฏที่ปรากฏในฐานข้อมูล โดยข้อมูลยีนต่างๆ ที่ได้เป็นประโยชน์ด้านการแสดงออกของยีนทนแล้งที่ปรากฏในข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 และอาจนำไปสู่การปรับปรุงพันธุ์พืชต่อไปได้ในอนาคต อีกทั้งอาจนำวิธีการ (approach) เดียวกันนี้ไปศึกษายีนที่แสดงออกในสภาวะขาดน้ำที่กำหนดในพืชสำคัญอื่นๆ ต่อไปได้ พัฒนาต่อในการปรับปรุงพันธุ์พืชเป็นผลงานทางวิชาการ ตีพิมพ์เผยแพร่ทางวิชาการได้

เอกสารอ้างอิง

Altschul,S.F., T.L. Madden, A.A., Schäffer, J, Zhang, W. Miller, and D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402.

Birnboim H.C., Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7(6): 1513-23.

Birnboim H.C. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods in Enzymology*. 100: 243-55.

ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3. 2552. http://www.food-resources.org/news/view.php?id=2646 (เข้าถึงข้อมูลทางระบบอินเทอร์เน็ต พ.ศ. 2552).

Cellier, F.; Conejero, G.; Brietler,; J-C,Casse, F. 1998. Molecular and physiological responses to water deficit in drough-tolerant and drought-sensitive lines of sunflower. Plant Physiology. 116. 319-328.

Clonetech Laboratories, USA. In-Fusion® SMARTer® cDNA Library Construction Kit User Manual. Cat No. 634933. 40 p.

Djilianov, D., Georgieva, T., Moyankova, D., Atanassov, A., Shinozaki, K., Smeeken, S.C.M., Verma, D.P.S., and Murata, N. 2005. Improved abiotic stress tolerance in plants by accumulation of osmoprotectants – Gene transfer approach. Biotechnol. Biotechnol. Equip. 19. (Special issue): 63-71.

Gasser, C.S., Gunning, D.A., Budeller, K.A., and Brown, S.M. 1990. Structure and expression of cytosolic/cyclophilin peptidyl- prolyl *cis-trans* isomerase of higher plants and and production of active tomato cyclophilin in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87. 9519-9523.

Giodani, Natali L, D'Ercole A, Pugliesi C, Fambrini M, Vernieri P, Vitagliano C, and Cavallini A. 1999. Expression of a dehydrin gene during embryo development and drought stress in ABA-deficient mutants of sunflower (*Helianthus annuus* L.). 39(4):739-48.

Iba, K. 2002. Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. Annu. Rev. Plant. Biol. 53: 225-245.

Labhilili, M., Joudrier, P. and Gautier, M.F. 1995. Characterization of cDNA encoding *Triticum durum* dehydrins and their expression patterns in cultivars that differ in drought tolerance. Plant Science. 112: 219-30.

Latini, A., Raci,C., Sperandei, M, Cantale, C, Iannetta, M., Dettori, M., Ammar, K., and Galeffi, P. 2007. Identification of DREB- related gene in *Triticum durum* and its expression under water stress conditions. *Annals of Applied Biology*. 150: 187-195.

Latini, A., Sperandei, M., Cantale, C., Arcangeli, C., Ammar, K., and Galeffi, P. 2013. Variability and expression profile of the DRF1 gene in four cultivars of durum wheat and one triticale under moderate water stress conditions. Planta. 237(4):967-78.

Plasmid isolation using Alkaline lysis. Plasmid Isolation Protocol. 2552. http://www.bio-protocol.org/wenzhang.aspx?id=30. (เข้าถึงข้อมูลทางระบบอินเทอร์เน็ต พ.ศ. 2552).

Sharma, A.D., and Kaur, P. 2009. Combinded effect of drought stress and heat shock on cyclophilin protein expression in *Triticum aestivum*. General and Applied Plant Physiology. 35 (1-2). 88-92.

Skinner, J.S., von Zitszewitz, J., Szucs, P., Marquez-Cedillo, L., Filichkin, T., Amundsen, K., Stockinger, E.J., Thomasow, M.F., Chen, T.N.N., & Hayes, P.M. 2005. Structure, functional and phylogenetic characterization of a large CBF gene family in Barley. Plant Molecular Biology. 59: 533-551.**Stress and disease tolerance. 2553.** http://www.knowledgebank.irri.org/ricebreedingcourse/Breeding_for_drought_resistance.htm. (เข้าถึงข้อมูลทางระบบอินเทอร์เน็ต พ.ศ. 2553). International Rice Research Institute.

Zhu, W., Zhang, L., Lv, H., Zhang, H., Zhang, D., Wang, X., and Chen, J. 2013. The dehydrin wzy2 promoter from wheat defines its contribution to stress tolerance. Funct Integr Genomics. 2013. [Epub ahead of print].

Yi, L., Shenjiao, Y., Shiqing, L., Xinping,C., and Fang, C. 2010. Growth and development of maize (*Zea mays* L.) in response to different field water management practices: Resource capture and use efficiency. Agriculture and Forest Meteorology. 150: 606-613.

การทดลองที่1.2 การศึกษาการแสดงออกของกลุ่มยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำในระดับอาร์เอ็นเอในข้าวโพดพันธุ์ทนแล้งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ

Difference of gene expression study in response to drought stress at the RNA levels in the economically important drought tolerance Maize variety.

ผู้วิจัย : นายพยุงศักดิ์ รวยอารี

ผู้ร่วมงาน : นางสาวอรุโณทัย ซาววา

: นางสุภาวดี ง้อเหรียญ

: นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์

สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

คำสำคัญ : ข้าวโพดทนแล้งพันธุ์นครสวรรค์ 3, การแสดงออกของยีน

บทคัดย่อ: ทำการศึกษาปริมาณการแสดงออกของยีนทนแล้งชนิดต่างๆ ในข้าวโพดทนแล้งพันธุ์นครสวรรค์ 3 โดยวิธีการวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอของข้าวโพดอายุ 2 สัปดาห์ ในระยะขาดน้ำที่ 24 ชั่วโมง (treated) เทียบกับข้าวโพดที่ให้น้ำปกติ โดยวิธีการ semi-qPCR (semi-quantitative PCR) จากการออกแบบไพรเมอร์ยีนทนแล้งชนิดต่างๆ (gene specific primers) เทียบกับไพรเมอร์ยีนควบคุม (reference genes หรือ internal control primers) ผลการศึกษาได้เพิ่มจำนวนยีนทนแล้งจำนวน 6 ชนิดยีน จากปฏิกิริยา PCR ได้แก่ ยีน cystatin, DREB4, dehydrin, DR4, extensin และ rip5 และ อีก 4 ชนิดยีนไพรเมอร์ควบคุม ได้แก่ actin, beta-tubulin, elongation factor และ 18s-rRNA (18 small subunit ribosomal nucleic acid) ผลการทดลอง พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏให้ขนาดที่แตกต่างกันและใช้เป็นตัวบ่งบอกระดับการแสดงออกของยีนทนแล้งชนิดนั้นๆได้ในเบื้องต้นของข้าวโพดในระยะขาดน้ำและให้น้ำปกติเมื่อเทียบกับระดับการแสดงออกของยีนโดยใช้ไพรเมอร์ควบคุม ข้อมูลที่ได้อาจเป็นประโย ชน์ต่อการนำยีนที่ได้จากการศึกษามาใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนทนแล้งในระยะขาดน้ำในเชิงลึกต่อไป

ABSTRACT: Study the quantitative gene expression study on drought tolerant genes in Nakhon Sawan 3 (*Zea mays* L.) at the RNA levels in two week olds maize leaves under 24 hour water depletion compared to control plants had been performed. In a present study, 6 gene specific primers for drought tolerant in plants and 4 reference genes have been used. Six drought tolerant genes are cystatin, DREB4, dehydrin, DR4, extension and rip5 and four internal genes are actin, beta-tubulin, elongation factor and 18s-rRNA (18 small subunit ribosomal nucleic acid). The expression profile of drought tolerant using RT-PCR will provide the spefic functions of those gene in response in the biotic stress responses in Maize.

Keyword: Hybrid Nakhon Sawan 3, Gene expression study

บทนำ

พืชมีการปรับตัวทางสรีระวิทยาให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เพื่อให้ตัวมันเองมีความอยู่รอดในสภาวะแวดล้อมนั้นๆ เช่น ขาดน้ำ หรือแห้งแล้ง เป็นต้น การปรับตัวของพืชให้มีการพัฒนาหรือให้เป็นไปตามปกติหรือคงทนอยู่ในสภาวะแวดล้อมดังกล่าวนั้น ต้องมีการแสดงออกของยีนบางชนิด ซึ่งอาจเป็นยีนเดียวหรือกลุ่มยีนส์ (ยีนหลายๆ ชนิด แสดงออกพร้อมกันในสภาวะเดียวกัน) จึงจะทำให้พืชมีการดำรงอยู่ในสภาวะนั้นๆ ได้หรือเกิดความเสียหายน้อยที่สุด ที่ผ่านมา นักวิจัยได้ศึกษาหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกในพืช เพื่อให้พืชเกิดการปรับตัวให้คงทนอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี ในปัจจุบั นข้อมูลยีนหรือกลุ่มยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกในสภาวะขาดน้ำหรือแห้งแล้งที่ได้จากค้นคว้าวิจัยมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้การนำข้อมูลที่ได้มาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะทนแล้งโดยอาศัยวิธีการเทคโนโลยีชีวภาพนั้นมีความเป็นไปได้มากขึ้น อีกทั้ง จากการศึกษาที่ผ่านมา พบข้อมูลที่แสดงให้เห็นชัดแล้วว่า อุณห ภูมิของโลกมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกๆปี และพบว่าพืชมีการแสดงออกของยีนที่จำเพาะบางชนิด เพื่อที่จะตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่นขาดน้ำหรือแห้งแล้งได้

ในประเทศไทย ข้าวโพดนับเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งที่ทำรายได้ให้กับประเทศเป็นอย่างมากและพบข้าวโพดพันธุ์ทนแล้งในประเทศอีกด้วย นับเป็นฐานพันธุกรรมในเชิงวิจัยได้เป็นอย่างดี รวมทั้งข้าวโพดเป็นพืชที่มีประโยชน์ทั้งด้านบริโภคและด้านงานวิจัย ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นนำเสนอการค้นหายีนหรือกลุ่มยีนส์ที่ได้มีการศึกษาค้นคว้ามาแล้วในพืชชนิดต่างๆ ในระดับอาร์เอ็นเอ แล้วนำยีนนั้นๆ มาศึกษากับข้าวโพดพันธุ์ทนแล้งในประเทศไทยว่าข้อมูลที่ได้มีความสอดคล้องหรือแตกต่างกันหรือไม่ โดยอาศัยวิธีการที่เรียกว่า Semi-quantitative RT-PCR (semi-qPCR) จากการสร้างสาย cDNA จาก Total RNA ที่สกัดได้จากใบข้าวโพดที่ระยะขาดน้ำต่างๆ และศึ กษาการแสดงออกของยีนโดยใช้ไพรเมอร์ยีนทนแล้งที่ออกแบบจากพืชชนิดต่างๆ มาเป็นตัวค้นหาปริมาณการแสดงออกของยีนเทียบกับยีนควบคุม (Reference genes) ทำให้งานวิจัยนี้ สามารถให้ข้อมูลในรูปแบบแผนยีนที่แสดงออกในสภาวะขาดน้ำเทียบกับสภาวะให้น้ำปกติ เพื่อเป็นงานวิจัยพื้นฐาน ที่นำไปสู่การต่อยอดที่เป็นประโยชน์ทางการเกษตรของประเทศไทยได้

วิธีดำเนินการ

1. ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์นครสวรรค์ 3 (NSW3) (ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์
, กรมวิชาการเกษตร)
2. ถุงพลาสติกสีดำขนาด 10" x 10" x 10" (กว้าง x ยาว x ลึก)

3. ดินและปุ๋ยตราลำดวน
4. ไนโตรเจนเหลวและโกร่งสำหรับบดตัวอย่างใบข้าวโพดตัวอย่าง
5. เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge; Labnet/Spectrafuge16M, National, USA)
6. เครื่องดูดสารปริมาณน้อย (ไมโครไปเปต) ขนาด 10, 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
7. อ่างน้ำปรับอุณหภูมิอัตโนมัติ 65°C
8. ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ 4°C (LAWCHAIN, ยี่ห้อ CHILLED รุ่น PT-30 Series)
9. ตู้แช่แข็ง -20°C (Puffer Hubbard, Thermo Scientific)
10. ตู้แช่แข็ง -80°C (SANYO ULTRA LOW, USA)
11. Trizol® Reagent (Invitrogen, USA)
12. ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega, Madison, USA)
13. Agarose gel
14. ไพรเมอร์ยีนชนิดต่างๆ (Life Science AP, Thailand)
15. 10x TAE Buffer
16. GelStar Solution (LONZA, Rockland, ME, USA)
17. เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA (Gene Amp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA)
18. เครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้าแนวนอน พร้อมเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Power supply)
19. เครื่องส่องดูแถบสารพันธุกรรมภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต (UV) GelDoc Transluminator (BIORAD, USA)
20. ชุดถ่ายภาพพร้อมเครื่องมือวิเคราะห์สารพันธุกรรม (GELDOC BIORAD, USA)
21. ช้อนตักสาร กระดาษชั่งสารและเครื่องชั่งสาร

- วิธีการ

1. ออกแบบไพรเมอร์ในส่วนของยีนที่ตอบสนองต่อสภาพขาดน้ำ
2. เพาะเมล็ดข้าวโพดในถุงพลาสติกดำและงดให้น้ำเมื่อพืชมีอายุ 14 วัน (treated) ส่วนการทดลองควบคุมให้น้ำตามปกติ (untreated หรือ control experiment)
3. สกัดสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอรวม (Total ribonucleic acid – Total RNA) จากใบข้าวโพดที่ปลูกไว้ในขั้นตอนที่ 2 หลังงดให้น้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4. ทำปฏิกิริยา Reverse-transcriptase PCR เพื่อแปลง RNA เป็นซีดีเอ็นเอสายแรก (First-strand complementary DNA – First-strand cDNA , ซีดีเอ็นเอสายแรก)
5. ตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำที่กำหนดโดยใช้ cDNA สายแรกจากใบข้าวโพดเป็นเทมเพลท และใช้ไพรเมอร์ชนิดต่างๆในการทำปฏิกิริยา PCR (ตารางที่ 1)
6. นำผลิตผล PCR ที่ได้มาวิเคราะห์ผ่านอะกาโลสเจล (Agarose gel electrophoresis)
7. วิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผล

ผลการทดลองและวิจารณ์

ตารางที่ 1 ชนิดของยีน ขนาดดีเอ็นเอ และ Tm (melting temperature) ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ดีเอ็นเอข้าวโพดเป็นเทมเพลท และโคลนลงในพลาสมิดดีเอ็นเอ

ชนิดยีน	ลำดับไพรเมอร์ (5’ -3’)	ขนาดยีน (bp)	Tm (°C)
Cystatin	F: GCATTGTCTGAAGGACTGA R: GAGCTGGCTCGTTATCTCT	200	55
ABRE	F: GSMNMDMANWNAAATAT R: GTGYHNGYRAAASASAV	200	37.5
Extensin (Rip5)	F: GCATTGTCTGAAGGACTGA R: GAGCTGGCTCGTTATCTCT F: GCATTGTCTGAAGGACTGA R: TCTTGGGCTTAGGCCTTTT	200 200	60 60
Dreb	F: CTCAAGAGCTCCACGAAAC R: CGGTGGTAGTGCTACTGGT	700	60
Dehydrin	F: GAYGARTAYGGIAAYCC R: GGIARYTTYTCYTTIATYTT	400	39
Dr4	F: CAAGTGGCTCCAGATCCAT R: TTTTGGAGTTGCTGCCTTC	400	55
ABA	F: EEKQHKHKQHLGEAGAI R: VAAAAAVEEEIKHRHAHPED F: AIAAGAFALYEKHEAK R: HKKEGGAEEADKHDK	200	37.5
Control (no template DNA)		-	-

ตารางที่ 2 แสดงชนิดยีน (internal control genes) จำนวนรอบ PCR และขนาดของแต่ละชนิดยีนที่ปรากฏ

Primer	Sample	จำนวนรอบปฏิกิริยาพีซีอาร์					
		40	38	36	34	33	30
Mac F1R1	Control	-	-	-	-	600 bp	600 bp
	New	-	-	-	-	600 bp	600 bp
Mac F2R2	Control	-	400 bp	-	-	400 bp	400 bp
	New	400 bp	400 bp	-	400 bp	400 bp	400 bp
Mac F3R3	Control	400 bp	400 bp	400 bp	400 bp	400 bp	400 bp
	New	400 bp	400 bp	400 bp	400 bp	400 bp	400 bp
Mac F4R4	Control	-	-	-	-	500 bp	-
	New	-	-	-	-	500 bp	-
	New	-	-	-	-	500 bp	-
Btub F4R4	Control	-	500 bp	500 bp	500 bp	500 bp	500 bp
	New	-	500 bp	500 bp	500 bp	500 bp	500 bp
Btub F5R5	Control	300 bp	300 bp	300 bp	300 bp	300 bp	300 bp
	New	-	300 bp	300 bp	300 bp	300 bp	-
18s sense-anti	Control	200 bp	200 bp	200 bp	-	200 bp	-
	New	200 bp	-	200 bp	-	-	-

หมายเหตุ C = ให้น้ำปกติ

\+ = งดให้น้ำที่ 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 3 แสดงไพรเมอร์ควบคุม (internal control primers) ของยีนที่มีการแสดงออกตลอดเวลา (housekeeping genes)

ยีน	ลำดับไพรเมอร์ (5’ -3’)	ขนาดยีน (bp)	Tm (˚C)	จำนวนรอบ	treatments
MAC	F1: GCTGCTGTACTGCTGTAGAAAC R1: CAATGCCATGCTCAATCGGG	600	60	30, 33	C / +
MAC	F2: GGCTGCTGTACTGCTGTAGAAA R2: AATGCTGGGGAAGACAGCTC	600	60	30, 33, 38	C / +
MAC	F3: GCTGCTGTACTGCTGTAGAAA R3: CTGGGGAAGACAGCTCTTGG	400	58	30, 33	C / +
MAC	F4: GCTTTTCCCTTAAACCATGAGCA R4: GGTGTGATGCCAGTTCTCCA	500	59	33	C / +
Beta-tubulin	F3: CCGGGCATTGGGATTGTTTT R3: CCAGAACTTGGCACCGATCT	500	59	33	+
Beta-tubulin	F4: AGCTTCCTGCGTCCGATTTC R4: GTTAGGGTTTGTGGGGAGGG	500	60	30, 33, 34 36, 38	C / +
Beta-tubulin	F5: TAGTGGGCGAGTACCACCAG R5: ACGGGAGGGAGGGGAAAATA	300	61	30, 33, 34 36, 38, 40	C / +
18s ribosomal RNA	F: TTCGGAACTGAGGCCATGAT R: CGAACCTCCGACTTTCGTTCT	200	60	33, 36*, 38 40*	C* / +
Elongation factor (EF)	F: GTCGTYGTYATYGGHCAYGT F: GCYCCYGGH CAYCGTGAYTTYAT F: CARGAYGTBTACAAGATYGGTGG R: ACHGTRCCR ATACCACCR ATC R: CCRGCRACR GTRTGT CTCAT R: ATGACACCRACRGCRACRGTYTG	-	60	-	C / +

รูปที่ 1แสดงผลการนำลำดับเบสและการเปรียบเทียบในส่วนของ conserved domain ของผลิตผล PCR ที่ได้กับฐานข้อมูลชีวภาพสากล

Sequence Search Results

Records **1** through **8** of a total **8** reference records matching the term **dreb**. This search took **0.0255** seconds.

PLN AB218832 (109119912): Zea mays ZmDREB2A mRNA for ERF/AP2 domain containing transcription factor, complete cds.
PLN AB218833 (109119914): Zea mays ZmDREB2A pseudogene mRNA.
PLN AF448789 (25990950): Zea mays DREB-like protein (dreb1) mRNA, complete cds.
PLN AF450481 (25991253): Zea mays DREB-like protein (DREB1A) mRNA, complete cds.
PLN JF915834 (385717699): Zea mays dehydration responsive element binding protein 2 (DREB2) and dehydration responsive element binding protein 2 isoform b (DREB2) genes, complete cds, alternatively spliced.
PLN JF915835 (385717703): Zea mays dehydration responsive element binding protein 2 isoform c (DREB2) mRNA, complete cds, alternatively spliced.
PLN JF915836 (385717705): Zea mays dehydration responsive element binding protein 2 isoform a (DREB2) mRNA, complete cds, alternatively spliced.
PLN JF915837 (385717707): Zea mays dehydration responsive element binding protein 2 isoform b (DREB2) mRNA, complete cds, alternatively spliced.

Zea mays DREB-like protein (dreb1), mRNA

Sequence ID: ref|NM_001111611.1| **Length:** 1388 **Number of Matches:** 1

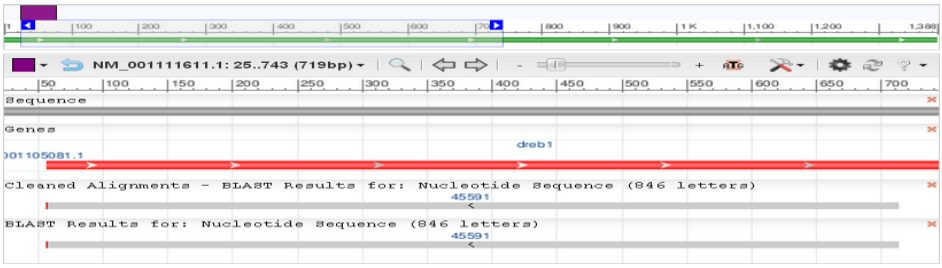
▶ See 1 more title(s)

Range 1: 57 to 710 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previou

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1175 bits(1302)	0.0	653/654(99%)	0/654(0%)	Plus/Plus

```
Query  1    ATTGCTCAAGAGCTCCACGAAACGTCCTCTTGCTCTGCCACCACCACCTCGTCGTGCACC  60
            || ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  57   ATGGCTCAAGAGCTCCACGAAACGTCCTCTTGCTCTGCCACCACCACCTCGTCGTGCACC  116

Query  61   ACATCCTGCTGCTCGTCCACTGTCACAGACTCGTCCTCTTCGCCCCCGTCACCGGCGGCG  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  117  ACATCCTGCTGCTCGTCCACTGTCACAGACTCGTCCTCTTCGCCCCCGTCACCGGCGGCG  176

Query  121  GCCAATGCCGCGCCCGCGACACGGAAgcggcaggcgttggaggccgaggccgaggccgag  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  177  GCCAATGCCGCGCCCGCGACACGGAAGCGGCAGGCGTTGGAGGCCGAGGCCGAGGCCGAG  236

Query  181  gcgggcggtgaggaggaggaggaggaggaggaaggcTGTGCTGGTAATAAGGCGGCGCCG  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  237  GCGGGCGGTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAAGGCTGTGCTGGTAATAAGGCGGCGCCG  296

Query  241  GCCAAGAAGCGACCGCGGGGCAGCGAGGGGAAGCACCCGACGTTCCGCGGCGTGCGGATG  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  297  GCCAAGAAGCGACCGCGGGGCAGCGAGGGGAAGCACCCGACGTTCCGCGGCGTGCGGATG  356

Query  301  CGGGCGTGGGGCAAGTGGGTGTCGGAGATCCGCGAGCCGCGCAAGAAGTCGCGCATATGG  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  357  CGGGCGTGGGGCAAGTGGGTGTCGGAGATCCGCGAGCCGCGCAAGAAGTCGCGCATATGG  416

Query  361  CTCGGCACGTTCCCCACCGCCGAGATGGCCGCGCGCGCCCACGACGTCGCGGCGCTCGCC  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  417  CTCGGCACGTTCCCCACCGCCGAGATGGCCGCGCGCGCCCACGACGTCGCGGCGCTCGCC  476

Query  421  ATCAAGGgccgcgccgcgcacctcaacttcccggacctcgccggcgcgctcccgcgcgcc  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  477  ATCAAGGGCCGCGCCGCGCACCTCAACTTCCCGGACCTCGCCGGCGCGCTCCCGCGCGCC  536

Query  481  gcgtccgcggcgccCAAGGACGTCCAGGCAGCCGCCGCATTGGCCGCTGCGTTCACGTCG  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  537  GCGTCCGCGGCGCCCAAGGACGTCCAGGCAGCCGCCGCATTGGCCGCTGCGTTCACGTCG  596

Query  541  CCGTCATCGGAGCCCGGCGCCGGCGCGCACGAGGAGCCCGCTGCCAAGGACGGCGCCGCG  600
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  597  CCGTCATCGGAGCCCGGCGCCGGCGCGCACGAGGAGCCCGCTGCCAAGGACGGCGCCGCG  656

Query  601  CCCGAGGAGGCAGCCGCCGACGCACAGGCACCAGTACCAGTAGCACTACCACCG  654
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  657  CCCGAGGAGGCAGCCGCCGACGCACAGGCACCAGTACCAGTAGCACTACCACCG  710
```

รูปที่ 2 แสดง conserved domain (ส่วนที่มีความเหมือนแสดงความเป็นอนุรักษ์ของยีน) ของยีน DREB ที่โคลนได้กับยีน DREB ในฐานข้อมูลชีวภาพสากล (ncbi database)



สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ : ได้ออกแบบไพรเมอร์ยีนทนแล้งเพื่อใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซี-อาร์ (PCR) การทดลองนี้เป็นการทดลองหาระดับการแสดงออกของยีน (ที่ได้จากการออกแบบไพรเมอร์ยีนที่ต้องการ) ในเชิงกึ่งปริมาณ (semi-quantitative PCR) เทียบกับการแสดงของยีนที่แสดงออกตลอดเวลาในเซลล์ (housekeeping genes) หรือยีนมาตรฐาน (internal control หรือ standard control) เป็นตัวเปรียบเทียบระดับการแสดงของยีน ตามความเข้ม (intensity) ของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในแต่ละชนิดยีน โดยวิธีการนี้เป็นที่ยอมรับและมีการเผยแพร่ในระดับสากล อย่างไรก็ตามวิธีการนี้เป็นเพียงการประมาณค่าการแสดงออกเท่านั้น ในปัจจุบันมีเทคนิคที่เรียกว่า Realtime PCR ที่สามารถวัดหาค่าการแสดงออกของยีนในขณะทำปฏิกิริยาแบบ Realtime ต่อไป โดยค่าการแสดงออกของยีนจะปรากฏในรูปกราฟและบ่งบอกระดับการแสดงของยีนเทียบกับระดับ การแสดงของยีนควบคุม (internal control) ที่แม่นยำและเที่ยงตรงมากกว่า (precise and accurate) ซึ่งสามารถวางแผนกระทำได้ต่อไปในอนาคต และนำผลการทดลองมาเปรียบเทียบกัน เพื่อศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำของพืชได้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Dombrowski, J.E., and Martin, R.C. 2009. Evaluation of reference genes for quantitative RT-PCR in *Lorium temurentum* under abiotic stress. Plant Science. 176:390-396.
Ferre, F. 1992. Quantitative or semi-quantitative PCR: Reality versus myth. *PCR Methods Applic*. 2, 1-9.

Gause, W.C., and Admovicz, J. 1995. Use of PCR to quantitate relative differences in gene expression. *PCR PRIMER*, 293-311.

Peter S. Solomon, Simon, V.S., Ipcho, James, K. Hane, Kar-chun Tan, Richard P. Oliver. A quantitative PCR approach to determine gene copy number. 2008. Fungal Genetics Reports. 5- 8.

Raeymaekers, L. 1995. A complementary on the practical applications of competitive PCR. *PCR Methods Applic*, 5 91-94.

Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., Heinen, E. 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. J. Biotechnol. 75: 291-295.

การทดลองที่ 1.3 การโคลนยีนที่ทนต่อสภาวะขาดน้ำในข้าวโพดพันธุ์ทนแล้ง

Cloning of Drought Stress Gene in *Zea mays* (L.)

ผู้วิจัย	นางสาวสุภาวดี ง้อเหรียญ	**สังกัด**	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	นายพยุงศักดิ์ รวยอารี	**สังกัด**	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางสาวอรุโณทัย ซาววา	**สังกัด**	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์	**สังกัด**	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

บทคัดย่อ

การโคลนยีนที่ทนต่อสภาวะขาดน้ำในข้าวโพดพันธุ์ทนแล้ง มีวัตถุประสงค์เพื่อโคลนยีนและศึกษาคุณสมบัติของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการทนต่อสภาวะขาดน้ำในพืช สำหรับนำไปใช้ในการพัฒนาพันธุ์พืชให้มีศักยภาพในการให้ผลผลิตและสามารถทนต่อสภาวะเครียดอันเกิดจากภาวะขาดน้ำในพืชได้ ซึ่งยีนที่ทำการโคลนในครั้งนี้ได้แก่ ยีน SINA3 และ SINAT3 เป็นยีนที่อยู่ในกลุ่ม E3 ubiquitin ligase เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะเครียดของพืช โดยการควบคุมการเปลี่ยนแปลงกระบวนการถอดรหัส (responsive transcription factors) ที่จำเป็นสำหรับการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะเครียดและการควบคุมกิจกรรมของโปรตีนต่างๆ สำ หรับนำไปใช้ภายในเซลล์พืช งานวิจัยนี้ได้ทำการโคลนยีน SINA3 และ SINAT3 จากข้าวโพดพันธุ์ทนแล้ง โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ในบริเวณที่มีความเหมือนของลำดับพันธุกรรมอย่างสูง (conserved region) จากยีน SINA3 และ SINAT3 ในพืชชนิดต่างๆ ที่ค้นหาได้จากฐานข้อมูล NCBI นำไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มาทำปฏิกิริยา RT-PCR กับอาร์เอ็นเอรวมของข้าวโพด 4 พันธุ์ ได้แก่ ตากฟ้า 1 (TF1), ตากฟ้า 3 (TF3), นครสวรรค์ 3 (NS3) และ นครสวรรค์ 1 (NS1) ได้ยีน SINA3 และ SINAT3 มีขนาดเท่ากับ 1026 และ 1050 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์โครงส ร้างของยีนโดยใช้โปรแกรม EMBL-EBI database พบว่า ยีน SINA3 และ SINAT3 ที่ได้มีส่วนประกอบครบทั้งยีน ซึ่งประกอบด้วย ลำดับเบสในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน Open Reading Frame (ORF) จำนวน 1 exon สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนของยีน SINA3 และ SINAT3 เท่ากับ 341 และ 349 amino acids เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ยีน SINA3 ที่โคลนได้จากข้าวโพดมีความเหมือนอย่างสูงกับยีนในกลุ่ม E3 ubiquitin protein ligase ที่พบในข้าวโพด (*Zea mays* L.) (EF434383.1) และข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italic*a (L.) Beauv.) (XM003572636.1) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 99% และ 90% ตามลำดับ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน SINAT3 ที่ได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน E3 ubiquitin protein ligase ที่พบในข้าวโพด (*Zea mays* L.) (EU966994.1) และข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italic*a (L.) Beauv.) (XM004960614.1) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 99% และ 90% ตามลำดับ และสามารถนำยีน SINA3 และ SINAT3 ที่โคลนได้จากข้าวโพดไปทำการสร้างชุด cassette สำหรับถ่ายฝากเข้าสู่พืชต้นแบบเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนต่อไป

Abstract

SINA3 and SINAT3 genes is an E3 ubiquitin ligase enzyme that plays a critical role in regulating plant responses to abiotic stresses such as drought, temperature fluctuations, high salinity, radiation and nutrient deprivation adversely affect growth, development and productivity. In this study, two full-length cDNA sequences of corn (*Zea mays* L.) encoding *Zm*SINA3 and *Zm*SINAT3 have been isolated from four corn variety names

TAKFA 1, TAKFA 3, NAKORNSAWAN 3 and NAKORNSAWAN 1 via RT - PCR based method with SINA3 (forward) + SINA3 (reverse) and SINAT3 (forward) + SINAT3 (reverse). The SINA3 and SINAT3 gene sequence contains a fragment of 1026 and 1050 bp complete ORF, encoded for 341 and 349 amino acids polypeptide. The highly conserved region of the gene is E3 ubiquitin protein ligase which are also found in monocots *Zea mays* L. (EF434383.1, EU966994.1) and *Setaria italic*a (L.) Beauv. (XM003572636.1, XM004960614.1) with 99% and 90% of homology respectively.

บทนำ

สภาวะโลกร้อน (Global Warming) หรือ สภาวะภูมิอากาศเปลี่ยนแปลง (Climate Change) คือ การที่อุณหภูมิเฉลี่ยของโลกเพิ่มขึ้นประมาณ 0.5-1 องศาเซลเซียสต่อปี จากผลของภาวะเรือนกระจก (Greenhouse Effect) และปรากฏการณ์เอลนิโน (ELNINO) ซึ่งเป็นหนึ่งในวิกฤติการณ์ที่ส่งให้อากาศในโลกร้อนขึ้นเรื่อยๆ สภาวะอากาศเปลี่ยนแปลงไปอย่างไม่เคยพบมาก่อน เช่น ฤดูหนาวที่สั้นลง ฤดูร้อนที่ยาวนานขึ้น ภาวะภัยแล้ง และอุทกภัยที่ เกิดบ่อยครั้ง และรุนแรงขึ้น ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิต ตลอดจนพืชผลทางการเกษตร ความรุนแรงของภัยแล้งขึ้นกับความชื้นในอากาศ ความชื้นในดินและระยะเวลาที่เกิดความแห้งแล้ง ในช่วงหลายปีที่ผ่านมา นอกจากประเทศไทยจะประสบกับปัญหาอุทกภัยที่รุนแรงแล้ว ปัญหาการขาดน้ำทั้งด้านอุปโภคบริโภค และการเกษตร ซึ่งอาจทำให้พืชชะงักการเจริญเติบโต และพื้นที่การเกษตรเสียหาย ซึ่งมีต้นเหตุมาจากการที่มนุษย์ได้เพิ่มปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ไนตรัสออกไซด์ และคลอโรฟลูโรคาร์บอน (CFC) จากการเผาไหม้เชื้อเพลิงต่างๆ การขนส่ง การผลิตในโรงงานอุตสาหกรรม และที่สำคัญจากการตัดไม้ทำลายป่าจำนวนมหาศาล (http://www.baanjomyut.com/library/global_warming) ส่งผลกระทบต่อการดำรงอยู่ของสิ่งมีชีวิตทั้งคน สัตว์ และพืช ซึ่งในปัจจุบันไม่สามารถคาดการณ์ปริมาณน้ำฝนที่ตกในแต่ละปีได้ อาจเกิดสภาวะน้ำท่วมฉับพลัน หรือแห้งแล้งอย่างรุนแรง ผลกระทบจากภาวะโลกร้อนที่เห็นได้ชัดเจนในระยะสั้นในประเทศไทยได้ก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตทางการเกษตรเป็นจำนวนมาก

การตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำของพืชในระดับยีน จากการศึกษาในพืชชนิดต่างๆ พบว่า มียีนจำนวนมากที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนแล้ง และการตอบสนองต่อสภาวะแล้งของพืชจะชักนำให้มีการแสดงออกของยีนต่างๆ การศึกษาการแสดงออกของยีนต่อสภาวะขาดน้ำ สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มสำคัญ คือ (1) กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับ signal transduction pathways (STPs) และการควบคุมการถอดรหัส (2) กลุ่มยีนที่ป้องกันเมมเบรนและฟังก์ชันของโปรตีน และ (3) กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึมน้ำ ไอออน และการขนส่ง (Vierling, 1991; Ingram and Bartels, 1996; Smirnoff, 1998; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2000) และพบว่ายีนที่ถูกชักนำให้แสดงออกในช่วงที่พืชเผชิญสภาวะขาด

น้ำ มีหน้าที่หลัก 2 ด้านคือ ช่วยป้องกันเซลล์จากการขาดน้ำและช่วยควบคุมการแสดงออกของยีนระหว่างที่พืชอยู่ภายใต้ภาวะเครียดจากการขาดน้ำ

การปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีความทนทานต่อสภาวะขาดน้ำ ที่ผ่านมาต้องอาศัยระยะเวลา และการปรับปรุงพันธุ์โดยอาศัยการปรับปรุงแบบปกติ ที่ผ่านมาไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร นักวิจัยจึงพยายามหาหนทางหรือแนวทางการปรับปรุงพันธุ์ โดยอาศัยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วยในการพัฒนาสายพันธุ์พืชกันมากขึ้นทั้งในประเทศ และต่างประเทศ เพื่อช่วยเร่งรัดกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ทนต่อสภาวะขาดน้ำได้ ซึ่งกรมวิชาการเกษตร โดยสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพได้มีงานวิจัยเกี่ยวกับการค้นหาและศึกษากลุ่มยีน การแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำในข้าวโพดพันธุ์ทนแล้งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เป็นการศึกษาหน้าที่การทำงานของยีน และค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกทางสรีรวิทยาของพืชที่สามารถทนต่อสภาวะขาดน้ำ โดยนำยีนและข้อมูลยีนที่ได้มาใช้ในการพัฒนาสายพันธุ์พืชให้มีความทนทานต่อสภาวะขาดน้ำในพืชเศรษฐกิจอื่นๆ ที่ต้องการ เพื่อให้สามารถนำมาใช้เป็นพืชทางเลือกในการลดปัญหาที่เกิดจากภาวะโลกร้อนได้ ซึ่งเป็นเรื่องที่นักวิจัยไทยต้องดำเนินการอย่างเร่งด่วน

ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงได้นำเทคโนโลยีด้านการโคลนยีนมาประยุกต์ใช้ในการค้นหาและศึกษาคุณสมบัติของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการทนต่อสภาวะขาดน้ำในข้าวโพด และสามารถนำยีนที่ได้ไปถ่ายฝากลงในพืชเศรษฐกิจอื่นๆ เพื่อให้ทนต่อสภาวะขาดน้ำต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ข้าวโพดพันธุ์ ตากฟ้า 1, ตากฟ้า 3, นครสวรรค์ 3 และ นครสวรรค์ 1 (ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์)

2. ไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์และตรวจวิเคราะห์ยีน SINA3 และ SINAT3 ได้แก่ SINA3 (forward) SINA3 (reverse) SINAT3 (forward) และ SINAT3 (reverse)

3. อุปกรณ์ในการสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ ได้แก่ โกร่ง เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบสูงแบบควบคุมอุณหภูมิต่ำได้ (Refrigerated Centrifuge) หลอดใส่ตัวอย่างขนาดต่างๆ อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

4. ไมโครปิเปตขนาด P1,000 P200 P100 และ P2 ไมโครลิตร

5. อุปกรณ์การอ่านภาพ และบันทึกผล ได้แก่ Gel documentation พร้อมเครื่องพิมพ์

6. เครื่อง Spectrophotometer สำหรับใช้วัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D.)

7. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม PCR (Thermal Cycle 9700)

8. เครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI Prism 310

9. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอ (MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit) ของ Epicentre® Biotechnologies

10. สารเคมีที่ใช้ในการทำ Electrophoresis และ Molecular Weight Marker

11. สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR Amplification) (HotStartTaq Master Mix Kit) ของ QIAGEN

12. สารเคมีที่ใช้ในการทำ RT-PCR (SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase Kit) ของ Invitrogen

13.สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากเจล (QIAquick Gel Extraction Kit) ของ QIAGEN

14. สารเคมีที่ใช้ในการโคลนยีน (T&A Cloning Kit) ของ Invitrogen

15. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit) ของ Fermentas

16. เชื้อแบคทีเรียเซลล์เจ้าบ้าน (Competent Cells) *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α

17. สารเคมีสำหรับใช้กับเครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI Prism 310

18. การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปและโปรแกรมบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต

- โปรแกรม BLAST จากเว็บไซด์ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Blast/
- โปรแกรม ClustalW Multiple Alignment จากเว็บไซต์ http://www.ebi.ac.uk/clustalw/
- โปรแกรม DNAStar software analysis (DNASTAR, Inc, USA)
- โปรแกรม CromasPro version 1.33 จากเว็บไซต์ http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่างพืช

ได้คัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดที่มีลักษณะทนแล้ง ได้แก่ พันธุ์ ตากฟ้า 1, ตากฟ้า 3, นครสวรรค์ 3 และนครสวรรค์ 1 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดจากศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ โดยนำเมล็ดพันธุ์มาปลูกในกระถางที่เตรียมไว้ รดน้ำ 2 - 3 วัน/ครั้ง เมื่ออายุประมาณ 45 วัน งดให้น้ำ นำใบอ่อนมาสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อหาส่วนของยีนที่มีการแสดงออก

2. ออกแบบไพรเมอร์ในส่วนของยีนที่มีการแสดงออก

ทำการศึกษา และค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการทนต่อสภาวะขาดน้ำในข้าวโพด ได้ แก่ ยีน SINA3 และ SINAT3 ที่มีรายงานในพืชชนิดต่างๆ จากฐานข้อมูลทางอินเทอร์เน็ต (www.ncbi.nim.nih.gov/) นำมาวิเคราะห์ลำดับเบสที่มีความเหมือนกันอย่างสูง (conserve region) โดยใช้โปรแกรม ClustalW2 Multiple Alignment (European Bioinformatics Institute, UK) ออกแบบไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์

ยีน SINA3 คือ SINA3 (forward) และ SINA3 (reverse) ไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีน SINAT3 คือ SINAT3 (forward) และ SINAT3 (reverse) (ตารางที่ 1)

3. การโคลนยีน SINA3 และ SINAT3 จากข้าวโพดในส่วนของยีนที่มีการแสดงออก

3.1 การสกัดอาร์เอ็นเอรวม

ตัวอย่างข้าวโพดที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ตากฟ้า 1, ตากฟ้า 3, นครสวรรค์ 3 และ นครสวรรค์ 1 เมื่ออายุได้ 45 วัน งดให้น้ำ นำมาสกัดอาร์เอ็นเอรวม โดยใช้ MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit (BIONEER Corporation) ตัดใบอ่อนของข้าวโพดประมาณ 1 - 5 มิลลิกรัม บดในโกร่งพร้อมกับไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงแป้ง ย้ายตัวอย่างลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Tissue and Cell Lysis Solution 300 ไมโครลิตร ผสมโดยการเอียงหลอดไปมาเบาๆ บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 65°C นาน 15 นาที เขย่าทุกๆ 5 นาที วางตัวอย่างบนน้ำแข็งนาน 3 – 5 นาที เติม MPC Protein Precipitation Reagent 150 ไมโครลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน นาน 10 วินาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนดีเ อ็นเอ ย้ายส่วนใสใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Isopropanol 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 30 – 40 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที เทส่วนใสออกให้หมด ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย DNaseI Solution 200 ไมโครลิตร บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 37°C นาน 10 - 30 นาที เติม MPC Protein Precipitation Reagent 200 ไมโครลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน นาน 10 วินาที วางตัวอย่างบนน้ำแข็ง นาน 3 – 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ย้ายสารละลายอาร์เอ็นเอที่ได้ลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Isopropanol 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 30 – 40 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ระวังอย่าให้ตะกอนหลุดหาย ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 75% Ethanol 300 ไมโครลิตร (ทำ 2 ครั้ง) เอา Ethanol ออกให้หมดโดยใช้ไปเปตละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย TE buffer 35 ไมโครลิตร แล้วเติม Script Guard RNase Inhibitor 1 ไมโครลิตร เพื่อยับยั้งไม่ให้ อาร์เอ็นเอถูกย่อย วัดค่าความเข้มข้น (O.D.) ของสารละลายอาร์เอ็นเอที่ได้ โดยใช้เครื่อง spectrophotometer เก็บสารละลายอาร์เอ็นเอที่ -80°C จนกว่าจะใช้งาน

3.2 การสังเคราะห์ cDNA จาก total RNA โดยวิธี RT-PCR

ทำการสังเคราะห์ cDNA จากอาร์เอ็นเอรวมของข้าวโพด โดยใช้ SuperScrip™ III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) ด้วยวิธี One-Step RT-PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน SINA3 ได้แก่ SINA3 (forward) และ SINA3 (reverse) และไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน SINAT3 ได้แก่ SINAT3 (forward) และ SINAT3

(reverse) ในปริมาตรของปฏิกิริยาพอลิเมเรสทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลาย total RNA 10 นาโนกรัม – 1 ไมโครกรัม, 10 μM Gene Specific Primer (forward), 10 μM Gene Specific Primer (reverse), 2X Reaction Mix, 2U SuperScript™III RT/Platinum Taq Mix นำปฏิกิริยาเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม PCR (Thermal Cycle 9700) โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre-Denature 55°C 30 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94°C 2 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denature 94°C 15 วินาที, Anneal 60°C 30 วินาที, Extend 68°C 3 นาที จำนวน 40 รอบ ตามด้วยขั้นตอน 68°C 5 นาที อีก 1 รอบ หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วเก็บตัวอย่างไว้ที่ 4°C และนำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1% Agarose gel electrophoresis และเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

3.3 การโคลนยีน SINA3 และ SINAT3 เข้าสู่เวกเตอร์ และการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

นำผลผลิต PCR มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) นำมาแยกด้วย 0.8% low melting gel แล้วย้อมด้วย Gel Star (Cambrex Bio Science Rockland, Inc) จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอบนเครื่อง Dark Reader Transilluminators ใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชั่งน้ำหนักเจลที่ได้เติม QG Buffer 3 เท่าของน้ำหนักเจล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50°C นาน 1 ชั่วโมง เขย่าแรงๆ ทุก 2 นาที จนเจลละลายหมด เติม Isopropanol 1 เท่าของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากัน ย้ายสารละลายทั้งหมดใส่ใน Binding Column บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม PE Buffer 750 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ย้าย Binding Column วางลงบนหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม EB Buffer (อุ่นที่อุณหภูมิ 50 - 60°C) 30 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 15 – 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที ตรวจสอบคุณภาพด้วย 1.5% Agarose gel electrophoresis จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยา ligation โดยใช้ T&A Cloning Kit (RBC Bioscience, Taiwan) ในปริมาตรของปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย Gel-purified PCR product 4 ไมโครลิตร, T&A Cloning vector 2 ไมโครลิตร, Ligation Buffer A 1 ไมโครลิตร, Ligation Buffer B 1 ไมโครลิตร, T4 DNA Ligase 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ ผสมปฏิกิริยาทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 22°C เป็นเวลา 15 – 30 นาที และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4°C นานข้ามคืน จากนั้นทำการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดยนำปฏิกิริยา ligation จำนวน 2 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดคอมพิเทนต์เซลล์ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และแช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไป heat – shock ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 30 วินาที (ไม่ต้องเขย่า) นำไปแช่บนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที เติม S.O.C. medium 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำ

ตัวอย่างไป spread บนอาหารแข็ง LB (เตรียม 1 ลิตร : 10 กรัม NaCl, 10 กรัม Tryptone, 5 กรัม Yeast extract, 15 กรัม Bacto-Agar, ddH_2O) เติมสารปฏิชีวนะ amplicillin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มเพลทไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นานข้ามคืน

3.4 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ และการตรวจสอบการปรากฏของยีน

คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่มีชิ้น insert ของยีน นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ amplicillin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบ/นาที นาน 12–16 ชั่วโมง นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้ GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, USA) นำเซลล์ที่เลี้ยงไว้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ เทอาหารทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วย Resuspension Solution 250 ไมโครลิตร เขย่าให้เซลล์ละลาย เติม Lysis Solution 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดขึ้นลง 4 – 6 ครั้ง เติม Neutralization Solution 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โด ยกลับหลอดขึ้นลง 4 – 6 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที จากนั้นย้ายสารละลายเซลล์ลงใน GeneJET™ spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม Wash Solution 500 ไมโครลิตร เพื่อล้าง column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) ย้าย GeneJET™ spin column วางบนหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Elution Buffer 50 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้นาน 15 – 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1% agarose gel electrophoresis และเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

การตรวจสอบการปรากฏของยีน SINA3 และ SINAT3 โดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 100 – 200 นาโนกรัม, 1X FastDigest Buffer, 0.5U FastDigest Enzyme ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80°C นาน 5 นาที นำมาตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis

3.5 การวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA Sequencing)

นำตัวอย่างพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของยีน SINA3 และ SINAT3 มาเป็นต้นแบบในการวิเคราะห์ลำดับเบส โดยใช้สารเคมี ABI PRISM® BigDye® Terminator Cycle Sequencing V3.1 Kit (Perkin-Elmer) ร่วมกับไพรเมอร์ M13 (forward) 5′ – GTA AAA CGA CGG CCA GT – 3′ และ M13 (reverse) 5′ –GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG G – 3′ ในการทำปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม, BigDye™ 2 ไมโครลิตร, Ready Reaction buffer 1 ไมโครลิตร, 5 ไมโครโมล ไพรเมอร์ Forward / Reverse และ ddH_2O 3.4 ไมโครลิตร นำปฏิกิริยา cycle sequencing ที่ได้ เข้าเครื่อง Thermal Cycler 9700 โดยตั้งรอบปฏิกิริยาดังนี้ Denaturation 96°C 10

วินาที, Annealing 50°C 5 วินาที, Extention 60°C 4 นาที จำนวน 25 รอบ และ Hold ที่ 4°C infinity (α) หลังจากนั้นทำการล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน โดยนำผลผลิตที่ได้ใส่ลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Solution A (ddH_2O 16 ไมโครลิตร: 95% ethanol 64 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงทุก 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0°C ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70% Ethanol 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0°C ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนแห้งในที่มืด จากนั้นละลายตะกอนด้วย Hidi-formamide 10 ไมโครลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากันในหลอด นำไปปั่นให้ดีเอ็นเอตกที่ก้นหลอด นำตัวอย่างใส่หลอด Septa บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 2 นาที และแช่ไว้บนน้ำแข็งทันที นำตัวอย่า ง load เข้าเครื่อง ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบส จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าต่างๆ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปและโปรแกรมบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ข้าวโพดพันธุ์ ตากฟ้า 1, ตากฟ้า 3, นครสวรรค์ 3 และ นครสวรรค์ 1 (ศูนย์วิจัยพืชไร่ตากฟ้า จังหวัดนครสวรรค์)

2. ไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์และตรวจวิเคราะห์ยีน SINA3 และ SINAT3 ได้แก่ SINA3 (forward) SINA3 (reverse) SINAT3 (forward) และ SINAT3 (reverse)

3. อุปกรณ์ในการสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ ได้แก่ โกร่ง เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบสูงแบบควบคุมอุณหภูมิต่ำได้ (Refrigerated Centrifuge) หลอดใส่ตัวอย่างขนาดต่างๆ อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

4. ไมโครปิเปตขนาด P1,000 P200 P100 และ P2 ไมโครลิตร

5. อุปกรณ์การอ่านภาพ และบันทึกผล ได้แก่ Gel documentation พร้อมเครื่องพิมพ์

6. เครื่อง Spectrophotometer สำหรับใช้วัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D.)

7. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม PCR (Thermal Cycle 9700)

8. เครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI Prism 310

9. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอ (MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit) ของ Epicentre® Biotechnologies

10. สารเคมีที่ใช้ในการทำ Electrophoresis และ Molecular Weight Marker

11. สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR Amplification) (HotStartTaq Master Mix Kit) ของ QIAGEN

12. สารเคมีที่ใช้ในการทำ RT-PCR (SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase Kit) ของ Invitrogen

13.สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากเจล (QIAquick Gel Extraction Kit) ของ QIAGEN

14. สารเคมีที่ใช้ในการโคลนยีน (T&A Cloning Kit) ของ Invitrogen

15. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit) ของ Fermentas

16. เชื้อแบคทีเรียเซลล์เจ้าบ้าน (Competent Cells) *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α

17. สารเคมีสำหรับใช้กับเครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI Prism 310

18. การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปและโปรแกรมบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต

- โปรแกรม BLAST จากเว็บไซด์ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Blast/
- โปรแกรม ClustalW Multiple Alignment จากเว็บไซต์ http://www.ebi.ac.uk/clustalw/
- โปรแกรม DNAStar software analysis (DNASTAR, Inc, USA)
- โปรแกรม CromasPro version 1.33 จากเว็บไซต์ http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่างพืช

ได้คัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดที่มีลักษณะทนแล้ง ได้แก่ พันธุ์ ตากฟ้า 1, ตากฟ้า 3, นครสวรรค์ 3 และนครสวรรค์ 1 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดจากศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ โดยนำเมล็ดพั นธุ์มาปลูกในกระถางที่เตรียมไว้ รดน้ำ 2 - 3 วัน/ครั้ง เมื่ออายุประมาณ 45 วัน งดให้น้ำ นำใบอ่อนมาสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อหาส่วนของยีนที่มีการแสดงออก

2. ออกแบบไพรเมอร์ในส่วนของยีนที่มีการแสดงออก

ทำการศึกษา และค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการทนต่อสภาวะขาดน้ำในข้าวโพด ได้แก่ ยีน SINA3 และ SINAT3 ที่มีรายงานในพืชชนิดต่างๆ จากฐานข้อมูลทางอินเทอร์เน็ต (www.ncbi.nim.nih.gov/) นำมาวิเคราะห์ลำดับเบสที่มีความเหมือนกันอย่างสูง (conserve region) โดยใช้โปรแกรม ClustalW2 Multiple Alignment (European Bioinformatics Institute, UK) ออกแบบไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีน SINA3 คือ SINA3 (forward) และ SINA3 (reverse) ไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีน SINAT3 คือ SINAT3 (forward) และ SINAT3 (reverse) (ตารางที่ 1)

3. การโคลนยีน SINA3 และ SINAT3 จากข้าวโพดในส่วนของยีนที่มีการแสดงออก

3.1 การสกัดอาร์เอ็นเอรวม

ตัวอย่างข้าวโพดที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ตากฟ้า 1, ตากฟ้า 3, นครสวรรค์ 3 และ นครสวรรค์ 1 เมื่ออายุได้ 45 วัน งดให้น้ำ นำมาสกัดอาร์เอ็นเอรวม โดยใช้ MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit (BIONEER Corporation) ตัดใบอ่อนของข้าวโพดประมาณ 1 - 5 มิลลิกรัม บดในโกร่งพร้อมกับไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงแป้ง ย้ายตัวอย่างลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Tissue and Cell Lysis Solution 300 ไมโครลิตร ผสมโดยการเอียงหลอดไปมาเบาๆ บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 65°C นาน 15 นาที เขย่าทุกๆ 5 นาที วางตัวอย่างบนน้ำแข็งนาน 3 – 5 นาที เติม MPC Protein Precipitation Reagent 150 ไมโครลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน นาน 10 วินาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ย้ายส่วนใสใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Isopropanol 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 30 – 40 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที เทส่วนใสออกให้หมด ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้ว ย DNaseI Solution 200 ไมโครลิตร บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 37°C นาน 10 - 30 นาที เติม MPC Protein Precipitation Reagent 200 ไมโครลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน นาน 10 วินาที วางตัวอย่างบนน้ำแข็ง นาน 3 – 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ย้ายสารละลายอาร์เอ็นเอที่ได้ลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Isopropanol 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 30 – 40 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ระวังอย่าให้ตะกอนหลุดหาย ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 75% Ethanol 300 ไมโครลิตร (ทำ 2 ครั้ง) เอา Ethanol ออกให้หมดโดยใช้ไปเปตละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย TE buffer 35 ไมโครลิตร แล้วเติม Script Guard RNase Inhibitor 1 ไมโครลิตร เพื่อยับยั้งไม่ให้ อาร์เอ็นเอถูกย่อย วัดค่าความเข้มข้น (O.D.) ของสารละลายอาร์เอ็นเอที่ได้ โดยใช้เครื่อง spectrophotometer เก็บสารละลายอาร์เอ็นเอที่ -80°C จนกว่าจะใช้งาน

3.2 การสังเคราะห์ cDNA จาก total RNA โดยวิธี RT-PCR

ทำการสังเคราะห์ cDNA จากอาร์เอ็นเอรวมของข้าวโพด โดยใช้ SuperScrip™ III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) ด้วยวิธี One-Step RT-PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน SINA3 ได้แก่ SINA3 (forward) และ SINA3 (reverse) และไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน SINAT3 ได้แก่ SINAT3 (forward) และ SINAT3 (reverse) ในปริมาตรของปฏิกิริยาพอลิเมเรสทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลาย total RNA 10 นาโนกรัม – 1 ไมโครกรัม, 10 μM Gene Specific Primer (forward), 10 μM Gene Specific Primer (reverse), 2X Reaction Mix, 2U SuperScript™III RT/Platinum Taq Mix นำปฏิกิริยาเข้า

เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม PCR (Thermal Cycle 9700) โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre-Denature 55°C 30 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94°C 2 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denature 94°C 15 วินาที, Anneal 60°C 30 วินาที, Extend 68°C 3 นาที จำนวน 40 รอบ ตามด้วยขั้นตอน 68°C 5 นาที อีก 1 รอบ หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วเก็บตัวอย่างไว้ที่ 4°C และนำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1% Agarose gel electrophoresis และเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

3.3 การโคลนยีน SINA3 และ SINAT3 เข้าสู่เวกเตอร์ และการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

นำผลผลิต PCR มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) นำมาแยกด้วย 0.8% low melting gel แล้วย้อมด้วย Gel Star (Cambrex Bio Science Rockland, Inc) จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอบนเครื่อง Dark Reader Transilluminators ใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชั่งน้ำหนักเจลที่ได้เติม QG Buffer 3 เท่าของน้ำหนักเจล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50°C นาน 1 ชั่วโมง เขย่าแรงๆ ทุก 2 นาที จนเจลละลายหมด เติม Isopropanol 1 เท่าของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากัน ย้ายสารละลายทั้งหมดใส่ใน Binding Column บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม PE Buffer 750 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ย้าย Binding Column วางลงบนหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม EB Buffer (อุ่นที่อุณหภูมิ 50 - 60°C) 30 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 15 – 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที ตรวจสอบคุณภาพด้วย 1.5% Agarose gel electrophoresis จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยา ligation โดยใช้ T&A Cloning Kit (RBC Bioscience, Taiwan) ในปริมาตรของปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย Gel-purified PCR product 4 ไมโครลิตร, T&A Cloning vector 2 ไมโครลิตร, Ligation Buffer A 1 ไมโครลิตร, Ligation Buffer B 1 ไมโครลิตร, T4 DNA Ligase 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ ผสมปฏิกิริยาทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 22°C เป็นเวลา 15 – 30 นาที และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4°C นานข้ามคืน จากนั้นทำการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบ คทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดยนำปฏิกิริยา ligation จำนวน 2 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดคอมพิเทนต์เซลล์ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และแช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไป heat – shock ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 30 วินาที (ไม่ต้องเขย่า) นำไปแช่บนน้ำแข็งทันทีเป็นเวล า 2 นาที เติม S.O.C. medium 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไป spread บนอาหารแข็ง LB (เตรียม 1 ลิตร : 10 กรัม NaCl, 10 กรัม Tryptone, 5 กรัม Yeast extract, 15 กรัม Bacto-Agar, ddH_2O) เติมสารปฏิชีวนะ amplicillin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มเพลทไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นานข้ามคืน

3.4 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ และการตรวจสอบการปรากฏของยีน

คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่มีชิ้น insert ของยีน นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ amplicillin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบ/นาที นาน 12–16 ชั่วโมง นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้ GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, USA) นำเซลล์ที่เลี้ยงไว้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ เทอาหารทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วย Resuspension Solution 250 ไมโครลิตร เขย่าให้เซลล์ละลาย เติม Lysis Solution 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดขึ้นลง 4 – 6 ครั้ง เติม Neutralization Solution 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากั น โดยกลับหลอดขึ้นลง 4 – 6 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที จากนั้นย้ายสารละลายเซลล์ลงใน GeneJET™ spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม Wash Solution 500 ไมโครลิตร เพื่อล้าง column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) ย้าย GeneJET™ spin column วางบนหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Elution Buffer 50 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้นาน 15 – 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1% agarose gel electrophoresis และเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

การตรวจสอบการปรากฏของยีน SINA3 และ SINAT3 โดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 100 – 200 นาโนกรัม, 1X FastDigest Buffer, 0.5U FastDigest Enzyme ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80°C นาน 5 นาที นำมาตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis

3.5 การวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA Sequencing)

นำตัวอย่างพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของยีน SINA3 และ SINAT3 มาเป็นต้นแบบในการวิเคราะห์ลำดับเบส โดยใช้สารเคมี ABI PRISM® BigDye® Terminator Cycle Sequencing V3.1 Kit (Perkin-Elmer) ร่วมกับไพรเมอร์ M13 (forward) 5′ – GTA AAA CGA CGG CCA GT – 3′ และ M13 (reverse) 5′ –GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG G – 3′ ในการทำปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม, BigDye™ 2 ไมโครลิตร, Ready Reaction buffer 1 ไมโครลิตร, 5 ไมโครโมล ไพรเมอร์ Forward / Reverse และ ddH_2O 3.4 ไมโครลิตร นำปฏิกิริยา cycle sequencing ที่ได้ เข้าเครื่อง Thermal Cycler 9700 โดยตั้งรอบปฏิกิริยาดังนี้ Denaturation 96°C 10 วินาที, Annealing 50°C 5 วินาที, Extention 60°C 4 นาที จำนวน 25 รอบ และ Hold ที่ 4°C infinity (α) หลังจากนั้นทำการล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน โดยนำผลผลิตที่ได้ใส่ลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Solution A (ddH_2O 16 ไมโครลิตร: 95% ethanol 64 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงทุก 5

นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0°C ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70% Ethanol 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0°C ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนแห้งในที่มืด จากนั้นละลายตะกอนด้วย Hidi-formamide 10 ไมโครลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากันในหลอด นำไปปั่นให้ดีเอ็นเอตกที่ก้นหลอด นำตัวอย่างใส่หลอด Septa บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 2 นาที และแช่ไว้บนน้ำแข็งทันที นำตัว อย่าง load เข้าเครื่อง ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบส จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าต่างๆ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปและโปรแกรมบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต

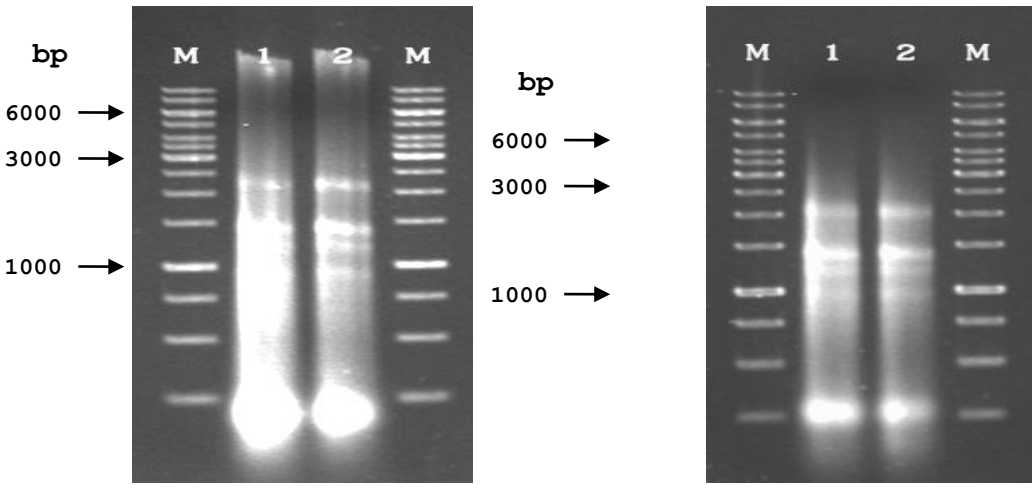
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การโคลนยีน SINA3 และ SINAT3 จากข้าวโพดในส่วนของยีนที่มีการแสดงออก

จากการโคลนยีน SINA3 และ SINAT3 ในส่วนของยีนที่มีการแสดงออก โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ บริเวณที่มีความเหมือนกันอย่างสูงที่มีรายงานในพืชชนิดต่างๆ จากฐานข้อมูลทางอินเทอร์เน็ ต NCBI สามารถออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน SINA3 คือ SINA3 (forward) และ SINA3 (reverse) และไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน SINAT3 คือ SINAT3 (forward) และ SINAT3 (reverse) (ตารางที่ 1) โดยนำไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ได้มาทำปฏิกิริยา RT – PCR กับอาร์เอ็นเอรวมของข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), ตากฟ้า 3 (TF3) (ภาพที่ 1ก), นครสวรรค์ 3 (NS3) และ นครสวรรค์ 1 (NS1) (ภาพที่ 1ข) พบว่าสามารถสังเคราะห์ยีน SINA3 และ SINAT3 จากข้าวโพดทั้ง 4 พันธุ์ ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.0 กิโลเบส (ภาพที่ 2ก และ 2ข) นำดีเอ็นเอของยีน SINA3 และ SINAT3 ที่ได้ไปเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ T&A Cloning Vector Kit และถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย DH5α คัดเลือกโคโลนีที่คาดว่ามียีน SINA3 และ SINAT3 นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (ภาพที่ 3ก และ 3ข) และตรวจสอบโคโลนีที่ได้รับการถ่ายยีนโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I พบว่า รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของยีน SINA3 และ SINAT3 ที่มีความถูกต้องจำนวน 2 แถบ ได้แก่ ขนาดประมาณ 2.7 กิโลเบส เป็นขนาดของเวกเตอร์ (Vector) และ 1.0 กิโลเบส เป็นขนาดของยีน SINA3 ตามลำดับ (ภาพที่ 4ก และ 4ข) นำพลาสมิดดีเอ็นเอโคลนที่มียีน SINA3 และ SINAT3 จากข้าวโพดทั้ง 4 พันธุ์ ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโ อไทด์ ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer พบว่า ยีน SINA3 จากข้าวโพดทั้ง 4 พันธุ์ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 1026 คู่เบส และสามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนในส่วนที่มีการแสดงออก (ORF) ของยีน SINA3 ได้จำนวน 341 amino acid (ภาพที่ 5) และ ยีน SINAT3 จากข้าวโพดทั้ง 4 พันธุ์ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 1050 คู่เบส และสามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนในส่วนที่มีการแสดงออก (ORF) ของยีน SINAT3 ได้จำนวน 349 amino acid (ภาพที่ 6)

ตารางที่ 1 แสดงคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา RT – PCR ของยีน SINA3 และ SINAT3

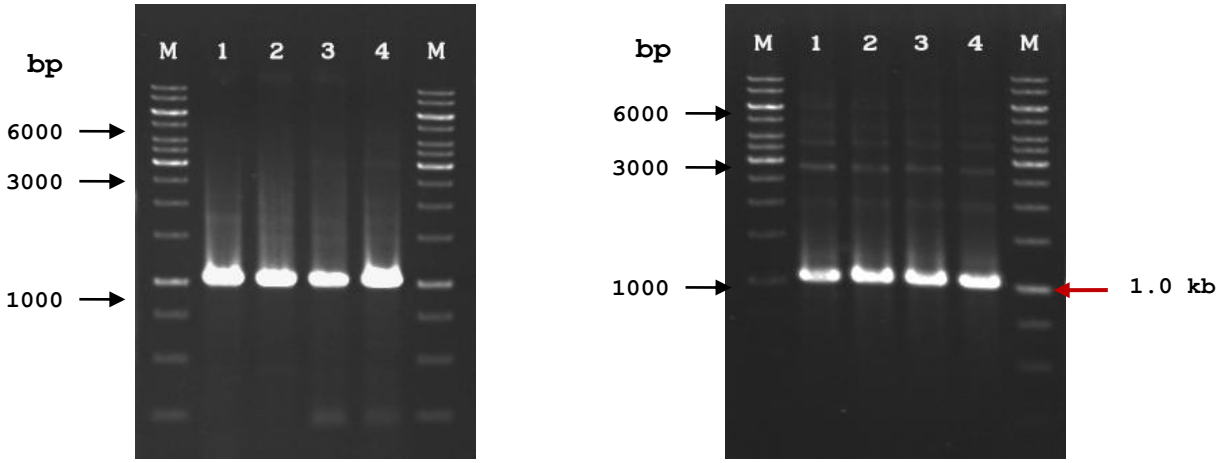
ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')	ขนาด (bp.)	อุณหภูมิ Tm (^{o}C)	GC content (%)
SINA3(forward)	ATG GAG CTG GAC AGC ATC GAG TGC ATG TCC TAC	33	71.6(55)	54.5
SINA3 (reverse)	TCA GCT GAA CAA ATT GGG AAT GCA GGC TCC TG	32	69.4(55)	50.0
SINAT3(forward)	ATG GAC ATG GAC AGG GAC AGC GTG GAG TGC CTC	33	73.2(55)	60.6
SINAT3 (reverse)	TCA GCT GCA AAG GTT AGG AAT GCA GGC TCC	30	70.4(55)	53.3



ก

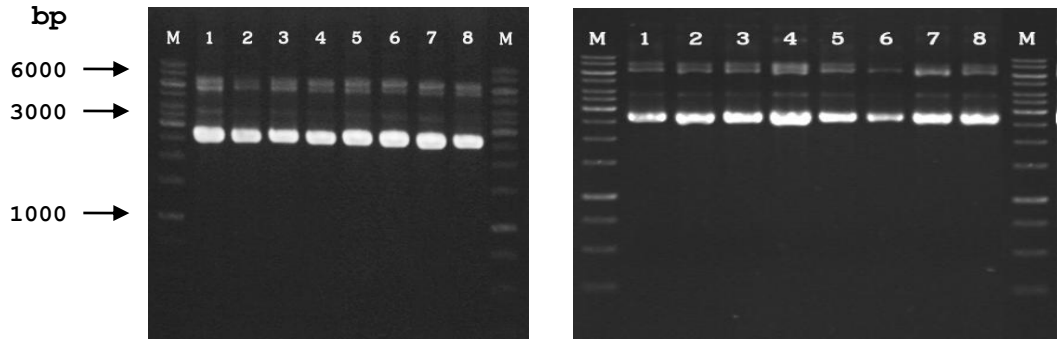
ภาพที่ 1 ก. แสดงอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้จากข้าวโพด 2 พันธุ์, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = ข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1) และ Lane 2 = ข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3)

ข. แสดงอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้จากข้าวโพด 2 พันธุ์, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 2 = ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)



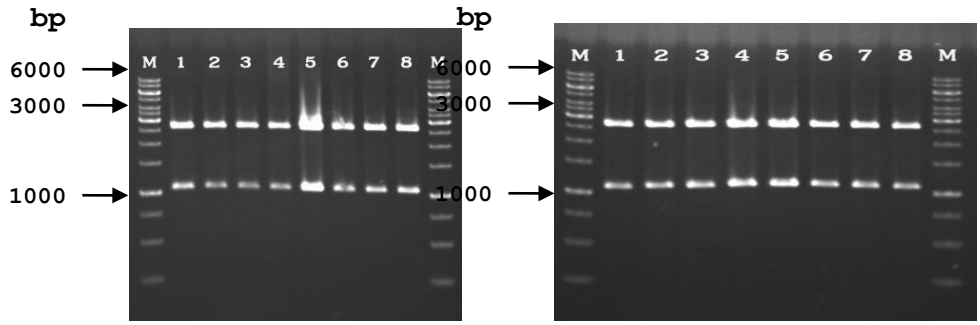
ภาพที่ 2 ก. แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน SINA3 ที่เพิ่มปริมาณได้จากข้าวโพด 4 พันธุ์ ร่วมกับคู่ไพรเมอร์ SINA3 (forward) และ SINA3 (reverse) ด้วยเทคนิค RT-PCR, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = แถบดีเอ็นเอของยีน SINA3 ในข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1(TF1), Lane 2 = แถบดีเอ็นเอของยีน SINA3 ในข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 3 = แถบดีเอ็นเอของยีน SINA3 ในข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 4 = แถบดีเอ็นเอของยีน SINA3 ในข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)

ข. แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน SINAT3 ที่เพิ่มปริมาณได้จากข้าวโพด 4 พันธุ์ ร่วมกับคู่ไพรเมอร์ SINAT3 (forward) และ SINAT3 (reverse) ด้วยเทคนิค RT-PCR, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = แถบดีเอ็นเอของยีน SINAT3 ในข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1(TF1), Lane 2 = แถบดีเอ็นเอของยีน SINAT3 ในข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 3 = แถบดีเอ็นเอของยีน SINAT3 ในข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 4 = แถบดีเอ็นเอของยีน SINAT3 ในข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)



ภาพที่ 3 ก. แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโคโลนีที่คาดว่ามียีน SINA3, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอ ข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 3-4 = แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 5-6 = แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอ ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 7-8 = แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอ ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)

ข. แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโคโลนีที่คาดว่ามียีนSINAT3, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอ ข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 3-4 = แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 5-6 = แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอ ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 7-8 = แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอ ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)



ภาพที่ 4 ก. แสดงรูปแบบของพลาสมิดดีเอ็นเอ ของยีน SINA 3 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = รูปแบบของแถบ ดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 3-4 = รูปแบบของแถบดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 5-6 = รูปแบบของแถบดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 7-8 = รูปแบบของแถบดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)

ข. แสดงรูปแบบของพลาสมิดดีเอ็นเอ ของยีน SINAT 3 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = รูปแบบของแถบ ดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 3-4 = รูปแบบของแถบดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 5-6 = รูปแบบของแถบดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 7-8 = รูปแบบของแถบดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)

```
1     atggagctggacagcatcgagtgcatgtcctactccgacagcatgggggacgacgacacc
      M  E  L  D  S  I  E  C  M  S  Y  S  D  S  M  G  D  D  D  T
61    gacgccgtcacctcgtcccagctccctcgccccttcctcaaatcctcctccaccgccggt
      D  A  V  T  S  S  Q  L  P  R  P  F  L  K  S  S  S  T  A  G
121   actgccgccgtcaacgtggtcgtcgtctccgaccgcgtcggtgccgccgggccggtagcg
      T  A  A  V  N  V  V  V  V  S  D  R  V  G  A  A  G  P  V  A
181   ggagcgggttcgctggtgatttcgccagccacgggcgtgcacgagctgctcgagtgcccc
      G  A  G  S  L  V  I  S  P  A  T  G  V  H  E  L  L  E  C  P
241   gtctgcaccaattccatgtacccgcccatccaccagtgccaaaatggtcatactctatgt
      V  C  T  N  S  M  Y  P  P  I  H  Q  C  Q  N  G  H  T  L  C
301   tccacctgcaaaactcgggtgcacaaccgctgcccaacttgtcgacaagagctaggtgac
      S  T  C  K  T  R  V  H  N  R  C  P  T  C  R  Q  E  L  G  D
361   atcaggtgtctggcattagagaaggtggctgaatcacttgagctcccctgcaaatactac
      I  R  C  L  A  L  E  K  V  A  E  S  L  E  L  P  C  K  Y  Y
421   cctcttggatgttcagaagtcttcccatactacagcaaactcaagcatgaatcacagtgt
      P  L  G  C  S  E  V  F  P  Y  Y  S  K  L  K  H  E  S  Q  C
481   aattttaggccatacaattgcccttatgctggttctgaatgctcagttgttggggatatt
      N  F  R  P  Y  N  C  P  Y  A  G  S  E  C  S  V  V  G  D  I
541   tcttttcttgtggcacatctgcgagatgatcataaagtggacatgcactctggatgtaca
      S  F  L  V  A  H  L  R  D  D  H  K  V  D  M  H  S  G  C  T
601   tttaatcaccgctatgtcgagtccaacccaagagaggttgaaaatgcaacttggatgcta
      F  N  H  R  Y  V  E  S  N  P  R  E  V  E  N  A  T  W  M  L
661   actgtttttcattgttttgggaagtactttgcttgcactttgaggcatttcagcttgga
      T  V  F  H  C  F  G  K  Y  F  C  L  H  F  E  A  F  Q  L  G
721   atggcaccagtatacatggctttcctccggtttatgggcgatgaaaatgatgctaggaac
      M  A  P  V  Y  M  A  F  L  R  F  M  G  D  E  N  D  A  R  N
781   tacagctatagtcttgaggttggtgcaaatggcaggaagatgatatgggagggaactccc
      Y  S  Y  S  L  E  V  G  A  N  G  R  K  M  I  W  E  G  T  P
841   cgcagcatccgggacagccacaggaaggttagggacagccatggtggtctaataattcag
      R  S  I  R  D  S  H  R  K  V  R  D  S  H  G  G  L  I  I  Q
901   cgcaacatggctctcttcttctcaggtggagaaaggaaagagctgaaactgcgagtcaca
      R  N  M  A  L  F  F  S  G  G  E  R  K  E  L  K  L  R  V  T
961   ggccgtatctggaaggagcagcagaatcctgactcaggagcctgcattcccaatttgttc
      G  R  I  W  K  E  Q  Q  N  P  D  S  G  A  C  I  P  N  L  F
1021  agctga
      S  -
```

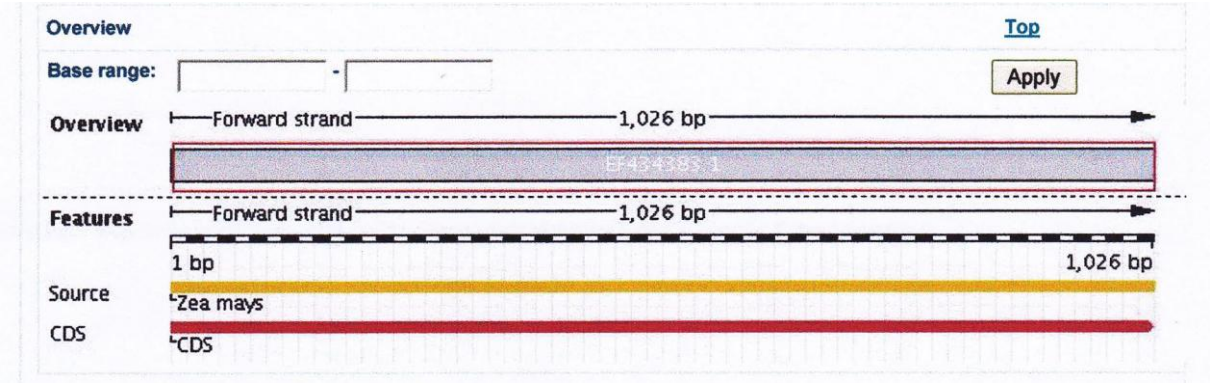
ภาพที่ 5 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโน ของยีน SINA3 ที่โคลนได้จากข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) ในส่วนที่มีการแสดงออก

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของยีน SINA3 และ SINAT3 มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างยีน โดยใช้โปรแกรม ClustalW Multiple Alignment บนอินเทอร์เน็ต พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของยีน SINA3 และ SINAT3 มีค่าความเหมือนกัน (% Identities) เท่ากับ 78 % (ภาพที่ 8) และพบว่ายีน SINA3 และ SINAT3 เป็นยีนที่อยู่ในกลุ่ม E3 ubiquitin ligase ซึ่งอยู่ในกระบวนการ ubiquitination คือ เป็นหนึ่งในกระบวนการ post-translational modification (กระบวนการดัดแปลง โปรตีนภายหลังการแปลรหัส เช่น การเติมหมู่ฟอสเฟต , การเติมหมู่น้ำ ตาล หรือโมเลกุลอื่นๆ ให้กับโปรตีน) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการพัฒนาทั้งหมดในเซลล์ eukaryotic เกิดการสร้างพันธะ covalent โดยอาศัยการเติม ubiquitin เข้าไปยังหมู่กรดอะมิโนไลซีน (lysine residue) ของโปรตีนเป้าหมาย เพื่อควบคุมความกระบวนการต่างๆ ในเซลล์ พืช เช่น ความคงตัว , การเกิดกิจกรรม และการขนส่ง เป็นต้น โดยโปรตีน E3 ubiquitin ligase เป็นกลุ่มโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการทนต่อสภาวะเครียด ซึ่ง เกี่ยวข้องโดยตรงระหว่าง กระบวนการ ubiquitin proteosome system (UPS) กับกลไกการตอบสนองต่อสภาวะความเครียดต่า งๆ โดย UPS อาจทำหน้าที่ในการรับรู้ต่อการกระตุ้นจากสิ่งเร้าภายนอกอย่างรวดเร็ว มีประสิทธิภาพ ซึ่งจะช่วยให้เซลล์ของพืชมีการปรับตัวเพื่อสามารถเจริญ เติบโตและมีชีวิตรอดได้เมื่ออยู่ในสภาวะไม่เหมาะสม (Thomann *et al.,* 2005; Sonoda *et al*., 2009; Pokhilko *et al*., 2011.)

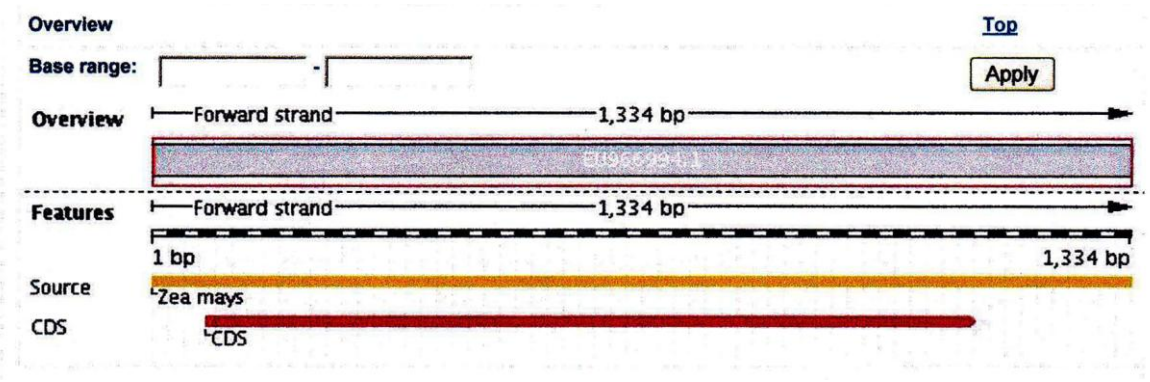
```
CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

SINA3_NS3     --MELDSIECMSYSDS-MGDDDTDAVTSS---QLP-RPFLKSSSTAGTAAVNVVVVSDRV 53
SINAT3_NS3    MDMDRDSVECLSLPDAAMDVDNVDGHPHHGHLGLPLHPAHLPSSGAGRAFPKVNAGGGGA 60
                 *: **:**:* .*: *. *:.*. .       ** :*    .** ** *  :* . .. .

SINA3_NS3     G--AAGPVAGAGSLVISPATGVHELLECPVCTNSMYPPIHQCQNGHTLCSTCKTRVHNRC 111
SINAT3_NS3    GPAVAGAAGAAGAGGGPPATSVHELLECPVCTNSMFPPIHQCQNGHTLCSTCKARVHNRC 120
              *  .**....**:    .***.**************:*****************:******

SINA3_NS3     PTCRQELGDIRCLALEKVAESLELPCKYYPLGCSEVFPYYSKLKHESQCNFRPYNCPYAG 171
SINAT3_NS3    PTCRQELGDIRCLALEKVAESLELPCKYCSLGCPEIFPYYSKIKHEAQCSFRPYNCPYAG 180
              ***************************** .***.*:******:***:**.**********

SINA3_NS3     SECSVVGDISFLVAHLRDDHKVDMHSGCTFNHRYVESNPREVENATWMLTVFHCFGKYFC 231
SINAT3_NS3    SECAVAGDIPFLVAHLRDDHKVDMHSGCTFNHRYVKSNPREVENATWMLTVFHCFGQYFC 240
              ***:*.***.************************:*******************:***

SINA3_NS3     LHFEAFQLGMAPVYMAFLRFMGDENDARNYSYSLEVGANGRKMIWEGTPRSIRDSHRKVR 291
SINAT3_NS3    LHFEAFQLGMAPVYMAFLRFMGDENEARNYTYSLEVGGNGRKMVWEGTPRSIRDSHRKVR 300
              *************************:****:******.*****:****************

SINA3_NS3     DSHGGLIIQRNMALFFSGGERKELKLRVTGRIWKEQQNPDSGACIPNLFS 341
SINAT3_NS3    DSHDGLIIQRNMALFFSGGDRKELKLKVTGRIWKEQTNPD-GACIPNLCS 349
              ***.***************:******:********* *** ******* *
```

เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์โครงสร้างของยีน โดยใช้โปรแกรม EMBL – EBI database บนอินเทอร์เน็ต พบว่า ยีน SINA3 และ SINAT3 มีส่วนประกอบครบทั้งยีน ซึ่งประกอบด้วย ลำดับเบสส่วนที่มีการแสดงออกของยีน open reading frame (ORF) หรือ coding sequence (CDS) ของยีน SINA3 ขนาด 1026 คู่เบส มีจำนวน 1 exon (ภาพที่ 7) และของยีน SINAT3 ขนาด 1050 คู่เบส มีจำนวน 1 exon (ภาพที่ 8) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน SINA3 ที่ได้มีความเหมือนอ ย่างสูงกับยีน ในกลุ่ม E3 ubiquitin protein ligase ที่พบในข้าวโพด (*Zea mays* L.) (EF434383.1) (ภาพผนวกที่ 1) และข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italic* (L.) Baeuv.) (XM004952220.1) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 99% และ 90% ตามลำดับ (ตารางที่ 2) และลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน SINAT3 ที่ได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน E3 ubiquitin protein ligase ที่พบในข้าวโพด (*Zea mays* L.) (EU966994.1) (ภาพผนวกที่ 2) และข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italic* (L.) Baeuv.) (XM004960614.1) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 99% และ 90% ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์โครงสร้างของยีน โดยใช้โปรแกรม EMBL – EBI database บนอินเทอร์เน็ต พบว่า ยีน SINA3 และ SINAT3 มีส่วนประกอบครบทั้งยีน ซึ่งประกอบด้วย ลำดับเบสส่วนที่มีการแสดงออกของยีน open reading frame (ORF) หรือ coding sequence (CDS) ของยีน SINA3 ขนาด 1026 คู่เบส มีจำนวน 1 exon (ภาพที่ 7) และของยีน SINAT3 ขนาด 1050 คู่เบส มีจำนวน 1 exon (ภาพที่ 8) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน SINA3 ที่ได้มีความเหมือนอย่ างสูงกับยีน ในกลุ่ม E3 ubiquitin protein ligase ที่พบในข้าวโพด (*Zea mays* L.) (EF434383.1) (ภาพผนวกที่ 1) และข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italic* (L.) Baeuv.) (XM004952220.1) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 99% และ 90% ตามลำดับ (ตารางที่ 2) และลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน SINAT3 ที่ได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน E3 ubiquitin protein ligase ที่พบในข้าวโพด (*Zea mays* L.) (EU966994.1) (ภาพผนวกที่ 2) และข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italic* (L.) Baeuv.) (XM004960614.1) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 99% และ 90% ตามลำดับ (ตารางที่ 3)



ภาพที่ 7 โครงสร้างของยีน SINA3 ในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน coding sequence (CDS) มีขนาด 1026 คู่เบส
(แถบลูกศรสีแดง) วิเคราะห์โดยโปรแกรม EMBL-EBI database.



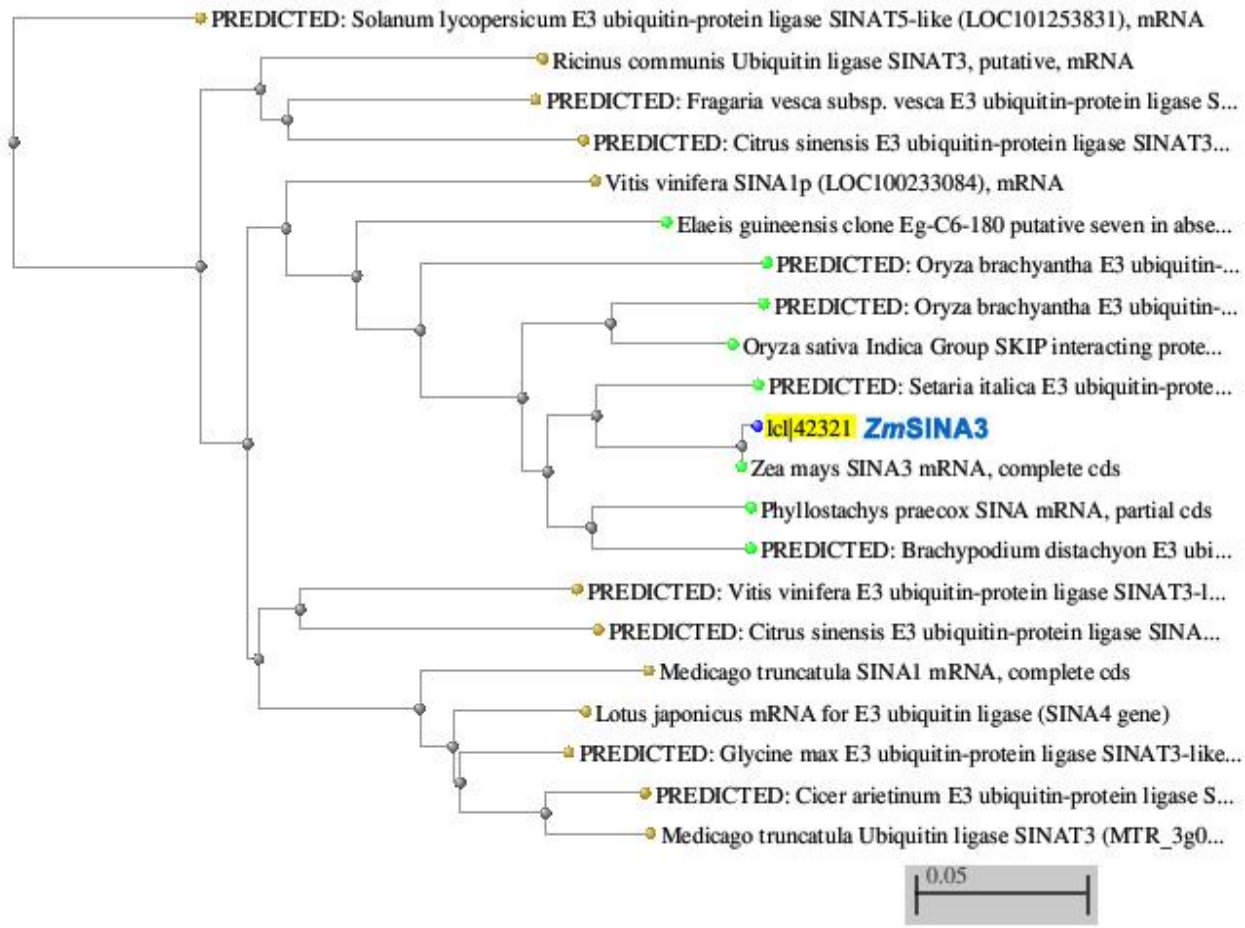
ภาพที่ 8 โครงสร้างของยีน SINAT3 ในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน coding sequence (CDS) มีขนาด 1050 คู่เบส (แถบลูกศรสีแดง) วิเคราะห์โดยโปรแกรม EMBL-EBI database.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Identities	Accession
Zea mays SINA3 mRNA, complete cds	1950	1950	100%	0.0	99%	EF434383.1
Setaria italica E3 ubiquitin-protein ligase SINAT4-like (LOC101753703), mRNA	1367	1367	100%	0.0	90%	XM004952220.1
Brachypodium distachyon E3 ubiquitin-protein ligase SINAT5-like (LOC100826252), mRNA	1029	1106	90%	0.0	89%	XM003572636.1
Phyllostachys praecox SINA mRNA, partial cds	1038	1038	79%	0.0	89%	DQ013805.1
Oryza brachyantha E3 ubiquitin-protein ligase SINAT3-like (LOC102707930), mRNA	952	1030	94%	0.0	87%	XM006647122.1

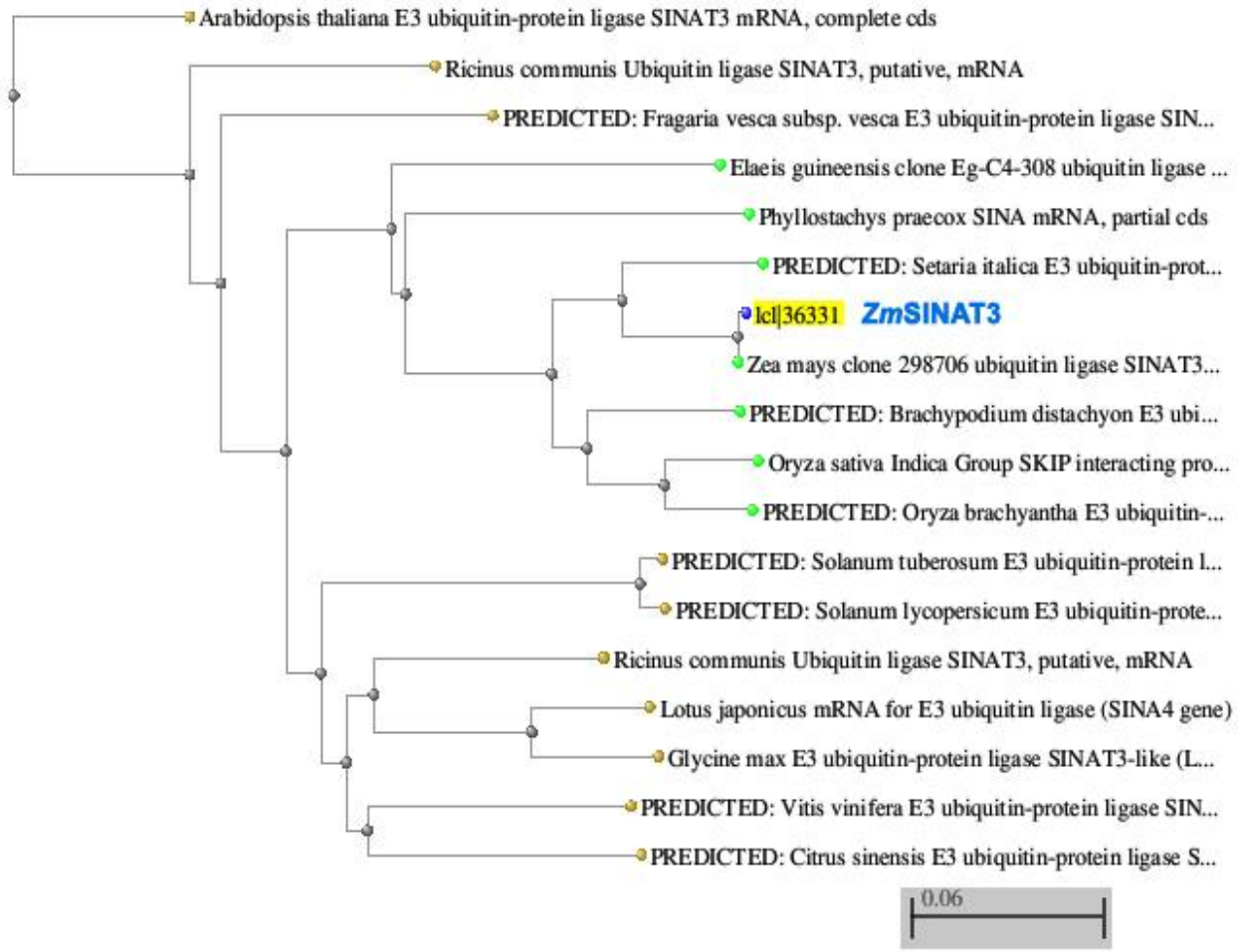
ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน SINAT3 ที่โคลนได้จากข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) กับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank บนอินเทอร์เน็ตโปรแกรม www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Identities	Accession
Zea mays clone 298706 ubiquitin ligase SINAT3 mRNA, complete cds	1880	1880	100%	0.0	99%	EU966994.1
Setaria italica E3 ubiquitin-protein ligase SINAT3-like (LOC101763752), mRNA	1385	1385	99%	0.0	90%	XM004960614.1
Brachypodium distachyon E3 ubiquitin-protein ligase SINAT3-like (LOC100822426), mRNA	1148	1148	99%	0.0	86%	XM003566357.1
Oryza brachyantha E3 ubiquitin-protein ligase SINAT3-like (LOC102711436), partial	1079	1079	79%	0.0	89%	XM006655063.1
Phyllostachys praecox SINA mRNA, partial cds	687	687	77%	0.0	81%	DQ013805.1

เมื่อนำข้อมูลยีน SINA3 และ SINAT3 จากข้าวโพดมาศึกษาความสัมพันธ์กับยีน ชนิดเดียวกันในพืช ชนิดต่างๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/treeView.cgi) พบว่า ยีน SINA3 และ SINAT3 ที่สังเคราะห์ได้จาก ข้าวโพด (*Zea mays* L.) มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับพืชในกลุ่มใบเลี้ยงเดี่ยว คือ ข้าวโพด (*Zea may* L.) ข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italica* (L.) Beauv.) และพืชตระกูลหญ้า (*Brachypodium distachyon*) มากกว่าพืชในกลุ่มใบเลี้ยงคู่ (ภาพที่ 9 และ ภาพที่ 10)



ภาพที่ 9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างยีน SINA3 ที่โคลนได้จากข้าวโพด เปรียบเทียบกับพืชชนิดต่างๆ โดยใช้โปรแกรม www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/treeView.cgi



ภาพที่ 10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างยีน SINAT3 ที่โคลนได้จากข้าวโพด เปรียบเทียบกับพืชชนิดต่างๆ โดยใช้โปรแกรม www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/treeView.cgi

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. การโคลนยีน SINA3 และ SINAT3 ในส่วนของยีนที่มีการแสดงออกจากอาร์เอ็นเอรวมของข้าวโพดทั้ง 4 พันธุ์ ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่า ยีน SINA3 ที่สังเคราะห์ได้มีขนาด 1026 คู่เบส และยีน SINAT3 ที่สังเคราะห์ได้มีขนาด 1050 คู่เบส เมื่อนำไปวิเคราะห์โครงสร้างของยีนด้วยโปรแกรม EMBL-EBI database บนอินเทอร์เน็ต พบว่า ยีนที่โคลนได้มีส่วนประกอบครบทั้งยีน และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปแปลรหัสเป็นโปรตีน พบว่า ยีน SINA3 สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ จำนวน 341 amino acid และ ยีน SINAT3 สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนได้จำนวน 349 amino acid

2. เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน SINA3 และ SINAT3 ไปเปรียบเทียบกับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ยีน SINA3 มีความเหมือนอย่างสูงกับยีนในกลุ่ม E3 ubiquitin protein ligase ที่พบในข้าวโพด และข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italic* (L.) Baeuv.) (XM004952220.1)

โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 99% และ 90% ตามลำดับ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน SINAT3 ที่ได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน E3 ubiquitin protein ligase ที่พบในข้าวโพด และข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italic* (L.) Baeuv.) (XM004960614.1) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 99% และ 90% ตามลำดับ

3. ยีน SINA3 และ SINAT3 ที่โคลนได้จากข้าวโพด จะนำไปสร้างเป็นชุด cassette ยีน สำหรับถ่ายฝากเข้าสู่พืชต้นแบบ เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ภาวะโลกร้อน. 2555. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: http://www.baanjomyut.com/library/global_warming. 9 มีนาคม 2555.

Ingram, J. and D. Bartels. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Biol*. 47: 377 – 403.

Pokhilko, A., J.A. Ramos, H. Holtan, D.R. Maszle, R. Khanna and A.J. Millar. 2011. Ubiquitin ligase switch in plant photomorphogenesis: a hypothesis. *Journal of Theoretical Biology*. 270: 31–41.

Shinozaki, K. and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2000. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signalling pathways. *Curr Opin Plant Biol*. 3: 217 – 223.

Smirnoff, N. 1998. Plant resistance to environmental stress. *Curr Opin Biotech.* 9: 214 – 219.

Sonoda, Y., K. Sako, Y. Maki, N. Yamazaki, H. Yamamoto, A. Ikeda and J. Yamaguchi. 2009. Regulation of leaf organ size by the Arabidopsis RPT2a 19S proteasome subunit. *The Plant Journal*. 60: 68–78.

Thomann, A., V. Brukhin, M. Dieterle, J. Gheyeselinck, M. Vantard, U. Grossniklaus and P. Genschik. 2005. Arabidopsis CUL3A and CUL3B genes are essential for normal embryogenesis. *The Plant Journal.* 43: 437–448.

Vierling, E. 1991. The roles of heat-shock proteins in plants. *Annu Rev Plant Biol*. 42: 579 – 620.

Zea mays SINA3 mRNA, complete cds

Sequence ID: gb|EF434383.1| Length: 1026 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 1026 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1833 bits(2032)	0.0	1022/1026(99%)	0/1026(0%)	Plus/Plus

```
Query  1     ATGGAGCTGGACAGCATCGAGTGCATGTCCTACTCCGACAGCATGGGGGACGACGACACC  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1     ATGGAGCTGGACAGCATCGAGTGCATGTCCTACTCCGACAGCATGGGGGACGACGACACC  60

Query  61    GACGCCGTCACCTCGTCCCAGCTCCCTCGCCCCTTCCTCAAATCCTCCTCCACCGCCGGT  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  61    GACGCCGTCACCTCGTCCCAGCTCCCTCGCCCCTTCCTCAAATCCTCCTCCACCGCCGGT  120

Query  121   ACTGCCGCCGTCAACGTGGTCGTCGTCTCCGACCGCGTCGGTGCCGCCGGGCCGGTAGCG  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  121   ACTGCCGCCGTCAACGTGGTCGTCGTCTCCGACCGCGTCGGTGCCGCCGGGCCGGTAGCG  180

Query  181   GGAGCGGGTTCGCTGGTGATTTCGCCAGCCACGGGCGTGCACGAGCTGCTCGAGTGCCCC  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  181   GGAGCGGGTTCGCTGGTGATTTCGCCAGCCACGGGCGTGCACGAGCTGCTCGAGTGCCCC  240

Query  241   GTCTGCACCAATTCCATGTACCCGCCCATCCACCAGTGCCAAAATGGTCATACTCTATGT  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  241   GTCTGCACCAATTCCATGTACCCGCCCATCCACCAGTGCCAAAATGGTCATACTCTATGT  300

Query  301   TCCACCTGCAAAACTCGGGTGCACAACCGCTGCCCAACTTGTCGACAAGAGCTAGGTGAC  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  301   TCCACCTGCAAAACTCGGGTGCACAACCGCTGCCCAACTTGTCGACAAGAGCTAGGTGAC  360

Query  421   CCTCTTGGATGTTCAGAAGTCTTCCCATACTACAGCAAACTCAAGCATGAATCACAGTGT  480
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  421   TCTCTTGGATGTTCAGAAGTCTTCCCATACTACAGCAAACTCAAGCATGAATCACAGTGT  480

Query  481   AATTTTAGGCCATACAATTGCCCTTATGCTGGTTCTGAATGCTCAGTTGTTGGGGATATT  540
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  481   AATTTTAGGCCATACAATTGCCCTTATGCTGGTTCTGAATGCTCAGTTGTTGGGGATATT  540

Query  541   TCTTTTCTTGTGGCACATCTGCGAGATGATCATAAAGTGGACATGCACTCTGGATGTACA  600
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  541   TCTTTTCTTGTGGCACATCTGCGAGATGATCATAAAGTGGACATGCACTCTGGATGTACA  600

Query  601   TTTAATCACCGCTATGTCGAGTCCAACCCAAGAGAGGTTGAAAATGCAACTTGGATGCTA  660
             |||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  601   TTTAATCACCGCTATGTCAAGTCCAACCCAAGAGAGGTTGAAAATGCAACTTGGATGCTA  660

Query  661   ACTGTTTTTCATTGTTTTGGGAAGTACTTTTGCTTGCACTTTGAGGCATTTCAGCTTGGA  720
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  661   ACTGTTTTTCATTGTTTTGGGAAGTACTTTTGCTTGCACTTTGAGGCATTTCAGCTTGGA  720

Query  721   ATGGCACCAGTATACATGGCTTTCCTCCGGTTTATGGGCGATGAAAATGATGCTAGGAAC  780
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  721   ATGGCACCAGTATACATGGCTTTCCTCCGGTTTATGGGCGATGAAAATGATGCTAGGAAC  780

Query  781   TACAGCTATAGTCTTGAGGTTGGTGCAAATGGCAGGAAGATGATATGGGAGGGAACTCCC  840
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  781   TACAGCTATAGTCTTGAGGTTGGTGCAAATGGCAGGAAGATGATATGGGAGGGAACTCCC  840

Query  841   CGCAGCATCCGGGACAGCCACAGGAAGGTTAGGGACAGCCATGGTGGTCTAATAATTCAG  900
             |||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||
Sbjct  841   CGCAGCATCCGGGACAGCCACCGGAAGGTTAGGGACAGCCATGATGGTCTAATAATTCAG  900

Query  901   CGCAACATGGCTCTCTTCTTCTCAGGTGGAGAAAGGAAAGAGCTGAAACTGCGAGTCACA  960
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  901   CGCAACATGGCTCTCTTCTTCTCAGGTGGAGAAAGGAAAGAGCTGAAACTGCGAGTCACA  960

Query  961   GGCCGTATCTGGAAGGAGCAGCAGAATCCTGACTCAGGAGCCTGCATTCCCAATTTGTTC  1020
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  961   GGCCGTATCTGGAAGGAGCAGCAGAATCCTGACTCAGGAGCCTGCATTCCCAATTTGTTC  1020

Query  1021  AGCTGA  1026
              ||||||
Sbjct  1021  AGCTGA  1026
```

ภาพผนวกที่ 1 การวิเคราะห์ alignment ระหว่างลำดับเบสของยีน SINA3 ของข้าวโพดที่ accession number EF434383.1 กับ ลำดับเบสของยีน SINA3 ที่โคลนได้จากข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3)

ภาพผนวกที่ 2 การวิเคราะห์ alignment ระหว่างลำดับเบสของยีน SINAT3 ของข้าวโพด ที่ accession number EU966994.1 กับ ลำดับเบสของยีน SINAT3 ที่โคลนได้จากข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3)

การทดลองที่ 2 การโคลนยีน Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H)จากอัญชัน และ พิทูเนีย

Cloning of Flavonoid 3',5' hydroxylase Gene from Butterfly Pea and Petunia.

ผู้วิจัย นางสาวกุหลาบ คงทอง
ผู้ร่วมวิจัย นายประสาน สืบสุข
นางสาวจีราพร แก่นทรัพย์

บทคัดย่อ

ยีน *Flavonoid 3',5' hydroxylase* (*F3'5'H*) เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มรงควัตถุแอนโทไซยานินสีน้ำเงินหรือสีม่วง ในงานวิจัยนี้ได้ทำการโคลนยีน *F3'5'H* ที่จากดอกอัญชัน และพิทูเนีย สีน้ำเงิน โดยทำการสืบค้นข้อมูลออกแบบไพรเมอร์และเพิ่มปริมาณยีน *F3'5'H* จากดอก อัญชันและพิทูเนีย พบว่ายีนที่โคลนได้มี ขนาด 1,739 และ 1852 bp. ตามลำดับ สามารถสร้างชุดยีน pMDC32- *F3'5'H*. และโดยนำยีน *F3'5'H* ที่โคลนได้เข้าสู่เวคเตอร์ pDONR 221 เพื่อนำยีนเข้าสู่เวคเตอร์แบบไบนารี่ pMDC32 แล้วทำการถ่ายฝากเข้าสู่ยาสูบพันธุ์แซนเทียร์โดยใช้อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 คัดเลือกต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนโดยเลี้ยงในอาหารที่เติม hygromycin และตรวจสอบต้นยาสูบที่ได้รับการคัดเลือกด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ พบว่าการถ่ายฝากยีน *F3'5'H* เข้าสู่ยาสูบประสบผลสำเร็จ ต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *F3'5'H* ดอกจะมีสีม่วงชมพู ส่วนต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายฝากยีนดอกจะมีสีขาวอมชมพู ยีน *F3'5'H* นี้สามารถนำมาใช้ถ่ายฝากสู่ไม้ดอกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเพื่อปรับแต่งสีดอกให้มีความหลากหลายมากขึ้นในโอกาสต่อไป

ABSTRACT

Flavonoid 3',5' hydroxylase (*F3'5'H*) gene is involved in flavonoid pathway leading to the production of the blue or purple-colored anthocyanins. In this study, *F3'5'H* was cloned from *Clitoria ternatea* and *Petunia hybrida* into binary vector, pMDC32, generating pMDC32- *F3'5'H*. The pMDC32- *F3'5'H* was introduced into the *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404. *Nicotiana tabacum cv. Xanthi* transformation was performed using the *A. tumefaciens*. The transformed *N. tabacum* was selected on media containing hygromycin. The transgenic *N. tabacum* plants were

subjected to PCR analysis using specific primers. The results showed that the transformation of *F3'5'H* into *N. tabacum* was successful. The transgenic *N. tabacum* flowers displayed light purple or pink color while non-transgenic *N. tabacum* flowers was pinky white. *F3'5'H* cloned in this study will be useful in modification of flower colors in economically important flowering-plants.

คำนำ

ประเทศไทยผลิตไม้ดอกเพื่อใช้ภายในประเทศ และการส่งออกทำรายได้เข้าประเทศเป็นจำนวนมากในแต่ละปี และมีแนวโน้มจะขยายตัวเพิ่มขึ้น เนื่องจากตลาดไม้ดอกเป็นตลาดที่มีผู้ค้าจำนวนมาก มีการแข่งขันสูง ดังนั้นการพัฒนาศักยภาพการผลิตไม้ดอกเพื่อส่งออกจึงเป็นสิ่งจำเป็น ผู้ผลิตต้องเอาใจใส่และตอบสนองความต้องการของลูกค้าในทุกรูปแบบ ปัจจุบันลูกค้าให้ความสำคัญกับสีสันของดอกไม้เป็นอันดับแรก ผู้ผลิตจึงต้องสร้างความแปลกใหม่ในตัวสินค้า เพื่อรักษาและเพิ่มส่วนแบ่งการตลาดให้ได้มากที่สุด ซึ่งวิธีสร้างความหลากหลายด้านสีดอกเป็นแนวทาง หนึ่งที่สามารถตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค แนวทางการสร้างสายพันธุ์ใหม่ให้มีดอกสีสรรโดดเด่น แปลกใหม่ สวยงาม มีความหลากหลายของสีดอก และมีโทนสีที่ไม่เคยปรากฏในธรรมชาตินั้น สามารถกระทำได้โดยใช้เทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรม ซึ่งเป็นการนำการวิจัยทางชีวโมเลกุลมาประ ยุกต์ใช้ร่วมกับงานด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชสมัยใหม่ ที่สามารถนำยีนควบคุมการเกิดสีดอกจากไม้ดอกชนิดอื่นที่มีโทนสีตามต้องการ ส่งถ่ายเข้าไปสู่ไม้ดอกที่สำคัญหรือยับยั้งการแสดงออกของยีนที่มีอยู่ ในต่างประเทศมีการทำการวิจัยอย่างจริงจังเกี่ยวกับปัจจัยในการควบคุมสี โดยยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ควบคุมการเกิดสีในวัฏจักรการสังเคราะห์รงควัตถุ anthocyanin เป็นยีนที่ได้รับความสนใจมาก มีเอนไซม์ที่ควบคุมการสร้าง pelargonidin cyanidin และ delphinidin ซึ่งเป็นรงควัตถุให้สีส้ม แดง และสีน้ำเงินตามลำดับ (ปิยะศักดิ์ 2542, Brugliera *et al*.1999, Eric *et al*.2001) ยีนเหล่านี้สามารถแยกได้จากดอกไม้สีต่างๆ และถ่ายสู่พืชในวัฏจักรที่ขาดยีนในกลุ่มดังกล่าวได้โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม บทบาทของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนสร้างรงควัตถุในวัฏจักร anthocyanin มีความสำคัญยิ่งกับสีของดอกไม้ การวิจัยเชิงลึกชี้ย้ำถึงบทบาทและหน้าที่ของยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง และความสำคัญในการพัฒนาสีแต่ละสีของดอกไม้ ความรู้พื้นฐานนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในวงกว้างกับไม้ดอกหลายชนิด ทำให้ได้รับความสนใจศึกษากันมาก (Biolley *et a*l.1994; Holton and Cornish 1995; Mol *et al*.1988; Kaltenback *et al*. 1999) มีงานวิจัยเพื่อปรับปรุงพันธุ์ไม้ดอกให้มีสีสันสวยงามเป็นจำนวนมาก พบว่าสีของดอกไม้ส่วนใหญ่เกิดจากพืชสะสม anthocyanin (Katsumoto *et al*.,2007) เช่นTanaka and Ohmiya (2008) สามารถเปลี่ยนดอกกุหลาบสีแดง ให้เป็นสีม่วงได้ โดยเพิ่ มการแสดงออกของยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ F3'5'H จากดอก Pansy เป็นต้น *Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H)* เป็นเอนไซม์หลักที่สำคัญในกระบวนสร้างรงควัตถุในวัฏจักร anthocyanin ในส่วนที่ควบคุมให้ดอกไม้เกิดสีน้ำเงินและม่วง โดยเปลี่ยน

Dihydrokaempferol (DHK) เป็น Dihydromyricetin (DHM) และนำไปสู่การสร้างสารประกอบ Delphinidin ซึ่งทำให้ดอกไม้มีสีน้ำเงินและม่วง (Katsumoto et al.,2007,He *et al*.,2013)

อัญชันและพิทูเนียเป็นพืชที่มีดอกสีน้ำเงิน มีการสังเคราะห์สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มรงควัตถุแอนโทไซยานินสีน้ำเงินค่อนข้างสูง ซึ่งรงควัตถุดังกล่าวจะเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์จากยีน *F3' 5'H* งานวิจัยนี้ได้โคลนยีน *F3' 5'H* จาก cDNA ของดอกอัญชันและพิทูเนียสีน้ำเงิน และนำยีนที่โคลนได้เข้าสู่เวคเตอร์แบบไบนารี่ pMDC32 เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ไม้ดอกชนิดต่างๆ ซึ่งก่อนจะนำยีนที่โคลนได้ไปใช้นั้นจะต้องมีการตรวจสอบเพื่อให้ทราบผลของยีน *F3' 5'H* ที่ทำให้สีของดอกเปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นจึงทำการถ่ายฝากยีน *Flavonoid 3',5' hydroxylase* จากอัญชันเข้าสู่ยาสูบดอกสีขาวอมชมพู เพื่อดูผลของยีน *F3' 5'H* จากดอกอัญชันที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงสีดอกของยาสูบ และสามารถประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ โดยการนำมาใช้ถ่ายฝากยีนสู่ไม้ดอกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเพื่อปรับแต่งสีดอกให้มีความหลากหลายมากขึ้นในโอกาสต่อไป

7. วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

อุปกรณ์

สารเคมีสำหรับใช้ในงานเครื่องหมายโมเลกุล

1. อัญชันดอกสีน้ำเงิน และดอกพิทูเนีย
2. ยาสูบพันธุ์ แซนเทียร์ (ดอกสีขาวอมชมพู)
3. Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma)
4. DNase I Amplification Grade (Invitrogen life technology)
5. SuperScrip III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen life technology)
6. QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)
7. pGEM-T Easy Vector System (Promega)
8. BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Appliedbiosystems)
9. สารปฏิชีวนะ เช่น ampicillin cefotaxime hygromycin
10. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย
11. เชื้อแบคทีเรีย Escherichia coli สายพันธุ์ JM109
12. เวคเตอร์ pDONR 221 (invitrogen)
13. pMDC32 binary vector
14. เครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอนความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (SORVALL RC28C)
15. เครื่องมือวัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D.) เครื่อง spectrophotometer
16. ชุดถ่ายภาพเจลและประมวลผล Gel documentation (BIORAD)

17. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (GeneAmp PCR System 9700)
18. เครื่องวิเคราะห์ลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรม (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer)
19. เครื่องมือสำหรับงานถ่ายยีน BTX Electroporation System รุ่น ELECTRO CELL MANIPULATOR 600 ,Electroporation cuvette ขนาด 0.2 มิลลิลิตร
20. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย
21. เชื้อแบคทีเรีย Escherichia coli สายพันธุ์ JM109
22. เวคเตอร์ pDONR 221 (invitrogen)
23. pMDC32 binary vector
24. เครื่องมือ และสารเคมีอื่น ๆ สำหรับงานชีวโมเลกุล

วิธีการทดลอง

การโคลนยีน

1. การสืบค้นข้อมูลยีน และออกแบบไพรเมอร์

สืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์ *Flavonoid 3',5' hydroxylase* (*F3'5'H*) ของดอกอัญชันและดอกพิทูเนียสีน้ำเงิน ที่มีรายงานในฐานข้อมูลสาธารณะ NCBI นำข้อมูลลำดับเบสที่ได้มาวิเคราะห์หาตำแหน่งที่เหมาะ สมในการออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้ โปรแกรม Vector NTI (ชนิดระบุระยะเวลาการใช้งาน) เพื่อโคลนยีน *F3'5'H*

2. การโคลนชิ้นส่วนของยีน *F3'5'H* จากดอกอัญชันและพิทูเนีย

2.1 การสกัด Total RNA

นำตัวอย่างดอกหน้าอัญชันและพิทูเนียในระยะเริ่มเกิดสีน้ำเงิน มาตัดดอกเป็นชิ้นเล็ก ๆ น้ำหนัก 100 มิลลิกรัมด้วยมีดผ่าตัดที่ปลอดเชื้อ และนำมาสกัด Total RNA ตามวิธีการของ Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma) นำสารละลาย Total RNA ที่ได้ไปหาปริมาณและความบริสุทธิ์ของ RNA โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer และตรวจสอบดูแถบ RNA ด้วย 1.5% Agarose gel electrophoresis ที่ย้อมด้วย GelStar แล้วนำไปใช้หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –80 $^{\circ}$C เพื่อนำไปใช้ต่อไป

2.2 การสังเคราะห์สาย cDNA และเพิ่มปริมาณยีน *F3'5'H* การสังเคราะห์สาย cDNA จาก mRNA ของยีน *F3'5'H* ด้วยเทคนิค RT-PCR นั้น จะต้องทำการกำจัด ดีเอ็นเอที่อาจจะปะปนอยู่ใน Total RNA ก่อน โดยใช้ DNase I Amplification Grade (Invitrogen life technology)

ทำการสังเคราะห์สาย cDNA จาก Total RNA ของดอกอัญชันและพิทูเนียโดยใช้ SuperScrip III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen life technology) ที่มีการเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา RNA/primer mixture ในหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยTotal RNA 1 ไมโครลิตร, Oligo(dT)20 primer 1ไมโครลิตร, 10mM dNTP mix 1ไมโครลิตร, DEPC-

treated water 7 ไมโครลิตร รวมปริมาตร10 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C นาน 5 นาที และนำไปไว้ในน้ำแข็งทันทีอย่างน้อยเป็นเวลานาน 1 นาที ในระหว่างนั้นให้เตรียมส่วนผสม cDNA Synthesis mix ซึ่งส่วนผสมประกอบด้วย 10xRTbuffer 2 ไมโครลิตร, 25 mM $MgCl_2$ 4 ไมโครลิตร, 0.1M DTT 2 ไมโครลิตร, RNaseOUT (40 U/ul) 1 ไมโครลิตร, SuperScrip III RT (200 U/ul) 1 ไมโครลิตร

เติม cDNA Synthesis mix ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงใน RNA/primer mixture ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เวลานาน 50 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 85 °C นาน 5 นาที จากนั้นในไปแช่ในน้ำแข็งทันที เติม RNase H ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 20 นาที หลังจากนั้นสามารถนำปฏิกิริยา cDNA Synthesis ไปใช้ทันทีหรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ- 20 °C เพื่อไปใช้ทำพีซีอาร์ต่อไป

การเพิ่มปริมาณยีน *F3'5'H* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยการเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาในหลอดพีซีอาร์ ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย 10X PCR Buffer 2 ไมโครลิตร, 10mM dNTP 0.4 ไมโครลิตร, 50 mM $MgCl_2$ 0.6 ไมโครลิตร,5 uM Forward Primer (*F3'5'H*) 2 ไมโครลิตร , 5 uM Reverse Primer (*F3'5'H*) 2 ไมโครลิตร, cDNA Template 1ไมโครลิตร, 5 U/ul Platinum *Taq* DNA Polymerase 0.2 ไมโครลิตร, DEPC-treated water11.8 ไมโครลิตร รวมปริมาตร 20ไมโครลิตร

จากนั้นผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง ที่กำหนดสภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

94 °C 2 นาที 1 รอบ

94 °C 1 นาที
55 °C 1 นาที } 35 รอบ
72 °C 2 นาที

72 °C 10 นาที 1 รอบ

จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ผลโดยใช้ 2 % Agarose gel electrophoresis แล้วย้อมเจลด้วยสารละลาย Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel documentation พร้อมบันทึกภาพ

2.3 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

นำชิ้นดีเอ็นเอของยีน *F3'5'H* ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ มาแยกด้วย 1.5 % Agarose gel electrophoresis แล้วย้อมด้วย gel star (Cambrex) และตรวจดูแถบดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Dark Reader transilluminators และตัดแถบดีเอ็นเอเป้าหมายมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) แล้วนำสารละลายดีเอ็นเอไปตรวจสอบด้วย 1% Agarose gel electrophoresis เก็บชิ้นดีเอ็นเอที่แยกได้ที่ –20 °C เพื่อนำไปเชื่อมต่อกับเวคเตอร์พาหะต่อไป

2.4 การเชื่อมต่อชิ้นยีน *F3'5'H* เข้ากับเวคเตอร์ และถ่ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับเวคเตอร์ ใช้ pGEM-T Easy Vector System (Promega) โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 2x Rapid ligation buffer, T4 DNA ligase 2.5 ไมโครลิตร, pGEM-T Easy Vector (50ng) 0.5ไมโครลิตร, PCR product 1.5 ไมโครลิตร T4 DNA ligase 0.5 ไมโครลิตร

ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือนำปฏิกิริยาที่ได้ไปเก็บที่ 4 °C นานข้ามคืน นำสารละลายที่ได้ไปใช้ในขั้นตอนส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่แบคทีเรีย โดยนำยีน *F3'5'H* ที่เชื่อมต่อกับเวคเตอร์เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย โดยการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าเชื้อ *Escherichia coli* JM109 (Promega) มีขั้นตอนการดำเนินงานดังนี้

1. ดูดสารละลายในปฏิกิริยาการเชื่อมต่อชิ้นยีน *F3'5'H* เข้ากับเวคเตอร์ (ligation) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร ที่อยู่ในน้ำแข็ง

2. นำ competent cell JM109 ออกจากตู้ -80 °C มาไว้ในน้ำแข็งทำให้ละลายช้าๆ แล้วผสมให้เข้ากันโดยดีดหลอดเบาๆ

3. ดูดสารละลาย competent cell ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในปฏิกิริยา ligation ดีดหลอดเบาๆ และนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที

4. นำไป Heat-shock cell โดยแช่ใน water- bath ที่มีอุณหภูมิ 42 °C เวลา 50 วินาที และรีบนำมาแช่ในน้ำแข็งทันที เป็นเวลานาน 2 นาที

5. เติมสารละลาย soc medium (อุณหภูมิห้อง) ปริมาตร 950 ไมโครลิตร

6. นำไปบ่มในตู้เลี้ยงเชื้อที่มี อุณหภูมิ 37 °C เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง 30 นาที

7. นำไป plate บนอาหารแข็ง LB ที่เติม 100 ug/ml ampicillin 0.5 mM IPTG และ 50 mg/ml X-Gal แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

2.5 การคัดเลือกโคลนเป้าหมาย

นำโคโลนีของแบคทีเรียที่มีสีขาวไปตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยวิธี Single colony PCR โดยใช้ไม้จิ้มฟันจิ้มโคโลนีที่มีสีขาว นำไปใส่ในหลอดที่มีปฏิกิริยาของพีซีอาร์ทีประกอบด้วย 10X PCR Buffer 2 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP 0.4 ไมโครลิตร, 50 mM $MgCl_2$ 0.6 ไมโครลิตร, 5 uM Forward Primer (M13F) 2 ไมโครลิตร, 5 uM Reverse Primer (M13R) 2 ไมโครลิตร, 5 U/ul Platinum *Taq* DNA Polymerase 0.2 ไมโครลิตร ,น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 12.8 ไมโครลิตร รวมปริมาตร20 ไมโครลิตร

จากนั้นผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่อ งด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง ที่กำหนดสภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

94 °C 2 นาที 1 รอบ

94 °C 1 นาที
55 °C 1 นาที } 35 รอบ
72 °C 2 นาที
72 °C 10 นาที 1 รอบ

นำตัวอย่างไปวิเคราะห์ผลโดยใช้ 1.5 % Agarose gel electrophoresis แล้วย้อมเจลด้วยสารละลาย Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel documentation พร้อมบันทึกภาพ

2.6 การสกัดพลาสมิด

เลี้ยงเชื้อโคโลนีที่ได้ผ่านการตรวจสอบว่ามียีนเป้าหมายปรากฏอยู่ นำไปสกัด พลาสมิดด้วย QIAprep Spin Miniprep Kit ตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดได้โดยใช้ 1% Agarose gel electrophoresis แล้วย้อมด้วย ethidium bromide นำสารละลายที่เหลือเก็บไว้ที่ –20 °C จนกว่าจะนำไปใช้หาลำดับเบส

2.7 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *F3'5'H*

นำพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอของยีน *F3'5'H* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการหาลำดับเบสโดยใช้สารเคมีชุด ABI PRISM® BigDye®Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit โดยเตรียมส่วนผสมต่างๆ ในหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ดังนี้ 2.5X Sequencing Buffer 3ไมโครลิตร,Terminator Ready Reaction Mix 2ไมโครลิตร,3.2 uM primer (T7 or SP6) 1ไมโครลิตร, Plasmid Template200นาโนกรัม เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อจนครบ20ไมโครลิตร

นำไปใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองที่กำหนดสภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

94 °C 2 นาที 1 รอบ
94 °C 10 วินาที
55 °C 5 วินาที } 35 รอบ
60 °C 4 นาที
60 °C 10 นาที 1 รอบ

นำสารละลายของปฏิกิริยาไปทำความสะอาดก่อนนำเข้าวิเคาะห์หาลำดับเบส นำไปวิเคราะห์หาลำดับเบสด้วยเครื่อง ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer นำลำดับเบสของยีน *F3'5'H* ที่โคลนได้จากดอกอัญชันและพิทูเนียไปเปรียบเทียบกับยีนในฐา นข้อมูลสาธารณะ NCBI โดยใช้โปรแกรม Blast เพื่อตรวจสอบกับยีนที่มีผู้รายงานมาก่อน

3.การสร้างชุดยีน Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H)

นำยีน *F3'5'H* เข้าสู่ Plant Expression Vector โดยใช้เทคโนโลยี Gateway

เทคโนโลยี Gateway ที่ใช้ในการโคลนยีน เป็นการเคลื่อนย้ายชิ้นส่วนของยีนจากเวคเตอร์หนึ่งไปสู่อีกเวคเตอร์หนึ่ง โดยการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของยีนซึ่งกันและกัน ซึ่งไม่ต้องใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ ขั้นตอนการดำเนินงานประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ดังนี้

3.1 การนำยีน *F3'5'H* เข้าสู่ Entry Clones

3.1.1 นำยีน *F3'5'H* ที่อยู่ในเวคเตอร์ pGEM T easy และได้ตรวจสอบความถูกต้องแล้ว มาเตรียมให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมกับเทคโนโลยี Gateway โดยการเพิ่มปริมาณส่วนของยีน *F3'5'H* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ที่กำหนดให้มีการเติมลำดับเบสของไพรเมอร์ด้านปลาย 5' ให้มีลำดับที่เหมาะสมสำหรับการเคลื่อนย้ายชิ้นยีนซึ่งกั นและกัน เรียกว่า attB-PCR product จากนั้นนำยีน *F3'5'H* attB-PCR product เข้าสู่เวคเตอร์ pDONR 221

3.1.2 นำสารละลายดีเอ็นเอที่มียีน *F3'5'H* attB-PCR product ปริมาตร 7 ไมโครลิตร ดูดใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมเวคเตอร์ pDONR (150 ng/ul) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร จากนั้นเติม BP Clonase II enzyme mix ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน โดยการ vortex นาน 2 วินาที แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม Proteinase K solution ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 10 นาที ได้สารละลายดีเอ็นเอ สำหรับใช้งานในขั้นตอนต่อไป

3.1.3 การนำเวคเตอร์เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

การนำยีน *F3'5'H* ที่เชื่อมต่ออยู่ในเวคเตอร์ pDONR 221 เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย One Shot Mach1 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen) โดยดูดสารละลายในข้อ 3.1.2 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร ที่มี Competent Cell 50 ไมโครลิตร นำไปแช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที จากนั้นนำเซลล์ไป Heat-shock โดยการนำไปแช่น้ำที่อุณหภูมิ 42 °C นาน 30 วินาที แล้วรีบนำไปแช่ในน้ำแข็งทันที นาน 2 นาที เติม S.O.C. medium ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ปิดฝาหลอด และนำไปบ่มในตู้เลี้ยงเชื้อที่เขย่าด้วยความเร็ว 225 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร ไป spread บนอาหารแข็ง LB ที่เติม 50 ug/ml kanamycin และนำไปเลี้ยงที่อุณภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำโคโลนีที่เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อไปตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยวิธี Single colony PCR และเลี้ยงเชื้อโคลนที่มียีนเป้าหมาย นำไปสกัดพลาสมิด ทำให้ได้ พลาสมิดสายผสมที่มียีน F35H เชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pDONR 221 เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.2 การส่งถ่ายยีน *F3'5'H* ที่เชื่อมต่อ pDONR 221 เข้าสู่ Plant Expression Vector

การนำยีน *F3'5'H* ที่เชื่อมต่อกับ เวคเตอร์ pDONR 221 เข้าสู่ Plant Expression Vector หรือ Binary vector (เวคเตอร์ pMDC32) โดยทำปฏิกิริยาในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลตร ที่ประกอบด้วย ยีน *F3'5'H* ที่เชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pDONR 221 (10 fmoles) จากข้อ 3.1.2 ปริมาตร 7 ไมโครลิตร และเติมเวคเตอร์ pMDC32 (20 fmoles) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติม LR

Clonase II Plus enzyme mix ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน นำหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นเติม Proteinase K solution ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 10 นาที

การนำยีน *F3'5'H* ที่เชื่อมต่ออยู่นในเวคเตอร์ pMDC32 เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย One Shot Mach1 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen) โดยปฏิบัติเช่นเดียวกันข้อ 3.1.3 นำโคโลนีที่เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อไปตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยวิธี Single colony PCR และเลี้ยงเชื้อโคลนที่มียีนเป้าหมาย นำไปสกัดพลาสมิด ทำให้ได้พลาสมิดสายผสมที่มียีน *F3'5'H* เชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pMDC32 เพื่อนำเข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens* ต่อไป

4. การนำพลาสมิด pMDC32- *F3'5'H* ถ่ายเข้าสู่ *Agrobecterium tumefaciens*

การนำเวคเตอร์ pMDC32 ที่ได้รับยีน *F3'5'H* เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 โดยวิธี electroporation มีขั้นตอนดังนี้

4.1 การเตรียม competent cell ของเชื้อ *A. tumefaciens*

4.1.1 นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 เลี้ยงในอาหารเหลว YEP ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่ผสมสารปฏิชีวนะ Rifampicin ความเข้มข้น 50 ug/ml นำไปเขย่าที่ 28 °C เขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ใช้เป็นเซลล์เริ่มต้น (starter) เพื่อเตรียม competent cell ต่อไป

4.1.2 นำเซลล์เริ่มต้น 2 มิลลิลิตร เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 4.1.1 ปริมาตร 200 ml นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 °C เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง จนได้ค่า OD. ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรประมาณ 0.2-0.3

4.1.3 แช่เชื้อในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ต่อจากนั้นนำไปตกตะกอนเซลโดยนำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วสารละลายส่วนบนทิ้ง

4.1.4 ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 10% glycerol ที่แช่เย็น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แช่ในน้ำแข็งต่อเป็นเวลา 10 นาที ตกตะกอนเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วสารละลายส่วนบนทิ้ง

4.1.5 ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 10% glycerol ที่แช่เย็น ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แช่ในน้ำแข็งต่อเป็นเวลา 10 นาที ตกตะกอนเซลล์โดยนำไปปั่นที่ ความเร็ว 3500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วสารละลายส่วนบนทิ้ง

4.1.6 ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 10% glycerol ที่แช่เย็น ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แบ่ง competent cell ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 50 ไมโครลิตร เก็บเซลล์ที่ได้ที่ อุณหภูมิ - 80 °C

หรือนำไปใช้ในขั้นตอนการเคลื่อนย้ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ *A. tumefaciens* ด้วยวิธี electroporation ต่อไป

4.2 การเคลื่อนย้ายพลาสมิด pMDC32 ที่ได้รับยีน *F3'5'H* เข้าสู่เซลล์ *A. tumefaciens* ด้วยวิธี electroporation

4.2.1 นำ competent cell ของเชื้อ *A. tumefaciens* จาก -80 °C มาละลายในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที

4.2.2 นำพลาสมิด pMDC32 ที่ได้รับยีน *F3'5'H* ปริมาตร 1 ไมโครลิตร มาใส่ในหลอด competent cell ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15-30 นาที ต่อจากนั้น นำส่วนผสมมาใส่ลงใน cuvette แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15-30 นาที

4.2.3 ทำการเคลื่อนย้ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ ด้วยวิธี electroporation โดยใช้เครื่อง BTX Electroporation System รุ่น ELECTRO CELL MANIPULATOR 600 โดยกำหนดสภาวะตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตดังนี้

cuvette Gap	0.1	cm
Voltage	2.0	Kv
Capacitor	25	μF
Resistor	200	Ω

4.2.4 เช็ด cuvette ให้แห้งก่อน pulse หลังจาก pulse ให้เติมอาหารเหลว YEP 1 มิลลิลิตรทันที

4.2.5 ย้ายส่วนผสมไปเลี้ยงในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28 °C เขย่าที่ความเร็ว 225 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4.2.5 ตกตะกอนเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เทอาหารออก แล้วเติมอาหารเหลวใหม่ลงไป 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ดูดสารละลาย 50 ไมโครลิตร ไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง YEP ที่เติม kanamycin 50 ug/ml เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 2-3 วัน นำโคโลนีที่เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อไปตรวจสอบการปรากฏของพลาสมิด pMDC32 ที่ได้รับยีน *F3'5'H* ด้วยเทคนิค PCR ต่อไป

4.3 การตรวจสอบการปรากฏของพลาสมิด pMDC32 ที่ได้รับยีน *F3'5'H* ในเซลล์ *Agrobecterium tumefaciens*

ตรวจสอบการปรากฏของ พลาสมิด pMDC32 ที่ได้รับยีน *F3'5'H* ใน *Agrobacterium tumefaciens* ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยการนำโคโลนีที่เจริญได้บนอาหารไปคัดเลือกด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ใช้ไม้

จิ้มฟันจิ้มเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวๆ แล้วนำเชื้อจุ่มลงในปฏิกิริยา พีซีอาร์ จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง ที่กำหนดสภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

94 °C 2 นาที 1 รอบ
94 °C 1 นาที
55 °C 1 นาที } 35 รอบ
72 °C 2 นาที
72 °C 10 นาที 1 รอบ

จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ผลโดยใช้ 1.5 % Agarose gel electrophoresis แล้วย้อมเจลด้วยสารละลาย Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel documentation พร้อมบันทึกภาพ

นำโคลนที่ตรวจพบ พลาสมิด pMDC32 ที่ได้รับยีน *F3'5'H* มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว YEP ที่เติม 50 ug/ml Kanamycin เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28ºC เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมงเพื่อใช้ในขั้นตอนการถ่ายยีนต่อไป

5. การทดสอบถ่ายยีนเข้าสู่ยาสูบ

5.1 การถ่ายยีนโดยอะโกรแบคทีเรียม

การเตรียมต้นยาสูบสำหรับใช้ในการถ่ายยีน ทำการเพาะเมล็ดยาสูบพันธุ์แซนเทียร์ ในอาหารสังเคราะห์ MS เมื่อเมล็ดงอกและเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์ ทำการตัดใบยาสูบเป็นรูป สี่เหลี่ยมขนาด 0.5-1 เซนติเมตร เลี้ยงในอาหารสูตร MS วาง 5 ชิ้น/plate

เตรียมเชื้ออะโกรแบคทีเรียม เลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียม LBA4404 ที่มีพลาสมิด pMDC32 ที่บรรจุยีน F3'5'H ที่โคลนได้จากอัญชันดอกสีน้ำเงิน (ที่ได้จากข้อ4.) มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว YEP (peptone 10 g/l +Yeast extract 10 g/l , NaCL 5 g/l pH7.0)ที่เติม Kanamycin 50 ug/ml เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28ºC เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง spindown และละลาย pellet bacteria ด้วย co-culture media ให้ได้ OD.600 ประมาณ0.6-1.0

ละลาย Agrobacterium LBA 4404 ในอาหารเหลว สูตรMS ที่เติม NAA 0.1 mg/l ร่วมกับ BA 1 mg/l sucrose 3 % pH 5.7 นำใบยาสูบที่ตัดเตรียมไว้มา เลี้ยงเขย่าร่วมกับ Agrobacterium 5 นาที เลี้ยงในอาหารแข็ง สูตรMS ที่อุณหภูมิห้องในสภาพมืดเป็นเวลา 2-3 วัน ล้างใบด้วย cefotaxime 100 mg/lg เลี้ยงในอาหารแข็ง สูตรMS ที่เติม cefotaxime 100 mg/l และ hygromycin 20 mg/l เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 7 วัน 3-5 ครั้ง จนมีแคลลัส แล้วเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ จนกระทั่งแคลลัสพัฒนาเป็นยอด ตัดยอดไปเลี้ยงในอาหารแข็ง MS ที่เติม hygromycin 20 mg/l sucrose 3 % pH 5.7

5.2 การตรวจสอบต้นยาสูบได้รับยีนด้วยเทคนิค PCR

นำใบของต้นยาสูบที่ผ่านการคัดเลือกให้ต้านทานต่อ hygromycin มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด NucleoSpin® Plant II Kit ตามวิธีของบริษัท MACHEREY-NAGEL ตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้ agarose gel electrophoresis ย้อมเจลด้วย Ethidium Bromide ตรวจสอบและบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel Doc จากนั้นวัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง BioDrop และปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้ได้ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปการตรวจสอบการปรากฏของยีน F3' 5'H ในยาสูบที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชุด คือ 1) Nos.F1 และ CtF35H.R1 เป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะกับตำแหน่งของ Nos terminater และยีนF3' 5'H 2) CtF35H.F2 และ 2X35S.R2 เป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะกับตำแหน่งของยีน F3' 5'H และ 2X35S promoter จากนั้นตรวจสอบผลผลิตของ PCR ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis

5.3 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสีดอกของยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน

นำต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน F3' 5'H ที่ผ่านการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR นำมาเพาะเลี้ยงให้พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ จากนั้นล้างวุ้นออกจากรากให้สะอาด แล้วนำต้นมาปลูกอนุบาลและออกปลูกในโรงเรือนความปลอดภัยทางชีวภาพ ดูการเปลี่ยนแปลงสีดอกของต้นยาสูบที่ได้รับและไม่ได้รับการถ่ายยีน

ผลการทดลองและวิจารณ์

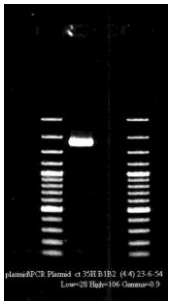
การโคลนชิ้นส่วนของยีน F3' 5'H

จากการสืบค้นข้อมูลออกแบบไพรเมอร์ในการโคลนยีน Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H) จาก cDNAของดอกอัญชันและพิทูเนียโดยการค้นหาข้อมูลลำดับเบสของยีน F3' 5'H จากฐานข้อมูล NCBI Sequence GeneBank ของพืชชนิดต่าง ๆ พบพืชที่มีรายงานยีน F3' 5'H ไว้ในฐานข้อมูล และเมื่อนำมาวิเคราะห์หาส่วนที่เหมือนกันโดยใช้โปรแกรม ClustalW Multiple Alignment พบลำดับเบสบางส่วนที่เหมือนกัน ได้ไพรเมอร์ F3' 5'H - F เพื่อใช้เป็น ไพรเมอร์ ด้าน 5’ ร่วมกับ ไพรเมอร์ F3' 5'H -R สำหรับเพิ่มปริมาณส่วนของยีน F3' 5'H จากดอกอัญชันและพิทูเนีย ผลจากการโคลนส่วนของยีน F3' 5'H ดอกอัญชัน และพิทูเนีย โดยใช้ ไพรเมอร์ F3' 5'H - F ร่วมกับ ไพรเมอร์ F3' 5'H -R ด้วยเทคนิค PCR พบว่าการใช้ ไพรเมอร์ ทั้งสองสามารถเพิ่มปริมาณหรือโคลนชิ้นส่วนของยีน F3' 5'H และเมื่อนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ไปตรวจสอบขนาดด้วยวิธีอิเลกโตรโฟรีซีสโดยใช้อะกาโรสเจล 1% โดยเปรียบเทียบขนาด

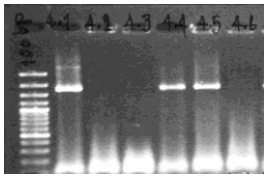
กับ Hyper Ladder I DNA markers พบว่าได้แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขนาดด้วยคู่ primer F3' 5'H - F ร่วมกับ primer F3' 5'H -R (ภาพที่1)

จากการนำชิ้นส่วนของยีน F3' 5'H ที่เพิ่มปริมาณได้มาแยกให้บริสุทธิ์โดยการแยกผ่านชิ้นวุ้น พบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่แยกได้มีดีเ อ็นเอเพียงแถบเดียว ซึ่งมีปริมาณเพียงพอสำหรับนำเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ และเมื่อนำชิ้นส่วนของยีน F3' 5'H ไปเชื่อมต่อกับ pGEM-T Easy เวคเตอร์ และถ่ายเข้าสู่ แบคทีเรีย *E. coli* JM 109 พบว่าประสบผลสำเร็จ โดยสามารถตรวจพบโคโลนีของแบคทีเรียที่มีชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งมีสีขาวเป็นจำนวนมาก โดยกลไกลการเกิดโคโลนีสีขาวนั้นเป็นผลมาจากการที่ชิ้นส่วนของยีน F3' 5'H ที่สอดแทรกอยู่ในเวคเตอร์ไปขัดขวางการถอดรหัสของยีน β-galactosidase แต่ถ้าไม่มีการสอดแทรกของยีน F3' 5'H ในเวคเตอร์จะเกิดเป็นโคโลนีสีฟ้า จากการตรวจสอบเพื่อยืนยันผลที่ได้ด้วยเทคนิค Single Colony PCR พบว่าทุกโคโลนีที่มีสีขาวได้มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมายไปแทรกอยู่ ทุกโคโลนี (ดังภาพที่ 2) สามารถแยกสกัดพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมายได้ และพลาสมิดที่สกัดได้โดยวิธีนี้มีปริมาณเพียงพอสำหรับนำไปใช้ในปฏิกิริยาการหาลำดั บเบสโดย BigDye®Terminator v3.1 Cycle Sequencing (ดังภาพที่3)

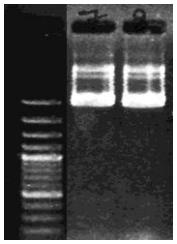
ผลจากการหาลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน F3' 5'H ที่แทรกตัวอยู่ใน pGEM-T Easy Vector ด้วย primer M13F และ M13R เมื่อนำลำดับเบสที่ได้มาตัดส่วนที่เป็นเวคเตอร์ออก และนำมาหาลำดับเบส พบว่าลำดับเบสของชิ้นส่ว นยีนที่โคลนได้จากดอกอัญชัน และพิทูเนีย มีขนาดเท่ากับ 1,739และ 1852 bp. ตามลำดับและจากการเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีน F3' 5'H ที่โคลนได้ กับข้อมูลที่อยู่ใน GenBank ด้วยโปรแกรม Blast-N พบว่า F3' 5'H ที่โคลนได้ มีลำดับเบสเหมือนกับยีน F3' 5'H ที่รายงานไว้ในฐานข้อมูล NCBI คิดเป็น100% กับ accession AB185900 ดังแสดงในภาพที่ 4,5และ6



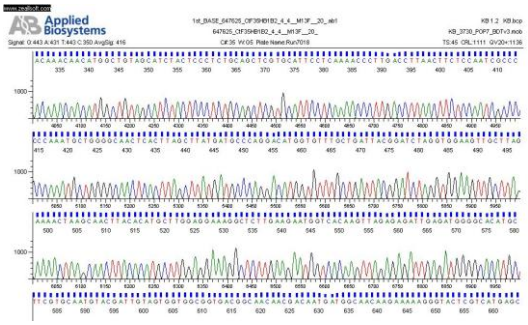
ภาพที่1. PCR ของยีน F3’5’H ที่เพิ่มปริมาณได้จากดอกอัญชัน



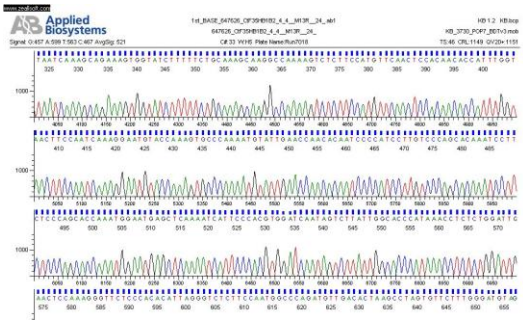
ภาพที่2. การตรวจสอบโคลนเป้าหมายที่ได้รับยีน F3’5’H ด้วยเทคนิค colony PCR



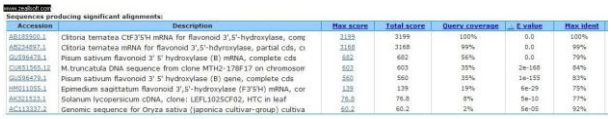
ภาพที่3. พลาสมิดทีสกัดได้เพื่อส่งหาลำดับเบส



ภาพที่4. ลำดับเบสของยีน CtF35H ที่หาโดยใช้ไพรเมอร์ M13F



ภาพที่5. ลำดับเบสของยีน CtF35H ที่หาโดยใช้ไพรเมอร์ M13R

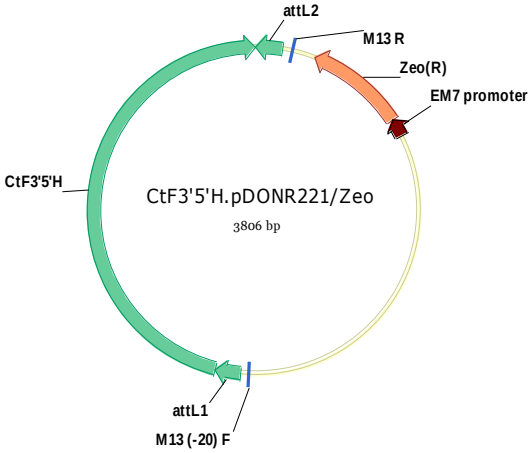


ภาพที่6. การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน CtF35H ในฐานข้อมูล NCBI มีความเหมือนกัน 100% กับ accession AB185900

การสร้างชุดยีน

การสร้างชุดยีน Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H)

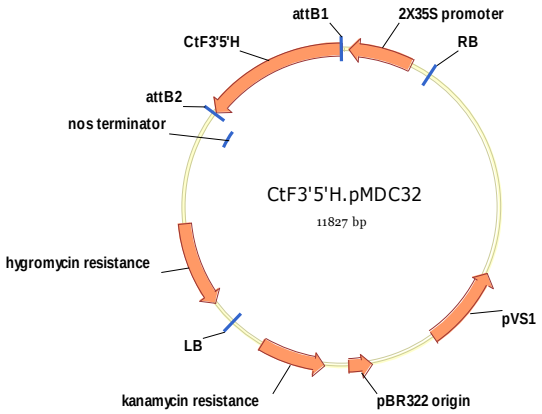
การนำยีนเข้าสู่ Entry Clones เป็นการเตรียมชิ้นดีเอ็นเอให้เหมาะสมสำหรับการโคลนยีน โดยใช้เทคโนโลยี Gateway จากการนำลำดับเบสของยีน F3’5’H มาออกแบบไพรเมอร์ใหม่ และดัดแปลงลำดับเบสของไพรเมอร์ Forward และ Reverse โดยเติมลำดับเบสที่ปลายด้าน 5’ จากการออกแบบไพรเมอร์ พบว่าได้ไพรเมอร์ด้าน Forward คือ F35HattB2 และได้ ไพรเมอร์ด้าน Reverse คือ F35HattB1 โดยไพรเมอร์ดังกล่าวจะไปจับบริเวณภายในของยีน F3’5’H ที่โคลนได้จากข้อ 2 จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ attB1 และ attB2 เชื่อมติดอยู่ เมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ PEG8000 พบว่าชิ้นดีเอ็นที่ได้มีความเข้มข้นมากกว่า 10 ng/ul และมีปริมาณเพียงพอในการนำยีนเข้าสู่เวคเตอร์ pDONR 221 ได้ประสบผลสำเร็จ ซึ่งจากการตรวจสอบโดยการนำโคโลนีของแบคทีเรียที่ได้รับโคลนเป้าหมายด้วยเทคนิค Single colony PCR โดยใช้ไพรเมอร์ M13F และM13R พบว่าทุกโคโลนีที่ทำการตรวจสอบสามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอโดย จากอัญชันและพิทูเนียมี ขนาด 2022 คู่เบส และ 2135 คู่เบส ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่าชิ้นยีน ได้ถูกนำเข้าไปอยู่ในเวคเตอร์ pDONR 221 แล้ว (ภาพที่7) และเมื่อนำโคโลนีเป้าหมายดังกล่าวไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณ และสกัดพลาสมิด พบว่าได้ พลาสมิดในปริมาณมาก และสามารถใช้ชิ้นยีนที่อยู่ในเวคเตอร์ pDONR 221 นำเข้าสู่ Plant Expression Vector ต่อไป



ภาพที่ 7. ชิ้นส่วนของยีน F3' 5'H จากดอกอัญชันที่อยู่ใน vector pDORN 221

การนำยีน F35H เข้าสู่ Plant Expression Vector

จากการใช้เทคโนโลยี Gateway นำยีน F3’5’H ที่เชื่อมต่ออยู่กับเวคเตอร์ pDONR 221 เข้าสู่ Plant Expression Vector ผลการทดลองพบว่าสามารถนำยีน เข้าสู่เวคเตอร์ pMDC32 ซึ่งเป็น Plant Expression Vector ได้สำเร็จ (ภาพที่8) และเมื่อนำโคลนเป้าหมายดังกล่าวไปเลี้ ยงเพิ่มปริมาณ และสกัดพลาสมิด พบว่าได้พลาสมิดที่มีปริมาณมาก สามารถใช้ในขั้นตอนการนำชิ้นยีน ที่อยู่ในเวคเตอร์ pMDC 32 ไปถ่ายเข้าสู่ *Agrobecterium tumefaciens* ต่อไปได้



ภาพที่8. ชิ้นส่วนของยีน F3' 5'H จากดอกอัญชันที่อยู่ใน Binary vector pMDC32

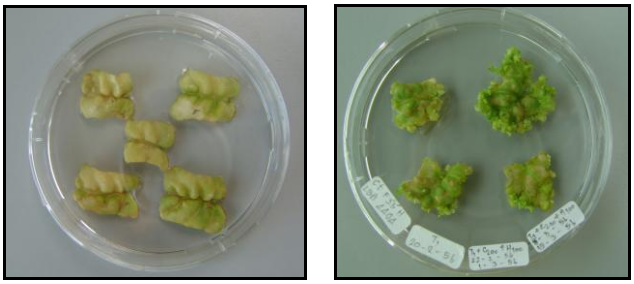
การนำพลาสมิด pMDC32-DFRAS ถ่ายเข้าสู่ *Agrobecterium tumefaciens*

การเคลื่อนย้าย ctF35HpMDC32 ซึ่งเป็น Binary vector เข้าสู่เซลล์ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 พบว่า competent cell สามารถส่งถ่ายพลาสมิด เข้าสู่เซลล์โดยวิธี

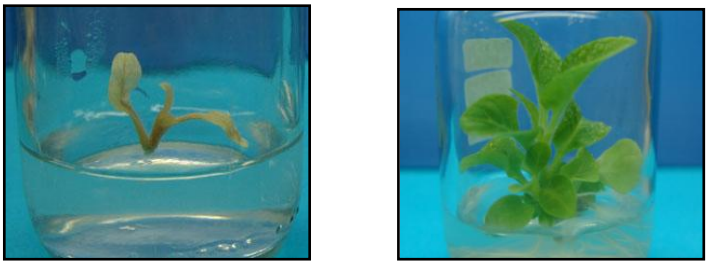
electroporation ได้สำเร็จ ผลที่ได้จากการนำเซลล์ไปคัดเลือกในอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ Kanamycin พบโคโลนีที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกได้

การถ่ายยีน *F3' 5'H* **เข้าสู่ยาสูบโดยอะโกรแบคทีเรียม**

จากการถ่ายยีน *F3' 5'H* ที่โคลนได้ที่อยู่ใ นพลาสมิด pMDC32 เข้าสู่ยาสูบโดยใช้ Agrobacterium พบว่าสามารถส่งถ่ายยีน *F3' 5'H* เข้าสู่ยาสูบได้สำเร็จ หลังจากเลี้ยงไปเป็นเวลา 3 สัปดาห์พบว่าชิ้นส่วนใบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะไม่พัฒนาและตายในที่สุด ส่วนที่ได้รับการถ่ายยีน เริ่มเจริญและพัฒนาเป็นแคลลัส (ภาพที่9) เมื่อตัดยอดที่พัฒนาจากแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก MS ที่เติม hygromycin 20 mg/l หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนเจริญเติบโตได้ เมื่อเพาะเลี้ยงต่อจนอายุ 45 วัน จะเจริญเป็นต้นที่สมบุรณ์และนำไปทดสอบต่อไป ส่วนต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะไม่เจริญเติบโตและตายไปในที่สุด (ภาพที่10)



ภาพที่9. แคลลัสจากใบยาสูบหลังจากเลี้ยบนอาหารสูตรMS ที่เติมcefotaxime 100 mg/l และ hygromycin 20 mg/l เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (ซ้าย –ใบไม่ได้รับการถ่ายยีน ขวา- ใบที่ผ่านการถ่ายยีน)



ภาพที่10 การเจริญเติบโตของยอดยาสูบหลังจากเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 45 วัน (ซ้าย-ต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ขวา- ต้นที่ได้รับการถ่ายยีน)

การตรวจสอบต้นยาสูบได้รับยีนด้วยเทคนิค PCR

ผลการตรวจสอบการปรากฏของยีน F3' 5'H ในยาสูบที่ได้จากการถ่ายยีนด้ว ยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Nos.F1 และ CtF35H.R1 พบว่าสามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 405 คู่เบส เพียงแถบเดียวเท่านั้น (ภาพที่11) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มีความจำเพาะกับตำแหน่งของยีน F3' 5'H และ Nos terminater ซึ่งเป็นชุดยีนที่ถ่ายเข้าสู่ต้นยาสูบ จากการตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ CtF35H.F2 และ 2X35S.R2 พบว่าแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวขนาด 451 คู่เบส (ภาพที่12) และมีความจำเพาะกับตำแหน่งของยีน F3' 5'H และ 2X35S promoter ของชุดยีนที่ถ่ายเข้าสู่ต้นยาสูบเช่นเดียวกัน นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าไพรเมอร์ 2 ชุด ที่ใช้ตรวจสอ บนั้นจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เฉพาะต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนเท่านั้น ไม่สามารถเพิ่มปริมาณจากดีเอ็นเอของต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ภาพที่11,12)

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

เนื่องจากเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรมีความเกี่ยวข้องกับสภาพแวดล้อมและสิ่งมีชีวิต การพัฒนาปรับปรุงพันธุ์พืชโดยอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพจึงมีความสำคัญ ในการโครงการวิจัยนี้กล่าวถึงปัญหาและขอบเขตที่เกี่ยวข้องแตกต่างกัน เช่น ปัญหาด้านความแห้งแล้ง ทำให้ผลผลิตพืชลดลง การพัฒนาสีดอกเพื่อเพิ่มมูลค่าทางการเกษตร การเพิ่มปริมาณน้ำตาลในพืชเพิ่มมูลค่า การค้น หายีนเครื่องหมายใหม่ๆ จาก ผลการวิจัยในภาพรวมของโครงการ ได้ผลตรงตามวัตถุประสงค์ดังต่อไปนี้

1.ยีนหรือกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทนต่อสภาวะขาดน้ำในข้าวโพด

2.ได้ชุดยีนที่ทนต่อสภาวะขาดน้ำที่อยู่ในพลาสมิดสายผสม (plasmid construct) สำหรับนำไปถ่ายฝากเข้าสู่พืชต้นแบบ

3.ยีนและข้อมูลการแสดงออกของยีนเพิ่มสีดอกไม้ Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H) จากอัญชันและพิทูเนีย

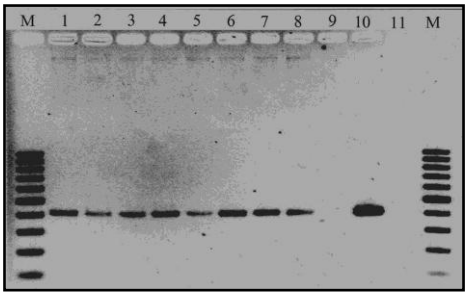
3.ชุดยีน Sucrose Synthase ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์น้ำตาลในอ้อยสำหรับนำไปถ่ายฝากเข้าสู่พืชต้นแบบ

4.ยีน DHS จากเบญจมาศ ได้ข้อมูลการยับยั้งการแสดงออกของยีน DHS ด้วยเทคนิค RNAi

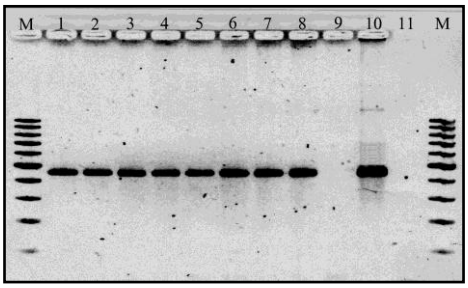
5.ยีนบางส่วนของเห็ดเรืองแสงเป็นเครื่องหมายโมเลกุล

6.เทคนิคการถ่ายฝากยีนเข้าสู่พืชหรือสิ่งมีชีวิตที่สนใจจากยีนที่ศึกษาดังกล่าว

โดยสรุปจากผลการวิจัยดังกล่าว ตรงตามวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยฯ สามารถได้ยีนทนแล้งจากข้าวโพดพันธุ์ทนแล้ง ยีนเพิ่มสีดอกไม้ ยีนเพิ่มปริมาณน้ำตาล ยีนเรืองแสงบางส่วน และลักษณะสีดอกไม้ภายหลังระงับการแสดงออกของยีน DHS โดยอาศัยเทคนิคการโคลนยีน การถ่ายฝากยีนและเทคนิค RNAi ตรงตามวัตถุประสงค์ที่ได้ตั้งไว้



ภาพที่ 11 ผลการตรวจสอบต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน F3' 5'H ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CtF35H.Nos.F1, CtF35H.Nos.R1 (405bp) (Lane M : 100 bp DNA Ladder, 1-8: ต้นที่ ได้รับการถ่ายยีน ,9: ต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน , 10: Plasmid pMDC32 ที่มียีน F3’5’H, 11: control)



ภาพที่12 ผลการตรวจสอบต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน F3' 5'H ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CtF35H.2X35S.F2 และ CtF35H.2X35S.R2 (415bp) (Lane M : 100 bp DNA Ladder, 1-8: ต้นที่ได้รับการถ่ายยีน ,9: ต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน , 10: Plasmid pMDC32 ที่มียีน F3’5’H, 11: control)

การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสีดอกของยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน

จากการนำต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน F3' 5'H ที่ผ่านการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR มาปลูกในโรงเรือนความปลอดภัยทางชีวภาพ ดูการเปลี่ยนแปลงสีดอกเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่าย ยีน พบว่าต้นที่ได้รับยีน F3' 5'H มีสีดอกเปลี่ยนแปลงไป จากดอกสีขาวอมชมพูเป็นสีม่วงชมพู (ภาพที่13) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ายีน *F3' 5'H* ที่ถ่ายเข้าสู่ยาสูบมีการแสดงออกในดอกยาสูบทำให้สีดอกเปลี่ยนแปลงไป ส่วนยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะไม่พบการแสดงออกของยีน ส่งผลให้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีดอก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Young park และ Kim (2000) ที่ได้ถ่ายยีน f3’5’h

จากมะเขือยาวเข้าสู่ยาสูบด้วยวิธีอะโกรแบคทีเรียม พบว่ายาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนจะมีสีดอกเปลี่ยนไปจากต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และในยาสูบที่ไม่ได้รั บการถ่ายยีนจะไม่พบการแสดงออกของยีนนี้ในกลีบดอก

ภาพที่13 การเปลี่ยนแปลงสีของดอกยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน
แถวบน-ดอกยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน (ดอกมีสีม่วงชมพู) แถวล่าง-ดอกยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ดอกมีสีขาวอมชมพู)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การโคลนยีน *Flavonoid 3',5' hydroxylase* (*F3'5'H*) เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มรงควัตถุแอนโทไซยานินสีน้ำเงินหรือสีม่วง จากดอกอัญชันและพิทูเนียสีน้ำเงิน ได้ชิ้นยีนขนาด 1,739 และ1852 bp. ตามลำดับ แล้วนำยีนที่โคลนได้เข้าสู่เวคเตอร์แบบไบนารี่ pMDC32 และนำเข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 เมื่อทำการตรวจสอบยีน *F3'5'H* ที่โคลนได้โดยการถ่ายเข้าสู่ยาสูบพันธุ์แซนเทียร์ดอกสีขาวอมชมพู โดยเลี้ยงใบยาสูบร่วมกับอะโกรแบคทีเรียม นั้นพบว่าที่ต้นที่ ได้รับยีน มีสีดอกเปลี่ยนแปลงไป จากดอกสีขาวอมชมพูเป็นสีม่วงชมพู ยีน *F3' 5'H* นี้สามารถนำมาใช้ถ่ายฝากสู่ไม้ดอกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเพื่อปรับแต่งสีดอกให้มีความหลากหลายมากขึ้นในโอกาสต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 2542. เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมในการควบคุมสีและลักษณะของดอก. วารสารข่าวศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง 13(1): 9-13.

Biolley, J.P., M. Jay., G. Forkmann. 1994. Pigmentation patterns of modern rose mutants throw light on the flavonoid pathway in *Rosa x Hybrida*. Phytochemisty 36: 1189-1196.

Brugliera F., G. Barri-Reweell., T.A. Holton and J.G. Mason. 1999. Isolation and characterization of a flavonoid 3'-hydroxylase cDNA clone corresponding to the Ht1 locus of *Petunia hybrida*. The Plant Journal 19(4): 441-451.

He, H., H. Ke., H. Keting., X. Qiaoyan., D. Silan. 2013. Flower color modification of chrysanthemum by suppression of *F3'H* and overexpression of the exogenous Senecio cruentus F3'5'H gene. PLOS ONE. Volume 8(11). E74395.

Holton, T.A. and Cornish. E.C. 1995. Genetic and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. Plant Cell 7: 1071-1083.

Johnson, E.T., S. Ryu., H. Yi., B. Shin., H. Chong and G. Choi. 2001. Alteration of single amino acid changes the substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase. The Plant Journal 25(3): 325-333.

Kaltenbach. M, G. Scroder., E. Schmelzer., V. Lutz and J. Schroder. 1999. Flavonoid hydroxylase from *Catharanthus roseus*: cDNA, heterologous expression, enzyme properties and cell-type specific expression in plant. The Plant Journal 19(2): 183-192.

Katsumoto, Y., M. Fukuchi-Mizutani., Y. Fukui., F. Brugliera., T.A. Holton., M. Karan., N. Nakamura., K. Yonekura-Sakakibara., J. Togami., A. Pigeaire., G.Q. Tao., N.S. Nehra., C.Y. Lu., B.K. Dyson., S. Tsuda., T. Ashikari., T. Kusumi., J.G. Mason and Y. Tanaka. 2007. Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hue flowers accumulation delphinidin. Plant Cell Physiol 48(11): 1589-1600.

Mol. J.N.M., E. Grotewold and R.E. Koes. 1998. How genes paint flowers and seeds. Trends Plant Sci 3: 212-217.

Tanaka, Y. and A. Ohmiya. 2008. Seeing is believing : Engineering anthocyanin and carotenoid biosynthetic pathways. Current Opinion in Biotechnology 19:190-197.

Young Park, S. and Y. Kim. 2000. The expression of egg plant flavonoid 3'5' hydroxylase gene in tobacco plant (Nicotiana tabacum cv. Xanthi). Plant Biotech 2(1):25-28.

การทดลองที่ 3 การโคลนยีน Sucrose Synthase ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์น้ำตาลในอ้อย

Title :Cloning of Sucrose Synthase Gene for Sucrose Metabolism in *Saccharum officinarum* (L.)

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวสุภาวดี ง้อเหรียญ	**สังกัด**	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ	**สังกัด**	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นายพยุงศักดิ์ รวยอารี	**สังกัด**	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางสาวภรณี สว่างศรี	**สังกัด**	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์	**สังกัด**	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

บทคัดย่อ

การโคลนยีน Sucrose Synthase ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์น้ำตาลในอ้อย มีวัตถุประสงค์เพื่อโคลนยีนและศึกษาคุณสมบัติของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลในพืช สำหรับนำไปใช้ในการพัฒนาพันธุ์พืชให้มีศักยภาพ ในการผลิตน้ำตาลให้สูงขึ้น โดยยีน Sucrose Synthase (SuSy) เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการ สังเคราะห์น้ำตาล มีกลไกในการควบคุม กระบวนการเมตาบอลิซึมคาร์โบไฮเดรต การย่อยสลาย น้ำตาล ซูโครสให้อยู่ในรูปของน้ำตาล hexoses และการเคลื่อนย้ายน้ำตาล กระตุ้นให้มีการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลซูโครส และ UDP ไปเป็น UDP-glucose และ fructose สำหรับนำไปใช้ในกิจกรรมต่างๆ ภายในเซลล์พืช งานวิจัยนี้ได้ทำการโคลนยีน Sucrose Synthase จากอ้อยซึ่งเป็นพืชที่ให้ความหวานสูง โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ในบริเวณที่มีความเหมือนของลำดับพันธุกรรมอย่างสูง (conserved region) จากยีน Sucrose Synthase ในพืชชนิดต่างๆ ที่ค้นหาได้จากฐานข้อมูล NCBI นำไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มาทำปฏิกิริยา PCR กับจีโนมิกดีเอ็นเอของอ้อยพันธุ์ อู่ทอง 8 (UT8) ได้ยีนขนาด 7495 คู่เบส เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์โครงสร้างของยีนโดยใช้โปรแกรม Software GenScan Version 1.0 พบว่า ยีน Sucrose Synthase ที่ได้มีส่วนประกอบครบทั้งยีน ซึ่งประกอบด้วยลำดับเบสในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน Open Reading Frame (ORF) จำนวน 12 exon, ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งของโปรโมเตอร์อยู่ระหว่างลำดับเบสที่ 1317 – 1356, ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง TATA signal (TATTTATT) อยู่ในส่วนของ 5′UTR ระหว่างตำแหน่งของลำดับเบสที่ 1640 – 1647, ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง PolyA signal (AATAAA) อยู่ในส่วนของ 3′UTR ระหว่างตำแหน่งของลำดับเบสที่ 7450 – 7445 จากนั้นทำการโคลนยีนในส่วนที่มีการแสดงออก โดยการทำปฏิกิริยา RT-PCR จากอาร์เอ็นเอรวมของอ้อยร่วมกับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน ซึ่งได้เติมลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *KpnI* เพื่อบังคับทิศทางของการแปลรหัส สามารถโคลนยีน Sucrose Synthase ได้ขนาด 2376 คู่เบส สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 792 amino acids เมื่อนำลำดับนิ

วคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ยีนที่ได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน SuSy ที่พบในอ้อย (*Saccharum officinarum* L.) (AF263384.1) ข้าวโพด (*Zea mays* L.) (FJ436056.1) และ ข้าวฟ่างหางหมา *(Setaria italic* (L.) P. Beauv.) (XM004964554.1) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 99% 99% และ 94% ตามลำดับ จากนั้นทำการสร้างชุดยีน *So*SuSy โดยการเชื่อมต่อยีน *So*SuSy เข้ากับ plant expression vector (pCAMBIA2300) ที่ประกอบด้วย โปรโมเตอร์ (35SCaMV) และเทอร์มิเนเตอร์ (NOS) ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีน มียีน nptII เป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือกได้พลาสมิดสาย ผสม (pCAMBIA2300 – *So*SuSy) ขนาดประมาณ 12 กิโลเบส จากนั้นนำชุดยีน pCAMBIA2300 – *So*SuSy ไปศึกษาการแสดงออกของยีนโดยการถ่ายฝากยีนเข้าสู่พืชต้นแบบ เพื่อเป็นข้อมูลในการนำชุดยีนที่ได้ไปใช้พัฒนาพันธุ์พืชเศรษฐกิจที่สนใจ เช่น อ้อย มันสำปะหลัง ข้าวฟ่างหวาน ฯลฯ เพื่อเพิ่มศักยภาพในการให้ผลผลิตและเพิ่มค่าความหวานให้สูงขึ้น

Abstract

Sucrose is important in starch synthesis because it is the main source of glucose-1-phosphate required for starch synthesis. Sucrose synthesis is catalyzed by two enzymes in higher plants, sucrose-phosphate synthase (SPS) and sucrose synthase (SuSy). Sucrose Synthase (SuSy) is an enzyme that plays a critical role in the metabolism of starch and sucrose. The enzyme has mechanism to catalyzes the reversible conversion of UDP to UDP-glucose and fructose for use in activities within plant cells. In this study, a full-length genomic DNA sequences of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) encoding sucrose synthase (*So*SuSy) have been isolated from sugarcane varieties name U-Thong 8 (UT 8) via PCR – based method. The gene sequence contains a fragment of 7495 bp, including with 12 exons, a 2376 bp complete ORF, plus a promoter, a TATA signal (TATTTATT) and a polyA signal AATAAA motif. *So*SuSy gene encoding the 792 amino acid polypeptide. The highly conserved region of the gene is sucrose synthase (SuSy) which are also found in *Saccharum officinarum* L. (AF263384.1), *Zea mays* L. (FJ436056.1) and *Setaria italic* (L.) P. Beauv. (XM004964554.1) with 99% 99% and 94% of homology respectively. A 2376 bp fragment of the *So*SuSy gene was amplified by RT – PCR method with the addition of *Xba*I and *Kpn*I restriction sites for protein translation purpose and then inserted into plant expression vector pCAMBIA2300 containing 35SCaMV promoter

and NOS terminator, nptII as selectable marker with total size of 12 kb for pCAMBIA2300 – *So*SuSy over – expression cassette.

บทนำ

อ้อย (*Saccharum officinarum* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของไทย และเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมการผลิตอ้อยและน้ำตาลที่สำคัญที่สุ ด นอกจากนั้นอ้อยยังเป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการผลิตผลิตภัณฑ์อื่นๆ ได้หลากหลาย เช่น กากอ้อยและใบอ้อย ใช้ผลิตกระดาษ ปุ๋ยชีวภาพ และใช้เป็นเชื้อเพลิงในการผลิตไฟฟ้า ส่วนกากน้ำตาลยังสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตสุรา และเอทานอล เป็นต้น ประมาณการว่ามีความต้องการบริโภคน้ำตาลในตลาดโลกสูงถึง 165 ล้านตันต่อปี ซึ่งปัจจุบันประเทศไทยใช้ประโยชน์จากอ้อยทั้งหมดไปผลิตน้ำตาล และพึ่งพารายได้จากการส่งออกน้ำตาลเป็นหลัก จึงประสบปัญหาเมื่อราคาน้ำตาลในตลาดโลกตกต่ำ ในขณะที่ความต้องการด้านพลังงานได้ขยายตัวเพิ่มขึ้นอย่างมาก และประเทศไทยต้ องพึ่งพาการนำเข้าพลังงานเป็นหลัก เมื่อราคาน้ำมันปรับตัวสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้ต้องสูญเสียเงินตราต่างประเทศอย่างมหาศาล ในขณะที่อ้อยเป็นพืชที่มีศักยภาพสูงในการนำไปผลิตพลังงานโดยเฉพาะเอทานอลที่สามารถใช้ทดแทนน้ำมันเชื้อเพลิงในรถยนต์ จึงส่งเสริมให้มีการนำอ้ อยไปผลิตเอทานอลเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิง ก่อให้เกิดความต้องการใช้อ้อยและกากน้ำตาลไปเป็นวัตถุดิบมากขึ้น ในปัจจุบันการผลิตอ้อยของไทยยังประสบปัญหาด้านประสิทธิภาพการผลิตต่ำ โดยในฤดูการผลิต ปี 2555/2556 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกอ้อย 9.5 ล้านไร่ ผลผลิตอ้อย 107 ล้านตัน ได้ผลผลิตเฉลี่ย 11.3 ตันต่อไร่ ผลิตเป็นน้ำตาลได้ 10 ล้านตัน และค่าความหวานอยู่ที่ 11 – 12 ซี.ซี.เอส โดยคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทรายกำหนด ราคาอ้อยขั้นต้น ปีการผลิต 2555/56 ตันละ 950 บาท ที่ความหวาน 10 ซี.ซี.เอส และกำหนดอัตราขึ้นและลงของราคาอ้อย ต่อความหวาน 1 ซี.ซี.เอส ต่อตัน เท่ากับ 57 บาท (สำนักคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาล , 2556) ในขณะที่ประเทศคู่แข่ง เช่น บราซิล และออสเตรเลีย ซึ่งเป็นประเทศที่มีความก้าวหน้าในด้านการผลิตอ้อยเป็นอันดับต้นของโลก โดยมีผลผลิตอ้อยเฉลี่ยอยู่ที่ 13 – 15 ตันต่อไร่ ค่าความหวานอยู่ที่ 13 – 15 ซี.ซี.เอส ปัจจัยสำคัญซึ่งส่งผลให้ผลผลิตอ้อยของไทยอยู่ในระดับต่ำเนื่องมาจากชาวไร่อ้อยส่วนใหญ่ปลูกอ้อยโดยอาศัยน้ำฝน ขาดการจัดการด้านน้ำ ดิน และปุ๋ย การขาดการวิจัยและพัฒนาพันธุ์อ้อยที่ให้ผลผลิตและค่าความหวานสูง ทนต่อโรค และที่สำคัญขาดการนำเทคโนโลยีสมัยใหม่มาใช้เพื่อพัฒนาพันธุ์ดีมีคุณภาพ ในอนาคตงานวิจัยและพัฒนาจะเข้ามามีบทบาทสำคัญอย่างสูงต่ออุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลและอุตสาหกรรมพลังงานทดแทน ยังผลให้เกษตรกรชาวไร่อ้อย มีวิถีชีวิตความเป็นอยู่ที่ดีขึ้น รวมทั้งทำให้อุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลทรายของไทยสามารถยืนหยัดต่ อไปได้อย่างยั่งยืน

อ้อย เป็นพืช C4 ที่มีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงสูง โดยใช้พลังงานแสงอาทิตย์ในการสังเคราะห์น้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรต จะได้น้ำตาลชนิด ซูโครส กลูโคส ฟรุคโตส หรือ total sugar และ

แป้ง กระบวนการสังเคราะห์แสงจะเกิดขึ้นบริเวณใบ ซึ่งทำหน้าที่โดยค ลอโรฟิลล์ มีน้ำและธาตุอาหารจาก ราก คาร์บอนไดออกไซด์จากใบเป็นวัตถุดิบ น้ำตาลที่สังเคราะห์ขึ้นได้ ถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งจะส่งไปยังปล้องอ่อนที่กำลังเจริญเติบโตและปล้องแก่เพื่อสร้างไฟเบอร์ อีกส่วนหนึ่งจะถูกลำเลียงจากใบมาเก็บสะสมไว้ที่ลำต้นในรูปของน้ำตา ลซูโครส น้ำตาลซูโครส ประกอบด้วย non reduction sugar คือ น้ำตาลกลูโคส (glucose) และน้ำตาล ฟรุคโตส (fructose) การสังเคราะห์น้ำตาลซูโครสในอ้อยเกิดจากการทำงานของ เอนไซม์สองชนิดมาช่วยเร่งปฏิกิริยาคือ UDP-glucose : D-fructose-6-phosphate-2-glucosyltransferase (sucrose phosphate synthetase ; SPS) เป็นเอนไซม์หลักที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ น้ำตาล ซูโครสทั้ง ในเนื้อเยื่อที่สังเคราะห์แสงและไม่สังเคราะห์แสง และ UDP-glucose : D-fructose-2-glucosyltransferase (sucrose synthetase ; SS) เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเคลื่อนย้ายและการสังเคราะห์น้ำตาล โดยเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึมคาร์โบไฮเดรต การย่อยสลายซูโครสให้อยู่ในรูปของน้ำตาล hexoses และการเคลื่อนย้ายของน้ำตาล กระตุ้นให้มีการเปลี่ยนแปลง ของน้ำตาลซูโครส และ UDP ไปเป็น UDP-glucose และ fructose ซึ่งพบว่า เอนไซม์จะถูกกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์แป้งในข้าวโพด (Chourey และ Nelson, 1976) และมีการพัฒนาเมล็ดของถั่ว (Dejardin et al., 1997) สำหรับในหัวมันฝรั่ง เมล็ดถั่วลิมา รากของพีแคน sweetgum มันสำปะหลัง และผลของมะเขือเทศ sucrose synthase จะมีส่วนในการกระตุ้นการทำงานของ sink strength (Sung *et al.,* 1989, Sun *et al.,* 1992, Zrenner *et al.,* 1995) มีการศึกษาการแสดงออกของ sucrose synthase ใน source tissue ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายพลังงานที่ใช้สำหรับการขนถ่ายภายในโฟลเอม และกระบวนการเมตาบอลิซึมของ sucrose ใน sink tissue ของใบและราก และพบว่าในสภาพแวดล้อมที่จำกัดพืชมีความต้องการ ATP และคาร์โบไฮเดรตมากขึ้น (Martin และคณะ , 1993) สำหรับในอ้อย พบว่า ยีน sucrose synthase (SS) เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึมของน้ำตาล sucrose (Sarah และ John, 2004) และกิจกรรมของ SS จะสัมพันธ์กับปริมาณการสะสมซูโครสในบริเวณ sink tissue โดยจะพบมากบริเวณลำต้นที่ยังอ่อนอยู่ เอนไซม์ SS ในอ้อยมี 2 isozyme คือ SS1 และ SS2 (Sung *et al.,* 1989) ยีน sucrose synthase สามารถจำแนกได้จากพืชหลายๆ ชนิดโดยเฉพาะพืชที่มีการสะสมแป้ง เช่น ในข้าวโพด (Werr *et al.,* 1985) ข้าว (Wang AY *et al.,* 1992) ข้าวสาลี (Marana *et al.,* 1990) มันฝรั่ง (Salanoubat และ Belliard, 1987) ถั่ว (Barratt *et al.,* 2001) และจากพืชที่มีการเก็บสะสมน้ำตาล เช่น sugar beet (Hesse และ Willmitzer, 1996) และอ้อย (Lingle และ Dyer, 2001) ในปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วยในการพัฒนาสายพันธุ์อ้อยกันมากขึ้นทั้งในประเทศ และต่างประเทศ มีการศึกษาการทำงานของยีน โดยค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะต่างๆ เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างแป้ง น้ำตาล และต้านทานโรคแมลงที่สำคัญในส่วนต่างๆ ของอ้อย เพื่อพัฒนาพันธุ์ให้มีคุณภาพและเพิ่มผลผลิต การพัฒนาโมเลกุลเครื่องหมายเพื่อใช้ในการตรวจสอบลักษณะต่างๆ ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเพื่อเร่งรัดกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ให้สามารถคัดเลือกพันธุ์ที่ต้องการของตลาด ทั้งเพื่อนำไปใช้อุตสาหกรรมอาหาร และอุ ตสาหกรรมแปรรูปอื่นๆ

ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงได้นำเทคโนโลยีด้านการโคลนยีนมาประยุกต์ใช้ในการค้นหาและศึกษาคุณสมบัติของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลในอ้อย และสามารถนำยีนที่ได้ไป ใช้การพัฒนาพันธุ์พืชเศรษฐกิจ เช่น อ้อย มันสำปะหลัง ข้าวฟ่าง หวาน มะเขือเทศ ฯลฯ เพื่อเพิ่มศักยภาพการผลิตน้ำตาลให้สูงขึ้นได้ จะเป็นประโยชน์อย่างมาก

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อ้อยพันธุ์อู่ทอง 8 (UT8)
2. ไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์และตรวจวิเคราะห์ยีน Sucrose Synthase (SuSy) ได้แก่ SuSy1 (forward) SuSy1 (reverse) SuSyXbaI (forward) SuSyKpnI (reverse) NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse)
3. Plant expression vector (pCAMBIA2300 จาก ดร.ศรีเมฆ ชาวโพงพาง, ม. เกษตรศาสตร์)
4. เครื่อง Spectrophotometer สำหรับใช้วัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D.)
5. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม PCR (Thermal Cycle 9700)
6. เครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI Prism 310
7. อุปกรณ์ในการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ โกร่ง เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบสูงแบบควบคุมอุณหภูมิต่ำได้ (Refrigerated Centrifuge) หลอดใส่ตัวอย่างขนาดต่างๆ อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
8. อุปกรณ์การอ่านภาพ และบันทึกผล ได้แก่ Gel documentation พร้อมเครื่องพิมพ์
9. เครื่องมือในการวิเคราะห์ผลแบบ Image Analyzer พร้อมโปรแกรมวิเคราะห์ผล
10. ไมโครปิเปตขนาด P1,000 P200 P100 และ P2 ไมโครลิตร
11. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ (Genomic DNA Extraction Mini Kit) ของ RBC Bioscience
12. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอ (MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit) ของ Epicentre® Biotechnologies
13. สารเคมีที่ใช้ในการทำ Electrophoresis และ Molecular Weight Marker
14. สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเ อ็นเอ (PCR Amplification) (HotStartTaq Master Mix Kit) ของ QIAGEN
15. สารเคมีที่ใช้ในการทำ RT-PCR (SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase Kit) ของ Invitrogen
16. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากเจล (QIAquick Gel Extraction Kit) ของ QIAGEN
17. สารเคมีที่ใช้ในการโคลนยีน (TOPO® XL PCR Cloning Kit) ของ Invitrogen
18. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit) ของ Fermentas

19. เชื้อแบคทีเรียเซลล์เจ้าบ้าน (Competent Cells) *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α
20. สารเคมีสำหรับใช้กับเครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI Prism 310
21. การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปและโปรแกรมบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต
    - โปรแกรม BLAST จากเว็บไซต์ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Blast/
    - โปรแกรม ClustalW Multiple Alignment จากเว็บไซต์ http://www.ebi.ac.uk/clustalw/
    - โปรแกรม DNAStar software analysis (DNASTAR, Inc, USA)
    - โปรแกรม CromasPro version 1.33 จากเว็บไซต์ http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่างพืช

ได้คัดเลือกพันธุ์อ้อยที่มีเปอร์เซ็นต์ความหวานสูง ได้แก่ พันธุ์อู่ทอง 8 (UT8) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์ท่อนพันธุ์อ้อยจากศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น โดยนำท่อนพันธุ์มาปลูกในแปลงที่เตรียมเป็นร่องไว้ระยะห่าง 50 x 50 ซม. กลบด้วยดินผสมลงบนท่อนพันธุ์ จากนั้นใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 อัตรา 50 กิโลกรัมต่อไร่ รดน้ำ 2 - 3 วัน/ครั้ง เมื่ออายุประมาณ 1 เดือน นำใบอ่อนมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อหาส่วนของยีนทั้งจีโนม และเมื่ออ้อยอายุประมาณ 5 - 6 เดือน งดให้น้ำ นำใบอ่อนมาสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อหาส่วนของยีนที่มีการแสดงออก

2. ออกแบบไพรเมอร์ในส่วนของยีนทั้งจีโนม และในส่วนของยีนที่มีการแสดงออก

ทำการศึกษา และค้นหายีนที่ เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์น้ำตาล ได้แก่ ยีนซูโครสซินเตส (Sucrose Synthase; SuSy) ที่มีรายงานในพืชชนิดต่างๆ จากฐานข้อมูลทางอินเทอร์เน็ต (www.ncbi.nim.nih.gov/) นำมาวิเคราะห์ลำดับเบสที่มีความเหมือนกันอย่างสูง (conserve region) โดยใช้โปรแกรม ClustalW2 Multiple Alignment (European Bioinformatics Institute, UK) ออกแบบไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีน SuSy ทั้งจีโนม คือ SuSy (forward) และ SuSy (reverse) ไพรเมอร์ที่ใช้สังเคราะห์ยีนในส่วนที่มีการแสดงออก คือ SuSyXbaI (forward) และ SuSyKpnI (reverse) ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการเชื่อมต่อของชิ้นยีน SuSy เข้ากับ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) คือ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse) (ตารางที่ 1)

3. การโคลนยีน Sucrose Synthase (SuSy) ในส่วนของยีนทั้งจีโนม

3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

ตัวอย่างอ้อยที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ พันธุ์อู่ทอง 8 เมื่ออายุได้ 1 เดือน นำมาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัด Genomic DNA Extraction Kit (RBC Bioscience, Taiwan) ตัดใบอ่อนของอ้อยประมาณ 50 – 100 กรัม บดในโกร่งพร้อมกับไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงแป้ง ย้ายตัวอย่างลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม GP1 buffer หรือ GPX1 buffer 400 ไมโครลิตร และ RNase A (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 5 ไมโครลิตร ผสมโดยการเอียงหลอดไปมาเบาๆ บ่มที่อุณหภูมิ 65°C นาน 10 นาที เขย่าทุกๆ 5 นาที เติม GP2 buffer 100 ไมโครลิตร ผสมโดยการเอียงหลอดไปมาเบาๆ วางตัวอย่างบนน้ำแข็งนาน 3 นาที วาง Filter column ลงใน Collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร และย้ายตัวอย่างลงใน Filter column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 3 นาที ทิ้ง Filter column และย้ายน้ำใสลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม GP3 buffer 750 ไมโครลิตร (1.5 เท่าของสารละลาย DNA ที่ได้) เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน นาน 5 วินาที วาง GD column ลงใน Collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร และย้ายตัวอย่างลงใน GD column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที ทิ้งน้ำใสใน Collection tube และเก็บ GD column ไว้ (ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที อีกครั้ง นาน 2 นาที ทิ้งน้ำใสใน Collection tube เติม W1 buffer 400 ไมโครลิตร ลงใน GD column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 30 วินาที เทน้ำใสทิ้ง และวาง GD column ลงใน Collection tube อีกครั้ง เติม Wash buffer 600 ไมโครลิตร ลงใน GD column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 30 วินาที เทน้ำใสทิ้ง และวาง GD column ลงใน Collection tube อีกครั้ง (ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที อีกครั้ง นาน 3 นาที เพื่อให้ Column แห้ง) ย้าย GD column ที่แห้งแล้วลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Preheat Elution buffer 100 ไมโครลิตร ลงตรงกลางของ Column matrix ทิ้งไว้นาน 3 – 5 นาที จนกระทั่ง Elution buffer ถูกดูดซับโดย matrix ได้มากที่สุด นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 30 วินาที จะได้สารละลายดีเอ็นเอที่มีคุณภาพ เก็บสารละลาย DNA (original) ที่ –20°C จนกว่าจะนำไปใช้ นำสารละลาย DNA ที่ได้ไปวัดค่าความเข้มข้น (Optical Density : OD) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer และนำมาเจือจางด้วย TE (Tris-EDTA) buffer หรือน้ำ ให้ได้ความเข้มข้น 60 นาโนกรัม เพื่อนำไปทำ PCR ต่อไป

3.2 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ จาก genomic DNA โดยวิธี PCR Amplification

นำดีเอ็นเอของอ้อยที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการในหลอดทดลองกับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน Sucrose Synthase ที่ออกแบบไว้จำนวน 1 คู่ ได้แก่ SuSy1 (forward) และ SuSy1 (reverse) ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยใช้ LongRange PCR Using Q-Solution (QIAGEN, USA) ใน

ปริมาตรของปฏิกิริยาพอลิเมเรสทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ 40 – 100 นาโนกรัม, 1X LongRange PCR Enzyme Mix with $Mg2^{+}$, 2U LongRange PCR Enzyme Mix, dNTP mix (500 μM of each dNTP), 1X Q-Solution, 0.4 μM Gene Specific Primer (forward), 0.4 μM Gene Specific Primer (reverse) โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre-Denature 93°C 3 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denature 93°C 15 วินาที, Anneal 60°C 30 วินาที, Extend 68°C 8 นาที จำนวน 40 รอบ ตามด้วยขั้นตอน 72°C 7 นาที อีก 1 รอบ หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วเก็บตัวอย่างไว้ที่ 4°C และตรวจวิเคราะห์ผล โดยนำผลผลิต PCR ที่ได้มาตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วย 1% Agarose gel electrophoresis เทียบขนาดแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas, USA) นำไปย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel-Doc Transluminator (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) พร้อมบันทึกภาพ และเก็บตัวอย่างที่เหลือไว้ที่อุณหภูมิ-20°C

3.3 การโคลนยีน SuSy เข้าสู่เวคเตอร์ และการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

นำผลผลิต PCR มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) นำมาแยกด้วย 0.8% low melting gel แล้วย้อมด้วย Gel Star (Cambrex Bio Science Rockland, Inc) จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอบนเครื่อง Dark Reader Transilluminators ใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชั่งน้ำหนักเจลที่ได้เติม QG Buffer 3 เท่าของน้ำหนักเจล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50°C นาน 1 ชั่วโมง เขย่าแรงๆ ทุก 2 นาที จนเจลละลายหมด เติม Isopropanol 1 เท่าของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากัน ย้ายสารละลายทั้งหมดใส่ใน Binding Column บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม PE Buffer 750 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ย้าย Binding Column วางลงบนหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม EB Buffer (อุ่นที่อุณหภูมิ 50 - 60°C) 30 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 15 – 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที ตรวจสอบคุณภาพด้วย 1.5% Agarose gel electrophoresis นำดีเอ็นเอที่ได้มาทำปฏิกิริยา ligation โดยใช้ TOPO® XL PCR Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) ในปริมาตรของปฏิกิริยาทั้งหมด 5 ไมโครลิตร ประกอบด้วย Gel-purified long PCR product 4 ไมโครลิตร, pCR®-XL-TOPO® vector 1 ไมโครลิตร ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากันบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 25°C เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติม 6X TOPO Cloning Stop Solution 1 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา ผสมปฏิกิริยาทั้งหมดให้เข้ากันและนำไปปั่นเป็นเวลา 3 - 5 วินาที นำไปวางบนน้ำแข็งทันที จากนั้นทำการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* โดยใช้ One Shot® TOP10 chemically competent cells นำปฏิกิริยา ligation จำนวน 2 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดคอมพิเทนต์เซลล์ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และแช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30

นาที นำไป heat – shock ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 30 วินาที (ไม่ต้องเขย่า) นำไปแช่บนน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 2 นาที เติม Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC) medium 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้รับการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียแล้วไป spread บนอาหารแข็ง Luria Bertani (LB) (เตรียม 1 ลิตร : 10 กรัม NaCl, 10 กรัม Tryptone, 5 กรัม Yeast extract, 15 กรัม Bacto-Agar, ddH_2O) เติมสารปฏิชีวนะ Kanamycin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มเพลทไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นานข้ามคืน

3.4 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ และการตรวจสอบการปรากฏของยีน

คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่มีชิ้น insert ของยีน นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ Kanamycin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบ/นาที นาน 12–16 ชั่วโมง นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้ GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, USA) นำเซลล์ที่เลี้ยงไว้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ เทอาหารทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วย Resuspension Solution 250 ไมโครลิตร เขย่าให้เซลล์ละลาย เติม Lysis Solution 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดขึ้นลง 4 – 6 ครั้ง เติม Neutralization Solution 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดขึ้นลง 4 – 6 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที จากนั้นย้ายสารละลายเซลล์ลงใน GeneJET™ spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม Wash Solution 500 ไมโครลิตร เพื่อล้าง column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) ย้าย GeneJET™ spin column วางบนหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Elution Buffer 50 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้นาน 15 – 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1% Agarose gel electrophoresis และเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

การตรวจสอบการปรากฏของยีน SuSy โดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Apa*I ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 100 – 200 นาโนกรัม, 1X FastDigest Buffer, 0.5U FastDigest Enzyme ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80°C นาน 5 นาที นำมาตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอด้วย 1% Agarose gel electrophoresis

3.5 การวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA Sequencing)

นำตัวอย่างพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของยีน SuSy มาเป็นต้นแบบในการวิเคราะห์ลำดับเบส โดยใช้สารเคมี ABI PRISM® BigDye® Terminator Cycle Sequencing V3.1 Kit (Perkin-Elmer)

ร่วมกับไพรเมอร์ M13 (forward) 5′ – GTA AAA CGA CGG CCA GT – 3′ และ M13 (reverse) 5′ – GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG G – 3′ ในการทำปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม, BigDye™ 2 ไมโครลิตร, Ready Reaction buffer 1 ไมโครลิตร, 5 ไมโครโมล ไพรเมอร์ Forward / Reverse และ ddH_2O 3.4 ไมโครลิตร นำปฏิกิริยา cycle sequencing ที่ได้ เข้าเครื่อง Thermal Cycler 9700 โดยตั้งรอบปฏิกิริยาดังนี้ Denaturation 96°C 10 วินาที, Annealing 50°C 5 วินาที, Extention 60°C 4 นาที จำนวน 25 รอบ และ Hold ที่ 4°C infinity (α) หลังจากนั้นทำการล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน โดยนำผลผลิตที่ได้ใส่ลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Solution A (ddH_2O 16 ไมโครลิตร: 95% ethanol 64 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงทุก 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0°C ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70% Ethanol 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงนา น 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0°C ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนแห้งในที่มืด จากนั้นละลายตะกอนด้วย Hidi-formamide 10 ไมโครลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากันในหลอด นำไปปั่นให้ดีเอ็นเอตกที่ก้นหลอด นำตัวอย่างใส่หลอด Septa บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 2 นาที และแช่ไว้บนน้ำแข็งทันที นำตัวอย่าง load เข้าเครื่อง ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบส จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าต่างๆ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปและโปรแกรมบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต

4. การโคลนยีน Sucrose Synthase (SuSy) ในส่วนที่มีการแสดงออก

4.1 การสกัดอาร์เอ็นเอรวม

ตัวอย่างอ้อยที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ พันธุ์อู่ทอง 8 เมื่ออายุได้ประมาณ 5 – 6 เดือน งดให้น้ำ นำมาสกัดอาร์เอ็นเอรวม โดยใช้ MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit (BIONEER Corporation) ตัดใบอ่อนของอ้อยประมาณ 1 - 5 มิลลิกรัม บดในโกร่งพร้อมกับไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงแป้ง ย้ายตัวอย่างลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Tissue and Cell Lysis Solution 300 ไมโครลิตร ผสมโดยการเอียงหลอดไปมาเบาๆ บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 65°C นาน 15 นาที เขย่าทุกๆ 5 นาที วางตัวอย่างบนน้ำแข็งนาน 3 – 5 นาที เติม MPC Protein Precipitation Reagent 150 ไมโครลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน นาน 10 วินาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ย้ายส่วนใสใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Isopropanol 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 30 – 40 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที เทส่วนใสออกให้หมด ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย DNaseI Solution 200 ไมโครลิตร บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 37°C นาน 10 - 30 นาที เติม MPC Protein Precipitation Reagent 200

ไมโครลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน นาน 10 วินาที วางตัวอย่างบนน้ำแข็ง นาน 3 – 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ย้ายสารละลายอาร์เอ็นเอที่ได้ลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Isopropanol 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 30 – 40 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ระวังอย่าให้ตะกอน หลุดหาย ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 75% Ethanol 300 ไมโครลิตร (ทำ 2 ครั้ง) เอา Ethanol ออกให้หมดโดยใช้ไปเปตละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย TE buffer 35 ไมโครลิตร แล้วเติม Script Guard RNase Inhibitor 1 ไมโครลิตร เพื่อยับยั้งไม่ให้ อาร์เอ็นเอถูกย่อย วัดค่าความเข้มข้น (O.D.) ของสารละลายอาร์เอ็นเอที่ได้ โดยใช้เครื่อง spectrophotometer เก็บสารละลายอาร์เอ็นเอที่ -80°C จนกว่าจะใช้งาน

4.2 การสังเคราะห์ cDNA จาก total RNA โดยวิธี RT-PCR

ทำการสังเคราะห์ cDNA จากอาร์เอ็นเอรวมของอ้อย โดยใช้ SuperScrip™ III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) ด้วยวิธี One-Step RT-PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน SuSy ได้แก่ SuSy*Xba*I (forward) และ SuSy*Kpn*I (reverse) ซึ่งได้เติมลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งจดจำของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *KpnI* เพื่อบังคับทิศทางของการ แปลรหัสในปริมาตรของปฏิกิริยาพอลิเมเรสทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลาย total RNA 10 นาโนกรัม – 1 ไมโครกรัม, 10 μM Gene Specific Primer (forward), 10 μM Gene Specific Primer (reverse), 2X Reaction Mix, 2U SuperScript™III RT/Platinum Taq Mix นำปฏิกิริยาเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม PCR (Thermal Cycle 9700) โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre-Denature 55°C 30 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94°C 2 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denature 94°C 15 วินาที, Anneal 60°C 30 วินาที, Extend 68°C 3 นาที จำนวน 40 รอบ ตามด้วยขั้นตอน 68°C 5 นาที อีก 1 รอบ หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วเก็บตัวอย่างไว้ที่ 4°C และนำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1% Agarose gel electrophoresis และเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

4.3 การโคลนยีน SuSy เข้าสู่เวคเตอร์ และการวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA Sequencing)

นำผลผลิต PCR มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) (ข้อ 3.3) จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยา ligation โดยใช้ T&A Cloning Kit (RBC Bioscience, Taiwan) ในปริมาตรของปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย Gel-purified PCR product 4 ไมโครลิตร, T&A Cloning vector 2 ไมโครลิตร, Ligation Buffer A 1 ไมโครลิตร, Ligation Buffer B 1 ไมโครลิตร, T4 DNA Ligase 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ ผสมปฏิกิ ริยาทั้งหมด

ให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 22°C เป็นเวลา 15 – 30 นาที และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4°C นาน ข้ามคืน จากนั้นทำการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดยนำปฏิกิริยา ligation จำนวน 2 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดคอมพิเทนต์เซลล์ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และแช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไป heat – shock ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 30 วินาที (ไม่ต้องเขย่า) นำไปแช่บนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที เติม S.O.C. medium 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไป spread บนอาหารแข็ง LB (เตรียม 1 ลิตร : 10 กรัม NaCl, 10 กรัม Tryptone, 5 กรัม Yeast extract, 15 กรัม Bacto-Agar, ddH_2O) เติมสารปฏิชีวนะ Amplicilin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มเพลทไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นานข้ามคืน

คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่มีชิ้น insert ของยีน นำไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ Amplicilin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบ/นาที นาน 12 – 16 ชั่วโมง นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้ GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, USA) (ข้อ 3.4) และนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1% Agarose gel electrophoresis และเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

การตรวจสอบการปรากฏของยีน SuSy โดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 100 – 200 นาโนกรัม, 1X FastDigest Buffer, 0.5U FastDigest Enzyme ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80°C นาน 5 นาที นำมาตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอด้วย 1% Agarose gel electrophoresis

นำตัวอย่างพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของยีน SuSy ในส่วนที่มีการแสดงออก มาเป็นต้นแบบในการวิเคราะห์ลำดับเบส โดยใช้สารเคมี ABI PRISM® BigDye® Terminator Cycle Sequencing V3.1 Kit (Perkin-Elmer) ร่วมกับไพรเมอร์ M13 (forward) และ M13 (reverse) (ข้อ 3.5) จากนั้นนำข้อมูลลำดับเบสที่ได้ไปวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปและโปรแกรมบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต

5. การเชื่อมต่อชิ้นยีน SuSy เข้ากับ Plant Expresstion Vector และการตรวจสอบการปรากฏของยีน

5.1 การเชื่อมต่อชิ้นยีน SuSy เข้ากับ Plant Expresstion Vector

นำพลาสมิด pCAMBIA2300 ที่มีส่วนประกอบของโปรโมเตอร์ (35SCaMV) และเทอร์มิเนเตอร์ (NOS) ซึ่งมีขนาด 9,648 คู่เบส มาใช้เป็น Plant Expression Vector มียีน NPTII (kanamycin) เป็นยีนคัดเลือก และชิ้นดีเอ็นเอของยีน SuSy ขนาด 2,375 คู่เบส นำแต่ละตัวอย่างมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I โดยในปฏิกิริยาทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอของยีน SuSy/พลาสมิดดี

เอ็นเอ ของ pCAMBIA2300 ที่ความเข้มข้นตัวอย่างละ 1 ไมโครกรัม, 1X FastDigest Buffer, 1U FastDigest enzyme ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที และนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 80°C นาน 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา หลังจากนั้นนำมาแยกด้วย 0.8% low melting gel แล้วย้อมด้วย Gel Star (Cambrex Bio Science Rockland, Inc) ตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการบนเครื่อง Dark Reader Transilluminators และแยกสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) (ข้อ 3.3) จะได้ชิ้นพลาสมิด pCAMBIA2300 และชิ้นยีน SuSy โดยที่ปลายข้างหนึ่งเป็นตำแหน่งจำจดของเอนไซม์ตั ดจำเพาะ *Xbal* และอีกข้างหนึ่งเป็นตำแหน่งของเอนไซม์ *KpnI*

นำชิ้นยีน SuSy เชื่อมต่อเข้ากับ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) เพื่อสร้างพลาสมิด ดีเอ็นเอสายผสมที่สมบูรณ์ ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ชิ้นดีเอ็นเอของยีน SuSy 100 – 200 นาโนกรัม, pCAMBIA2300 50 – 400 นาโนกรัม, 1X Ligation Buffer, T4 DNA ligase, ปรับปริมาตรด้วยน้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 22°C นาน 1 ชั่วโมง และนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 65°C นาน 10 นาที จากนั้นทำการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดยนำปฏิกิริยา ligation จำนวน 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดคอมพิเทนต์เซลล์ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และแช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไป heat – shock ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 45 วินาที นำไปแช่บนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 30 นาที เติม S.O.C. medium 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไป spread บนอาหารแข็ง LB (เตรียม 1 ลิตร : 10 กรัม NaCl, 10 กรัม Tryptone, 5 กรัม Yeast extract, 15 กรัม Bacto-Agar, ddH_2O) เติมสารปฏิชีวนะ Kanamycin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มเพลทไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นานข้ามคืน

5.2 **การตรวจสอบการปรากฏของยีนด้วยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ และเทคนิค PCR**

การตรวจสอบการปรากฏของยีนด้วยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยคัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าได้รับพลาสมิดสายผสม นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดพลาสมิด GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, USA) และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I ในปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร, 1X FastDigest buffer, 0.5U FastDigest enzyme, ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ นำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่ 80°C นาน 5 นาที จากนั้นนำไปตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis เทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas, USA)

การตรวจสอบการปรากฏของยีนด้วย เทคนิค PCR โดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้นำมาทำปฏิกิริยา PCR ร่วมกับไพรเมอร์ NOS (forward) และ 35SCaMv (reverse) (ตารางที่ 1) ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัม, 2U HotStart Taq Master Mix, 0.5 μM Primer (forward), 0.5 μM Primer (reverse) ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre-Denature 95°C 15 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denature 94°C 30 วินาที, Anneal 60°C 30 วินาที, Extend 72°C 3 นาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วยขั้นตอน 72°C 10 นาที อีก 1 รอบ และ Hold ที่ 4°C infinity (α) หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วเก็บตัวอย่างไว้ที่ 4°C และตรวจวิเคราะห์ผล โดยนำผลผลิต PCR ที่ได้มาตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วย 1% Agarose gel electrophoresis นำไปย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transiluminators เทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas, USA) พร้อมบันทึกภาพ และเก็บตัวอย่างที่เหลือไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

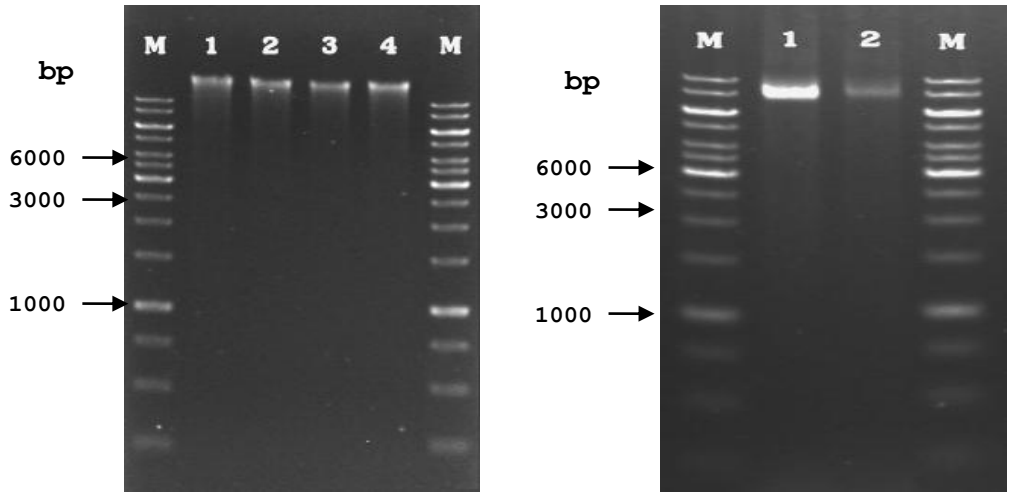
ผลการทดลองและวิจารณ์

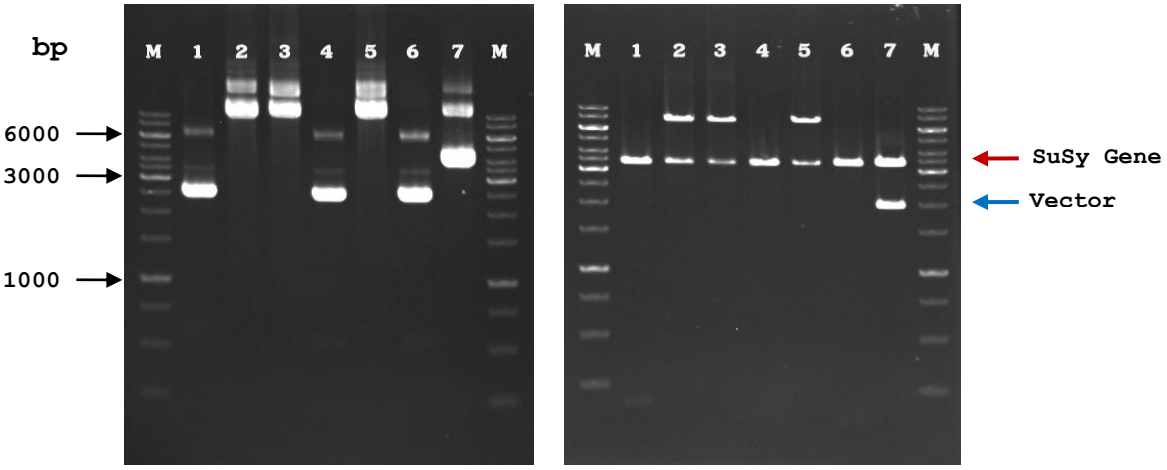
1. การโคลนยีน Sucrose Synthase (SuSy) ในส่วนของยีนทั้งจีโนม

จากการโคลนยีน Sucrose Synthase (SuSy) ในส่วนของยีนทั้งจีโนม โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ บริเวณที่มีความเหมือนของลำดับพันธุกรรมอย่างสูง (conserved region) ที่มีรายงานในพืชชนิดต่างๆ จากฐานข้อมูลทางอินเทอร์เนต NCBI สามารถออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน SuSy ได้จำนวน 1 คู่ คือ SuSy1 (forward) และ SuSy1 (reverse) (ตารางที่ 1) โดยนำไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ได้มาทำปฏิกิริยา PCR กับจีโนมิกดีเอ็นเอของอ้อยพันธุ์อู่ทอง 8 (UT8) (ภาพที่ 1ก) พบว่า สามารถทำปฏิกิริยาได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 7.5 กิโลเบส (ภาพที่ 1ข) นำดีเอ็นเอของยีน SuSy ที่ได้ไปเชื่อมต่อเข้ากับเวคเตอร์ TOPO® XL PCR Cloning Kit และถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย One Shot® TOP10 chemically competent cells คัดเลือกโคโลนีที่คาดว่ามียีน SuSy นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ จำนวน 7 โคลน (ภาพที่ 2ก) และตรวจสอบโคโลนีที่ได้รับการถ่ายยีนโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Apa*I พบว่า รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของยีน SuSy มีจำนวน 3 โคลน ได้แก่ โคลนที่ 2, 3 และ 5 (ภาพที่ 2ข) นำพลาสมิด ดีเอ็นเอโคลนที่มียีน SuSy ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้ วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer พบว่า ยีน SuSy มีลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 7495 คู่เบส (ภาพที่ 3)

ตารางที่ 1 แสดงคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ของยีน Sucrose Synthase (SuSy)

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')	ขนาด (bp.)	อุณหภูมิ Tm (°C)	GC content (%)
SuSy1(forward)	GTT CTG TCG ACG CCA TTC CTG TGC TCT GCC GTC CAG CG	38	77.6(60)	63.2
SuSy1(reverse)	CAT TGC ATT GAA CTT TGG AAG ACA GGT GAA CGA GC	35	69.4(60)	45.7
SuSyXbaI(forward)	CAC TCT AGA ATG GCT GCC AAG TTR ACT CGC CTC CAC	36	73.2(60)	54.2
SuSyKpnI(reverse)	CAC GGT ACC CTA CGG TAT TTC AGA GCA TAG AAC ATC	36	70.4(60)	47.2
NOS(forward)	GTT TGA ACG ATC GGG GAA ATT CGA GCT C	28	67.5(60)	50.0
35SCaMV(reverse)	CAT TTG GAG AGG ACA CGC TGA CAA GCT GAC	30	70.1(60)	53.3





ก ข

ภาพที่ 1 ก. แสดงจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากอ้อยพันธุ์อยู่ทอง 8 (UT8), Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-4 = อ้อยพันธุ์อู่ทอง 8 (UT8)

ข. แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน Sucrose Synthase (SuSy) ที่เพิ่มปริมาณได้จากอ้อยพันธุ์ อู่ทอง 8 (UT8) ร่วมกับคู่ไพรเมอร์ SuSy1 (forward) และ SuSy1 (reverse) ด้วยเทคนิค PCR, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = แถบดีเอ็นเอของยีน SuSy1 ในอ้อยพันธุ์อู่ทอง 8 (UT8)

ภาพที่ 2 ก. แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดพลาสมิดโ คโลนีสีขาวที่คาดว่ามียีน Sucrose Synthase (SuSy), Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-7 = แถบ ดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอโคลนที่ 1 - 7

ข. แสดงรูปแบบของพลาสมิดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ*Bam*HI และ *Apa*I, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-7 = รูปแบบของพลาสมิดดีเอ็นเอโคลนที่1 – 7

```
   1 gttctgtcga cgccattcct gtgctctgcc gtccagcgtt tgcgaaggta tgcatcgacg
  61 actcgtctcg tctcgtccgt gttgcctcta cgatgcaatg ccggccactg tgttccgaaa
 121 ttgtgcatgc gtttggttgg ggagggtggt acgtctgtta gcggaaactg ggcatgcaag
 181 ctaggtctgt ttgctggcgt ttttttagtt tatgtaccca gtgcacattt taattctttt
 241 agtattgtcc tttgcatcct gatgatagcc gccgaaaagt tgaaaatgct tttgagacaa
 301 gtaattgtca acgtgacggg atggatcttt aatggtacac acaaatcatg cattatcgtc
 361 cccgcaagca aagcgtttgg atttggatct catatgctgt tgcctgttga gagactagcc
 421 gtgacatgac aagagcgctc atgtggtcct cctgtgtcct ctttgcctct ttctttttcg
 481 tgcaagaaga agcgcctcct tttctgttcc gctaccgcta gcttctcgtc accacctcgc
 541 ttgatttttt tcttttccat gtcagcaccg cataggcact tcttgtttag gcagctctgt
 601 tcttgtttgg aacgtagccc caaacctcgc ggcggacggc acgcccgatg cgagtgccgt
 661 ctggcggctc atctcatcag ctcatcaggc gcccgcccag ctgcatcgac caatcttcgc
 721 aagaaccgat gctttctgtt cttgaaacga tatctgcgct cggcaacttt cttgttgccg
 781 cttgtcgctt gtgctgctga ctggacgcag ctccggaggg tttttggatg catttttagg
 841 gatggttgtg cctgcttttt tcgtagagaa ttcgcccact tgtttgcagc acgttcttgg
 901 tgtttccccc cgttgtttct gcacacgggc tttctgagag acccgtgttt tacttttttat
 961 acatttctag aaggacggca aacctactga tccaatggca ttagggaggg ggaaaatatc
1021 tcgctgctac tttttaatcc ggacaatctt atctgcgttt gcgtctgatg atgactgcaa
1081 tgctgatcgt atcttgggtg ccggatcacc gccttttgc tgctcaccaa atcagctgcg
1141 agatttcggt ggtgaaatta ggaactcatc gagagaataa tacagtagaa agaagctttc
1201 ttttttttc tccgttggcc ggtttccttt cgtttcttgc tcgcctttct ctcccagcca
1261 gtctttgctt gcgttcactg cacctgcaca agtcaccccg accagcactg tacgagtctg
      Promotor
1321 cataaaaaaa ggtccaagct ttttcgaaac cagccattgg tctggtagtg gtaggccagc
1381 atatgctaat tggatgcttt tgccgcacca ttcagtccat gacactatca gtgacaccac
1441 caccagtatt tggaaattct agttttcaag tatagtaatt tggcattatc cattgcttaa
1501 aattcccagc tttgtcagct tgaaggtgga ccctaccatt tgcaccacag ctcacaggta
1561 ccacctcggt acctcacgca ggctcacagg tcacagcact ggggtccggg agccttgggc
                          TATA signal
1621 ttacagcagc tgccctctct atttattggt tcctcttccg tcccggagaa agcctcctcc
1681 attggactgc tccctgttga ccatttgggt atgctcgctc ttctgtttat ctccgtacta
1741 aacctctgtc ctctggtaat cctgggtggg gtttttgctg ggattttgag ctaatatggc
1801 cgcggtagaa aaagatcgtg tcttgatgag cgctatcact cgccttaatt gtctccttgc
1861 cccgccattt cttccggttt tcgtgcgttt tccgtgattc gctgggtgcg tcatcgcctg
1921 aatcttgcct gggctctgct gacatggtct tgggtttatt gtagatttct ctgatctaaa
1981 ccgttcctgt actgcgcgca gagctttccg ccgtcctttt ctgggggttt tgagcttagg
2041 attatacttg gtggtggtgg taaacttgga ttcacacatg gatactgtag aaattctagg

2101 ctctgtagtt tgcttgagat cttgctgtga ttgcgtgccg tgctcacctc ttttgctttg
2161 cgacgaatgt atttgtcctt ttggtggatt attagcgcga ttttttttg tttttggttc
2221 ttttactacg aaaagtcatc ttgttggatt tttctatatt tcacctttt attgatgtgc
2281 ttactctagg aatttgtgaa gccagatcct cttattttca caggtttttg gctgtttctt
2341 agtggggttt agggtctgaa tggcatcaat actcttaaca aacagaaatt taactcaatc
2401 aagttggttc ctttctcctt tgaaaatatt atcagataac taagtgcttg tgcggaatca
2461 gtacttgctt ttgtttggtg gaggatcaat actgaataaa tacttgcttt tgtttaggtg
2521 ggggataagt gcctgcttta tcatgactat tttgctatag gattctatct tgttaattgt
2581 ttctgttgag ataaatcaaa tagtatagct gcatactatt tttttctcca aatttaggtt
```

ภาพที่ 3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Sucrose Synthase (SuSy) ทั้งจีโนม

```
2641 gctttagcat ggcctacttt ttcagacagt cttctaagtt ctaagtggta gctcttgata
2701 tcttgttctt gtacaagtgg tgctgctgcc tgaatcttaa ctgtatagct cgaattgcag
2761 tattgagtgt cattgagcca tggctgccaa gttgactcgc ctccacagtc ttcgcgaacg
2821 ccttggtgcc accttctcct ctcatcccaa tgagctgatt gcactcttct ccaggtgggc
2881 ataccaaaat atgtaacttg catttcattt cctgtactga aatttgttaa tttggtattc
2941 tcctcatccc tatcttaata gcacgcccaa atgtaaacac gagcatatgc aacttctttc
3001 ttggtttctt ttgttgacac catcatgcat gctaatttct aaggatgtta catattcatc
3061 ctcgactata ttgatcatat gtaatgattt tatgatcaga agattattga ttgtaaagca
3121 tagtgttact gttcttcagt ttttgtagcc ttttggtttg attagtacaa tttagttgat
3181 aagacagtaa gtttgtggta catcatttgg cagattgttt gtctttagct ggtacagtgc
3241 catttaatat ttacatcctt cagatctaaa taggatatga gatgtccatc acaacaggga
3301 aaaaggtaca tgatatgaga tgtaacatcc attttatttg tgaaatatca cttttacagg
3361 tatgttaacc agggcaaggg aatgcttcag cgccatcaac tgcttgctga gtttgatgcc
3421 ctgtttgata gtgacaagga gaagtatgcg cccttcgaag actttcttcg cgctgctcag
3481 gtaacactgc tgagatgcct gcttgagttc ttgccaattg aaaatcaggt actcattcta
3541 atttcccttg tctgcatata ggaagcaatt gtgctccctc cctgggtagc acttgctatc
3601 aggccaaggc ctggtgtctg ggattacatt cgagtgaatg taagcgagtt ggctgtggag
3661 gagctgagtg tttctgagta cttggcattc aaggagcagc tggtggatgg aaagtaagtt
3721 cttcgatgaa ttctttgtag ttttataggc taatctctag attctagtta tggaaacttg
3781 tatatgtact aattccatac ctccttttcc ttataccagt tccaacagca actttgttct
3841 tgagcttgat tttgagccct tcaatgcctc attccctcgt ccttccatgt caaagtccat
3901 tggaaatgga gtgcaattcc ttaaccgaca cctgtcttcc aagttgttcc aggacaagga
3961 gagcctgtac ccattgctga atttcctcaa agcccataac tacaagggca cggtgagctt
4021 acagtccaga atcttccaag cgcatgcttc acaatcgatg atgacaatat ttatttaatt
4081 ttatttagga actttacata acctgaaaat ggattaaatg atgccacccg actccttcat
4141 ttgtaagtcc tttttttttct gttacagacg atgatgttga atgacagaat tcagagcctc
4201 cgtgggctcc agtcatccct tagaaaggca gaagagtatc tactgagtgt ccctcaagac
4261 actccctact cagagttcaa ccataggtga ttgatcaata aattgtcctt gccatttaac
4321 tttggttgaa ctagcaaatg gattaactgc ttgtaatgcc accatgatct gcattaggtt
4381   ccaagagctt ggcttggaga agggttgggg tgacactgca aagcgcgtac ttgatacact
4441 ccacttgctt cttgaccttc ttgaggcccc tgatcctgcc aacttggaga agttccttgg
4501 aactatacca atgatgttca atgttgttat cctgtctcct catggctact ttgcccaatc
4561   caatgtgctt ggataccctg acactggtgg tcaggtacag aatcttagtg attatttttc
4621 ttttagctac tgtagctttt aggtttctca tttgcaatcg ttttgcaggt tgtgtacatt
4681 ttggatcaag tccgtgcttt ggagaatgag atgcttctta ggattaagca gcaaggcctt
4741 gacatcaccc cgaagatcct cattgtatgt ttcatgtttg agaccatgtt tcgccttctg
4801 aacccttttca ttgtttcttg atttactcag taaatgttcc tacataatct tatttgtgca
4861 ggttaccagg ctgttgcctg atgctgttgg gactacgtgc ggtcagcgtc tggagaaggt
4921 cattggaacc gagcacacag acattattcg tattccattc agaaatgaga atggtattct
4981 ccgcaagtgg atctctcgtt ttgatgtctg gccatacctg gagacataca ctgaggtata
5041 tagattatct gactgaatgt cctacacagc atagcttgtt tgagtaatac tgaagtcatg
5101 cattctgtgc tacaggatgt tgccagtgaa ataatgttag aaatgcaggc caagcctgac
5161 cttatcgttg gcaactacag tgatggcaat ctagtcgcca ctctgctcgc gcacaagttg
5221 ggagttactc aggtctgttt ggctgtacat gagtaattga gtttttttat aaaattatta
5281 agttctccaa atgcttaata gttttgtaca tgcttgcagt gtaccattgc ccacgccttg
5341 gagaaaacca aatatcccaa ctcagacata tacttggaca aatttgacag ccaataccac
```

ภาพที่ 3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Sucrose Synthase (SuSy) ทั้งจีโนม (ต่อ)

```
5401 ttctcatgcc agttcacagc tgaccttatt gccatgaatc acactgattt catcatcacc
5461 agtacattcc aagaaatcgc gggaaggtaa gttttgtata ttatctttag aatctcgctg
5521 tattgtagta gtaactaaac tagtatctga tgttttctct gttatttctg cagcaaggac
5581 actgtggggc agtatgagtc ccacattgcg ttcattcttc ctggacttta ccgtgttgtc
5641 catggcattg atgtttttga tcccaaattc aacattgtct ctcctggagc agacatgggt
5701 gtttactacc catacactga aactgacaag agactcactg ccttccatcc tgaaattgag
5761 gagctcatct acagtgatgt tgagaacgat gagcacaagt gagtactgaa ctgattgaat
5821 gtcttcttgt agtcaatcag cttgtaaata ttccaacact catctgcatg tctgtccatc
5881 tttctatcta ttaagatatg caaagctgtt attgccattt acaataaata agttttcgac
```

```
5941 ctgaacacct ggtatttaat tgcttccagg tttgtgttga aggacaagaa caagccgatc
6001 atcttctcaa tggctcgtct tgaccgtgtg aagaacatga caggcttggt tgagatgtat
6061 ggtaagaatg cacgcctgag ggaattggca aaccttgtga ttgttgctgg tgaccatggc
6121 aaggaatcga aggacaggga ggagcaggca gagttcaaga agatgtacag tctcattgat
6181 gagtacaact tgaagggcca tatccggtgg atctcagctc agatgaaccg tgtccgcaac
6241 gctgagttgt accgctacat ttgtgacacg aagggagcat ttgtgcaggt acatatacac
6301 acttaatcta ataaatcact tccaggttcc aacaatagtg caatctactt tcagataacg
6361 acagtcatag agcttgtgca ggactaaatt attttgtcac tttgtttttg tagcctgcat
6421 tctatgaagc attcggcctg actgtcattg agtccatgac gtgcggtttg ccaacaattg
6481 caacctgcca tggtggccct gctgaaatca ttgtggacgg ggtgtctggt ttgcacattg
6541 atccttacca cagtgacaag gctgcagata ttttggtcaa cttctttgag aagtgcaagg
6601 cagacccaag ctactgggac aagatctcac agggtggact gcagagaatt tatgagaagt
6661 atgaaatttt ctcttctgcc atatatgata taaatagata tacactgaag aattcttgtt
6721 gaccaaaggc cgcatctgat taattctcat aatcagatat tatagggttg agcacttaga
6781 tatttgtgtt acccttgtag ccttctctgg ttacaaacac tatatcattc ccagtagggg
6841 gaaacccctc ctgttttcaa aaataaaata aaattaaata aaaaacacta tatgattcca
6901 tgccacgaac actcagaaat ttgtgttatc cttctctagt tgggagtaat cctgatacga
6961 taagctttgc attgctcagg tacacctgga agctctactc cgagaggctg atgaccctga
7021 ctggtgtata cggattttgg aagtatgtga gcaatctgga gaggcgtgag actcgccgct
7081 accttgagat gttctatgct ctgaaatacc gtagcctggt aagtttttg atgtcttgct
7141 agagagaata tgtgtagcat cgagtgttca gttcagcagt cttaaacaag tggattaact
7201 agtacatctc tttcttgaat ccaggcaagt gcggttccat tgtccttcga ttagtgtggg
7261 aaagaagaac cccaatctgg agtagtggag aaccatcatc tgcatttcga ttgttcgctg
7321 caattcgcat tgttagttgt gtatttgagt tatgtgtact tcgtttccaa gcactttggt
7381 tccttttgc gagttttggg cagcgctggc tggttccttt tataggaatt agctgcacct
```

PolyA signal

```
7441 tttgcttcaa ataaacgcct gctcgttcac ctgtcttcca aagttcaatg caatg
```

ภาพที่ 3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Sucrose Synthase (SuSy) ทั้งจีโนม (ต่อ)

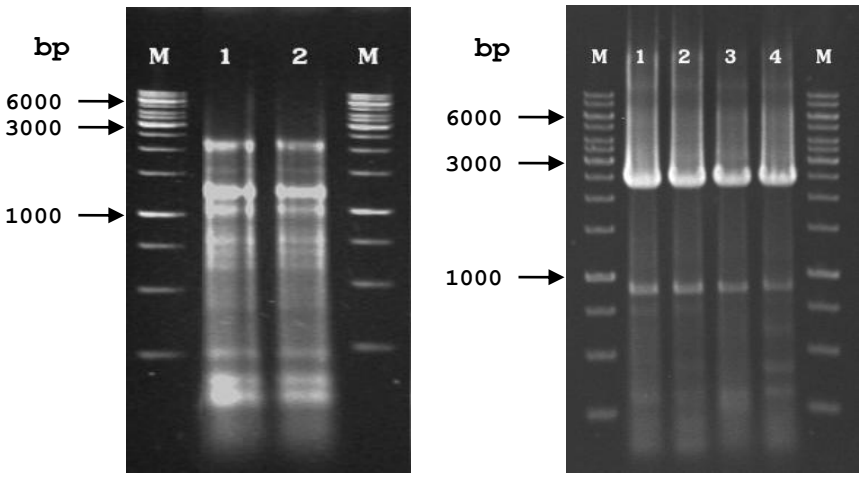
เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์โครงสร้างของยีน โดยใช้โปรแกรม Software GenScan บนอินเทอร์เน็ต พบว่า ยีน Sucrose Synthase ที่ได้มีส่วนประกอบครบทั้งยีน ซึ่งประกอบด้วย ตำแหน่งของโปรโมเตอร์ อยู่ระหว่างลำดับเบสที่ 1317 – 1356 ลำดับเบสส่วนที่มีการแสดงออกของยีน Open Reading Frame (ORF) จำนวน 12 exon (ตารางที่ 2) และพบลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง TATA signal (TATTTATT) อยู่ในส่วนของ 5′UTR ระหว่างตำแหน่งของลำดับเบสที่ 1640 – 1647 ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง PolyA signal (AATAAA) อยู่ในส่วนของ 3′UTR ระหว่างตำแหน่งของลำดับเบสที่ 7450 – 7445 (ภาพที่ 3)

ตารางที่ 2 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Sucrose Synthase (SuSy) ในส่วนของยีนที่มีการแสดงออก (exon) บนอินเทอร์เน็ตโปรแกรม www.genes.mit.edu/GENSCAN.html

ลำดับที่	ชนิดของยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์เริ่มต้น (bp)	ลำดับนิวคลีโอไทด์สิ้นสุด (bp)	ความยาว exon (bp)
1.00	Promotor	1317	1356	40
1.01	Initial exon (ATG to 5' splice site)	2780	2874	95
1.02	Internal exon (3' to 5'splice site)	3360	3480	121
1.03	Internal exon (3' to 5' splice site)	3562	3713	152
1.04	Internal exon (3' to 5' splice site)	3820	4012	193
1.05	Internal exon (3' to 5' splice site)	4466	4594	129
1.06	Internal exon (3' to 5' splice site)	4862	5035	174
1.07	Internal exon (3' to 5' splice site)	5116	5232	117
1.08	Internal exon (3' to 5' splice site)	5413	5486	74
1.09	Internal exon (3' to 5' splice site)	5574	5798	225
1.10	Internal exon (3' to 5' splice site)	5970	6288	319
1.11	Internal exon (3' to 5' splice site)	6414	6658	245
1.12	Internal exon (3' to 5' splice site)	6980	7118	139

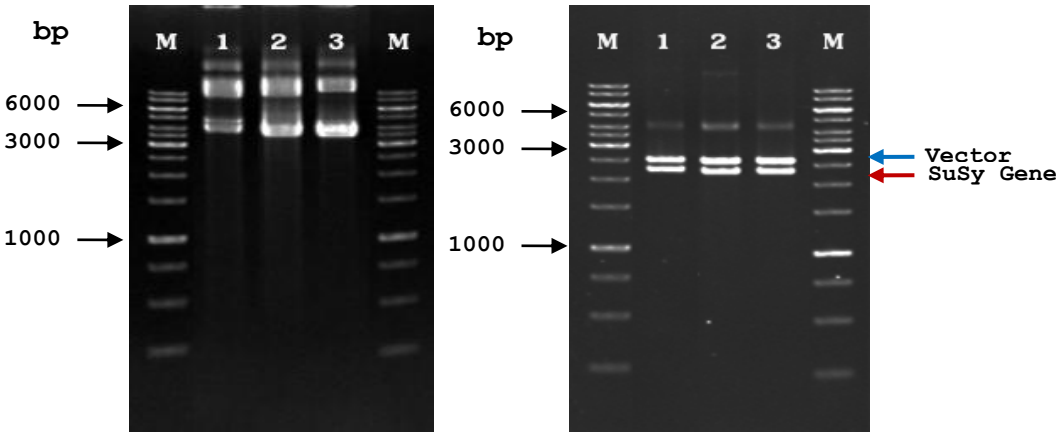
2. การโคลนยีน Sucrose Synthase (SuSy) ในส่วนที่มีการแสดงออก

ทำการโคลนยีน SuSy ในส่วนที่มีการแสดงออก โดยนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน SuSy ทั้งจีโนมที่วิเคราะห์ได้ มาออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีนในส่วนของยีนที่มีการแสดงออก ซึ่งได้เติมลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I เพื่อบังคับทิศทางของการแปลรหัส คือ SuSyXbaI (forward) และ SuSyKpnI (reverse) (ตารางที่ 1) โดยนำไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ไว้มาทำปฏิกิริยา RT-PCR กับอาร์เอ็นเอรวมของอ้อยพันธุ์อู่ทอง 8 (UT8) (ภาพที่ 4ก) พบว่า สามารถทำปฏิกิริยาได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2.4 กิโลเบส (ภาพที่ 4ข) นำแถบดีเอ็นเอที่ได้ไปเชื่อมต่อเข้ากับเวคเตอร์ T&A Cloning Vector และถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียสายพัน ธุ์ DH5α ทำการคัดเลือกโคโลนีสีขาว นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (ภาพที่ 5ก) และตรวจสอบโคโลนีที่ มีชิ้นส่วนของยีน SuSy โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I พบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่มีความถูกต้องจำนวน 2 แถบ ได้แก่ ขนาดประมาณ 2.7 กิโลเบส เป็นขนาดของเวคเตอร์ (Vector) และ 2.4 กิโลเบส เป็นขนาดของยีน (SuSy Gene) ตามลำดับ (ภาพที่ 5ข) จากนั้นนำพลาสมิดดีเอ็นเอ ที่มีชิ้นส่วนของยีนไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer พบว่า ยีน SuSy ลำดับนิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 2,376 คู่เบส สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโน ของยีน Sucrose Synthase (SuSy) โดยใช้โปรแกรม ExPASy Bioinformatics Resource Portal บนอินเทอร์เน็ต จำนวน 792 amino acid และอยู่ภายใน Open reading frame ระหว่างตำแหน่งของลำดับดับเบสที่ 1 – 2376 (ภาพที่ 6) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ยีนที่ได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน SuSy ที่พบในอ้อย (*Saccharum officinarum* L.) (AF263384.1) (ภาพผนวกที่ 1) ข้าวโพด (*Zea mays* L.) (FJ436056.1) และข้าวฟ่างหางหมา *(Setaria italic)* (XM004964554.1) โดยมีค่า %Max Identities เท่ากับ 99% 99% และ 94% ตามลำดับ (ตารางที่ 3)



ภาพที่ 4 ก. แสดงอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้จากอ้อย , Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = อ้อยพันธุ์อู่ทอง 8 (UT8)

ข. แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน Sucrose Synthase (SuSy) ที่เพิ่มปริมาณได้จากอ้อยพันธุ์อู่ทอง 8 (UT8) ร่วมกับคู่ไพรเมอร์ SuSyXbaI (forward) และ SuSyKpnI (reverse) ด้วยเทคนิค RT-PCR, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-4 = แถบ ดีเอ็นเอของยีน SuSy



ภาพที่ 5 ก. แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดพลาสมิดโคโลนีสีขาวที่มียีน Sucrose Synthase (SuSy), Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-3 = แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอโคลนที่ 1 - 3

ข. แสดงรูปแบบของพลาสมิดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-3 = รูปแบบของพลาสมิดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโคลนที่ 1 – 3

```
  1   atggctgccaagttgactcgcctccacagtcttcgcgaacgccttggtgccaccttctcc
      M  A  A  K  L  T  R  L  H  S  L  R  E  R  L  G  A  T  F  S
 61   tctcatcccaatgagctgattgcactcttctccaggtatgttaaccagggcaagggaatg
      S  H  P  N  E  L  I  A  L  F  S  R  Y  V  N  Q  G  K  G  M
121   cttcagcgccatcaactgcttgctgagtttgatgccctgtttgatagtgacaaggagaag
      L  Q  R  H  Q  L  L  A  E  F  D  A  L  F  D  S  D  K  E  K
181   tatgcgcccttcgaagactttcttcgtgctgctcaggaagcaattgtgctccctccctgg
      Y  A  P  F  E  D  F  L  R  A  A  Q  E  A  I  V  L  P  P  W
241   gtagcacttgctatcaggccaaggcctggtgtctaggattacattcgagtgaatgtaagc
      V  A  L  A  I  R  P  R  P  G  V  S  D  Y  I  R  V  N  V  S
301   gagttggctgtggaggagctgagtgtttctgagtacttggcattcaaggaacagctggtg
      E  L  A  V  E  E  L  S  V  S  E  Y  L  A  F  K  E  Q  L  V
361   gatggaaattccaacagcaactttgttcttgagcttgattttgagcccttcaatgcctca
      D  G  N  S  N  S  N  F  V  L  E  L  D  F  E  P  F  N  A  S
421   ttccctcgtccttccatgtcaaagtccattggaaatggagtgcaattccttaaccgacac
      F  P  R  P  S  M  S  K  S  I  G  N  G  V  Q  F  L  N  R  H
481   ctgtcttccaagttgttccaggacaaggagagcctgtacccattgctggatttcctcaaa
      L  S  S  K  L  F  Q  D  K  E  S  L  Y  P  L  L  D  F  L  K
541   gcccataactacaagggcacgacgatgatgttgaatgacagaattcagagcctccgtggg
      A  H  N  Y  K  G  T  T  M  M  L  N  D  R  I  Q  S  L  R  G
601   ctccagtcatcccttagaaaggcagaagagtatctactgagtgtccctcaagacactccc
      L  Q  S  S  L  R  K  A  E  E  Y  L  L  S  V  P  Q  D  T  P
661   tactcagagttcaaccataggttccaagagcttggcttggagaagggttggggtgacact

      Y  S  E  F  N  H  R  F  Q  E  L  G  L  E  K  G  W  G  D  T
721   gcaaagcgcgtacttgatacactccacttgcttcttgaccttcttgaggcccctgatcct
      A  K  R  V  L  D  T  L  H  L  L  L  D  L  L  E  A  P  D  P
781   gccaacttggagaagttccttggaactataccaatgatgttcaatgttgttatcctgtct
      A  N  L  E  K  F  L  G  T  I  P  M  M  F  N  V  V  I  L  S
```

ภาพที่ 6 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน Sucrose Synthase (SuSy) ในส่วนที่มีการแสดงออก

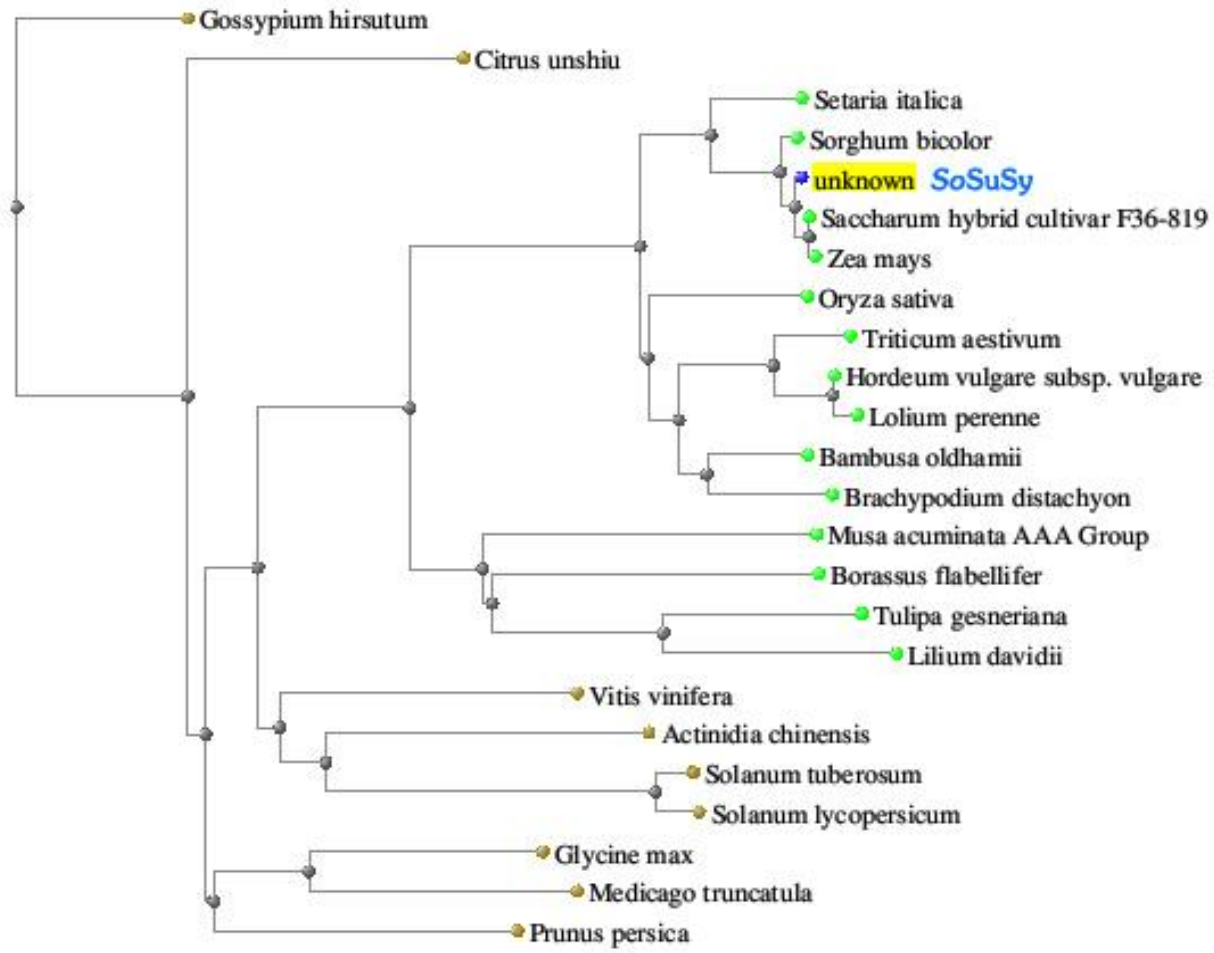
```
841    cctcatggctactttgcccaatccaacgtgcttggataccctgacactggtggtcaggtt
       P  H  G  Y  F  A  Q  S  N  V  L  G  Y  P  D  T  G  G  Q  V
 901   gtgtacattttggatcaagtccgtgctttggaggatgagatgcttcttaggattaagcag
       V  Y  I  L  D  Q  V  R  A  L  E  D  E  M  L  L  R  I  K  Q
 961   caaggccttaacatcaccccgaagatcctcattgttaccaggctgttgcctgatgctgtt
       Q  G  L  N  I  T  P  K  I  L  I  V  T  R  L  L  P  D  A  V
1021   gggactacgtgcggtcagcgtctggagaaggtcattggaaccgagcacacagacattatt
       G  T  T  C  G  Q  R  L  E  K  V  I  G  T  E  H  T  D  I  I
1081   cgtattccattcagaaatgagaatggtattctccgcaagtggatctctcgtttttgatgt
       R  I  P  F  R  N  E  N  G  I  L  R  K  W  I  S  R  F  S  C
1141   ctggccatacctggagacatacactgaggatgttgccagtgaaataatgttagaaatgca
       L  A  I  P  G  D  I  H  S  G  C  C  Q  S  N  N  V  R  N  A
1201   ggccaagcctgaccttatcgttggcaactacagtgatggcaatctagtcgccactctgct
       G  Q  A  S  P  Y  R  W  Q  L  Q  S  W  Q  S  S  R  H  S  A
1261   cgcgcacaagttgggagttactcagtgtaccattgcccacgccttggagaaaaccaaata
       R  A  Q  V  G  S  Y  S  V  Y  H  C  P  R  L  G  E  N  Q  I
1321   tcccaactcagacatatacttggacaaatttgacagccaataccacttctcatgccagtt
       S  Q  L  R  H  I  L  G  Q  I  S  Q  P  I  P  L  L  M  P  V
1381   cacagctgaccttattgccatgaatcacactgatttcatcatcaccagtacattccaaga
       H  S  S  P  Y  C  H  E  S  H  S  F  H  H  H  Q  Y  I  P  R
1441   aatcgcgggaagcaaggacactgtggggcagtatgagtcccacattgcgttcactcttcc
       N  R  G  K  Q  G  H  C  G  A  V  S  V  P  H  C  V  H  S  S
1501   tggactttaccgtgttgtccatggcattgatgtttttgatcccaaattcaacattgtctc
       W  T  L  P  C  C  P  W  H  S  C  F  S  S  Q  I  Q  H  C  L
1561   tcctggagcagacatgagtgtttactacccatacactgaaactgacaagagactcactgc
       S  W  S  R  H  E  C  L  L  P  I  H  S  N  S  Q  E  T  H  C
1621   cttccatcctgaaattgaggagctcatctacagtgatgttgagaacgatgagcacaagtt
       L  P  S  S  N  S  G  A  H  L  Q  S  C  S  E  R  S  A  Q  V
1681   tgtgttgaaggacaagaacaagccgatcatcttctcaatggctcgtcttgaccgtgtgaa
       C  V  E  G  Q  E  Q  A  D  H  L  L  N  G  S  S  S  P  C  E
1741   gaacatgacaggcttggttgagatgtatggtaagaatgcacgcctgagggaattggcaaa
       E  H  D  R  L  G  S  D  V  W  S  E  C  T  P  E  G  I  G  K
1801   ccttgtgattgttgctggtgaccatggcaaggaatcgaaggacagggaggagcaggcaga
       P  C  D  C  C  W  S  P  W  Q  G  I  E  G  Q  G  G  A  G  R
1861   gttcaagaagatgtacagtctcattgatgagtacaacttgaagggccatatccggtggat
       V  Q  E  D  V  Q  S  H  S  S  V  Q  L  E  G  P  Y  P  V  D
1921   ctcagctcagatgaaccgtgtccgcaacgctgagttgtaccgctacatttgtgacacgaa
       L  S  S  D  E  P  C  P  Q  R  S  V  V  P  L  H  L  S  H  E
1981   gggagcatttgtgcagcctgcattctatgaagcattcggcctgactgtcattgagtccat
       G  S  I  C  A  A  C  I  L  S  S  I  R  P  D  C  H  S  V  H
2041   gacgtgcggtttgccaacaattgcaacctgccatggtggccctgctgaaatcattgtgga
       D  V  R  F  A  N  N  C  N  L  P  W  W  P  C  S  N  H  C  G
2101   tggggtgtctggtttgcacattgatccttaccacagtgacaaggctgcagatattttggt
       W  G  V  W  F  A  H  S  S  L  P  Q  S  Q  G  C  R  Y  F  G
2161   caacttctttgagaagtgcaaggcagacccaagctactgggacaagatctcacagggtgg
       Q  L  L  S  E  V  Q  G  R  P  K  L  L  G  Q  D  L  T  G  W
2221   actgcagagaatttatgagaagtacacctggaagctctactccgagaggctgatgaccct
       T  A  E  N  L  S  E  V  H  L  E  A  L  L  R  E  A  D  D  P
2281   gactggtgtatacggattctggaagtatgtgagcaatctggagaggcgtgagactcgccg
       D  W  C  I  R  I  L  E  V  C  E  Q  S  G  E  A  S  D  S  P
2341   ctaccttgagatgttctatgctctgaaataccgtag
       L  P  S  D  V  L  C  S  E  I  P  *
```

ภาพที่ 6 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน Sucrose Synthase (SuSy) ในส่วนที่มีการแสดงออก (ต่อ)

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน SuSy ที่โคลนได้จากอ้อยพันธุ์อู่ทอง 8 (UT8) กับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank บนอินเทอร์เน็ตโปรแกรม www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Identities	Accession
Saccharum officinarum sucrose synthase-2 mRNA, complete cds	4210	4210	100%	0.0	99%	AF263384.1
Zea mays isolate sh1B sucrose synthase-like mRNA, complete sequence	4422	4422	100%	0.0	99%	FJ436056.1
Setaria italica sucrose synthase 1-like (LOC101759310), mRNA	3654	3654	100%	0.0	94%	XM004964554.1
Bambusa oldhamii clone BoSUS4 sucrose synthase mRNA, complete cds	3312	3312	100%	0.0	91%	AF412039.2
Oryza sativa clone KCB711H10 Sucrose synthase 2 mRNA, complete cds	3164	3164	99%	0.0	90%	JF969237.1
Brachypodium distachyon sucrose synthase 1-like (LOC100840503), mRNA	3113	3113	100%	0.0	89%	XM003564108.1
Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein, complete cds, clone: NIASHv2077A20	3005	3005	100%	0.0	88%	AK368617.1
Triticum aestivum mRNA for sucrose synthase type I	2946	2946	99%	0.0	88%	AJ001117.1
Lolium perenne LpSUS mRNA for sucrose synthase, complete cds	2796	2796	100%	0.0	87%	AB232656.1

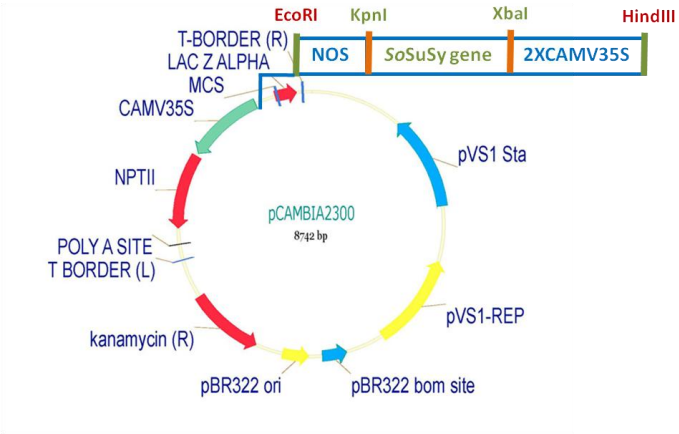
เมื่อนำข้อมูลยีน SuSy จากอ้อยมาศึกษาความสัมพันธ์กับยีน SuSy ในพืชชนิดต่างๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/ treeView.cgi) พบว่า ยีน SuSy ที่สังเคราะห์ได้จากอ้อย (*Saccharum officinarum*) มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับพืชในกลุ่มใบเลี้ยงเดี่ยว คือ ข้าวโพด (*Zea may* L.) ข้าวฟ่าง (*Sorghum biocolor* (L.) Moench) และ ข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italic* (L.) P. Beauv.) มากกว่าพืชในกลุ่มใบเลี้ยงคู่ (ภาพที่ 8)



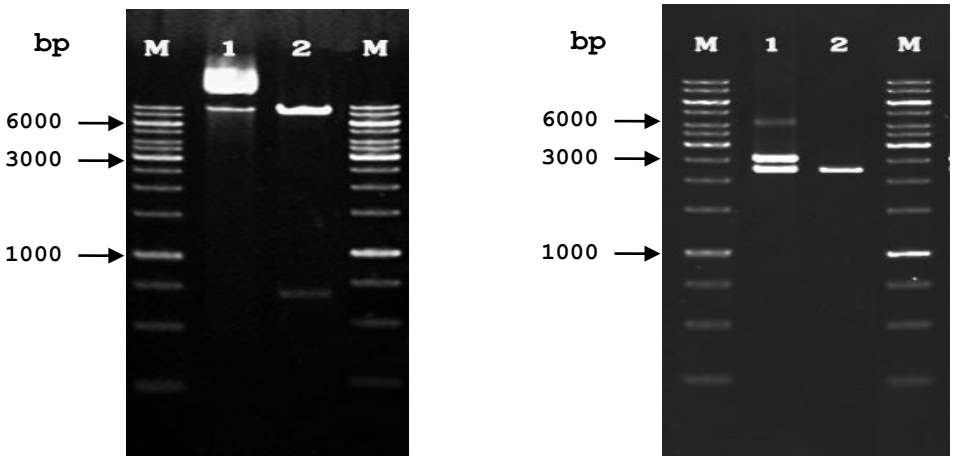
ภาพที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างยีน Sucrose Synthase (SuSy) ที่โคลนได้จากอ้อย เปรียบเทียบกับพืชชนิดต่างๆ โดยใช้โปรแกรม www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/treeView.cgi

3. การเชื่อมต่อชิ้นยีนเข้ากับ Plant Expression Vector และการตรวจสอบการปรากฏของยีน

นำชิ้นยีน SuSy ที่สังเคราะห์ได้ มีขนาด 2376 คู่เบส มาเชื่อมต่อเข้ากับ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) (ภาพที่ 8) ขนาดประมาณ 9640 คู่เบส ซึ่งผ่านการทำ double digestion ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I (ภาพที่ 9 ก และ 9ข) โดยที่ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ (35SCaMV) และเทอร์มิเนเตอร์ (NOS) เป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีน และมียีน NPTII (kanamycin) เป็นยีนคัดเลือก จากนั้นตรวจสอบการปรากฏของยีน SuSy ซึ่งมีด้วยกัน 2 วิธี วิธีแรกคือ การใช้ เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I พบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ถูกต้องจำนวน 2 แถบ ได้แก่ ขนาด 2.5 และ 9 กิโลเบส ตามลำดับ (ภาพที่ 10ก) และวิธีที่สองคือ การตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse) พบว่า สามารถทำปฏิกิริยาได้แถบดีเอ็นเอของยีน SuSy ขนาดประมาณ 2.4 กิโลเบส (ภาพที่ 10ข) โดยโครงสร้างของพลาสมิดสายผสมที่มีความสมบูรณ์สามารถเชื่อมต่อชิ้นยีน SuSy เข้ากับ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300 – SuSy) จะมีขนาดประมาณ 12 กิโลเบส (ภาพที่ 11)

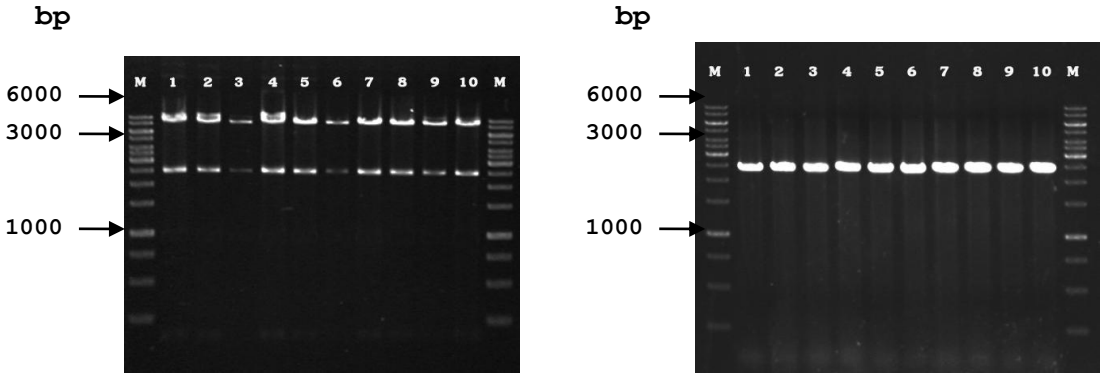


ภาพที่ 8 แผนที่ของ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) และตำแหน่งในการเชื่อมต่อชิ้นยีน sucrose synthase (*So*SuSy)



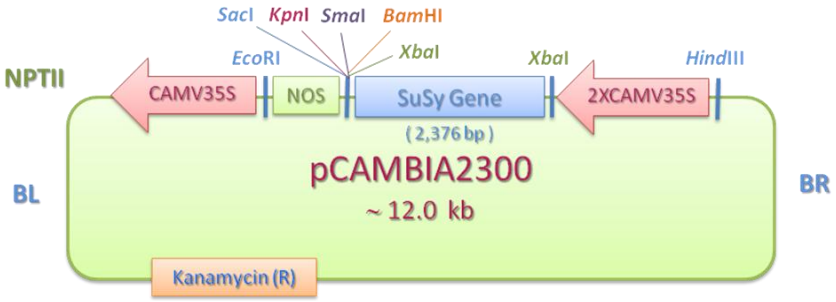
ภาพที่ 9 ก. แสดงแถบดีเอ็นเอของ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = แถบดีเอ็นเอของ pCAMBIA2300, Lane 2 = แถบดีเอ็นเอของ pCAMBIA2300 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I

ข. แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน SuSy ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = แถบดีเอ็นเอของยีน SuSy, Lane 2 = แถบดีเอ็นเอของยีน SuSy ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I



ภาพที่ 10 ก. แสดงรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดพลาส มิดดีเอ็นเอสายผสม pCAMBIA2300–SuSy ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-10 = แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมโคลนที่ 1–10 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I

ข. แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR กับพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pCAMBIA2300 – SuSy โดยใช้ไพรเมอร์ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse), Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-10 = แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาPCR โคลนที่ 1 – 10



ภาพที่ 11 แสดงโครงสร้างพลาสมิดสายผสม pCAMBIA2300 – SuSy

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การโคลนยีน Sucrose Synthase (SuSy) ในส่วนของยีนทั้งจีโนมจากจีโนมิกดีเอ็นเอของอ้อยพันธุ์อู่ทอง8 พบว่า ยีนที่สังเคราะห์ได้มีขนาด 7495 คู่เบส เมื่อนำไปวิเคราะห์โครงสร้างของยีนด้วยโ ปรแกรม Software GenScan บนอินเทอร์เน็ต พบว่า ยีนที่โคลนได้มีส่วนประกอบครบทั้งยีน และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปแป ลรหัสเป็นโปรตีน พบว่าสามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนของยีน SuSy ได้จำนวน 792 amino acid

การโคลนยีน SuSy ในส่วนของยีนที่มีการแสดงออกจากอาร์เอ็นเอรวมของอ้อยพันธุ์อู่ทอง 8 ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยนำข้อมูลยีนที่ได้มาออกแบบไพรเมอร์ในส่วนของยีนที่มีการแสดงออกทางปลาย 5’ และ 3’ พบว่า ยีนที่สังเคราะห์ได้มีขนาด 2376 คู่เบส โดยที่ปลายทั้งสองข้างมีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I เมื่อนำลำดับนิวคลีโอ

ไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ยีนที่ได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน SuSy ที่พบในอ้อย ข้าวโพด และข้าวฟ่างหมา โดยมีค่า % Max Identity เท่ากับ 99% 99% และ 94% ตามลำดับ

การสร้างพลาสมิดสายผสม โดยการเชื่อมต่อชิ้นยีน SuSy เข้ากับ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ 35SCaMV และเทอร์มิเนเตอร์ NOS ได้พลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pCAMBIA2300–SuSy มีขนาดประมาณ 12 กิโลเบส ตรวจสอบผลการปรากฏของยีน SuSy โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และเทคนิค PCR พบว่า สามารถสร้างพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมที่มีความสมบูรณ์ ได้จำนวน 10 โคลน ซึ่งยีนชุดยีน pCAMBIA2300 – SoSuSy ที่โคลนได้สามารถนำไปใช้ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืช เพื่อเพิ่มศักยภาพในการผลิตน้ำตาลให้สูงขึ้นได้

เอกสารอ้างอิง

สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย , 2556. รายงานพื้นที่ปลูกอ้อย ปีการผลิต 2555/2556. (ออนไลน์). แหล่งที่มา : http://www.ocsb.go.th/upload/journal/fileupload/923-2469.pdf. 13 พฤศจิกายน 2556.

Barratt, D.H.P., Barber, L., Kruger, N.J., Smith, A.M., Wang, T.L., and Martin, C. (2001) Multiple, distinct isoforms of sucrose synthase in pea. Plant Physiol. 127: 655-664.

Chourey, P.S. and Nelson, O.E. (1976). The enzymatic deficiency conditioned by the *shrunken-l* mutations in maize. Biochem. Genet. 14: 1041-1055.

Dejardin, A., Rochat, C., Wuillem, S. and Boutin, J.P. (1997). Contribution of sucrose synthase, ADP-glucose pyrophosphorylase and starch synthase to starch synthesis in developing pea seeds. Plant Cell Environ. 20: 1421-1430.

Hesse, H. and Willmitzer, L. (1996). Expression analysis of a sucrose synthase gene from sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Plant Mol Biol. 30: 863-872.

Lingle, S.E. and Dyer, J.M. (2001). Cloning and expression of sucrose synthase-1 cDNA from sugarcane. Plant Physiol. 158: 129-131.

Marana, C., Garcia-Olmedo, F. and Carbonero, P. (1990) Different expression of two types of sucrose synthase-encoding gene in wheat in response to anaerobiosis, cold shock and light. Gene 88: 167-172.

Martin, T., Frommer, W.B., Salanoubat, M. and Willmitzer, L. (1993). Expression of an *Arabidopsis* sucrose synthase gene indicates a role in metabolization of sucrose both during phloem loading and in sink organs. The Plant journal : for cell and molecular biology. Aug; 4(2): 367-77.

Salanoubat, M. and Belliard, G. (1987). Molecular cloning and sequencing of sucrose synthase cDNA from potato (Solanum tuberosum L.) : preliminary characterization of sucrose synthase mRNA distribution. Gene 60: 47-56.

Sarah, E. Lingle. and John, M. Dyer. 2004. Polymorphism in the Promoter Region of the Sucrose Synthase-2 Gene of *Saccharum* Genotypes. Journal American Society Sugar Cane Technologists, Vol. 24: 241-249.

Sun, J.D, Loboda, T., Sung, S.J. and Black, C.C. (1992). Sucrose synthase in wild tomato, *Lycopersicon chmielewskii,* and tomato fruit sink strength. Plant Physiol. 98: 1163-1169

Sung, S.J., Xu, D.P. and Black, C.C. (1989). Identification of actively filling sucrose sinks. Plant Physiol 89: 1117-1121.

Werr, W., Frommer, W.B., Maas, C. and Starlinger, P. (1985). Structure of the sucrose synthase gene on chromosome 9 of *Zea mays* L. EMBO J 4: 1373-1380.

Wang, AYYuWP., Juang, R.H., Huang, J.W., Sung, H.Y. and Su, J.C. (1992). Presence of three rice sucrose synthase gene as revealed by cloning and sequencing of cDNA. Plant Mol Biol 18: 191-1194.

Zrenner, R., Salanoubat, M., Willmitzer, L. and Sonnewald, U. (1995). Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). Plant J 7: 97-107.

การทดลองเรื่องที่ 3.2 การถ่ายยีน Sucrose Synthase ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์น้ำตาลและการตรวจสอบการปรากฏของยีนในพืชต้นแบบ

Title: Transformation and Detection Sucrose Synthase Gene in Model Plants

หัวหน้าการทดลอง	นางภุมรินทร์ วณิชชนานันท์	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	นางสุภาวดี ง้อเหรียญ	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางสาวอัจฉราพรรณ ใจเจริญ	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์	สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

คำสำคัญ : เชื้ออะโกรแบคทีเรียม, สารปฏิชีวนะ, มะเขือเทศ

Keyword : *Agrobacterium tumefaciens*, Kanamycin, Carbenicillin, Tomato

บทคัดย่อ

การถ่ายยีน Sucrose Synthase ลงในพืชต้นแบบ โดยศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำใบมะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายยีนด้ วยวิธี Leaf disc โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 นำชิ้นส่วนใบมะเขือเทศมาทดสอบบนสูตรอาหาร จำนวน 11 สูตร ประกอบด้วย สูตรอาหาร MS ที่มี BA ที่ระดับความเข้มข้น 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า การเกิดยอดใหม่ของสูตรอาหาร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยสูงสุด 4.6 ยอด ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และสามารถเกิดรากเฉลี่ย 1.4 ราก เมื่อตัดแยกต้นเดี่ยวสามารถเจริญเติบโตและมีรากเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ สำหรับขั้นตอนการเตรียมเชื้อ *A. tumefaciens* พบว่าค่า OD_{600} ที่เหมาะสมจะเท่ากับ 0.6 และปริมาตรเชื้อ 10 มิลลิลิตรจะเป็นปริมาตรที่ มีความเข้มข้นของเชื้อ เหมาะสม ในการถ่ายยีน โดยใช้ระยะเวลาการแช่ชิ้น ส่วนใบนาน 10 นาที สูตรอาหารเพื่อการคัดเลือกที่มีการเติมสารปฏิชีวนะ Kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารปฏิชีวนะ Carbenicillin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า สารปฏิชีวนะ Carbenicillin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่สามารถ กำจัดเชื้อจากเนื้อเยื่อของพืช และมีผลยับยั้งการเกิดยอดใหม่

ABSTRACT

Study on medium for induced shoot form tomato leaf using leaf disc technique by *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA 105. Tomato leaf were cultured on MS medium containing 1, 1.5, 2, 2.5, 3 mg/L BA and 0.1 or 0.2 mg/L IAA. The result showed that the new shoot can growth form MS medium supplemented with 2.5 mg/L BA and 0.1 mg/L IAA. The medium is the best for induced new shoot is 4.6 shoot and number of new root 1.4 root. Preparation of *A. tumefaciens* was optimize OD_{600} = 0.6 by using 10 volume and 10 min treated explants. The result showed that selection medium with 50 mg/L Kanamycin and 100 mg/L Carbenicillin could not eliminate *A. tumefaciens* from the explants. In contrast, this selection medium prevented shoot induction.

บทนำ

อ้อย (*Saccharum officinarum* L.) เป็นพืชอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญมากต่อระบบเศรษฐกิจของประเทศไทย ในปีการผลิต 2556/57 ผลิตอ้อยได้สูงถึง 103.67 ล้านตัน ผลิตเป็นน้ำตาลได้ประมาณ 11.29 ล้านตัน ในจำนวนนี้ใช้บริโภคภายในประ เทศ 2.5 ล้านตัน ส่วนที่เหลือส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศ สร้างมูลค่ารวมได้ประมาณ 180,000 ล้านบาท ซึ่งหากรวมรายได้จากการแปรรูปเป็นอุตสาหกรรมต่อเนื่องอื่นๆ ได้แก่ การผลิตเอทานอล สุรา ชอส ซีอิ๊ว ผงชูรส อาหารสัตว์ ไม้อัด กระดาษ ปุ๋ยอินทรีย์ และเชื้อเพลิงผลิตไฟ ฟ้าแล้ว สามารถสร้างรายได้เพิ่มอีกนับแสนล้านบาท ในปีการผลิต 2557/58 มีพื้นที่เพาะปลูกอ้อยในเขตพื้นที่สำรวจรวม 47 จังหวัด จำนวน 10,530,927ไร่ แบ่งเป็นพื้นที่ปลูกอ้อยส่งโรงงาน 9,591,448ไร่ และพื้นที่ปลูกอ้อยทำพันธุ์ 939,479 ไร่ โดยมีพื้นที่เพิ่มขึ้นจากปี กา ร ผลิต 2556/57 จำนวน 455,784 ไร่ หรือร้อยละ 4.52 สำหรับการซื้อขายอ้อยตามค่าความหวานเริ่มใช้ตั้งแต่ฤดูการผลิตปี 2535/36 เป็นต้นมา โดยกำหนดให้ซื้อขายอ้อยตามคุณภาพความหวานวัดเป็น ซี .ซี. เอส. (Commercial Cane Sugar : C.C.S.) ซึ่งหมายความว่า ราคาอ้อยจะผันแปรไ ปตามคุณภาพหรือความหวาน ดังนั้นหากอ้อยมีความหวานมาก คือ มีค่า .**ซี**.เอส. สูง ชาวไร่อ้อยจะรับราคาอ้อยสูงขึ้นด้วย

อ้อย เป็นพืช C4 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงสูง กระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลในอ้อยให้ได้น้ำตาลซูโครส จะเกิดจากการทำงานของเอนไซม์สองชนิดมาช่ วยเร่ง คือ Sucrose Phosphate Synthase (SPS) และ Sucrose Synthase (SS) ซึ่งพบว่า Sucrose Synthase เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครส โดยเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึมคาร์โบไฮเดรต การย่อยสลายซูโครสให้อยู่ในรูปข องน้ำตาล hexoses และการเคลื่อนย้ายของน้ำตาล กระตุ้นให้มีการเปลี่ยนของน้ำตาลซูโครส และ UDP ไปเป็น UDP-glucose และ fructose ได้

ในปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วยในการพัฒนาสายพันธุ์ อ้อยกันมากขึ้นทั้งในประเทศ และต่างประเทศ มีการศึกษาการทำงานของยีน โ ดยค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะต่างๆ เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างแป้ง น้ำตาล และต้านทานโรคแมลงที่สำคัญในส่วนต่างๆ ของอ้อย เพื่อพัฒนาพันธุ์ให้มีคุณภาพและเพิ่มผลผลิต หากสามารถโคลนยีน Sucrose Synthase ได้ และนำยีนที่ได้ไปใช้ในการพัฒนาพันธุ์อ้อยให้มี ผลผลิตและค่าความหวานที่สูงขึ้น หรือนำไปถ่ายฝากลงในพืชที่มีการสร้างน้ำตาลได้น้อย เพื่อเพิ่มศักยภาพในการผลิตน้ำตาลให้มากขึ้นได้

ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงได้นำเทคโนโลยีด้านการถ่ายฝากยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครสลงในพืชต้นแบบ เพื่อการเพิ่มศักยภาพการผลิตน้ำตาลให้สูงขึ้นและพัฒนาต่อไปในพันธุ์อ้อยในอนาคต

<u>สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช</u> (พีรเดช, 2537)

ออกซิน (auxin) มีหน้าที่ควบคุมการขยายตัวของเซลล์ การเติบโตของใบ การติดผล การเกิดราก และเกี่ยวข้องกับกระบวนการอื่นๆ อีกมากมาย IAA (indol-3-yl acetic acid) เป็นสารออกซินชนิดแรกที่ค้นพบ ซึ่งเป็นสารที่พืชสร้างขึ้นเอง โดยมีคุณสมบัติเป็นสารเร่งการเจริญเติบโต มีผลกระตุ้นการขยายขนาดของเซลล์ การยืดตัวของเซลล์ และยังมีผลกระตุ้นการเกิดราก

ไซโตไคนิน (Cytokinins) สารสังเคราะห์ในกลุ่มไซโตไคนิน ได้แก่ ไคเนติ น (kinetin) BAP (6-benzylaminopurine) สารในกลุ่มนี้มีผลต่อการแบ่งเซลล์ และกระตุ้นการเจริญทางด้านลำต้นของพืช กระตุ้นการเจริญของตาข้าง และยังมีผลเล็กน้อยต่อการพัฒนาของผล ใช้กันมากในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อกระตุ้นการเจริญของก้อนแคลลัส (callus) ให้เติบโตขึ้นเป็นลำต้น

อัญจนา (2544) ได้ศึกษาพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะเขือเทศ 2 พันธุ์ พบว่า การเพาะเลี้ยงมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 และวีเอฟ 134-1-2 โดยใช้ชิ้นส่วนใบเลี้ยงเพาะเลี้ยงในอาหาร MS-B5 ที่เติม BA ร่วมกับ IAA (BA/IAA) ในอัตรา 1.0/0.2 และ 2.5/0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และเพาะเลี้ยงชิ้นใบในที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน สามารถชักนำการเกิดยอดได้ในอัตรา 50.0 และ 60.0% ตามลำดับ

<u>การกำจัดเชื้อโดยใช้สารปฏิชีวนะ</u>

การถ่ายยีนด้วยเชื้อ *Agrobacterium* จำเป็นต้องใช้สารปฏิชีวนะในการกาจัดแบคทีเรียพาหะเมื่อเสร็จสิ้นการถ่ายยีนแล้วสารปฏิชีวนะที่นิยมใช้ ได้ แก่ carbenicillin, cefotaxime, penicillin G และ paromomycin มีความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งสารปฏิชีวนะเหล่านี้มีผลในการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรียโดยการยับยั้งการเกิด cross-link ของ petidoglycan โดยการเข้าไปเกาะและขัดขวางการสร้างเอนไซม์ในการสร้างผนังเซลล์ จึงมีผลทำให้เซลล์แตก (Ling และคณะ , 1998) เนื่องจากสารปฏิชีวนะดังกล่าวเข้าจับกับ penicillin binding protein (PBP-3) ซึ่งเป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของ inner membrane ใช้ในการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรีย ทั้งนี้สารปฏิชีวนะ cefotaxime มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้มากชนิดกว่าและยังมีฤทธิ์ทางเภสัชสูงกว่า carbenicillin (Mathais และ Boyd, 1986)

นอกจากนี้ carbenicillin และ penicillin G ยังมีโครงสร้างคล้าย auxin เมื่อแตกตัวจะให้สาร phenylacetic acid ซึ่งมีลักษณะคล้ายฮอร์โมนพืชที่เกี่ยวข้องกับการชักนำให้เกิดแคลลัสและการเกิดยอด (Halford และ Newbury, 1992) อย่างไรก็ตามแม้สารปฏิชีวนะทั้ง 2 ชนิด จะมีการแตกตัวให้สารที่มีคุณสมบัติคล้ายฮอร์โมนพืช ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แต่ก็มีผลต่อการพัฒนาการเกิดเป็น ยอดที่สมบูรณ์และลดอัตราการเกิดยอดของพืช เนื่องจากสารที่แตกตัวนั้นทำให้สมดุลของสัดส่วนระหว่าง auxin และ cytokinin ในพืชเปลี่ยนไป (Nauerby และคณะ, 1997; Ling และคณะ, 1998)

วัตถุประสงค์

ศึกษาสูตรอการที่เหมาะสมในการชักนำต้นมะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยวิธี Leaf disc โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens*

วิธีดำเนินการ

<u>อุปกรณ์</u>

1. เมล็ดมะเขือเทศพันธุ์สีดา
2. อาหารสังเคราะห์สูตร Murashige and Skoog (MS)(1962), Phytagel, น้ำตาล sucrose
3. อาหารสังเคราะห์สูตร Luria-Bertani broth และ Luria-Bertani Agar
4. สารควบคุมการเจริญเติบโต เช่น 6-Benzylaminopurine (BA), Indole-3-acetic acid (IAA)
5. อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น คีมคีบ (forcept), มีดผ่าตัด, จานเพาะเลี้ยง (Petri dish), หลอดเลี้ยงเชื้อขนาด 50 มิลลิลิตร
6. เชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105

<u>วิธีการ</u>

1. การทดสอบสูตรอาหารเพื่อการชักนำยอดจากชิ้นส่วนใบมะเขือเทศ
   เตรียมเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศมาฟอกฆ่าเชื้อตามขั้นตอนดังนี้
   1) นำเมล็ดมะเขือเทศมาล้างด้วยน้ำผสมน้ำยาล้างจานให้สะอาด
   2) แช่เมล็ดมะเขือเทศในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 นาที
   3) นำเมล็ดมะเขือเทศมาฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย โซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCl) Haiter ® ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลา 20 นาที
   4) ล้างด้วยน้ำสะอาดนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง
   5) นำเมล็ดมะเขือเทศมาเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS จำนวน 10 เมล็ดต่อขวด

   ตัดชิ้นส่วนใบมะเขือเทศให้มีเส้นกลางใบ ขนาด 0.5 X 0.5 ตารางเซนติเมตร นำมาทดสอบการเกิดยอดและรากบนสูตรอาหาร MS ที่ประกอบด้วย BA ที่ความเข้มข้น 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 mg/l ร่วมกับ IAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 mg/l รวม 11 กรรมวิธี ดังนี้

1) MS (Control)

2) MS + BA 1 mg/l + IAA 0.1 mg/l

3) MS + BA 1 mg/l + IAA 0.2 mg/l

4) MS + BA 1.5 mg/l + IAA 0.1 mg/l

5) MS + BA 1.5 mg/l + IAA 0.2 mg/l

6) MS + BA 2 mg/l + IAA 0.1 mg/l

7) MS + BA 2 mg/l + IAA 0.2 mg/l

8) MS + BA 2.5 mg/l + IAA 0.1 mg/l

9) MS + BA 2.5 mg/l + IAA 0.2 mg/l

10) MS + BA 3 mg/l + IAA 0.1 mg/l

11) MS + BA 3 mg/l + IAA 0.2 mg/l

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ประกอบด้วย 11 กรรมวิธี โดยแต่ละกรรมวิธีมีจำนวน 10 ซ้ำ

บันทึกจำนวนยอดและจำนวนราก

2. เตรียมอะโกรแบคทีเรียม และทดสอบความเข้มข้นของอะโกรแบคทีเรียมที่เหมาะสมและระยะเวลาที่ใช้ในการถ่ายยีน

นำเชื้อ A. tumefaciens ที่มียีนเป้าหมาย Sucrose Synthase (SuSy) มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง Luria-Bertani (LB) เติม Kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 2-3 วัน จากนั้นคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติม Kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

นำมาวัดค่า OD ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่า 0.6-0.8 จากนั้นนำเชื้อปริมาตร 5 หรือ 10 มิลลิลิตร มาปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทอาหารเหลวทิ้ง เติมอาหารเหลว MS ลงไปปริมาณ 10 มิลลิลิตร เขย่าจนเซลล์ทั้งหมดแขวนลอยอยู่ในอาหาร เจือจางเซลล์แบคทีเรียในอัตรา 1 : 1 ด้วยอาหารเหลว MS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมสาร acetosyringone 200 ไมโครโมลาร์

<u>การถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศ โดยวิธี leaf disc</u>

ตัดชิ้นส่วนใบมะเขือเทศให้มีเส้นกลางใบ ขนาด 0.5 X 0.5 ตารางเซนติเมตร นำมาแช่ในสารละลาย ที่เตรียมได้จากข้อ 2 นาน 5 หรือ 10 นาที ซับชิ้นส่วนใบบนกระดาษกรองปลอดเชื้อ แล้วย้ายชิ้นส่วนใบมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม acetosyringone 200 ไมโครโมลาร์ บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นย้ายเนื้อเยื่อมาเลี้ยงในสภาพที่มี แสง บนอาหารสูตรที่คัดเลือกจากข้อ 1 ที่เติม Kanamycin 50 หรือ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารปฏิชีวนะคัดเลือก Carbennicillin 50 หรือ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ จากนั้นคัดเลือก

ต้นที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารที่ มีสารปฏิชีวนะคัดเลือก Carbennicillin มาเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ไม่มีสารปฏิชีวนะให้เจริญเติบโต โดยเปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์ นำต้นที่ได้รับการถ่ายยีนมาตรวจสอบยีนด้วยวิธี PCR

3. ตรวจสอบการปรากฏของยีนในมะเขือเทศด้วยเทคนิค PCR

การตรวจสอบการปรากฏของยีน SuSy โดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้จากต้นมะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายยีนมาทำปฏิกิริยา PCR ร่วมกับไพรเมอร์ NOS (forward) และ 35SCaMv (reverse) จากนั้นตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การทดสอบสูตรอาหารเพื่อการชักนำยอดจากชิ้นส่วนใบมะเขือเทศ

นำเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศพันธุ์สีดามาเพาะในสภาพปลอดเชื้อ บนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ใช้ระยะเวลา 7-10 วัน จะเกิดต้นมะเขือเทศ จากนั้นนำชิ้นส่วนใบมะเขือเทศมาทดสอบบนสูตรอาหารเพื่อการชักนำให้เกิดยอด จำนวน 11 สูตร ประกอบด้วย สูตรอาหาร MS ที่มี BA ที่ระดับความเข้มข้น 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า การเกิดยอดใหม่ของสูตรอาหาร ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีการชักนำให้เกิดยอดเฉลี่ยสู งสุด 4.6 ยอด ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และสามารถเกิดรากเฉลี่ย 1.4 ราก เมื่อตัดแยกต้นเดี่ยวสามารถเจริญเติบโตและมีรากเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ (ภาพที่ 1) ในขณะที่สูตรอาหาร MS (control) มีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยมีค่าเฉลี่ยการเกิดรากสูงสุด 2.6 ราก (ตารางที่ 1) สอดคล้องกับการรายงานของ อัญจนา (2544) ได้ศึกษาพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมะเขือเทศ 2 พันธุ์ พบว่า การเพาะเลี้ยงมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3 และวีเอฟ 134-1-2 โดยใช้ชิ้นส่วนใบเลี้ยงเพาะเลี้ยงในอาหาร MS-B5 ที่เติม BA ร่วมกับ IAA (BA/IAA) ในอัตรา 1.0/0.2 และ 2.5/0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร และเพาะเลี้ยงชิ้นใบในที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน สามารถชักนำการเกิดยอดได้ในอัตรา 50.0 และ 60.0% ตามลำดับ

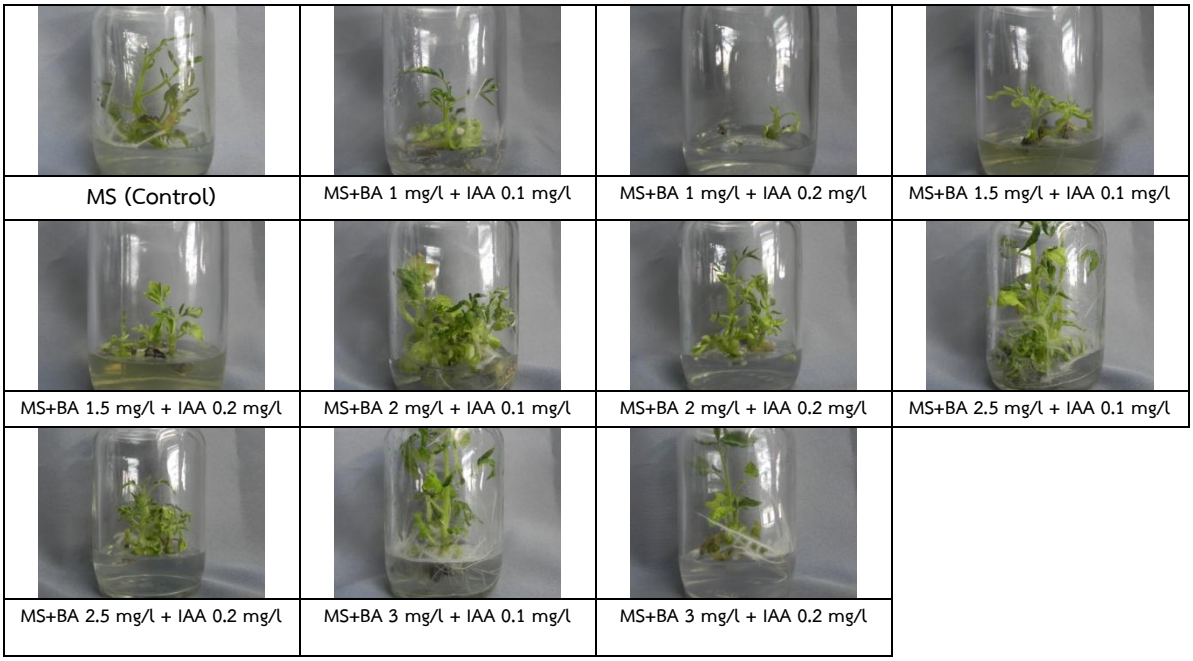
ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยจำนวนยอดและจำนวนรากที่เกิดจากชิ้นส่วนใบมะเขือเทศ เมื่อเลี้ยงบนสูตรอาหาร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

สูตรอาหาร	ค่าเฉลี่ย	
	จำนวนยอด (ยอด)	จำนวนราก (ราก)
MS (Control)	3.2 ab [1/]	2.6 a
MS + BA 1 mg/l + IAA 0.1 mg/l	1.8 b	1.0 bcd
MS + BA 1 mg/l + IAA 0.2 mg/l	1 b	0.4 cd
MS + BA 1.5 mg/l + IAA 0.1 mg/l	1.6 b	0 d
MS + BA 1.5 mg/l + IAA 0.2 mg/l	1.6 b	0 d
MS + BA 2 mg/l + IAA 0.1 mg/l	4.4 a	0.4 cd
MS + BA 2 mg/l + IAA 0.2 mg/l	2.6 ab	0.6 cd
MS + BA 2.5 mg/l + IAA 0.1 mg/l	4.6 a	1.4 bc
MS + BA 2.5 mg/l + IAA 0.2 mg/l	2.8 ab	1.2 bcd
MS + BA 3 mg/l + IAA 0.1 mg/l	3.2 ab	2.0 ab
MS + BA 3 mg/l + IAA 0.2 mg/l	3.2 ab	0.8 cd
F-test	*	**
c.v.(%)	57.97	89.63

* : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

** : แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

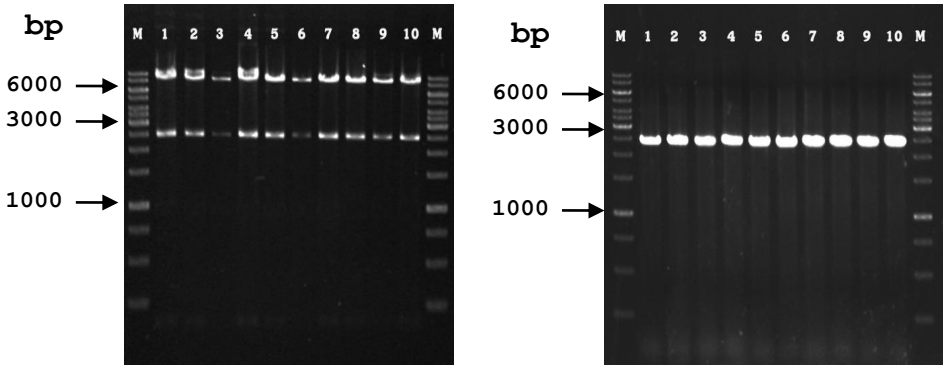
1/ : ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 1 การเกิดยอดและรากของต้นมะเขือเทศ เมื่อเลี้ยงบนสูตร อาหาร MS ร่วมกับ BA ความเข้มข้น 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ IAA ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. เตรียมอะโกรแบคทีเรียมและทดสอบความเข้มข้นของอะโกรแบคทีเรียมที่เหมาะสมและระยะเวลาที่ใช้ในการถ่ายยีน

จากการรายงานของ สุภาวดี (2556) ที่ทำการโคลนยีน Sucrose Synthase (SuSy) ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์น้ำตาล ได้ทำการโคลนยีนและเชื่อมต่อชิ้นยีน Sucrose Synthase ขนาด 2376 คู่เบส เข้ากับ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) ขนาด 9640 คู่เบส และทำการตรวจสอบการปรากฏของยีน (ภาพที่ 2) นำพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมที่มียีน Susy เข้าสู่เชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ด้วยวิธี electroporation คัดเลือกเซลล์ของ *A. tumefaciens* ที่ได้รับพลาสมิดสายผสมที่มียีน Susy บนอาหารแข็งสูตร LB ที่ผสม Kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และทำเป็น mater plate เพื่อนำไปใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืช



ภาพที่ 2 ก. แสดงรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pCAMBIA2300–SuSy ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-10 = แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมโคลนที่ 1–10 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I

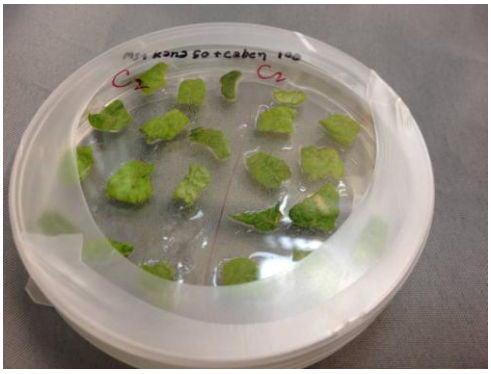
ข. แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR กับพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pCAMBIA2300 – SuSy โดยใช้ไพรเมอร์ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse), Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-10 = แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาPCR โคลนที่ 1 – 10

<u>การถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศ โดยวิธี leaf disc</u>

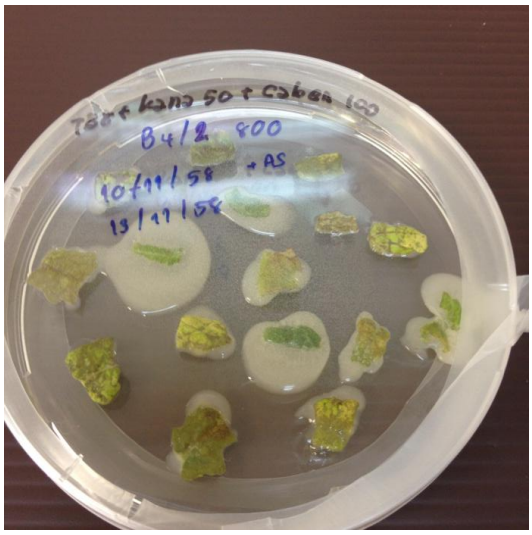
นำเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ที่มียีนเป้าหมาย Sucrose Synthase (SuSy) ซึ่งได้เตรียมเป็น master plate มาเลี้ยงทำการ streak เพื่อให้เกิดเป็นโคโลนีเดี่ยวบนอาหารแข็ง Luria-Bertani (LB) เติม Kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 2-3 วัน จากนั้นคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติม Kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

นำมาวัดค่า OD ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้มีค่า 0.6-0.8 โดยใช้ระยะเวลาการเลี้ยง 4-6 ชั่วโมง พบว่า ในการทดลองค่าที่เหมาะสมจะเท่ากับ 0.6 และจากทดสอบนำเชื้อปริมาตร 5 หรือ 10 มิลลิลิตร พบว่า ปริมาตร 10 มิลลิลิตรจะเป็นปริมาตรที่เหมาะสมมีปริมาณของเซลล์ที่เพียงพอ เมื่อนำมาปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียด้วยความเ ร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทอาหารเหลวทิ้ง เติมอาหารเหลว MS ลงไปปริมาณ 10 มิลลิลิตร เขย่าจนเซลล์ทั้งหมดแขวนลอยอยู่ในอาหาร เจือจางเซลล์แบคทีเรียในอัตรา 1 : 1 ด้วยอาหารเหลว MS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมสาร acetosyringone 200 ไมโคร โมลาร์ ช่วยเพิ่มประสิ ทธิภาพของ Agrobacterium ในการนำยีนเข้าสู่เนื้อเยื่อพืช

จากนั้นเตรียมชิ้นส่วนใบมะเขือเทศให้มีเส้นกลางใบ ขนาด 0.5 X 0.5 ตารางเซนติเมตร นำมาแช่ในสารละลายที่มีเซลล์ *A. tumefaciens* จากการทดสอบระยะเวลาในการแช่ชิ้นส่วนใบลงในสารละลาย ที่มีเซลล์ พบว่า การแช่ชิ้น ใบนาน 10 นาทีจะทำให้ประสิทธิภาพการเข้าสู่เซลล์เนื้อเยื่อพืชของ *A. tumefaciens* เกิดขึ้นได้ดีกว่า การแช่นาน 5 นาที นำชิ้นใบขึ้นมาซับเซลล์แบคทีเรียออกบนกระดาษกรองฆ่าเชื้อ แล้วจึงย้ายชิ้นส่วนใบมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม acetosyringone 200 ไมโครโมลาร์ บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นย้ายเนื้อเยื่อมาเลี้ยงในสภาพที่มีแสง บนอาหาร Co-cultivation สูตร MS ร่วมกับ BA 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติม Kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับสารปฏิชีวนะ Carbenicillin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 3) พบว่า เชื้อ *A. tumefaciens* ที่เข้าสู่เนื้อเยื่อพืชมีปริมาณมากและสารปฏิชีวนะ Carbenicillin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่สามารถ กำจัดเชื้อจากเนื้อเยื่อของพืชได้ และเมื่อระยะเวลาผ่านไป จะทำให้เนื้อเยื่อใบมะเขือเทศไม่สามารถพัฒนาเกิดเป็นแคลลัสซึ่งจะพัฒนาต่อเป็นยอดใหม่ได้ โดยใบมะเขือเทศจะมีลักษณะใบเป็นสีเหลือง หรือบางชิ้นใบจะมีเชื้อ *A. tumefaciens* เกิดขึ้นรอบๆ บริเวณใบมะเขือเทศ (ภาพที่ 4) Sheila (1991) ได้รายงานว่า การถ่ายยีนในมะเขือเทศ จะทำได้ยากกว่าการถ่ายยีนในพืชชนิดอื่นๆ เช่น พิทูเนีย และ ยาสูบ ซึ่งจะมีอัตราความสำเร็จที่สูงกว่า รวมทั้งขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น คือ สายพันธุ์ของเชื้อ Agrobacterium, ชนิดของสารปฏิชีวนะ และจากรายงานของ สุมนทิพย์ และ เนริสา (1997) ได้ศึกษาอิทธิพลของสารปฏิชีวน ะ (antibiotic) timentin, cefotaxime และ carbenicillin ต่ออัตราการเจริญของแคลลัสถั่วพุ่ม พบว่า timentin และ cefotaxime มีผลยับยั้งการเจริญของแคลลัสถั่วพุ่มที่ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ carbenicillin ต้องใช้ความเข้มข้นสูงถึง 100 มิลลิกรัม ต่อลิตร สำหรับความสามารถในการกำจัด A. tumefaciens strain EHA 105 และจากคุณสมบัติของ carbenicillin ที่มีการแตกตัวให้สารที่มีคุณสมบัติคล้ายฮอร์โมนพืช ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดแคลลัสได้ แต่ก็มีผลต่อการพัฒนาการเกิดเป็นยอดที่สมบูรณ์และลดอัตราการเกิดยอดของพืช เนื่องจากสารที่แตกตัวนั้นทำให้สมดุลของสัดส่วนระหว่าง auxin และ cytokinin ในพืชเปลี่ยนไป (Nauerby และคณะ, 1997; Ling และคณะ, 1998)



ภาพที่ 3 การถ่ายยีน Sucrose synthase เข้าสู่ใบมะเขือเทศ โดยใช้เทคนิค leaf disc



ภาพที่ 4 ชิ้นส่วนใบมะเขือเทศที่ได้ รับการถ่ายยีนด้วยวิธี leaf disc และมีการปนเปื้อนของเชื้อ *A. tumefaciens*

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. เทคนิคการถ่ายยีนด้วยวิธี leaf disc โดย *Agrobacterium tumefaciens*. สายพันธุ์ EHA 105 ในขั้นตอนการเตรียมเชื้อควรวัดค่า OD600= 0.6 จะเป็นค่าที่เหมาะสมสำหรับการนำเชื้อไปใช้ในการถ่ายยีน โดยใช้ปริมาตรของเชื้อ 10 มิลลิลิตร และใช้เวลาในการแช่ชิ้นส่วนใบ นาน 10 นาที

2. สูตรอาหารคัดเลือก ประกอบด้วยสารปฏิชีวะ Kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารปฏิชีวนะที่ใช้กำจัดเชื้อ *A. tumefaciens*. ไม่ควรเลือกใช้ carbenicillin เนื่องจากมีผลยับยั้งต่อการชักนำให้เกิดยอดใหม่จากชิ้นส่วนใบพืช

3. สูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดต้นใหม่ในมะเขือเทศพันธุ์สีดา ได้แก่ สูตรอาหารร่วมกับ BA ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

เอกสารอ้างอิง

พีรเดช ทองอำไพ. 2537. ฮอร์โมนพืชและสารสังเคราะห์ : แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.196 หน้า

สุมนทิพย์ บุนนาค และ เนริสา คุณประทุม. 1997. อิทธิพลของ timentin, cefotoxime และ carbenicilline ต่ออัตราการเจริญของแคลลัสถั่วพุ่ม และความสามารถในการกำจัด *Agrobacterium tumefuciens***.** วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 25 (3) : 201-207

อัญจนา บุญชด. 2544. การถ่ายยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ของ cucumber mosaic virus เข้าสู่มะเขือเทศ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 90 หน้า

Holford, P and H.J. Newbury. 1992. The effect of antibiotic and their breakdown products on the in vitro growth of *Antirrhinum majus*. Plant Cell Rep. 11: 93-96.

Ling, H. Q., D. Kriseleit and M.W. Ganal.1998. Effect of ticarcillin/potassium clavulanate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Plant Cell Rep. 17: 843-847.

Mathias, R. Y. and L. A. Boyd. 1986. Cefotaxime stimulates callus growth, embryogensis and regeneration in hexaploid bread wheat (*Tritricum aestivum* L EM. Thell). Plant Science. 46 : 217-223.

McCormick, S. 1991. Transformation of tomato with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Tissue Culture Manual. B6: 1-9.

การทดลองเรื่องที่ 4 การถ่ายฝากเวคเตอร์ RNAi เพื่อยับยั้งการเสื่อมสภาพและการแสดงออกของยีน *DHS* ในพืชต้นแบบ

Title: Transformation of RNAi Vector for *DHS* Gene Suppression and Expression in Model Plant

คณะผู้ดำเนินงาน

นางสาวอรุโณทัย ซาววา[1] นางสาวอัจฉราพรรณ ใจเจริญ[1]

นายพยุงศักดิ์ รวยอารี[1] นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์[1]

บทคัดย่อ

RNAi คือ กระบวนการในการควบคุมการแสดงออกของ ยีนอย่างหนึ่ง ซึ่งพบทั้งในพืช และสัตว์ อาศัยการทำงานของชิ้นส่วน double strand RNA (dsRNA) ซึ่งเมื่อผ่านกระบวนกา รต่างๆ แล้ว จะมีผล ไปยับยั้งการทำงานของ messenger RNA (mRNA) ทำให้ยีนนั้นๆ ถูกยับยั้งและไม่แสดงออกได้ การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการยับยั้งการแสดงออกของยีน *Deoxyhypusine Synthase* (*DHS*) ที่เกี่ยวข้องกับการ เสื่อมสภาพ ของเบญจมาศ ในพืชต้นแบบ ได้แก่ ยาสูบ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการถ่ายฝากเข้าต้นเบญจมาศต่อไป การโคลนยีน *DHS* ในเบญจมาศพันธุ์โมนาลิซ่า ได้ชิ้นส่วนยีนมีความยาว 919 เบส มีความเหมือนกับ *Senecio vernalis Arabidopsis thaliana* และ *Nicotiana sylvestris* ที่ค่า identity 91 85 และ 82 เปอร์เซ็นต์ สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 306 อะมิโน มีความเหมือนกับ *Senecio vernalis Arabidopsis thaliana* และ *Nicotiana tabacum* ที่ค่า identiry 88 79 และ 78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน *DHS* จากเบญจมาศกับฐานข้อมูลแสดงการแยกกลุ่มอย่างชัดเจน อาจส่งผลให้ลำ ดับนิวคลีโอไทด์จากการสร้าง dsRNA ไม่คลายคลึงกับยีน DHS ในยาสูบได้ การสร้างเวคเตอร์ RNAi ได้ชุดยีน *DHSRNAi* ความยาว 1071 เบส ต่อเข้ากับเวคเตอร์ pCAMBIA3304 แล้วนำไปถ่ายเข้าใบยาสูบ ยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนถูกนำไปทดสอบความทนต่อ สภาวะเครียดบนอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 2.0 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ต้นยาสูบชุดควบคุมและต้นยาสูบที่มียีน *DHSRNAi* มีความทนต่อสภาวะเค็มไม่แตกต่างกัน แสดงว่า dsRNA จาก *DHSRNAi* ของเบญจมาศไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *DHS* ในยาสูบได้ เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *DHS* ในเบญจมาศและยาสูบมีความแตกต่างกันมาก จึงควรนำไปทดสอบในต้นเบญจมาศต่อไป

Abstract

RNA interference is a regulatory mechanism of gene expression in plants and animals. The process is triggered by double-stranded RNA (dsRNA) and requires a conserved set of gene products, mRNA will be inhibited, and no gene expressed. This research is basic data aims to suppress DHS gene that related to senescence of chrysanthemum in plant model, is tobacco. The partial 919 bp of *DHS* gene was cloned from chrysanthemum "Monalisa". Nucleotide blast showed identity 88% 79% and 78% with *DHS* gene of *Senecio vernalis, Arabidopsis thaliana*, and *Nicotiana tabacum* respectively. The deduced amino acid showed 88% 79% and 78% homology with Deoxyhypusine Synthas from putative, *Senecio vernalis, Arabidopsis thaliana*, and *Nicotiana tabacum* respectively. Chrysanthemum *DHS* gene phylogeny presented out groups of other plants, dsRNA might be no homology with tobacco mRNA. The 1071 of *DHSRNAi* construct was cloned into pCAMBIA3304 and transformed by *Agrobacterium tumefaciens.* Transgenic and control tobacco were grown on MS with sodium chloride 2% and 2.5% (W/V). Results showed that transgenic and control tobacco no differentiation of salt tolerance. However, the dsRNA from *DHSRNAi* not mediated gene silencing in tobacco as nucleotide of chrysanthemum and tobacco no homology. Consequently, *DHSRNAi* will be study gene silencing especially in chrysanthemum.

คำนำ

ปัจจุบันเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่มีบทบาทในการพัฒนาพันธุ์พืชมากขึ้น โดยเทคนิคทางชีวโมเลกุลที่นำมาการศึกษาหน้าที่ของยีนในพืช ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้ได้ลักษณะที่ต้องการ ทำให้รวดเร็วกว่าการปรับปรุงพันธุ์พืชแบบดั้งเดิม หนึ่งในเทคนิคทางชีวโมเลกุล ได้แก่ เทคนิค RNA interference (RNAi) คือ กระบวนการในการควบคุมการแสดงออกของลักษณะทางพันธุกรรมอย่างหนึ่ง ซึ่งพบทั้งในพืช สัตว์ และมนุษย์ โดยอาศัยการทำงานของชิ้นส่วน double strand RNA (dsRNA) ซึ่งเมื่อผ่านกระบวนการต่างๆ แล้ว จะมีผลไปยับยั้งการทำงานของ messenger RNA (mRNA) ทำให้ยีนนั้นๆ ถูกยับยั้งและไม่แสดงออกได้ การนำเทคโนโลยี RNAi ไปใช้ในพืช ส่วนใหญ่แล้วจะมุ่งเน้นการนำ RNAi ไปเป็นเครื่องมือในการยับยั้งการแสดงออกของยีนเป้าหมายที่จำเพาะ หรือตำแหน่ง promoters ของยีนนั้น เพื่อปรับปรุงพันธุ์พืชให้ได้ลักษณะใหม่ๆที่ต้องการซึ่งสามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นหลังได้ การสร้าง dsRNA ในพืชมีหลายวิธี เช่น การสร้า งพืชปรับปรุงพันธุ์ที่ผลิต sense RNA และ พืชปรับปรุงพันธุ์ที่ผลิต

antisense RNA แยกต้นกัน แล้วนำทั้ง 2 ต้นมาผสมข้ามกัน ทำให้เกิดต้นพืชที่ผลิต dsRNA พบว่า ต้นพืชที่ผลิต dsRNA มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีนได้ดีกว่าต้นที่ผลิตเพียง sense หรือ anti-sense RNA เพียงอย่างเดียว (Wang et al, 2001) นอกจากนี้ วิธี hpRNA โดยการสร้างลำดับทั้ง sense และ antisense RNA ให้อยู่ใน promoter เดียวกันโดยมี intron คั่นกลางระหว่างลำดับ sense และ antisense ลำดับเหล่านี้จะสร้างเป็น hpRNA หลังจากผ่านกระบวนการถอดรหัส ซึ่งวิธีการใหม่นี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีนในพืชได้ดีกว่า dsRNA โดยจะให้ผล 80-100% (Mallory et al, 2001) ดังนั้นจึงมีการนำวิธี hpRNA มาใช้กันอย่างแพร่หลาย

ปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยี RNAi ไปใช้ในพืช เช่น การเปลี่ยนแปลงกระบวนการ metabolism ของพืชในกา รผลิตสารต่างๆ ให้ลดหรือเพิ่มปริมาณสารบางชนิดที่พืชสร้างและเก็บสะสมไว้ เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ของพืช เช่น ข้าวสายพันธุ์หนึ่งมี hpRNA ที่มีผลในการยับยั้งการแสดงออกของยีนของ *glutelin* ซึ่งเป็นโปรตีนหลักในเมล็ดข้าว ทำให้เกิดข้าวสายพันธุ์ที่มีโปรตีน glutelin ต่ำ จึงมีการ ผลิตข้าวสายพันธุ์นี้มาใช้ในทางการค้า เป็นข้าวสำหรับผู้ป่วยโรคไตที่จำเป็นต้องควบคุมปริมาณโปรตีนในอาหาร (Meins, 2000) และมีการสร้างพืชกาแฟให้มีปริมาณคาเฟอีนน้อยลง โดยปรับปรุงพันธุกรรมให้สามารถสร้าง antisense hpRNA ของยีน *CaMxMt1* ที่มีส่วนในกระบวนกา รสร้างคาเฟอีน ซึ่ง antisense hpRNA จะกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ RNAi จึงมีผลยับยั้งการสร้างสารคาเฟอีนทำให้มีปริมาณลดลง (Ogita et al, 2003) นอกจากนี้ยังมีการใช้ RNAi เพื่อเพิ่มความต้านทานต่อโรคในพืช เช่น การสร้างพืชยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) ให้ต้านทานต่อ *tobamovirus* โดยการยับยั้งการแสดงออกของยีน *TOM1* และ *TOM3* ที่สามารถถอดรหัสได้เป็นโปรตีนที่จำเป็นต่อการเพิ่มจำนวนของไวรัส เมื่อยีนดังกล่าวถูกยับยั้งไวรัสจึงไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ ดังนั้นยาสูบจึงมีความต้านทานต่อเชื้อไวรัส *tobamovirus* ได้ (Asano et al, 2005) และไม้ผลยืนต้น พืชตระกูลถั่ว และพืชไม้ประดับหลายชนิดจะมียีน *iaam* และ *ipt* ที่ทำให้เกิดโรค Crown gall จากเชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* จึงมีการใช้ RNAi ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนทั้ง 2 ตำแหน่ง ทำให้พืชมีความต้านทานต่อโรค Crown gall ได้เช่นกัน (Dunoyer, 2006)

การเจริญเติบโตของพืชโดยทั่วไปแบ่งออกเป็น 3 ระยะด้วยกัน คือระยะแรกเริ่มของการเจริญเติบโต (exponential phase) ระยะที่สองคือ linear phase เป็นระยะที่มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นจนมีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด และระยะสุดท้าย คือ senescence phase เป็นระยะที่มี การเจริญเติบโตช้าสุดและจะลดลงเรื่อยๆ จนกระทั่งไม่มีการเจริญเติบโตอีกเลย (อัตราการเจริญเติบโตมีค่าเท่ากับ 0) เมื่อพืชเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว (maturity) จากนั้นเซลล์ก็จะเสื่อมสภาพแล้วตายในที่สุด (นิตย์, 2541) ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพและโปรแกรมการตายข องเซลล์นั้นมีอยู่หลากหลาย ยีน *DHS* หรือ Deoxyhypusine Synthase (EC 2.5.1.46) ชื่อย่อ พบในสิ่งมีชีวิตยูคาริโอต อยู่ในกลุ่ม eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF-5A) เป็นกระบวนการเริ่มต้นในการเปลี่ยนเป็น hypusine (N-(4-amino-2-hydroxybutyl)lysine) ที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพของเซลล์และกระตุ้นให้เซลล์หมดอายุการใช้งานอย่างรวดเร็ว (Myung Hee *Park et al*. 1998) ซึ่งจะพบมากในช่วงการเสื่อมสภาพของพืช

เมื่อมีปริมาณของ *DHS* เพิ่มขึ้นจะกระตุ้นให้พืชเกิดการแก่ เซลล์เสื่อมสภาพ และตายในที่สุด ดังนั้นการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ *DHS* ในพืชจะช่วยยืดระยะการแก่ การหลุดร่วง หรือการเสื่อมสภาพของพืชได้ ทำให้พืชมีอายุยืน และ มีอายุการเก็บรักษาที่นานขึ้น จึงส่งผลให้ผลผลิตที่ได้มีคุณภาพเพิ่มขึ้น การศึกษาปริมาณ *DHS* แต่ละระยะการเจริญเติบโตของมะเขือเทศพบว่า เมื่อมะเขือเทศอายุมากขึ้น ปริมาณ *DHS* ก็จะมากขึ้นตามไปด้วย และมีมากในระยะการเสื่อมสภาพของดอกและผล รวมถึงระยะที่เกิดสภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อมของใบมะเขือเทศ(Tzann-Wei wang *et al*. 2001)

การระงับการทำงานของ *DHS* ใน canola โดยใช้ antisense ถ่ายฝากเข้าไปโดยอะโกรแบคทีเรียมพบว่าระดับของ *DHS* ในใบลดลง และเลื่อนระยะการแก่ของใบ ทำให้ใบมีขนาดเพิ่มขึ้น 1.5-2 เท่า และได้ผลผลิตเมล็ดเพิ่มขึ้น 65 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งยังช่วยต้านทานสภาวะเครียดของ canola ด้วย (Tzann-Wei wang *et al*. 2005) นอกจากนี้การยับยั้งการทำงานของยีน *DHS* ใน *Arabidosis Thaliana* โดยใช้ At*DHS* สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตทางลำต้นและการเจริญเติบโตในช่วงการสืบพันธุ์ได้ดียิ่งขึ้น (Duguay J *et al.* 2006) และ At*DHS* ยังสามารถยืดการสุกนิ่มของผลมะเขือเทศได้ (Tzann-Wei wang *et al*. 2005) ดังนั้นการทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะชะลอการเสื่อมสภาพของดอกเบญจมาศ จึงได้ศึกษาการยับยั้งการแสดงออกของยีน *DHS* ของเบญจมาศในพืชยาสูบ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการถ่ายฝากเข้าต้นเบญจมาศต่อไป

วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

<u>อุปกรณ์</u>

1. สารเคมีที่ใช้ในงานทางชีววิทยาโมเลกุล อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และอาหารเลี้ยงเชื้อ
2. อุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเลี้ยงเชื้อ
3. ตู้เขี่ยเชื้อแบบ lamina flow
4. เครื่อง spectrophotometer (PARKIN ELMER MBA2000)
5. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (GeneAmp PCR System 9700)
6. ชุดถ่ายภาพ และ UV Transilluminators (BIORAD)
7. เครื่องหมุนเหวี่ยงตะกอนความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิ(SORVALL RC28C)
8. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส และ -80 องศาเซลเซียส

<u>วิธีดำเนินการ</u>

1. การโคลนยีน *DHS* จากเบญจมาศ

1.1. การออกแบบไพรเมอร์

สืบค้นข้อมูลของยีน *Deoxyhypusine Synthase (DHS)* จากฐานข้อมูล Genbank มา 3 accession คือ NM_001036762.1 (*Arabidopsis thaliana*) AJ242017.1 (*Nicotiana tabacum*) และ NM_001247566.1 (*Solanum lycopersicum*) นำมาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 3

accession เฉพาะ Open Reading Frame (ORF) โดยใช้โปรแกรม multiple sequence alignment ClustalW2 ใน European Bioinformatics Institute (EBI) (http://www.ebi. ac.uk/Tools /msa/clustalw2/) เพื่อการออกแบบไพรเมอร์

1.2. การสกัดอาร์เอ็นเอรวม

ทำการสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากใบ เบญจมาศพันธุ์โมนาลิซ่าดอกสีเหลือง โดยใช้ RNeasy Plant Mini Kit ของบริษัท Qiagen นำใบเบญจมาศปริมาณ 0.5 กรัม มาบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีบัฟเฟอร์ RLT ปริมาตร 450 ไมโครลิตร และ β-mercaptoethanol ผสมอยู่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เขย่าสารละลายโดยการ vortex เป็นเวลา 10 วินาที จากนั้นดูดสารละลายลงไปใน QIAshredder spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ดูดส่วนน้ำใสที่ผ่านการกรองด้ วย QIAshredder spin column (ปริมาตรประมาณ 450 ไมโครลิตร) มาเติมลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ แล้วเติม absolute ethanol 0.5 เท่าของส่วนใส ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยวิธีดูดขึ้นและลง แล้วดูดสารละลายดังกล่าวลงไปใน RNeasy spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสข้างล่างทิ้งไป ล้าง column ด้วยการเติมบัฟเฟอร์ RW_1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสข้างล่างทิ้ง ล้าง column อีกสองครั้งโดยการเติมบัฟเฟอร์ RPE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสข้างล่างทิ้ง ปั่นเหวี่ยง column ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เพื่อกำจัดบัฟเฟอร์ที่เหลือค้างอยู่บน column ให้หมดไป ย้ายเฉพาะในส่วนของ column ไปวางลง microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชะอาร์เอ็นเอออกจาก column ด้วยการเติม RNase free water ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ที่มี RiboLock™ RNase Inhibitor ของบริษัท Fermentas ผสมอยู่ความเข้มข้น 0.04 ยูนิตต่อไมโครลิตร

1.3. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายผสม (cDNA synthesis)

ทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายผสมด้วยชุด RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit ยี่ห้อ Thermo โดยนำอาร์เอ็นเอ รวมความเข้มข้น 100 นาโนกรัม /ไมโครลิตร 5 ไมโครลิตร เติมไพร์เมอร์ $oligo(dT)_{18}$ 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ DEPC 6.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้ววางบนน้ำแข็งนาน 5 นาที จากนั้นนำมาเติมบัปเฟอร์ 5X reaction 4.5 ไมโครลิตร Ribolock™ RNase inhibitor 1 ไมโครลิตร 10mM dNTP mix 2 ไมโครลิตร และ ReverstAid M-MuLV 1 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

1.4 การเพิ่มปริมาณยีน *DHS* ด้วยวิธีพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction)

เตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังต่อไปนี้

cDNA template	1	ไมโครลิตร
5x Buffer	5	ไมโครลิตร
dNTPs (2mM)	2	ไมโครลิตร
$MgCl_2$ (25mM)	2	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ Forward (10 µM)	1	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ Reverse (10 µM)	1	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase, Pomega	0.1	ไมโครลิตร
Distilled water	12.9	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	25	ไมโครลิตร

ดูดสารละลายที่กล่าวมาข้างต้นลงในหลอดพีซีอาร์ แล้วนำเข้าเครื่อง ง themal cycle, Gene Amp 9700 ตั้งโปรแกรมดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นตั้งที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ แล้วตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเล็คโทรโฟรีซีส

2. การสร้างเวคเตอร์ RNAi

2.1. การสร้างชุดยีน *DHS* ชนิด RNAi

2.1.1. การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน

หาส่วนของยีน *DHS* ตรงส่วนอนุรักษ์โดยเทียบกับฐานข้อมูลที่ใกล้เคียงกับเบญจมาญมากที่สุด ได้ความยาว 250 เบส และใช้ intron จากฐานข้อมูลของเบญจมาศ *Chrysanthemum zawadskii* chloroplast petB gene, intron, isolate: population K01 หมายเลข accession AB234661.1 ความยาว 571 เบส เป็นตัวกั้นระหว่าง *DHS* sense และ *DHS* antisense เพื่อสร้างเป็น hpRNA ออกแบบไพรเมอร์ เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ดังนี้

- ไพรเมอร์สำหรับชิ้นส่วนยีน *DHS* sense

  xba*DHS*siF1 = 5' GGG GTC TAG AAC TGT AAG TTT GAG GAT TGG ATT AT 3‘

  SiIn*DHS*R = 5’CTT AAT CTA TTT CAT ATA TTC CAT GTC GAC CAC AAG ACC TGG A 3’

- ไพรเมอร์สำหรับชิ้นส่วนยีน *DHS* antisense

  InAs*DHS*F = 5’ GGT GTT TTT GCT TGA GCT GAT GTC GAC CAC AAG ACC TGG A 3’

  sac*DHS*siR4 5' CCC CGA GCT CAC TGT AAG TTT GAG GAT TGG ATT AT 3'

- ไพรเมอร์สำหรับชิ้นส่วน *Chr*Intron

การเพิ่มปริมาณพีซีอาร์ครั้งที่ 1 จากดีเอ็นเอเบญจมาศ

*Chr*IntronF = 5’ GGA ATA TAT GAA ATA GAT TAA G 3’

*Chr*IntronR = 5’ CAG CTC AAG CAA AAA CAC CCA AAT A 3’

การเพิ่มปริมาณพีซีอาร์ครั้งที่ 2 จากชิ้นส่วนพีซีอาร์

senIntron = 5’ AGG TCT TGT GGT CGA CAT GGA ATA TAT GAA ATA GAT TAA G 3’

antIntron = 5’TCC AGG TCT TGT GGT CGA CAT CAG CTC AAG CAA AAA CAC C 3’

นำไพรเมอร์ดังกล่าวมาทำพีซีอาร์ โดยเตรียมปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังต่อไปนี้

DNA template	4	ไมโครลิตร
5x Buffer	20	ไมโครลิตร
dNTPs (2mM)	8	ไมโครลิตร
$MgCl_2$ (25mM)	8	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ Forward (10 µM)	4	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ Reverse (10 µM)	4	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase, Pomega	0.4	ไมโครลิตร
Distilled water	51.6	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	100	ไมโครลิตร

ดูดสารละลายที่กล่าวมาข้างต้นลงในหลอดพีซีอาร์ แล้วนำเข้าเครื่อง themal cycle, Gene Amp 9700 ตั้งโปรแกรมดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นตั้งที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ แล้วตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็คโทรโฟรีซีส

2.1.2. การเชื่อมต่อชิ้นส่วนพีซีอาร์ให้เป็นชุดยีน *DHSRNAi*

เมื่อตรวจสอบชิ้นส่วนพีซีอาร์ถูกต้องแล้วนำชิ้นส่วนยีนที่ได้ทั้ง 3 ชิ้นมาเชื่อมต่อกันด้วยวิธีพีซีอาร์ ตามปฏิกิริยาดังนี้

Purified *DHS* sense PCR product (~500ng)	10	ไมโครลิตร
Purified *DHS* sense PCR product (~500ng)	10	ไมโครลิตร
Purified *DHS* sense PCR product (~500ng)	10	ไมโครลิตร
5x Buffer	20	ไมโครลิตร
dNTPs (2mM)	8	ไมโครลิตร

$MgCl_2$ (25mM)	8	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase, Pomega	0.4	ไมโครลิตร
Distilled water	33.6	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	100	ไมโครลิตร

ดูดสารละลายที่กล่าวมาข้างต้นลงในหลอดพีซีอาร์ แล้วนำเข้า เครื่อง themal cycle, Gene Amp 9700 ตั้งโปรแกรมดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 58 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที จำนวน 10 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 72 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นตั้งที่ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที 1 รอบ แล้วตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็คโทรโฟรีซีส

2.2. การตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการและสกัดแยกดีเอ็นเอจากอะกาโรสเจล

นำผลผลิตพีซีอาร์หยดลงในแผ่นวุ้นอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วย สีไซเบอร์กรีน ตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยใบมีดผ่าตัดที่ปราศจากเชื้อใส่ลงในหลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปสกัดแยกดีเอ็นเอโดยใช้ชุด Gel extraction kit (Qiagen) ตามขั้นตอนดังนี้ ชั่งน้ำหนักเจลที่ตัดได้แล้วเติม Buffer QG 3 เท่าของน้ำหนักเจล บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ให้ผสมกันโดย vortex ทุกๆ 2-3 นาที เมื่อเจลละลายดีแล้วเติม Isopropanol ไป 1 เท่าของเจล ผสมให้เข้ากัน นำตัวอย่างที่ได้ใส่ลงใน Column หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เติม Buffer QG 500 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทของเหลวทิ้ง ล้าง Column ด้วย Buffer PE 750 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทของเหลวทิ้ง หมุนเหวี่ยงอีก 1 นาที(เพื่อให้แห้ง) ย้าย Column ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม Buffer EB ทิ้งไว้ 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที จะได้ดีเอ็นเอที่ต้องการ จากนั้นนำไปโคลนเข้าสู่พีซีอาร์เวคเตอร์แล้วตรวจสอบความถูกต้องของยีนด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

2.3. การตัดและเชื่อมต่อชุดยีน *DHSRNAi* เข้าสู่เวคเตอร์ pCAMBIA3304

นำชุดยีน *DHSRNAi* ที่อยู่บนพีซีอาร์เวคเตอร์ และเวคเตอร์ pCAMBIA3304 มาตัดด้วยเอ็นไซม์ตามปฏิกิริยาดังนี้

Vector (~500ng)	10	ไมโครลิตร
10x Buffer fast digestion	3	ไมโครลิตร
XbaI enzyme	1	ไมโครลิตร
SacI enzyme	1	ไมโครลิตร
Distilled water	15	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	30	ไมโครลิตร

ดูดสารละลายที่กล่าวมาข้างต้นลงในหลอด 1.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็คโทรโฟรีซีส แล้วตัดชิ้นส่วนเวคเตอร์และชุดยีนมาทำให้บริสุทธิ์ ตามวิธีการข้อที่ 2.2 แล้วนำมาการเชื่อมต่อชุดยีนเข้ากับเวคเตอร์ ตามปฏิกิริยาดังนี้

Vector (~30ng)	2	ไมโครลิตร
ชิ้นส่วนชุดยีน *DHSRNAi* (~50ng)	2	ไมโครลิตร
5x ligase reaction Buffer	4	ไมโครลิตร
T4 DNA ligase, Invitrogen	1	ไมโครลิตร
Distilled water	11	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	20	ไมโครลิตร

บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วนำพลาสมิดสายผสมที่ได้ไปถ่ายเข้าสู่ competent cell ของเชื้อ *E. coli* ต่อไป

2.4. การเตรียม competent cell ของเชื้อ *E. coli*

การเตรียม competent cell ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดยใช้ calcium chloride เพื่อใช้ทำ transformatiom โดยดัดแปลงวิธีของ Inoue และคณะ (1990) มีวิธีการดังนี้คือ streak เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α บนอาหารแข็ง 2xYT บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน แล้วจึงนำโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าข้ามคืนบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ต่อมา นำเชื้อที่เลี้ยงไว้ข้ามคืนมาเติมลงในอาหารเหลว 2xYT ใหม่ปริมาตร 1% ของปริมาตรอาหารใหม่ (100 มิลลิลิตร) แล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานประมาณ 2 ชั่วโมง ให้ค่า OD_{600} เท่ากับ 0.5 จึงหยุดการเจริญเติบโตของเชื้อโดยก ารแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาปั่นเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทอาหารเดิมทิ้งไป จากนั้นละลายตะกอนเซลล์อย่างเบา ๆ ด้วยสารละลาย TB ที่แช่เย็นปริมาตร 32 มิลลิลิตร และแช่เย็นไว้เป็นเวลา 30 นาที แล้วปั่นเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทสารละลาย TB เดิมทิ้งไป ละลายตะกอนเซลล์อย่างเบา ๆ อีกครั้ง ด้วยสารละลาย TB แช่เย็นปริมาตร 2 มิลลิลิตร เมื่อตะกอนเซลล์ละลายหมดเติม DMSO ปริมาตร 140 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆในที่เย็น แล้วแบ่ง competent cell ที่ได้ไว้ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตรหลอดละ 50 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ตู้ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

2.5. การถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli*

ถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเ รีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธี heat shock transformation (Sambrook และ Russell, 2001) โดย เติมพลาสมิดสายผสมปริมาตร 6 ไมโครลิตร ใน competent cell ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปแช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที แล้ว heat

shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที จากนั้นแช่น้ำแข็งทันทีนาน 3 นาที เอาออกมาเติมอาหารเหลว SOC ปริมาตร 250 มิลลิลิตร นำหลอดไปเขย่าในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายออกมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง 2xYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

2.6. การสกัดพลาสมิดของดีเอ็นสายผสม (recombinant DNA)

คัดเลือกเซลล์ของเชื้อ*E. coli* ที่เจริญบนอาหารคัดเลือกแต่ละโคโลนีมาเลี้ยงในอาหารเหลว2xYT ที่เติมสารปฏิชีวนะkanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัด พลาสมิดโดยดัดแปลงวิธีการของ Sambrook และ Russell (2001) ดูดเซลล์ที่เลี้ยงไว้ในอาหารเหลวลงในmicrocentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเก็บเซลล์ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทอาหารทิ้งไป เติม TE buffer (10 mM Tris-HCl; (pH 8.0), 1 mM EDTA) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ละลายตะกอนเซลล์ด้วยการ vortex เป็นเวลาประมาณ 30 วินาที จากนั้นเติม lysis buffer (0.2 mM NaOH, 1% SDS) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดขึ้นและลงเบาๆ เติม precipitation buffer (5 M potassium acetate, 96% acitic acid) ปริมาตร 225 ไมโครลิตร และคลอโรฟอร์ม 200 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดขึ้นและลงเบาๆ แช่น้ำแข็ง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนน้ำใสใส่หลอดใหม่ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วเติม isopropanol ปริมาตรหนึ่งเท่าของปริมาตรส่วนใส (500 ไมโครลิตร) พลิกหลอดไปมาเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้งไป ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร พลิกหลอดขึ้นและลง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้งไป ปล่อยให้ตะกอนแห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงละลายตะกอนของพลาสมิดด้วยน้ำที่เติม RNase A ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้งาน

3. การถ่ายยีนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียม

3.1 การเตรียม electrocompetent cell ของเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens*

เตรียม electrocompetent cell ของเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ดัดแปลงตามวิธีของ Abdallah และคณะ (2004) ดังนี้ คือ streak เชื้อ *A. tumefaciens* บนอาหารแข็ง 2xYT บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นานข้ามคืนบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส แล้วเติมเชื้อที่เลี้ยงไว้ลงในอาหารเหลว 2xYT ใหม่ ปริมาตร 10% ของปริมาตรอาหารใหม่ (อาหารใหม่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จะเติมเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร) จากนั้นนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นานประมาณ 3 ชั่วโมง ให้ค่า OD_{600} เท่ากับ 0.5 ต่อจากนั้นหยุด

การเจริญเติบโตของเชื้อโดยการแช่เชื้อไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดปั่นเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทอาหารเดิมทิ้งไป แล้วละลายตะกอนเซลล์อย่างเบา ๆ ด้วย glycerol 15 เปอร์เซ็นต์ ที่แช่เย็น ปริมาตร 1 ต่อ 20 ของปริมาตรเชื้อที่ใช้เตรียม และแช่เย็นไว้เป็นเวลา 30 นาที ปั่นเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทสารละลายเดิมทิ้งไป จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ให้หมดอย่างเบา ๆ ด้วย glycerol 15 เปอร์เซ็นต์ แช่เย็น ปริมาตร 1 ต่อ 50 ของปริมาตรเชื้อที่ใช้เตรียม สุดท้ายแบ่ง competent cell ที่ได้ไว้ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตรหลอดละ 50 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ ตู้ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

3.2 การถ่ายยีนเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียมด้วยวิธีอิเลคโตรโพเรชั่น (electroporation)

นำเวคเตอร์ RNAi*DHS*pCAMBIA3304 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใส่ลงไปในหลอดที่มี electrocompetent cell ของเชื้อ *A. tumefaciens* ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้บนน้ำแข็งนาน 30 นาที แล้วดูดใส่หลอดคิวเวทสำหรับส่งถ่ายกระแสไฟด้วยเครื่อง electro cell manipulator 600 (BTX San Diego, California) โดยตั้งค่าโหมด T เท่ากับ 2.5 กิโลโวลต์ ค่า resistance R เป็น R5 (129ohm) ค่า charging voltage เท่ากับ 1.44 กิโลโวลต์ หลังจากส่งถ่ายกระแสไฟแล้วให้ใส่ในอาหารเหลว LB ทันที แล้วนำไปบ่มที่ 28 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง ดูดเชื้อปริมาตร 200-400 ไมโครลิตร เลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่มีสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 2-3 วัน จากนั้นคัดเลือกเซลล์อะโกรแบคทีเรียมที่มีเวคเตอร์ RNAi*DHS*pCAMBIA3304 ด้วยวิธีโคโลนีพีซีอาร์

4. การถ่ายยีนเข้าสู่ใบยาสูบและการทดสอบความทนต่อสภาวะเครียด(ทนเค็ม)

4.1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อใบยาสูบ

ทำการเพาะเมล็ดใบยาสูบ พันธุ์เบอร์เลย์ (*Nicotiana tabacum* L. *'Burley'*) โดยฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอร์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที ตามด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที และ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 รอบ แล้วเพาะ บนอาหาร MS (Murashige และ Skoog, 1962) เมื่อเมล็ดเจริญเติบโตเป็นต้นสมบูรณ์ จึงทำการ subculture เพื่อเพิ่มจำนวนต้น

4.2. การเตรียมเชื้ออะโกรแบคทีเรียมสำหรับการถ่ายยีน

นำโคโลนีเดี่ยวของ เชื้ออะโกรแบคทีเรียม ที่มีพลาสมิด RNAi*DHS*pCAMBIA3304 มาเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ที่มี kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ข้ามคืนบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 120 rpm ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จนมีค่า OD_{600} ประมาณ 1.0 ถึง 1.5 แล้วนำออกมาเติม acetosyringone ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครโมล นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 120 รอบต่อนาที

ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ต่ออีก 5 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเจือจางในอาหาร MS เหลวในอัตราส่วนของปริมาตรเชื้อในอาหารเหลว : ปริมาตรอาหาร MS เหลวเท่ากับ 1 : 50 สำหรับใช้ในการถ่ายยีน

4.3. การถ่ายยีนโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรียม

ใช้มีดผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงไปในเชื้อ อะโกรแบคทีเรียม ที่เจือจางไว้ กรีดลงบนใบของยาสูบที่เพาะเลี้ยงเนื่อเยื่อ อายุประมาณ 1 เดือนหลังการ subculture โดยกรีดให้เป็นสี่เหลี่ยมขนาด 1×1 เซนติเมตร แล้วจึงนำชิ้นส่วนใบที่ตัดได้ จากนั้นวางลงบนจานอาหารสูตร MS โดยเรียงชิ้นส่วนใบให้เต็มพื้นที่บนจานอาหาร ประมาณ 20 ชิ้น เก็บจานอาหารไว้ในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน (cocultivation) จากนั้นจึงย้ายชิ้นส่วนใบยาสูบที่ผ่านการ cocultivation ลงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ที่มี naphthaleneacetic acid (NAA) 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร, benzyladenine (BA) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร, glufosinate 50 ppm. และ cefotaxime 200 มิลลิกรัมต่อลิตร วางจานอาหารให้ได้รับแสง รอจนกระทั่งชิ้นส่วนใบเกิดแคลลัส นำแคลลัสที่ได้ย้ายลงในอาหารคัดเลือกสูตร MS ที่ปราศจากฮอร์โมน รอจนกระทั่ง แคลลัสเจริญเป็นต้น จึงนำต้นที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือก ไปตรวจสอบการได้รับ ชุดยีน *DHSRNAi* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

4.4. การทดสอบความทนสภาวะเครียด(ความเค็ม)

ทดสอบความทนต่อสภาวะเครียด (ความเค็ม) ของยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *DHSRNAi* โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Random Design; CRD) เปรียบเทียบต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *DHSRNAi* และชุดควบคุม (ไม่ได้รับการถ่ายยีน) ใช้ต้นยาสูบ อายุประมาณ 3 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NaCl ที่ความเข้มข้น 2.0 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน แล้วบันทึกค่าความสูงต้นและค่าความสว่างของสีใบดัดแปลงตามวิธีของ Lukinac และคณะ (2009) โดยวัดค่าความสว่างสี ΔE_{RGB} จากการคำนวณค่า R G B ที่ได้จากโปรแกรม Photoshop มาคำนวณด้วยสูตร

$$\Delta E_{RGB} = \sqrt{\left[(\Delta R)^2 + (\Delta G)^2 + (\Delta B)^2\right]}$$

เมื่อ ΔR = ค่าสี $R_{เริ่มต้น}$ – ค่าสี $R_{ตัวอย่าง}$

ΔG = ค่าสี $G_{เริ่มต้น}$ – ค่าสี $G_{ตัวอย่าง}$

ΔB = ค่าสี $B_{เริ่มต้น}$ – ค่าสี $B_{ตัวอย่าง}$

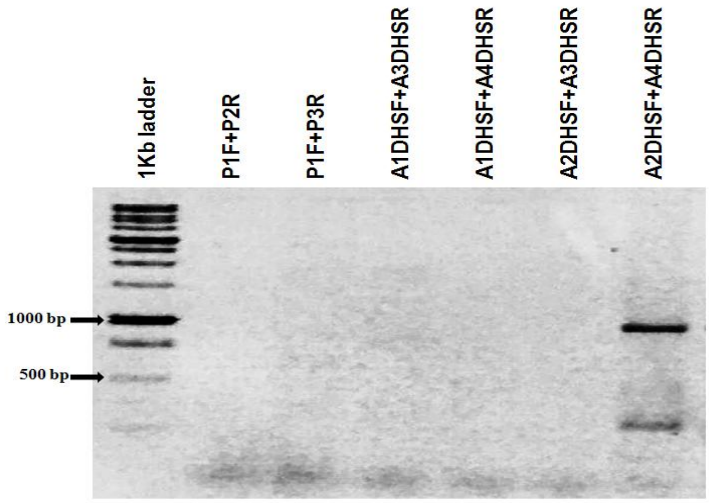
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การโคลนยีน *DHS* จากเบญจมาศ

การโคลนยีน *DHS* จากเบญจมาศ จำเป็นต้องใช้ไพรเมอร์แบบ Degenerate เนื่องจากยังไม่มีรายงานการโคลนยีนดังกล่าวในเบญจมาศ การทดลองนี้ใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้แล้วตามรายงานของ Ober และ Harmann (1999) จำนวน 3 เส้น ได้แก่ P1F P2R และ P3R ร่วมกับไพรเมอร์ที่ออกแบบเอง โดยใช้ข้อมูลยีน *Deoxyhypusine Synthase (DHS)* จากฐานข้อมูล Genbank มา 3 accession คือ NM_001036762.1 (*Arabidopsis thaliana*) AJ242017.1 (*Nicotiana tabacum*) และ NM_001247566.1 (*Solanum lycopersicum*) มาออกแบบไพรเมอร์ได้จำนวน 4 เส้น ได้แก่ A1DHSF A2DHSF A3DHSR และ A4DHSR (ตารางที่ 1) เมื่อนำไพรเมอร์ที่ได้ไปเพิ่มปริมาณยีน *DHS* ในเบญจมาศ โดยการจับคู่ดังนี้ P1F+P2R P1F+P3R A1DHSF+A3DHSR A1DHSF+A4DHSR A2DHSF+A3DHSR และ A2DHSF+A4DHSR พบว่ามีเพียง 1 คู่ไพรเมอร์ คือ A2DHSF+A4DHSR (A2DHSF: 5'-ARG GNT AYG AYT TYA AYM AAG G-3' ร่วมกับ A4DHSR: 5'-AAR GCW ATR GTK GCA TCA CAR T-3') เท่านั้นที่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน *DHS* ในเบญจมาศได้ (ภาพที่ 1) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีนที่ได้มีความยาว 919 เบส (ภาพที่ 2) สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 306 อะมิโน (ภาพที่ 3) เมื่อนำไป blast กับฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *DHS* ในเบญจมาศ มีความเหมือนกับ *Senecio vernalis Arabidopsis thaliana* และ *Nicotiana sylvestris* ที่ค่า identity 91 85 และ 82 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ลำดับกรดอะมิโนของยีน DHS มีความเหมือนกับ *Senecio vernalis Arabidopsis thaliana* และ *Nicotiana tabacum* 88 79 และ 78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แบบ degenerate ที่ใช้ในการโคลนยีน *DHS*

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	เบส	เอกสารอ้างอิง
P1F	5'-ARG ARG AYT TYA THA ART GYY TNG-3'	24	Ober และ Harmann (1999)
P2R	5'-GCY TCR TCN GGW CKN GMR CC-3'	20	Ober และ Harmann (1999)
P3R	5'-CCC CAN SWN ACN GCY TCR TC-3'	20	Ober และ Harmann (1999)
A1DHSF	5'-ATG TTY CAA GCH TCH AAY CTY GG-3'	23	Degenerate primer design
A2DHSF	5'-ARG GNT AYG AYT TYA AYM AAG G-3'	22	Degenerate primer design
A3DHSR	5'-AAA NGT YTC AGC NAC MAR YA-3'	20	Degenerate primer design
A4DHSR	5'-AAR GCW ATR GTK GCA TCA CAR T-3'	22	Degenerate primer design



ภาพที่ 1 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน *DHS* ด้วยไพรเมอร์จากตารางที่ 1 บนอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์

```
AGGGTATGATTTTAACCAAGGGGTCAATCATTCTGAGCTTCTTAAATCCATGGTTTCCACTGGCTTTCAAGC
TTCTAATCTTGGTGATGCTATTCATATTGTTAATCAAATGCTAGATTGGAGGCTTTCACATGAAAAATTAGC
AGAAGATTGCAGTGAGGAAGAGAAGAATCCAACATACAGAGAGTCTGTCAAGTGCAAAATATTCCTTGGTTT
CACTTCAAACCTCATTTCCTCTGGTGTCCGAGACATTATTCGGTATCTAGTCCAACATCATATGGTGGAAGT
GATTGTGACAACAACTGGTGGGATTGAGGAAGATCTAATAAAATGCCTTGCAAACACATATAGAGGTGAATT
TTCTCTACCTGGCGCTGCATTGCGTTCGAAAGGACTAAATCGTATTGGTAACTTGTTGGTGCCTAATGATAA
CTACTGTAAGTTTGAGGATTGGATTATCCCAATATTTGACCAAATGTTGGAAGAACAAAAAACAAAGAATGT
ATTATGGACACCGTCAAAAGCGATAGCGCGTTTGGGGAAGGAAATTAACGACGAGAGTTCATATCTATATTG
GGCATATAAGAACGATATTCCCGTCTTCTGTCCCGGCTTGACAGATGGATCTCTTGGGGACATGTTATATTT
CCATTCGTTTCGCAATCCAGGTCTTGTGGTCGACATAGTACAAGATATAAGGGCTATCAACGGTGAGGCTGT
GCATGCAAACCCTAGGAAGACTGGAATGATAATTCTAGGAGGGGGGTTGCCAAAACATCACATCTGCAACGC
GAATATGATGCGTAATGGTGCAGATTATGCTGTTTTCATCAACACAGCCCAAGAATTTGATGGTAGTGATTC
AGGTGCTCGTCCTGATGAAGCTGTCTCATGGGGGGAAAATACGTGGTTCTGCTAA
```

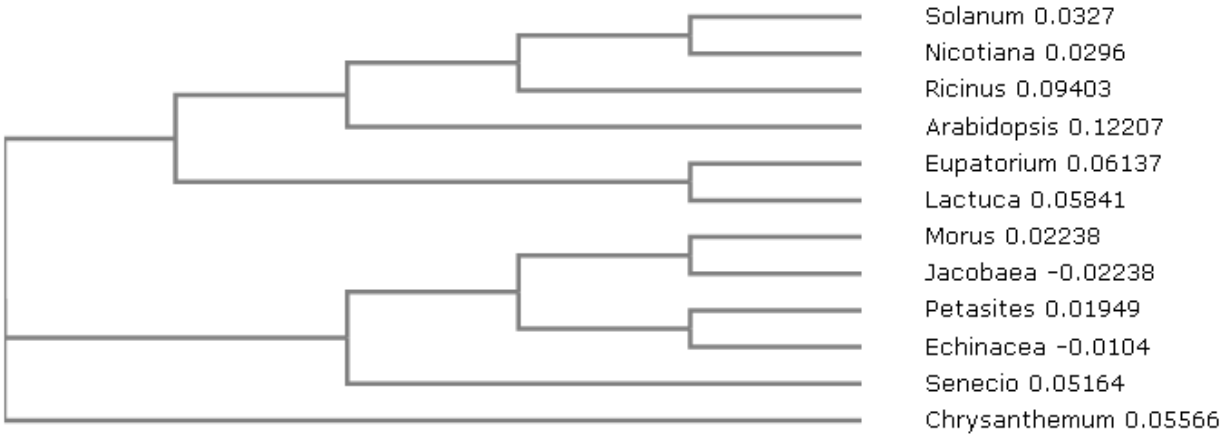
ภาพที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน *DHS* ที่โคลนได้จากเบญจมาศ ความยาว 919 เบส

```
  1 GYDFNQGVNH SELLKSMVST GFQASNLGDA IHIVNQMLDW RLSHEKLAED CSEEEKNPTY
 61 RESVKCKIFL GFTSNLISSG VRDIIRYLVQ HHMVEVIVTT TGGIEEDLIK CLANTYRGEF
121 SLPGAALRSK GLNRIGNLLV PNDNYCKFED WIIPIFDQML EEQKTKNVLW TPSKAIARLG
181 KEINDESSYL YWAYKNDIPV FCPGLTDGSL GDMLYFHSFR NPGLVVDIVQ DIRAINGEAV
241 HANPRKTGMI ILGGGLPKHH ICNANMMRNG ADYAVFINTA QEFDGSDSGA RPDEAVSWGE
301 NTWFC*
```

ภาพที่ 3 ลำดับกรดอะมิโนของชิ้นส่วนยีน *DHS* ที่โคลนได้จากเบญจมาศ ความยาว 306 อะมิโน

การนำ นิวคลีโอไทด์ของ ยีน *DHS* จากเบญจมาศมาศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม กับฐานข้อมูล พบว่ายีน *DHS* แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ *Solanum* sp. *Nicotiana* sp. *Ricinus* sp. *Arabidopsis* sp. *Eupatorium* sp. *Lactuca* sp. กลุ่มที่ 2 ได้แก่ *Morus* sp. *S.Jacobaea Petasites* sp. *Echinacea* sp. *Senecio* sp. และกลุ่มที่ 3 ได้แก่ *Chrysanthemum* sp.

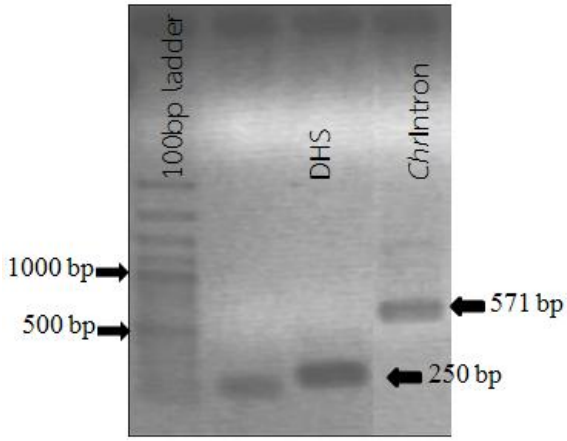
(ภาพที่ 4) ซึ่งเบญจมาศได้แยกออกจากกลุ่มอื่น (out group) อย่างชัดเจน แสดงว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของเบญจมาศมีความคล้ายคลึงกับพืชชนิดอื่นต่ำ ดังนั้นการสร้าง dsRNA อาจส่งผลให้ไม่คล้ายคลึง (homologue) กับยีน *DHS* เป้าหมายในยาสูบได้



ภาพที่ 4 แผนผัง Phylogenatic tree ของยีน *DHS* จากเบญจมาศกับฐานข้อมูล GenBank

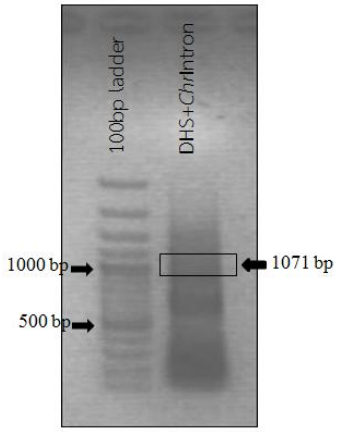
2. การสร้างเวคเตอร์ RNAi

กระบวนการ RNA silencing หรือ RNA interference (RNAi) คือ กระบวนการควบคุมการแสดงออกของยีนอย่างหนึ่ง ซึ่งมีการยับยั้งการแสดงออกของยีนหลังการถอดรหัสพันธุกรรม (Post-Transcriptional Gene Silencing : PTGS) ไม่ให้เกิดการแปลรหัส (Translation) ไปเป็นโปรตีนต่อไปได้ สามารถเกิดขึ้นได้ในสิ่งมีชีวิตยูคาริโอตทุกชนิดรวมถึงเชื้อรา ซึ่งกระบวนการเกิด RNAi เป็นการทำงานของ Dicer ที่จดจำตำแหน่งของ siRNA, hpRNA หรือ dsRNA เป็นต้น สามารถส่งถ่ายสัญญาณแบบ cell- to-cell และทางท่ออาหาร (Mlotshwa *et.al.,* 2002) ดังนั้นการสร้างเวคเตอร์ RNAi สิ่งที่ต้องคำนึงถึงคือ เมื่อมีการถอดรหัสนิวคลีโอไทด์จากดีเอ็นเอมาเป็นเอ็มอาร์เอ็นเอแล้ว ชุดยีนที่ออกแบบต้องสร้าง siRNA, hpRNA หรือ dsRNA ขึ้นมาได้ เพื่อให้กระบวนการ RNAi ในพืชเริ่มทำงาน การทดลองนี้จึงได้นำยีน *DHS* ความยาว 250 เบส และส่วนของ *Chr*Intron ความยาว 571 เบส จากเบญจมาศ (ภาพที่ 5) เพื่อสร้างชุดยีนให้เป็นแบบ hpRNA เมื่อมีการถ่ายยีนสำเร็จ พืชจะสามารถสร้าง dsRNA จากชุดยีน *DHSRNAi* ได้



ภาพที่ 5 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน *DHS* และ *Chr*Intron จากดีเอ็นเอเบญจมาศ บนอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์

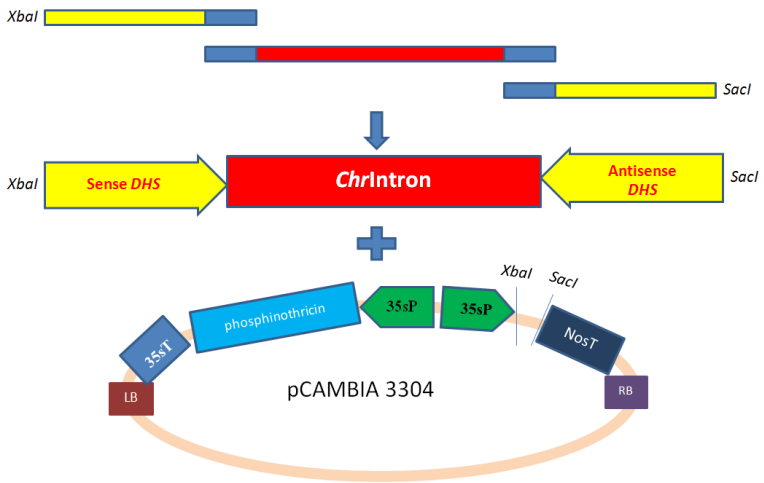
การสร้างชุดยีนแบบ hpRNA ได้ประยุกต์ใช้วิธีพีซีอาร์ในการสร้างชุดยีน *DHSRNAi* ซึ่งการออกแบบ ไพรเมอร์ต้องมีส่วนปลายของชิ้นส่วนยีนที่ต้องการต่อออกไปจากไพรเมอร์เดิม 19-25 เบส ดังนั้นการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 3 ชิ้น คือ *DHS* senese จากเดิมความยาว 250 เบส จะได้ความยาวประมาณ 275 เบส *Chr*Intron จากเดิมความยาว 571 เบส จะได้ความยาวประมาณ 620 เบส และ *DHS* antisense จากเดิมความยาว 250 เบส จะได้ความยาวประมาณ 275 เบส เมื่อนำมาเชื่อมต่อกันด้วยวิธีพีซีอาร์แล้วจะได้ความยาว 1071 เบส จึงทำการตัดคัดเลือกแถบดีเอ็นเอ ที่ให้ขนาดประมาณ 1071 เบส (ภาพที่ 6) นำแถบดีเอ็นเอดังกล่าวไปโคลนเข้าพีซีอาร์เวคเตอร์ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าการเชื่อมต่อชิ้นยีนทั้ง 3 ชิ้น ความยาว 1071 เบส มีส่วนของ *DHS* sense *Chr*Intron และ *DHS* antisense ตามลำดับ (ภาพที่ 9) ชุดยีน *DHSRNAi* ถูกต่อเข้ากับเวคเตอร์ pCAMBIA3304 (ภาพที่ 8) แล้วตรวจสอบความถูกต้องของชุดยีนหลังจากการต่อด้วยการตัดด้วยเอ็นไซม์ *Xba*I และ *Sac*I อีกรอบได้ผล คือ มีเวคเตอร์ pCAMBIA3304 ขนาด 3304 เบส และ *DHSRNAi* ขนาด 1071 เบส (ภาพที่ 9) ดังนั้นชุดยีน *DHSRNAi* ที่ได้จะเป็นแบบ hpRNA มีส่วนประกอบเริ่มจากโปรโมเตอร์คือ 35s Promoter ต่อด้วย *DHS* senese *Chr*Intron *DHS* antisense และ nos terminator (ภาพที่ 10) เมื่อมีการถอดรหัสจะได้อาร์เอ็นเอที่สร้าง dsRNA ได้ สามารถนำไปถ่ายยีนเข้าสู่พืชต่อไป



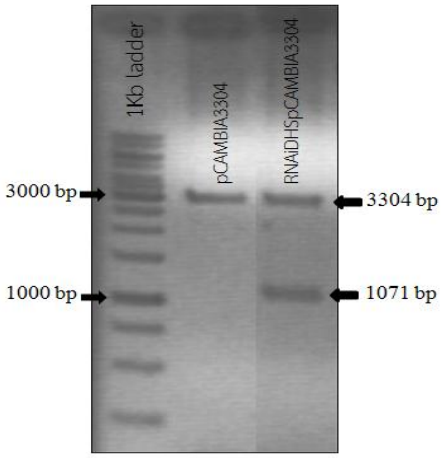
ภาพที่ 6 ชิ้นส่วนยีนที่ต่อกันด้วยวิธีพีซีอาร์ แ ละการตัดชิ้นส่วนยีน *DHS* แบบ sense, antisense และ *Chr*Intron ที่เชื่อมต่อกัน บนอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์

ACTGTAAGTTTGAGGATTGGATTATCCCAATATTTGACCAAATGTTGGAAGAACAAAAAACAAAGAATGTAT
TATGGACACCGTCAAAAGCGATAGCGCGTTTGGGGAAGGAAATTAACGACGAGAGTTCATATCTATATTGGG
CATATAAGAACGATATTCCCGTCTTCTGTCCCGGCTTGACAGATGGATCTCTTGGGGACATGTTATATTTCC
ATTCGTTTCGCAATCCAGGTCTTGTGGTCGACATggaatatatgaaatagattaagaaatatttgaactatg
attcatacttaatatgcaaacctcgtggccggactccaaaaagattccaagaatttagaaaagaaatataaa
ttgtttcttctttcaaatgtatgcttattttgactcaaagacaactctttcttcggatttttggttattatc
tattcgtggaataagggatgatccgcgggttcttactcagggaatctttgggcttaacttagtatttttatt
gaatcatcgtggttctagtatgaatctggggttttaatcgattcatagggtcttaacaagagaattcctatc
aataataaatcaaaaaatacaaaaacaaataaaagaaagaaatagggaagagaggattcaagaggcccgtaa
ggatcaagataaagacgactgagccaacttgatattttggtattatcaccacaaagaagaactttcggattt
ttttgattcatatcttcagagcagattgaatcggaaagcaataagtttctttctattacatatccgttccga
ccagtatttgggtgtttttgcttgagctgATGTCGACCACAAGACCTGGATTGCGAAACGAATGGAAATATA
ACATGTCCCCAAGAGATCCATCTGTCAAGCCGGGACAGAAGACGGGAATATCGTTCTTATATGCCCAATATA
GATATGAACTCTCGTCGTTAATTTCCTTCCCCAAACGCGCTATCGCTTTTGACGGTGTCCATAATACATTCT
TTGTTTTTTGTTCTTCCAACATTTGGTCAAATATTGGGATAATCCAATCCTCAAACTTACAGT

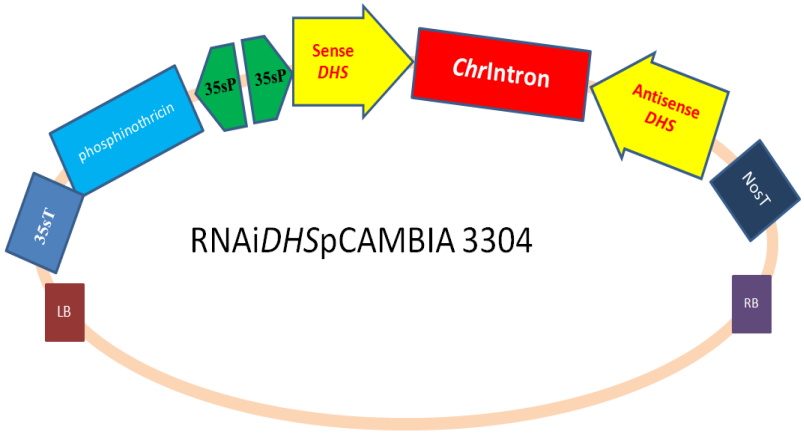
ภาพที่ 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชุดยีน *DHSRNAi* ที่มี *Chr*Intron ตรงกลางขนาดความยาว 1071 เบส



ภาพที่ 8 การเชื่อมต่อชิ้นส่วนยีน *DHSRNAi* เข้าสู่เวคเตอร์ pCAMBIA3304



ภาพที่ 9 การตรวจสอบเวคเตอร์ RNAi*DHS*pCAMBIA 3304 จากการตัดด้วยเอนไซม์ *XbaI* และ *SacI* บน อะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์

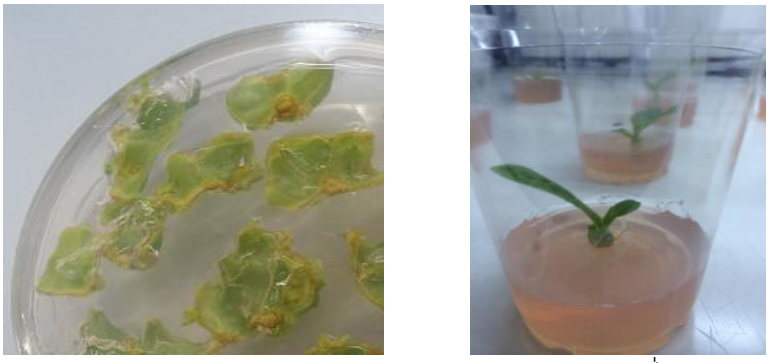


ภาพที่ 10 เวคเตอร์ RNAi*DHS*pCAMBIA 3304

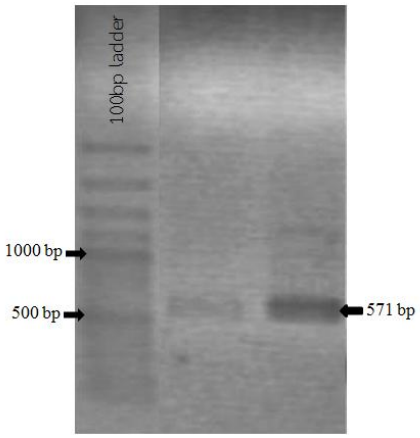
3. การถ่ายยีนเข้าสู่ใบยาสูบและการทดสอบความทนต่อสภาวะเครียด(ความเค็ม)

ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนจะ คัดเลือก บนอาหารที่มี สาร glufosinate เนื่องจากเวคเตอร์ pCAMBAI3304 มียีนคัดเลือก *phosphinothricin* ที่ต้านทานต่อสาร glufosinate การทดสอบความต้านทาน ปริมาณสาร ที่ใช้ คือ 10,50 และ 100 ppm พบว่า ทุกควา มเข้มข้นสามารถทำให้ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อตาย โดยความเข้มข้นที่ 50 และ 100 ppm เริ่มแสดงอาการเหลืองทั้งใบในระยะเวลา 3 วัน แต่ 10 ppm เริ่มแสดงอาการหลังจาก 4 วัน จึงเลือกใช้ความเข้มข้นที่ 50 ppm ในการคัดเลือก การเกิดแคลลัส บนอาหารคัดเลือก MS ที่มี naphthaleneacetic acid (NAA) 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร , benzyladenine (BA) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร glufosinate 50 ppm และ cefotaxime 200 มิลลิกรัมต่อลิตรที่มีฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบแคลลัสสามารถเจริญบนอาหารคัดเลือก เมื่อ 2 สัปดาห์ นำแคลลัสที่ได้ย้ายลงในอาหารคัดเลือกสูตร MS ที่ปราศจากฮอร์โมน รอจน เจริญเป็นต้น (ภาพที่ 11) นำไปตรวจสอบชุดยีน *DHSRNAi* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ *Chr*IntronF + *Chr*IntronR ตรวจสอบเฉพาะชิ้น *Chr*Intron ได้ความยาวของชิ้นยีน 571

เบส (ภาพที่ 12) จากต้นยาสูบทั้งหมด 6 ต้น มียีน *DHSRNAi* จำนวน 2 ต้น จึงนำไปเลี้ยงขยายเพื่อทดสอบความทนต่อสภาวะเครียดต่อไป



ภาพที่ 11 ภาพการเกิดแคลลัสหลังจากการถ่ายยีน และต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน



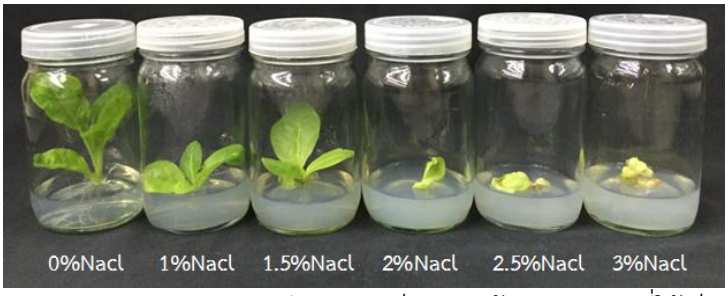
ภาพที่ 12 การตรวจสอบต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยไพรเมอร์ *Chr*IntronF + *Chr*IntronR ความยาว 571 เบส บนอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์

การควบคุมการแสดงออกยีน *DHS* ในพืช มีรายงานว่าเมื่อยีนถูกยับยั้งการแสดงออกภายหลังจากการถอดรหัสเป็นเอ็มอาร์เอ็นเอ ไม่สามารถแปลรหัสไปเป็นโปรตีนได้ ทำให้พืชมีการเสื่อมสภาพของพืชน้อยลง ส่งผลให้มี การเจริญเติบโตที่ดีและสามารถทนต่อสภาวะเครียดต่างๆ ได้ (Tzann-Wei wang *et al*. 2005) การทดลองนี้จึงได้ทดสอบการสร้างสภาวะเครียด (ความเค็ม) ในต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน อายุ 2 สัปดาห์ โดยการเพิ่มปริมาณสารโซเดียมคลอไรด์ลงไปในอาหาร MS ที่ความเข้มข้น 1-3 เปอร์เซ็นต์ (W/V) พบว่าต้นยาสูบเริ่มแสดงอาการใบซีดในสัปดาห์แรก และไม่มีการเจริญเติบโตหลังจากอยู่บนอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ 14 วัน (ภาพที่ 13) เมื่อวัดความสูงต้นที่อายุ 21 วัน พบว่าค่าเฉลี่ยความสูงต้นสูงสุดในอาหาร MS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้ แก่ 1.5 2 1 3 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.9 5.0 4.8 4.7 3.8 และ 3.5 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95

เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) ดังนั้น การเปรี ยบเทียบความทนเค็มของต้นยาสูบชุดควบคุม (ต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน) และต้นที่มียีน *DHSRNAi* จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ 2.0 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากแสดงอาการเสื่อมสภาพชัดเจน และให้ค่าเฉลี่ยของความสูงแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยความสูงต้นยาสูบปกติ(ไม่ได้รับการถ่ายยีน) อายุ 21 วัน บนอาหาร MS ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0-3 เปอร์เซ็นต์ (W/V)

ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์	ค่าเฉลี่ยความสูงต้น (เซนติเมตร)
MS+NaCl 0 เปอร์เซ็นต์	5.9ab
MS+NaCl 1 เปอร์เซ็นต์	4.7abc
MS+NaCl 1.5 เปอร์เซ็นต์	5.0b
MS+NaCl 2 เปอร์เซ็นต์	4.8b
MS+NaCl 2.5 เปอร์เซ็นต์	3.5c
MS+NaCl 3 เปอร์เซ็นต์	3.8c
95% Confidence Interval	*
Std. Error	0.5



ภาพที่ 13 การทดสอบความทนต่อสภาวะเครียด (ทนเค็ม) ของต้นยาสูบปกติที่ใช้เป็นชุดควบคุม อายุ 21 วัน บนอาหาร MS ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-3 เปอร์เซ็นต์ (W/V)

การทดสอบความทนเค็มของต้นยาสูบอายุ 3 สัปดาห์ บนอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 2.0 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ใบยาสูบแสดงลักษณะซีดลงเริ่มจากโคนใบขึ้นไป และเริ่มแสดงอาการชัดเจนเมื่ออายุ 14 วัน (ตารางที่ 3) การวัดค่าความสว่างสีของใบนั้นเมื่อค่าเพิ่มขึ้นหมายความว่าใบยาสูบเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเพิ่มขึ้น จากการวัดค่าความสว่างสีมีการเพิ่มขึ้นในวันที่ 14 และ 21 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับค่าความสว่างสีในวันที่ 7 ซึ่งการเลี้ยงต้นยาสูบบนอาหาร MS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ ชุดควบคุมแสดงค่าเฉลี่ยความสว่างสีเมื่อ 7 14 และ 21 วัน ที่ 57.84 66.97 และ 129.62 ตามลำดับ ต้นยาสูบที่มียีน *DHSRNAi* แสดงค่าเฉลี่ยความสว่างสีที่ 36.15 53.00 และ 106.16 ตามลำดับ สำหรับต้นยาสูบบนอาหาร MS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ชุดควบคุมแสดงค่าเฉลี่ย

ความสว่างสีเมื่อ 7 14 และ 21 วัน ที่ 21.33 64.90 และ 143.16 ตามลำดับ ต้นยาสูบที่มียีน *DHSRNAi* แสดงค่าเฉลี่ยความสว่างสีที่ 28.62 53.36 และ 110.23 ตามลำดับ ทั้งนี้ค่าความสว่างสีในชุดควบคุมและมียีน *DHSRNAi* ไม่มีความแตกต่าง ทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และค่าเฉลี่ยความสูงของต้น พบว่าต้นยาสูบทั้งชุดควบคุมและมียีน *DHSRNAi* ในทุกความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ วันที่ 7 14 และ 21 มีการเพิ่มขึ้นที่ไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 4) แสดงว่ายาสูบทั้ง 2 ชนิด ตอบสนองต่อความเค็มไม่ต่างกัน

ตารางที่ 3 ภาพเปรียบเทียบต้นยาสูบชุดควบคุมและยาสูบที่ยีน *DHSRNAi* อายุ 7-14 วัน หลังจากเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ 2 เปอร์เซ็นต์ และ 4 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมคลอไรด์ (%)		จำนวนวันหลังเติมโซเดียมคลอไรด์		
		7 วัน	14 วัน	21 วัน
2 เปอร์เซ็นต์	ยาสูบชุดควบคุม			
	ยาสูบที่มียีน DHSRNAi			
2.5 เปอร์เซ็นต์	ยาสูบชุดควบคุม			
	ยาสูบที่มียีน DHSRNAi			

ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยความสว่างสีใบและความสูงต้นยาสูบ

ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์	จำนวนวัน	ต้นยาสูบ	ค่าเฉลี่ย		
			ค่าความสว่างสีใบ (ΔE_{RGB})		ความสูงต้น (เซนติเมตร)
Ms+NaCl 2.0 เปอร์เซ็นต์	7	ชุดควบคุม	57.84a	*a	3.82a
		มียีน *DHSRNAi*	36.15a		5.02a
	14	ชุดควบคุม	66.97a	*b	4.78a
		มียีน *DHSRNAi*	53.00a		5.80a
	21	ชุดควบคุม	129.62a	*c	5.80a
		มียีน *DHSRNAi*	106.16a		4.20a

Ms+NaCl 2.5 เปอร์เซ็นต์	7	ชุดควบคุม	21.33a	*a	5.78a
		มียีน *DHSRNAi*	28.62a		4.36a
	14	ชุดควบคุม	64.90a	*b	4.38a
		มียีน *DHSRNAi*	53.36a		4.76a
	21	ชุดควบคุม	143.16a	*c	4.70a
		มียีน *DHSRNAi*	110.23a		6.10a
95% Confidence Interval			*		*
Std. Error			10.70		0.35

เมื่อต้นยาสูบชุดควบคุมและต้นที่มียีน *DHSRNAi* มีความทนทานต่อสภาวะเค็มและการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน แสดงว่าการทำงานของยีน *DHS* ในรูปแบบเวคเตอร์ RNAi เมื่อสร้าง dsRNA แล้วไม่สามารถยับยั้งการทำงานของ *DHS* ในยาสูบได้ เนื่องจากการทำงานของกระบวนกา ร RNAi เริ่มจาก DCLs หรือ dsRNA-specific endonuclease สามารถจดจำและ ตัด dsRNA ที่สร้างได้จาก *DHSRNAi* ออกเป็นสายสั้นๆ เรียกว่า small interference RNA (siRNA) มีความยาวประมาณ 21-25 คู่ จากนั้น AGO2 จะเข้ามาจับ siRNA ดังกล่าวเกิดเป็น ribonucleoprotein complex (RNP) และเหนี่ยวนำให้โปรตีนชนิดอื่นเข้ามารวมกันเพื่อสร้างเป็น RISC complex จะทำการแยก siRNA สายคู่ออกเป็นสายเดี่ยว โดยสายเดี่ยวที่เป็น antisense ของ siRNA จะมีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมาย จึงเป็นตัวกำหนดความจำเพาะ และการจดจำให้ RISC complex เข้าจับ และทำลายเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมายได้อย่างแม่นยำ ซึ่ง RISC ที่มี siRNA สายเดี่ยวรวมอยู่ด้วย (RISC complex) เข้าจับกับเอ็มอาร์เอ็นเอ เป้าหมายโดยอาศัยลำดับเบสคู่สมระหว่าง siRNA และเอ็มอาร์เอ็นเอเป้าหมาย จากนั้นเอ็มอาร์เอ็นเอจะถูกย่อยโดย slicer ใน RISC complex เป็นผลให้ไม่มีเอ็มอาร์เอ็นเอผ่านเข้าสู่กระบวนการแปลรหัสไปเป็นโปรตีน ทำให้ไม่มีการสร้างโปรตีนจากยีนนั้นเกิดขึ้น (Qu *et.al*, 2008) แต่ยีน *DHS* ที่ได้จากเบญจมาศมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมห่างจากยาสูบมากและมีลักษณะเป็นกลุ่มแยกออกมาจากพืชชนิดอื่นๆ นิวคลีโอไทด์มีจึงความแตกต่างกัน เมื่อถูกตัดเป็น siRNA เพียงแค่ 21-25 เบส จึงไม่ที่มีความคล้ายคลึง (homologue) กับ *DHS* ของ mRNA เป้าหมายในยาสูบ และจากข้อมูลการ blast ยีน *DHS* ที่ได้จากเบญจมาศกับฐานข้อมูลจะเห็นว่าตรงกับ *N. sylvestris* แต่การทดลองนี้ได้ใช้ต้นยาสูบ *N. tabacum* และไม่พบความเหมือนกับ *N. tabacum* แสดงว่ายีน *DHS* ที่ได้จากเบญจมาศมีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างจากยาสูบ *N. tabacum* มาก ดังนั้น dsRNA จาก *DHSRNAi* ของเบญจมาศจึงไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *DHS* ในยาสูบได้

9. สรุป

การถ่ายฝากเวคเตอร์ RNAi เพื่อยับยั้งการ เสื่อมสภาพและการแสดงออกของยีน *DHS* ในพืชต้นแบบ พบว่า การโคลนยีน*DHS* ในเบญจมาศ ไม่สามารถเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์แบบ degeneration P1F+P2R P1F+P3R ตามรายงานของ Ober และ Harmann (1999) แต่สามารถเพิ่มปริมาณได้ด้วยไพร์เมอร์ A2DHSF: 5'-ARG GNT AYG AYT TYA AYM AAG G-3' และ A4DHSR: 5'-AAR GCW ATR GTK GCA TCA CAR T-3' ได้ชิ้นส่วนยีนที่ได้มีความยาว 919 เบส สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 306 อะมิโน เมื่อนำไป blast กับฐานข้อมูล GenBank พบว่า มีความเหมือนกับ *Senecio vernalis* *Arabidopsis thaliana* และ *Nicotiana sylvestris* ที่ค่า identity 91 85 และ 82 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ลำดับกรดอะมิโนของยีน DHS มีความเหมือนกับ *Senecio vernalis Arabidopsis thaliana* และ *Nicotiana tabacum* 88 79 และ 78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การ นิวคลีโอไทด์ของ ยีน *DHS* จากเบญจมาศมาศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับฐานข้อมูล พบว่ายีน *DHS* แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ได้แก่ *Solanum* sp. *Nicotiana* sp. *Ricinus* sp. *Arabidopsis* sp. *Eupatorium* sp. *Lactuca* sp. กลุ่มที่ 2 ได้แก่ *Morus* sp. *S.Jacobaea Petasites* sp. *Echinacea* sp. *Senecio* sp. และกลุ่มที่ 3 ได้แก่ *Chrysanthemum* sp. ซึ่งเบญจมาศได้แยกออกจากกลุ่มอื่น (out group) อย่างชัดเจน แสดงว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของเบญจมาศมีความคล้ายคลึงกับพืชชนิดอื่นต่ำ การสร้าง dsRNA อาจส่งผลให้ไม่คล้ายคลึง (homologue) กับยีน *DHS* เป้าหมายในยาสูบได้

การสร้างเวคเตอร์ RNAi จากยีน *DHS* ความยาว 250 เบส และส่วนของ *Chr*Intron ความยาว 571 เบส จากเบญจมาศ ให้เป็นแบบ hpRNA ด้วยวิธีพีซีอาร์ สามารถเชื่อมต่อได้ชุดยีน *DHSRNAi* ความยาว 1071 เบส เมื่อต่อเข้ากับเวคเตอร์ pCAMBIA3304 ได้ชุดยีน *DHSRNAi* ที่มีส่วนประกอบเริ่มจากโปรโมเตอร์คือ 35s Promoter ต่อด้วย *DHS* senese *Chr*Intron *DHS* antisense และ nos terminator การถ่ายยีนเข้าสู่ใบยาสูบได้ต้นยาสูบที่ได้รับยีน *DHSRNAi* จำนวน 2 ต้น จึงนำไปเลี้ยงขยายแล้วทดสอบความทนต่อสภาวะเครียด (ความเค็ม) ของต้นยาสูบอายุ 3 สัปดาห์ บนอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 2.0 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ใบของยาสูบแสดงลักษณะซีดลงเริ่มจากโคนใบขึ้นไป และเริ่มแสดงอาการชัดเจนเมื่ออายุ 14 วัน การวัดค่าความสว่างสีมีการเพิ่มขึ้นในวันที่ 14 และ 21 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับค่าความสว่างสีในวันที่ 7 ซึ่งการเลี้ยงต้นยาสูบบนอาหาร MS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2 เปอร์เซ็นต์ ชุดควบคุมแสดงค่าเฉลี่ยความสว่างสีเมื่อ 7 14 และ 21 วัน ที่ 57.84 66.97 และ 129.62 ตามลำดับ ต้นยาสูบที่มียีน *DHSRNAi* แสดงค่าเฉลี่ยความสว่างสีที่ 36.15 53.00 และ 106.16 ตามลำดับ สำหรับต้นยาสูบบนอาหาร MS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ชุดควบคุมแสดงค่าเฉลี่ยความสว่างสีเมื่อ 7 14 และ 21 วัน ที่ 21.33 64.90 และ 143.16 ตามลำดับ ต้นยาสูบที่มียีน *DHSRNAi* แสดงค่าเฉลี่ยความสว่างสีที่ 28.62 53.36 และ 110.23 ตามลำดับ ทั้งนี้ค่าความสว่างสีในชุดควบคุมและมียีน *DHSRNAi* ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และค่าเฉลี่ยความสูงของต้นพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อต้นยาสูบชุดควบคุมและต้นที่มียีน *DHSRNAi* มีความทนทานต่อสภาวะเค็มและการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน แสดงว่าการทำงานของยีน *DHS* ในรูปแบบเวคเตอร์ RNAi เมื่อ

สร้าง dsRNA แล้วไม่สามารถยับยั้งก ารทำงานของ *DHS* ในยาสูบได้ ซึ่งยีน *DHS* ที่ได้จากเบญจมาศมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมห่างจากยาสูบมากและมีลักษณะเป็นกลุ่มแยกออกมาจากพืชชนิดอื่นๆ นิวคลีโอไทด์จึงมีความแตกต่างกันมาก เมื่อถูกตัดเป็น siRNA เพียงแค่ 21-25 เบส จึงไม่ที่มีความคล้ายคลึง (homologue) กับ *DHS* ของ mRNA เป้าหมาย ในยาสูบ ดังนั้น dsRNA จาก *DHSRNAi* ที่ได้จากเบญจมาศจึงไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *DHS* ในยาสูบได้ จึงควรนำไปศึกษาในเบญจมาศเท่านั้น

เอกสารอ้างอิง

นิตย์ ศกุนรักษ์. 2541. สรีรวิทยาของพืช. มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 218 หน้า

Abdallah, M., A. H. Fahmy, K. S. Abdalla and W. S. Maaty. 2004. Transformation of a High Molecular Weight (HMW) glutenin subunit Dy10 gene into maize. Arab J. Biotech. 7(2): 165-172.

Asano, M., Satoh, R., Mochizuki, A., Tsuda, S., Yamanaka,T., Nishiguchi, M., Hirai, K., Meshi, T., Naito, S. and Ishikawa, M. 2005. Tobamovirus-resistant tobacco generated by RNA interference directed against host genes. FEBS Letters 579(20): 4479-4484.

Duguay J, Jamal S, Liu Z, Wang TW, Thompson JE. (2006) Leaf-specific suppression of deoxyhypusine synthase in Arabidopsis thalina enhances growth without negative pleiotropic effects. Plant Physiol. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=Abstract&list_uids=16600425&query_hl=3&itool=pubmed_docsum

Dunoyer, P. 2006. Induction, suppression and requirement of RNA silencing pathways in virulent Agrobacterium tumefaciens infections. Nat Genet 38: 258–263.

Inoue, H., H. Nojima., and H. Okayama. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene. 96: 23-28.

Lukinac J., S. Jokie, M. Planinie, D. Magdic, M. Bilic, S. Tomas, D. Velie and A. Bucic-Kojic. 2009. An application of image analysis and colorimetric methods on color change of dehydrated asparagus (Asparagus maritimus L.). Agric. conspec. sci. Vol. 74 No. 3. pp. 233-237.

Mallory, A.C., Ely, L., Smith, T.H., Marathe, R., Anandalakshmi, R., Fagard, M., Vaucheret, H., Pruss, G., Bowman, L. and Vance, V.B. 2001. HC-Pro suppression of transgene

silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile silencing signal. Plant Cell 13:571-583.

Meins, F. Jr. 2000. RNA degradation and models for post-transcriptional gene silencing. Plant Mol Biol 43: 261-273.

Mlotshwa, S., Voinnet O., Mette M. F., Matzke M., Vaucheret H., Ding S.W., Pruss G. and B. Vicki Vance. 2002. RNA Silencing and the Mobile Silencing Signal. **The Plant Cell.** S289–S301.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15(3): 473-497.

Myung Hee Park, Young Ae Joe and Kee Ryeon Kang. (1998). Deoxyhypusine Synthase Activity Is Essential for Cell Viability in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The Journal of Biological Chemistry. 273: 1677-1683.

Ober, D. and T. Hartmann. 1999. Deoxyhypusine Synthase from Tobacco. The Journal of Biological Chemistry, Vol. 274, No.45. pp. 32040-32047**.**

Ogita, S., Uefuji, H., Yamaguchi, Y., Koizumi, N. and Sano, H. 2003.. Producing decaffeinated coffee plants. Nature 423: 823.

Qu F., Ye X., and T. J. Morris. 2008. Arabidopsis DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1**.** PNAS, vol. 105, no. 38. 14732–14737.

Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3th ed.

Tzann-Wei Wang, Chun-Guang Zhang, Wendy Wu, Linda M. Nowack, Ewa Madey, and John E.Thompson. (2005). Antisence Suppression of Deoxyhypusine Synthase in Tomato Delays Fruit Softening and Alters Growth and Development. Plant Physiology. 138: 1372-1382.

Tzann-Wei Wang, Lily Lu, Denis wang, and John E. Thompson. (2001). Isolation and Characterization of Senescence-induced cDNAs Encoding Deoxyhypusine Synthase and Eucaryotic Translation Initiation Factor 5A from Tomato. The Journal of Biological Chemistry. 276:17541-17549

Tzann-Wei wang, Wendy Wu, Chun-Guang Zhang, Linda M.Nowack, Zhongda Liu and John E. Thompson.(2005). Antisense suppression of deoxyhypusine synthase by vacuum-infiltration of *Agrobacterium* enhances growth and seed yield of canola**.** Physiologia Plantarum**.** Vol. 124 Page 493

Vol 1–3.

Wang, M.B., Wesley, S.V., Finnegan, E.J., Smith, N.A. and Waterhouse, P.M. 2001. Replicating satellite RNA induces sequence-specific DNA methylation and truncated transcripts in plants. RNA 7: 16-28.

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1 ภาพลักษณะดอกของพืชที่ใช้ฐานข้อมูลยีน *DHS* จาก GenBank มาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยการสร้าง Phylogenetic tree

การทดลองเรื่องที่ 5 การโคลนยีนเรืองแสงจากเห็ดเรืองแสง

Title : Cloning of luminescence gene from luminescence mushroom

นางสาวมัลลิกา แก้ววิเศษ สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน:

นางอัญชลี เชียงกูล สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

นายศรีเมฆ ชาวโพงพาง สังกัด มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บทคัดย่อ:

เห็ดเรืองแสงที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เก็บตัวอย่างได้จาก อ.สวนผึ้ง จ.ราชบุรี เมื่อนำมาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนจากไพร์เมอร์ที่ออกแบบจากยีน Lux และยีนที่ให้แสงโดยการทำพีซีอาร์ พบว่าไม่สามารถให้ชิ้นส่วนยีนเรืองแสงตามที่ออกแบบไว้ ได้เพียงชิ้นส่วนของโปรตีนที่ยังไม่สามารถจำแนกได้ คาดว่ายีนเรืองแสงของเห็ดเรืองแสงน่าจะเกิดจากการทำปฏิกิริยาของยีนหลายยีนด้วยกัน ดังนั้นการหายีนเรืองแสงเดี่ยวๆ จึงอาจมีความยุ่งยากในการที่จะสามารถหาได้

Abstract

Luminescent mushroom from this study was collected from Amphoe Suan Phueng, Ratchaburi province. PCR amflification was conducted by using Lux and light primer. The result showed that product from expected gene wasn't found. there was only some parts of protein. It should be luminescent gene was happened from reaction of many genes. Therefore, it was difficult to find single luminescent gene.

6. คำนำ :

ปัจจุบันมีการนำยีนเรืองแสงมาทำเป็นโมเลกุลเครื่องหมายในการติดตามการถ่ายยีน เช่น ยีน GPF ที่ได้จากแมงกระพรุน นอกจากนี้ยังมีสารเรืองแสงบางอย่างที่นำมาศึกษา เช่น แบคทีเรียVibrio cambelli

เห็ดเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะใกล้เคียงกับพืช ดังนั้นการสกัดยีนจากเห็ด จึงเป็นยีนที่น่าจะปลอดภัยต่อสิ่งมีชีวิตมากกว่ายีนที่สกัดได้จากเชื้อแบคทีเรีย เมื่อได้ยีนเรืองแสงจากเห็ดแล้ว มีความเป็นไปได้ว่าจะมีการนำยีนนี้มาใช้ประโยชน์ในทางการเกษตรและการแพทย์ต่อไป ประการสำคัญถ้ายีนนี้สามารถผลิตได้เองในประเทศไทยจะลดค่าใช้ถ่ายในการซื้อยีนเครื่องหมายที่เรืองแสงเพื่อที่จะนำมาใช้งานในด้านชีวโมเลกุล ในประเทศไทยมีการศึกษาเรื่องเห็ดเรืองแสงกันน้อยมาก เนื่องจากเป็นเห็ดที่ไม่

สามารถนำมากินได้และหายาก มีรายงานการนำสารพิษจากเห็ดเรืองแสงมาใช้ควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมในมะเขือเทศ (สุรีย์พร และวีระศักดิ์, 2552) ในทางการแพทย์พบว่ามีสาร illudine S และ illudine M ที่เป็นสารต่อต้านการเกิดมะเร็ง (Van, 2006)

วิธีดำเนินการ :

-อุปกรณ์

-ตู้ควบคุมระดับความเย็นที่ 4, –20 และ -80 องศาเซลเซียส

- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ
- เครื่อง electrophoresis
- เครื่อง centrifuge
- vortex mixer
- water bath
- หม้อนึ่งความดัน
- ไมโครปิเปต ขนาด 2 Ul, 20 ul, 200 ul และ 1000 ul
- เครื่อง incubate shaker
- ตู้ laminar flow
- เครื่องกวนสาร
-. ตู้ไมโครเวฟ
- เครื่อง spectrophotometer
- เครื่องชั่งชนิดละเอียด
- ตู้อบ

วิธีการ

1. เก็บตัวอย่างเห็ดเรืองแสงจากแหล่งต่างๆ
2. เพิ่มปริมาณเส้นใยเส้นใยเห็ดโดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA
3 . ทำการสกัดโปรตีนจากเห็ดเรืองแสง โดยใช้ Extract-EZ N Plant Protein Extraction Kit
4. ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเห็ดเรืองแสง CTAB, DNeasy Plant Mini kit ของ QIAGEN ®
5. ออกแบบไพร์เมอร์จากยีนเรืองแสง ทำการออกแบบจาก

ยีน LUX 13 คู่ ดังนี้

สายที่	Primer	ลำดับเบส
1	MK_L1 F	5’ATCCATTAGT CTGGTCTT 3’
2	MK_L1 R	5’AAAGTATG GCGAACCAAT3’
3	MK_L2 F	5’GCTTGTTCTT CCTTAACT3’
4	MK_L2 R	5’AACTTCATTG GAATCATC3’
5	MK_L3 F	5’ATGAAACGGT TGGTTAAA3’
6	MK_L3 R	5’CTCGTTATAA AGCTCAAT3’
7	MK_L4 F	5’TCTGGGAGAC GCTGCCAA3’
8	MK_L4 R	5’CGTTCATT GACTGCCGCA3’
9	MK_L5 F	5’GCCAACTGGA TATCTATG3’
10	MK_L5 R	5’GCTGCGGA TACTAAATCA3’
11	MK_L6 F	5’ACATTAACAG TAAGCAAT3’
12	MK_L6 R	5’ATTGGCTT GACAATATTC3’
13	MK_L7 F	5’GTAATTAACA CATTGCAG3’
14	MK_L7 R	5’ACATAGAG ATCGTAATCA3’
15	MK_L8 F	5’ATCATTTGAT TACGCAGG3’
16	MK_L8 R	5’ATTAGCCAGA CAATATTC3’
17	MK_L9 F	5’TGTATTACCC GTCAGTTC3’
18	MK_L9 R	5’ATGGAACA TATAGGTCAT3’
19	MK_L10 F	5’ATGACTAGAG AAACTCC3’
20	MK_L10 F	5’GGAAAACG ATTTCCCATT 3’
21	MK_L11 F	5’GTTAACACAT ATGTGGGA3’
22	MK_L11 R	5’GTCCTATA GATTGAAAGT3’
23	MK_L12 F	5’AGTTCATTCT CATGTGGG3’
24	MK_L12 R	5’ATCGGCTA ATTCTATATG3’
25	MK_L13 F	5’CACTGTTGAT CATACTCG3’
26	MK_L13 R	5’ACACGAAC ATCCGAACTA3’

แล้วทำพีซีอาร์ทดสอบไพร์เมอร์

6. ออกแบบไพร์เมอร์เพิ่มเติม จาก light gene ของเห็ดชนิดต่างๆที่มีข้อมูลอยู่

UCKL F	ATTGTCTGATGCTCTCCATCTTCACTCC
UCKL R	GCGGTAGAGCCAGAAAGAAGTTTAGC
WC1	GGNMGNAAYTGYMGNTTYYTICA
WC2	TCNCKNGTRAANACNGGNACRTCRTCNGGRTG
Le F	AGGGAGTATAAGCTTGTCGTTGTCG
Le R	TCACAACACAACACAACCACCACAAC
Le cry F	GCCTCCAATACCACCCAAAGT
Le cry R	GGTGGTCCGAGTCCACAATC
phrA F	TTGTCTGTTCTGGCCCGAGTA
phrA R	TCGTAGGGCCGAACGTCTAT

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. เก็บตัวอย่างเห็ดเรืองแสง จากแหล่งต่างๆ โดยไปทำการเก็บตัวอย่างที่

1. อ. สวนผึ้ง จ. ราชบุรี 4-5 กรกฎาคม 2554 29 สิงหาคม 2555 16 ตุลาคม 2555
2. จ. จันทบุรี 15 มิถุนายน 2554
3. อ่าวคุ้งกระเบน จ. จันทบุรี 23 สิงหาคม 2554
4. สถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช จ. นครราชสีมา 24 สิงหาคม 2554

พบว่าตัวอย่างเห็ดเรืองแสงจะสามารถเก็บดอกได้ในช่วงหน้าฝน โดยเห็ดจะขึ้นตามกอไผ่ และต้นไม้ใหญ่ในป่า ในบางสถานที่ก็ไม่พบเห็ดเรืองแสง เช่น จ. จันทบุรี จ. นครราชสีมา เนื่องจากไปในช่วงที่เห็ดยังไม่ได้ออกดอก ใน จ. นครราชสีมา พบเชื้อราเรืองแสงในป่า ซึ่งคาดว่าน่าจะอีก 1-2 อาทิตย์เชื้อราเรืองแสงเหล่านี้ถึงจะเจริญเป็นเห็ดเรืองแสงต่อไป

2. การเพิ่มปริมาณเส้นใยเห็ดในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA พบว่าเส้นใยเห็ดสามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ โดยเส้นใยที่ได้จะมีสีขาว

3. การสกัดโปรตีนจากเห็ดเรืองแสง โดยใช้ Extract-EZ N Plant Protein Extraction Kit จากผลที่ได้เมื่อทำการ Gel electrophoresis ไม่สามารถแยกความแตกต่างของแถบระหว่างเห็ดเรืองแสงกับเห็ดไม่เรืองแสงได้

4. การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธี CTAB, DNeasy Plant Mini kit ของ QIAGEN ® พบว่าสามารถสกัดดีเอ็นเอของเห็ดเรืองแสงได้

5. ทำการทดสอบไพร์เมอร์จากยีนเรืองแสง ยีน LUX 13 คู่ โดยการทำพีซีอาร์ จากการทดสอบไพร์เมอร์ทั้ง 13 คู่ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณแถบดีเอ็นเอได้บางคู่เท่านั้น เช่น L1, L3, L4, L10

ทำผลผลิตของพีซีอาร์ให้บริสุทธิ์โดย Wizard ®SV Gel and PCR clean-up System (Promega) แล้วส่งผลผลิตพีซีอาร์ไปหาลำดับเบส เมื่อนำลำดับเบสไปเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโน แล้วเทียบข้อมูลใน GenBank จะได้ข้อมูลดังนี้

L1 เทียบแล้วเป็น hypothetical protein 39%

L3 เทียบแล้วเป็น Lacctoccus 57%

L4 เทียบแล้วเป็น hypothetical protein 78%

L10 เทียบแล้วเป็น 5-methylthioadenosine nucleosidase 48% plastid transported acetyl-CoA 45%

6. ทำการทดสอบไพร์เมอร์จากยีนเรืองแสง โดยการทำพีซีอาร์ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณยีนที่ต้องการได้เพียงบางไพร์เมอร์เท่านั้น

ยีนเรืองแสงของเห็ดเรืองแสงน่าจะเกิดจากการทำปฏิกิริยาของยีนหลายยีนด้วยกัน ดังนั้นการหายีนเรืองแสงเดี่ยวๆ จึงอาจมีความยุ่งยากในการที่จะสามารถหาได้ ในงานวิจัยเกี่ยวกับยีนเรืองแสงที่ผ่านมา มีการหายีนเรืองแสงจากหิ่งห้อยซึ่งมียีน Luciferase ซึ่งต้องการพลังงาน ATP luciferin และออกซิเจนเป็นตัวตั้งต้นในการผลิต luciferase

กระบวนการที่ทำให้เกิดแสงในเห็ดเป็นกระบวนการที่ซับซ้อนที่มีสารเคมีหลายชนิดมาเกี่ยวข้อง ดังนั้นจึงเป็นไปได้ยากในการที่จะแยกยีนเรืองแสงออกมาเดี่ยวๆ ในญี่ปุ่นมีการหาสาร lampteroflavin ซึ่งแยกได้จากเห็ดเรืองแสง Lampteromyces japonica (Takahashi et al., 1991) ในการเกิดแสงของสิ่งมีชีวิตต้องการสารตั้งต้นคือ เอนไซม์ luciferase ที่ catalyze oxidation ของ luciferin ออกซิเจนก็เป็นส่วนหนึ่งที่ต้องการในการออกซิเดชั่น luciferin จะถูกออกซิไดซ์เป็น oxyluciferin ในช่วงขั้น excite แล้วจะผลิต fluorescence molecule ซึ่งทำให้เกิดแสง (Uyakul et al., 1990) ซึ่งเห็ดดังกล่าวเป็นเห็ดพื้นเมืองของญี่ปุ่นที่มีการศึกษากันมาก แต่ยังไม่มีรายงานการพบเห็ดชนิดนี้ในประเทศไทย

กระบวนการที่ทำให้เกิดแสงในเห็ดเรืองแสงยังไม่ชัดเจน การที่จะแยก luciferin จากเห็ดอาจจะเป็นไปได้ถ้ามีการควบคุม pH ของ buffer ผลของอุณหภูมิจะชักนำให้เกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ (Mori et al., 2011)

เนื่องจากกระบวนการแยกสารเรืองแสงของเห็ดเรืองแสงมีความยุ่งยากซับซ้อน จึงทำให้การแยกสารในการทดลองครั้งนี้ไม่สำเร็จ อีกทั้งยีนเรืองแสงน่าจะมีความเฉพาะเจาะจงกับเห็ดแต่ละชนิดค่อนข้างมาก จึงไม่สามารถได้ผลผลิตยีนตามที่ต้องการได้

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถโคลนยีนเรืองแสงได้ ได้เพียงบางส่วนของโปรตีนที่ยังไม่สามารถจำแนกได้เท่านั้น เนื่องจากยีนเรืองแสงของเห็ดเรืองแสงน่าจะเกิดจากการทำปฏิกิริยาของยีนหลายยีนด้วยกัน ดังนั้นการหายีนเรืองแสงเดี่ยวๆ จึงอาจมีความยุ่งยากในการที่จะสามารถหาได้

เอกสารอ้างอิง

สุรีย์พร บัวอาจและวีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์. 2552. การใช้ประโยชน์จากเห็ดเรืองแสง. ข่าวสาร

เทคโนโลยีชีวภาพ หน้า 14-15.

Desjardin, D.E., B. A. Perry, D. J. Logde, C. V. Stevani and E. Nagasawa. 2010. Luminescent Mycena : new and noteworthy species. Mycoologia 102: 459-477.

Takahashi, H., M. Isobe and T. Goto. 1991 Chemical synthesis of lampteroflavin as emitter. Terahedron: (47) 6215-6222.

Uyakul, D., M. Isobe and T. Goto, 1990. Lampteroflavin, the first riboflavinyl alpha ribofuranoside as light emitter in the luminous mushroom, L. japonicas. Terahedron: (66) 1367-1378.

Hayashi, S., R. Fukushima and N. Wada. 2012. Extraction and purification of a luminiferous substance from the luminous mushroom *Mycena chlorophos*. Biophysic 111-114.

Mori, K., S. Kojima, S. Maki, T. Hirano and H. Niwa. 2011. Bioluminesecence characteristics of the fruiting body of Mycena chlorophos. Luminescence

ชื่อการทดลองที่ 6 การศึกษาและค้นหายีนที่ตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NSW3) โดยอาศัยเทคนิค PCR

Title : Genes Discovery expressed in response to drought stress in the drought tolerant Maize (NSW3 variety) by PCR technique.

หัวหน้าการทดลอง : นายพยุงศักดิ์ รวยอารี : สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน : นายสุริพัฒน์ ไทยเทศ ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์

บทคัดย่อ

นำวิธีการ PCR ที่อิงไพรเมอร์ควบคุมการเชื่อมต่อสาย (Annealing Control-Primers-based Gene Fishing Technique) มาใช้ในการระบุยีนที่แสดงออกจากใบข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 ในสภาวะขาดน้ำนาน 7 วัน (treated) จากการใช้ 20 ไพรเมอร์ควบคุมกับ cDNA ใบข้าวโพดขาดน้ำเป็นเทมเพลทในปฏิกิริยา PCR เทียบกับ cDNA จากใบข้าวโพดให้น้ำปกติ (untreated) แอมพลิคอนยีนที่ปรากฏจะถูกนำมาสกัดแยกดีเอ็นเอ โคลนนิ่ง หาลำดับเบสเปรียบเทียบลำดับเบสและหาหน้าที่ของยีน (putative

gene functions) เทียบกับฐานข้อมูลชีวภาพสากล ข้อมูลเบื้องต้นโดยใช้ cDNA ควบคุม (control cDNA) ในการทำปฏิกิริยา PCR ผลการทดลองให้ผลบวก ส่ วนปฏิกิริยา PCR ที่ใช้อาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 ในสภาวะขาดน้ำนาน 7 วัน เป็นเทมเพลท โดยใช้ไพรเมอร์ควบคุม พบการเชื่อมต่อสายกับไพรเมอร์สองเส้นที่แสดงออก (up-regulated) ได้แก่ ACP2 และ ACP12 ข้อมูลที่ได้ในเบื้องต้นอาจนำมาสู่การศึกษาหน้าที่ของยีน หรือ ความเข้าใจมากขึ้นเกี่ยวกับการตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำในพืช และนำไปสู่การพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์พืชทนแล้งต่อไป

Abstract

In the present study, we have used an annealing control primer (ACP) based reverse transcription polymerase chain reaction (Annealing Control-Primers-based Gene Fishing Technique) to identify drought-stress-induced differentially expressed genes in 19 days maize leaves after seedling. The total RNA was extracted from maize leaves at 7 days after water depletion. Using 12 ACP-based RT PCR screening method, two up-regulated ACPs were identified which were ACP2 and ACP12. DEG screening was performed by GeneFishing method. The identified up-regulated ACPs were then isolated, cloned and sequenced for their putative gene functions. The results of these two ACPs, ACP2 and ACP12 are hypothethical proteins. The information might be helpful for better understanding of drought stress mechanism in maize to further gaining information about the plant genetic improvement for drought tolerance in plant.

บทนำ

PCR (Polymerase Chain Reaction) เป็นปฏิกิริยาเอนไซม์ที่อาศัยหลักการที่ง่าย ทำนายผลง่ายและรวดเร็ว ใช้ปริมาณดีเอ็นเอน้อย การศึกษาที่ผ่านมา สามารถนำวิธีการนี้มาใช้ในการค้นหาที่เกี่ยวข้องกับสภาวะทนแล้งที่ส่งผลต่อผลผลิตได้ เช่น ยีน DREB (Garg, et al., 2008) พืชมีการปรับตัวทางสรีระวิทยาให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมต่างๆที่ไม่เหมาะสม เพื่อให้ตัวมันเองมีความอยู่รอดในสภาวะแวดล้อมนั้นๆ เช่น ในสภาพเซลล์ขาดน้ำหรือแห้งแล้ง เป็นต้น การปรับตัวของพืชให้มีการพัฒนาหรือให้เป็นไปตามปกติหรือคงทนอยู่ในสภาวะแวดล้อมดังกล่าวนั้น ต้องมีการแสดงออกของยีนบางชนิด ซึ่งอาจเป็นยีนเดียวหรือกลุ่มยีนส์ (ยีนหลายๆ ชนิด แสดงออกเพื่อตอบสนองพร้อมกันในสภาวะเดียวกัน) ยีนที่ตอบสนอง เช่น ดีไฮดรินส์ , LEA (late embryogeneis abundant protein group II) (Ingram and Bartels, 1996) , ไซโคลฟิลิต (Gasser et al., 1990) Dedydration responsive element binding

(DREB) (Skinner et al., 2005; Latini et al, 2007) เป็นต้น จึงจะทำให้พืชมีการดำรงอยู่ในสภาวะนั้นๆ ได้หรือเกิดความเสียหายน้อยที่สุด ที่ผ่านมานักวิจัยได้ศึกษาหน้าที่ของยีนที่ เกี่ยวข้องกับการแสดงออกในพืช เพื่อให้พืชเกิดการปรับตัวให้คงทนอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี

ในปัจจุบัน ข้อมูลยีนหรือกลุ่มยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกในสภาวะขาดน้ำหรือแห้งแล้งที่ได้จากค้นคว้าวิจัยมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำให้การนำข้อมูลที่ ได้มาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะทนแล้งโดยอาศัยวิธีการเทคโนโลยีชีวภาพนั้นมีความเป็นไปได้มากขึ้น อีกทั้งจากการศึกษาที่ผ่านมา มีข้อมูลที่แสดงให้เห็นชัดแล้วว่า อุณหภูมิของโลกมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกๆ ปี และพบว่าพืชมีการแสดงออกของยีนที่จำเพาะบางชนิด เพื่อที่จะตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่นขาดน้ำหรือแห้งแล้งได้ งานวิจัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์นำเทคนิค PCR มาใช้ในการค้นหาการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำในข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์ลูกผสมนครสวรรค์ 3 (ชื่อเดิมว่า NSX 042029) เป็นพันธุ์ลูกผสมเดี่ยว เกิดจากการผสมข้ามระหว่างพันธุ์แท้ตากฟ้า 1 (พันธุ์แม่) และพันธุ์แท้ตากฟ้า 3 (พันธุ์พ่อ) ซึ่งศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ ได้ทำการศึกษาระหว่างปี 2547-2551 มีลักษณะทนต่อความแล้งและให้ปริมาณสูงถึง 1,147 กิโลกรัมต่อไร่ (http://www.food-resources.org/news/view.php?id=2646) โดยกรมวิชาการได้คาดการณ์ไว้ว่า จะสามารถผลิตเมล็ดข้าวโพดได้ 350 ตัน นำไปส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกได้ 10,000 ไร่

ในประเทศไทย ข้าวโพดนับเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งที่ทำ รายได้ให้กับประเทศเป็นอย่างมากและพบข้าวโพดพันธุ์ทนแล้งในประเทศอีกด้วย นับเป็นฐานพันธุกรรมในเชิงวิจัยได้เป็นอย่างดี รวมทั้งข้าวโพดเป็นพืชที่มีประโยชน์ทั้งด้านบริโภคและด้านงานวิจัย ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการค้นหายีนหรือกลุ่มยีนส์ที่ได้มีการศึกษาค้นคว้ามาแล้วในพืชชนิดต่างๆ แล้วนำยีนนั้นๆ มาศึกษากับข้าวโพดพันธุ์ทนแล้งในประเทศไทยว่าข้อมูลที่ได้มีความสอดคล้องหรือแตกต่างกันหรือไม่ เพื่อนำข้อมูลที่ได้นั้นมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีคุณลักษณะทนแล้งได้ต่อไปในอนาคต ทำให้งานวิจัยนี้สามารถให้ข้อมูลในรูปยีนที่เป็นประโยชน์ทางการเกษตรของประเทศไทยได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์ลูกผสมนครสวรรค์ 3 (ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์, กรมวิชาการเกษตร)
2. ถุงพลาสติกสีดำขนาด 10" x 10" x 10" (กว้าง x ยาว x ลึก)
3. ดินและปุ๋ยตราลำดวน
4. ไนโตรเจนเหลวและโกร่งสำหรับใช้บดใบข้าวโพดตัวอย่าง

5. ชุดสกัด RNA (Trizol® Reagent, Invitrogen, USA) และ ชุดสกัดอาร์เอ็นเอรวม Plant RNeasy mini kit (Qiagen, CA, USA)

6. เอ็นไซม์ Reverse transcriptase (Promega, Madison, USA)

7. TOPO TA cloning kit (Life Technology, Calsbad, CA, USA)

8. GENECLENEII kit (Q. BIOgene, USA)

9. 100bp DNA ladder (ThermoFisher SCIENTIFIC, USA)

10. ชุดสกัดสารพันธุกรรมจากอะกาโลสเจล (GeneJet Gel Extraction Kit, ThermoFisher SCIENTIFIC, USA)

11. เครื่องเหวี่ยงความเร็วสูง (Labnet/Spectrafuge16M, National, USA)

12. เครื่องดูดสารปริมาณน้อย (ไมโครไปเปต) ขนาด 10, 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร

13. อ่างน้ำปรับอุณหภูมิอัตโนมัติ 65°C

14. ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ 4°C (LAWCHAIN LC203LD ยี่ห้อ CHILLED รุ่น PT-30 Series)

15. ตู้แช่แข็ง -20°C (Thermo Scientific Puffer Hubbard, Austria)

16. ตู้แช่แข็ง -80°C (SANYO ULTRA LOW FREEZER, SANY0, USA)

17. 10x TAE Buffer (Promega, USA)

18. GelStar Solution (Lonza, Rockland, ME, USA)

19. เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA (Gene Amp PCR system 9700, Applied Biosystems, Foster, CA, USA)

20.สารละลาย GTE (4M Guanidine Isothiocyanate, 25 mM NaCitrate pH 7.0, 0.5% Lauryl Sarcosine และ 0.1 M Beta-Mercaptoethanol)

21. เครื่องแยกสารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้าแนวนอนพร้อมเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าในตัว (Toyobo, GelMate 2000, Japan)

22. เครื่องส่องดูแถบสารพันธุกรรมภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต (UV) GelDoc Transluminator (BIORAD, USA)

23. ชุดถ่ายภาพพร้อมเครื่องมือวิเคราะห์สารพันธุกรรม (GELDOC BIORAD, USA)

24. PCR GeneFishing DEG Kit (Soul, South Korea) cat. No. K1021 (GeneFishing™ DEG Kit, Seegene, Soul, South Korea)

25. ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (Plasmid DNA) (QIAprep spin miniprep kit, Qiagen, Valencia, USA)

26. เครื่องหาลำดับเบสแบบอัตโนมัติ ABI PRISM® 377 DNA Sequencer (Perkin-Elmer, CA, USA)

27. DNAStar Software Analysis (DNASTAR, Inc, USA)

28. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

29. ช้อนตักสาร กระดาษชั่งสาร และเครื่องชั่งสาร

- วิธีการ

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมพืชทดลอง การงดให้น้ำ และการเก็บพืชตัวอย่าง

เพาะเมล็ดข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์นครสวรรค์ 3 ในถุงพลาสติกดำขนาด 10x10x10 นิ้ว ที่ใส่ดินและปุ๋ย ในช่วงเดือนกันยายนถึงตุลาคม พ .ศ. 2556 ให้น้ำทุกวันเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนงดให้น้ำเป็นเวลา 7 วัน (treated) จึงตัดใบ ส่วน control plant ให้น้ำต่อไปปกติ (untreated) เก็บใบพืชที่อุณหภูมิ -80°C จนกว่าจะนำมาใช้สกัดสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอรวม (Total RNA)

ขั้นตอนที่ 2 การสกัดสารพันธุกรรม Total RNA จากใบข้าวโพดตัวอย่าง

2.1 ตัดใบข้าวโพดตัวอย่างจากตู้แช่เย็นอุณหภูมิ -80°C สกัดอาร์เอ็นเอด้วยสาร TRIzol® Reagent และ/หรือด้วยการใช้ชุดสกัด Plant RNeasy mini kit (Qiagen, CA, USA)

2.2 สำหรับการสกัดด้วยการใช้ TRIzol® Reagent ชั่งน้ำหนักใบพืชตัวอย่างละประมาณ 100 มิลลิกรัมและเติมสาร TRIzol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บดตัวอย่างใบให้ละเอียดโดยการใช้โกร่งและในสภาพไนโตรเจนเหลว ตักตัวอย่าง ที่บดละเอียดแล้วลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หรือในหลอดโพลิโพรพิลีนขนาด 15 มิลลิลิตร (Greiner Bio-one Inc, USA) ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนปริมาตรการสกัด ส่วนการสกัดด้วยวิธีการใช้ชุดสกัด ทำตามคำแนะนำที่ระบุไว้ในคู่มือผู้ผลิต

2.3 บ่มสารละลายที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที

2.4 เติมสารละลายคลอโรฟอร์ม 200 มิลลิลิตร (สำหรับหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร) เขย่าหลอดให้ทั่วนาน 15 วินาที และบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ถึง 3 นาที

2.5 ปั่นหลอดที่อุณหภูมิ 4°C ที่ความเร็ว 12,000 g นาน 15 นาที ดูดสารละลายใส (supernatant) ลงในหลอดใหม่ และเหวี่ยงหลอดด้วยความเร็วสูงซ้ำอีกครั้งนาน 5 นาที ที่ 10,000 rpm ดูดสารละลายใสลงในหลอดใหม่

2.6 ตกตะกอน RNA ด้วยการเติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 100 ไมโครลิตร (สำหรับหลอดขนาดเล็ก)
และ 1 มิลลิลิตร (สำหรับหลอดขนาดใหญ่) ผสมให้เข้ากัน เหวี่ยงหลอดด้วยความเร็วสูงนาน 15 นาที ที่ความเร็ว 5,000 g ใช้ไปเปตดูดสารละลายใสทิ้งไป ล้าง RNA ที่ได้ด้วย 70% เอทานอล จากนั้นดูดเอทานอลทิ้งปั่นเหวี่ยงหลอดซ้ำอีกครั้ง ดูดเอทานอลที่เหลือออกซ้ำอีกครั้งด้วยไปเปต

2.7 เติมบัฟเฟอร์ GTE ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ละลาย RNA ให้เข้ากัน เก็บรักษาในระยะสั้น RNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C (และเก็บที่ -80°C ในระยะยาว)

2.8 วิเคราะห์ RNA ที่สกัดได้โดยนำมาแยกผ่านเครื่องวิเคราะห์สารพันธุกรรมด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel electrophoresis) ขนาด 80 โวลต์ นาน 30 – 45 นาที โดยใช้ 2 เปอร์เซ็นต์ Agarose Gel เป็นตัวกลาง จากนั้ นนำ Agarose Gel มาย้อมด้วยสาร GelStar นาน 10 ถึง 15 นาที ล้างเจลด้วยน้ำ

กลั่นนานประมาณ 5 นาที และบันทึกภาพด้วยเครื่องส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง Ultraviolet (GelDoc transluminator) วัดปริมาณและคุณภาพของปริมาณ RNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) เก็บรักษา RNA ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -80°C

ขั้นตอนที่ 3 การสังเคราะห์ cDNA สายแรก (First-Strand cDNA synthesis) โดยเอ็นไซม์ Reverse transcriptase (Promega, Madison, USA)

ในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

3.1 อาร์เอ็นเอที่สกัดไว้ความเข้มข้นประมาณ 3 ไมโครกรัม	x	ไมโครลิตร
3.2 5x reaction buffer	4	ไมโครลิตร
3.3 dNTPs (2Mm แต่ละชนิด)	5	ไมโครลิตร
3.4 dT-ACP1 (10μM)	2	ไมโครลิตร
3.5 Rnase inhibitor (40U/μl)	0.5	ไมโครลิตร
3.6 Moloney murine leukemia - virus reverse transtriptase (200U/ μl)	1	ไมโครลิตร
3.7 เติมน้ำ (dH_20) ลงในปฏิกิริยาข้างต้น	x - 8	ไมโครลิตร
3.8 ปริมาตร	20	ไมโครลิตร

3.9 ดำเนินปฏิกิริยาที่ อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 1.5 ชั่วโมง

3.10 เติมน้ำ (dH_20) ลงในปฏิกิริยาข้างต้นอีก	80	ไมโครลิตร

ขั้นตอนที่ 4 การเตรียมปฏิกิริยา PCR สำหรับ ACP-based Gene Fishing PCR (Second-Strand cDNA Synthesis and Cloning), การโคลนแอมพลิคอนยีนที่ปรากฏเข้าสู่เวคเตอร์ TOPO cloning vector, และการหาลำดับเบส

1. เตรียมปฏิกิริยา PCR สำหรับ ACP-based PCR ตามที่ได้อธิบายไว้ใน Kim และคณะ (2004)
2. 2x seeAmp ACP™ mastermix
3. Reverse transcriptase
4. 2 mM dNTP RNase inhibitor
5. RNase-free water
6. PCR Thermocyclers
7. สังเคราะห์ cDNA สายสอง สำหรับใช้ในปฏิกิริยาในปฏิกิริยา PCR ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม โดยนำcDNA สายแรกในขั้นตอนที่ 3 มาใช้ (ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม โดยประมาณ) ปริมาตร 3-5 ไมโครลิตร และปรับสภาวะ PCR ให้เหมาะสม ตามที่ได้อธิบายไว้ใน Kim และคณะ (2004)
8. แยกแถบที่ปรากฏบน 2% อะกาโลสเจล
9. ย้อมด้วย GelStar และตัดแถบ PCR -DEG ที่ปรากฏ
10. แถบดีเอ็นเอจากอะกาโลสเจล (Gel / PCR DNA Fragments Extraction Kit, Geneaid, Taiwan)
11. นำแถบดีเอ็นเอโคลนเข้าสู่ TOPO TA cloning vector (Invitrogen, Calsbad, CA, USA)

ตามคำแนะนำจากคู่มือผู้ผลิต

12. หาลำดับเบสจากพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยการใช้ M13 ไพรเมอร์ โดยใช้เครื่องหาลำดับเบส (ABI PRISM® 377 DNA Sequencer)
13. เปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับฐานข้อมูลชีวภาพสากล

ผลการทดลองและวิจารณ์

รูปที่ 1 แสดงภาพโดยสรุป (overview) ของเทคนิค PCR-DEG เพื่อที่จะระบุยีนที่แสดงออกหรือตอบสนองในสภาวะขาดน้ำ ในการทดลองนี้ได้นำวิธีการ ACP-based Gene Fishing Technique มาใช้ร่วมกับไพรเมอร์ ACP จำนวน 12 คู่ (Seegene, South Korea) ที่อยู่ในชุดคิท (รูปที่ 2) โดยเทคนิคนี้ ได้ประยุกต์เทคนิคระบบ Annealing control primer system มาใช้ในการค้นหาการแสดงแสดงของยีนที่แตกต่าง (Kim et al., 2004) รูปที่ 3 แสดงอาร์เอ็นเอ

รวม (total RNA) ที่นำมาใช้ในปฏิกิริยาควบคุม และใช้อาร์เอ็นเอจากตับหนูและไตหนูเป็นตัวอย่างควบคุม

ภายหลังทดสอบปฏิกิริยาควบคุมแล้ว จากการสังเคราะห์ cDNA สายแรก โดยใช้ oligo$(dT)_{15}$ ACP เป็นไพรเมอร์ และใช้ RNA ตัวอย่างจริงเป็นเทมเพลท ทำให้แต่ละตัวอย่าง RNA สังเคราะห์เป็น cDNA สายแรกได้ และนำ cDNA สายแรกที่ได้ มาใช้เป็นเทมเพลทในการสังเคราะห์ cDNA สายสอง จากการใช้ arbitrary ACP primers และสามารถตรวจหา (detect) การแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันได้ (differentially expressed genes) พบว่า ACP จำนวน 2 คู่ ให้ผลแถบดีเอ็นเอที่แสดงของยีนที่ แตกต่างกันชัดเจนที่สุด (up-regulated) ได้แก่ ACP2 และ ACP12 โดยในตัวอย่าง RNA จากใบข้าวโพดที่อยู่ในสภาวะขาดน้ำแสดงแถบพีซีอาร์เข้ม (รูปที่ 1) เมื่อเทียบกับตัวอย่าง RNA จากข้าวโพดที่ให้น้ำปกติ

เพื่อทดสอบการแสดงออกของยีนว่ามีการ up-regulated หรือ down-regulated การทดลองเกี่ยวกับการวิเคราะห์ northern blot และ/หรือ real time PCR สามารถนำมาใช้ต่อยอดในการยืนยันการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับสภาวะขาดน้ำต่อไปได้ ส่วนการทดลองแบบ large scale หรือการค้นหายีนจำนวนมากในสภาวะที่กำหนด สามารถนำเทคนิคดีเอ็นเอไมโครแอเรย์ ห รือดีเอ็นเอชิพ (Shalon, 2008) มาใช้ทดสอบการทดสอบการแสดงออกของยีนในสองสภาวะ เพื่อหาการปรากฏของยีนได้พร้อมกันในเวลาเดียวกัน

เพื่อที่จะทำการศึกษาในเบื้องต้นต่อการปรากฏของยีนที่ตอบสนองในสภาวะขาดน้ำกับข้าวโพดเลี้ยงสัตว์พันธุ์ลูกผสมนครสวรรค์ 3 การทดลองนี้ได้ทำการเลือกยีนที่ได้แสดงออกในสภาวะขาดน้ำในพืชชนิดต่างๆ ที่ได้เคยมีการศึกษามาแล้ว โดยนำวิธีการพีซีอาร์มาใช้ ได้แก่ ยีน Extensin, Dehydrin, Dreb1, Dr4, Dhn1, SAD2, ARBE และ lea2 ผลการทดลองสังเกตพบแอมพลิคอนยีนปรากฏจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ยกเว้นยีน ARBE, lea2 และ sad2 ดังรูปที่ 4 ทำการยืนยันยีนที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยวิธีการหาลำดับเบส พบมีความเหมือนกับชนิดยีนที่ต้องการ

ยีน Dreb ประกอบด้วย 2 subfamilies ได้แก่ Dreb1 และ Dreb2 และจัดเป็น homologous ยีน และเกิดการการแสดงอย่างสูง (induction) ในสภาวะเค็มจัด, เย็นจัด และขาดน้ำ อย่างไรก็ตาม ผลที่เกิดขึ้นอาจเนื่องมาจากความซับซ้อนของยีนแฟมิลี่ (gene family) หรือเนื่องมาจากความไม่ชัดเจนจากปฏิกิริยาพีซีอาร์

มากไปกว่านั้น ผลที่ได้จากการทดลองนี้จะได้นำไปใช้ต่อยอดในการศึกษาการแสดงออกที่แตกต่างของยีนในสภาวะขาดน้ำเชิงปริมาณหรือที่เรียกว่าวิธี “quantitative RT-PCR” เพื่อนำ

พัฒนาเป็นโมเลกุลเครื่องหมาย (molecular markers) หรือเป็นเครื่องมือ (tools) ในการปรับปรุงพันธุ์พืชทนแล้งต่อไป

ในการทดลองใช้เทคนิคนี้ เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนต่อสภาวะแล้งในพืชอื่นๆ เช่น บาร์เลย์ พบว่า ภายใน 6 ชั่วโมง หลังงดให้น้ำ มีการแสดงออกของระดับ mRNA เพิ่มมากขึ้นของยีนดีไฮดริน รีเซบเตอร์ ไคเนส (receptor kinase) และกรดแจสโมนิค (Jasmonic acid) (Lee, et al, 2011)

ในปัจจุบัน เป็นที่ทราบกันดีว่า การเปลี่ยนแปลงสภาวะภูมิอากาศของโลก เป็นสิ่งสำคัญยิ่งที่ส่งผลกระทบต่อปริมาณผลผลิตพืช ดังนั้น เป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องค้นหายีนใหม่ๆ เพื่อใช้พัฒนาปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะทนแล้ง

รูปที่ 1 ภาพโดยสรุปของเทคนิค PCR-DEG

-ตัวอย่าง A (ให้น้ำปกติ) -ตัวอย่าง B (งดให้น้ำ)

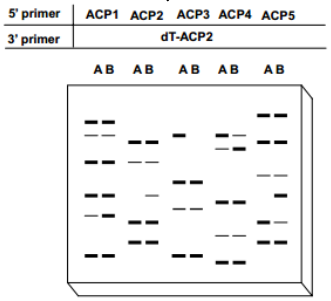
- สังเคราะห์ cDNA สายแรก โดย dT-ACP1

-สังเคราะห์ cDNA สายแรก - สังเคราะห์ cDNA สายแรก

⇩

- เพิ่มปริมาณ cDNA ที่แสดงออก โดย GeneFishing techniques Arbitrary ACP กับ dT-ACPs

⇩



รูปที่ 2 ไพรเมอร์ (arbitrary primers) ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR-DEG (GeneFishing™ Kit, Cat. No. K1021-k1026, Seegene, Soul, Korea)

• dT- ACP1 (10 μM): For Reverse Transcription, ใช้เปลี่ยนเป็น first stranded cDNA

dT-ACP1: 5′-CTGTGAATGCTGCGACTACGATXXXXX(T)18 -3′

• dT- ACP2 (10 μM):, ใช้สำหรับ GeneFishing™ PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์เส้นใดเส้นหนึ่งต่อไปนี้ในชุดคิท กับ dT-ACP2: 5′-CTGTGAATGCTGCGACTACGATXXXXX(T)15 -3′

Arbitrary ACPs (5 μM):

ACP1 : 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGCCATCGACC-3′

ACP2 : 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXAGGCGATGCC-3′

ACP3 : 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCCGGAGGATG-3′

ACP4 : 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGCTGCTCGCG-3′

ACP5 : 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXAGTGCGCTCG-3′

ACP6 : 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGGCCACATCG-3′

ACP7 : 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCTGCGGATCG-3′

ACP8 : 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGGTCACGGAG-3′

ACP9 : 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGATGCCGCTG-3′

ACP10: 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXTGGTCGTGCC-3′

ACP11: 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCTGCAGGACC-3′

ACP12: 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXACCGTGGACG-3′

ACP13: 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGCTTCACCGC-3′

ACP14: 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGCAAGTCGGC-3′

ACP15: 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCCACCGTGTG-3′

ACP16: 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGTCGACGGTG-3′

ACP17: 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCAAGCCCACG-3′

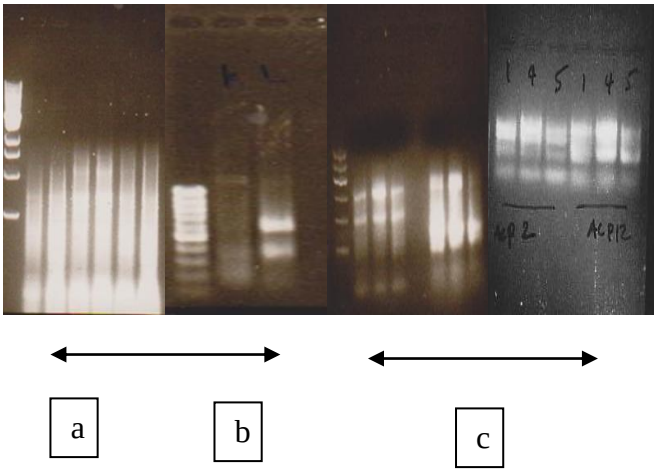
ACP18: 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCGGAGCATCC-3′

ACP19: 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXCTCTGCGAGC-3′

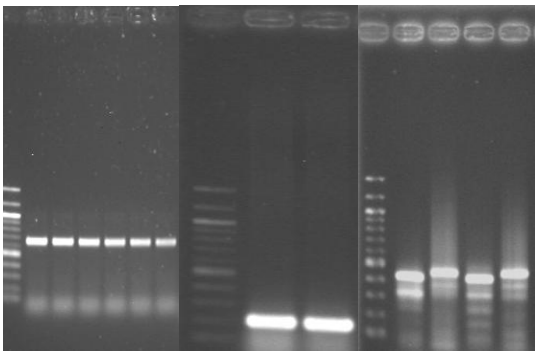
ACP20: 5′-GTCTACCAGGCATTCGCTTCATXXXXXGACGTTGGCG-3′

รูปที่ 3 (a) แสดงภาพแยกชิ้นส่วนสารพันธุกรรมผ่านกระแสไฟฟ้า (อะกาโลสเจลอิเลกโตรฟอเรซิส) ของ Total RNA ที่สกัดได้จากใบข้าวโพดตัวอย่างก่อนนำมาผ่านเอ็นไซม์ DNaseI (b)

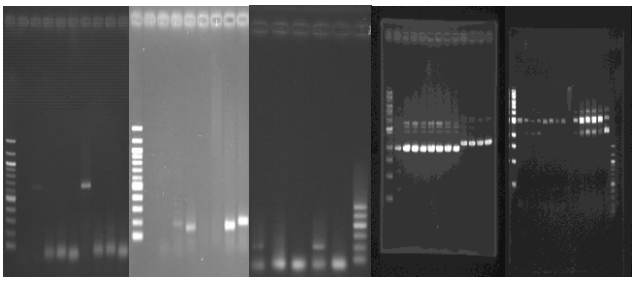
ปฏิกิริยาควบคุม ACP-based Gene Fishing โดยใช้ liver mouse RNA และ kidney mouse RNA (control experiment) (c) การทำปฏิกิริยา ACP-based PCR โดยใช้ RNA จากใบข้าวโพดตัวอย่างให้น้ำปกติ (ควบคุม) และ ใบข้าวโพดตัวอย่างขาดน้ำ (3 เลนขวามือ) และนำแถบดีเอ็นเอที่แยกได้มาแอมพลิไฟล์ด้วยการใช้ ACP primers (5μM) ในชุดคิทจำนวน 2 คู่ (ACP2 และ ACP 12) จากจำนวน 12 คู่



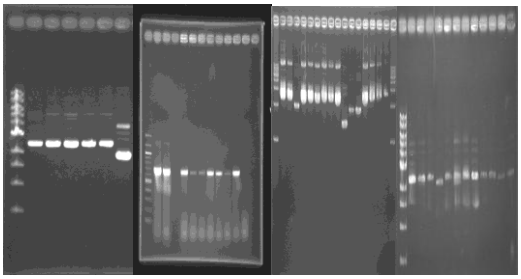
รูปที่ 3 แสดงพีซีอาร์แอมพลิคอนที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ของยีน DrebI, Cystatin และ Dr4 โดยใช้ Gene Specific primers



รูปที่ 4 แสดงพลาสมิดดีเอ็นเอและแอมพลิคอนยีนชนิดต่างๆ ที่โคลนและแยกได้โดยวิธี colony PCR รูปที่ (1) แสดง Dreb I แอมพลิคอน, Dedydrin แอมพลิคอน และ Extensin แอมพลิคอน

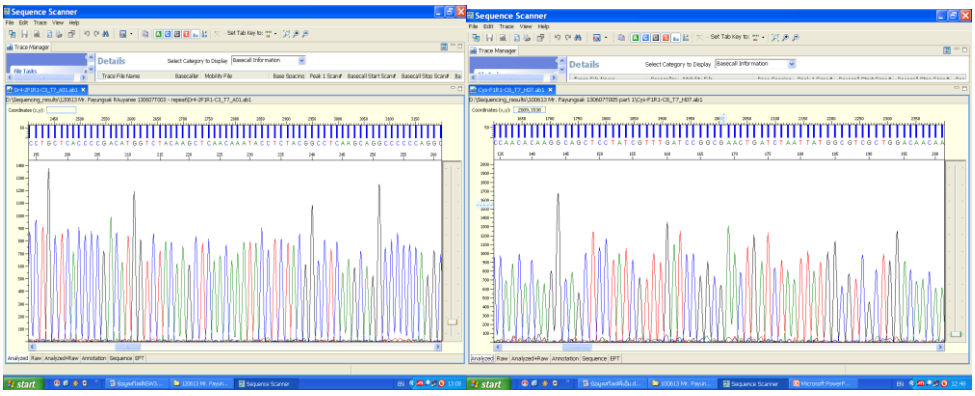


Dreb1 dehydrin



extensin

รูปที่ 5 ตัวอย่างลำดับดีเอ็นเอที่ได้จากเครื่องหาลำดับเบส



รูปที่ 6 ลำดับเบสของยีนทนแล้งที่ได้จากซีดีเอ็นเอใบข้าวโพดลูกผสมพันธุ์นครสวรรค์ 3 เมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลชีวภาพสากล

ยีน DREB (มีความเหมือนกับ NCBI Reference Sequence : NM_001111611.1)

nucleotide (57-902)

TTTTGGCCAACGTCGCATGCTCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTGCTCAAGAGCTCCACGAAACGTCCTCT
TGCTCTGCCACCACCACCTCGTCGTGCACCACATCCTGCTGCTCGTCCACTGTCACAGACTCGTCCTCTTCGCCCCCGTC
ACCGGCGGCGGCCAATGCCGCGCCCGCGACACGGAAGCGGCAGGCGTTGGAGGCCGAGGCCGAGGCCGAGGCGGGCGGTG

AGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAAGGCTGTGCTGGTAATAAGGCGGCGCCGGCCAAGAAGCGACCGCGGGGCAGCGAGGGG
AAGCACCCGACGTTCCGCGGCGTGCGGATGCGGACGTGGGGCAAGTGGGTGTCGGAGATCCGCGAGCCGCGCAAGAAGTC
GCGCATATGGCTCGGCACGTTCCCCACCGCCGAGATGGCCGCGCGCGCCCACGACGTCGCGGCGCTCGCCATCAAGGGCC
GCGCCGCGCACCTCAACTTCCCGGACCTTGCCGGCGCGCTGCCGCGCGCCGCGTCCGCGGCGCCCAAGGACGTCCAGGCG
GCCGCCGCATTGGCCGCTGCGTTCACGTCGCCGTCATCGGAGCCCGGCGCCGGCGCCGGCGCGCACGAGGAGCCCGCTGC
CAAGGACGGCGCCGCGCCCGCGCCCGCGCCCGAGGAGGCAGCCGCCGACGCACAGGCACCAGTACCAGTAGCACTACCAC
CGCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAG
TATTCTATAGTGTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAA
TTCCACACAAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCAACATTAAAT
TGCGTGGCGCTCACCTGCCCGCCTTT

ยีน DREB (มีความเหมือนกับ NCBI Reference Sequence : NM_001111611.1)
nucleotide (51-723)

TGGGGCCCGAGTTCCATGCTCCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGGAATTCGATTGCTCAAGAGCTCCACGAAACGTCCTC
TTGCTCTGCCACCACCACCTCGTCGTGCACCACATCCTGCTGCTCGTCCACTGTCACAGACTCGTCCTCTTCGCCCCCGT
CACCGGCGGCGGCCAATGCCGCGCCCGCGACACGGAAGCGGCAGGCGTTGGAGGCCGAGGCCGAGGCCGAGGCGGGCGGT
GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAAGGCTGTGCTGGTAATAAGGCGGCGCCGGCCAAGAAGCGACCGCGGGGCAGCGAGGG
GAAGCACCCGACGTTCCGCGGCGTGCGGATGCGGACGTGGGGCAAGTGGGTGTCGGAGATCCGCGAGCCGCGCAAGAAGT
CGCGCATATGGCTCGGCACGTTCCCCACCGCCGAGATGGCCGCGCGCGCCCACGACGTCGCGGCGCTCGCCATCAAGGGC
CGCGCCGCGCACCTCAACTTCCCGGACCTTGCCGGCGCGCTGCCGCGCGCCGCGTCCGCGGCGCCCAAGGACGTCCAGGC
GGCCGCCGCATTGGCCGCTGCGTTCACGTCGCCGTCATCGGAGCCCGGCGCCGGCGCCGGCGCGCACGAGGAGCCCGCTG
CCAAGGACGGCGCCGCGCCCGCGCCCGCGCCCGAGGAGGCAGCCGCCGACGCACAGGCACCAGTACCAGTAGCACTACCA
CCGCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGA
GTATTCTATAGTGTCACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTTCCTGTGTGAAATGTTATCCGCTCACA
TCTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGGTGCCTAAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATT
GCGGTTGGCG

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ยีนชนิดต่างๆที่ใช้ในการปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR)

Gene Names ™(°C)	Primers	PCR Sizes
Dreb (60°C)	drebF1 (5'-gctcaagagctccacgaaac-3')	700 bp
	drebR1 (5'-gcggtggtagtgctactggt-3'	
Dehydrin (39°C)	dehyF (5'-GAYGARTAYGGIAAYCC-3')	300 bp
	dehyR (5'-GGIARYTTYTCYTTIATYTT-3)'	
Cystatin (55°C)	cysF1(5'-aaaactacaggctgcgcatt-3')	200 bp
	cysR1(5'-acgcggtacttgcagaattt-3')	
	cysF1(5'-aaaactacaggctgcgcatt-3')	200 bp
	cysR2(5'-tcctagaaggcgactcgaac-3')	
RiP5 (extensin) (60°C)	extF2(5'-cgcattgtctgaaggactga-3')	200 bp
	extR2(5'-gtcttgggcttaggcctttt-3')	

1. **สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ** : ได้สารพันธุกรรม (Total RNA - อาร์เอ็นเอรวม) จากใบข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 อายุสองสัปดาห์ที่ให้น้ำปกติ (untreated) และ งดให้น้ำ (treated) ที่สภาวะกำหนดขาดน้ำ 7 วัน โดยใช้วิธีการพีซีอาร์อิงไพรเมอร์ควบคุมเอซีพีด้วยการเชื่อมต่อสายดีเอ็นเอกับไพรเมอร์จำนวน 20 ไพรเมอร์ (ACP-based primers Gene Fishing reverse transcription PCR) มาใช้ในการหาการแสดงออกของแถบซีดีเอ็นเอที่ปรากฏ เพื่อทำการโคลนนิ่ง และหาลำดับเบส และเทียบลำดับเบสที่ได้กับฐานข้อมูลชีวภาพสากล ผลการทดลองให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่าง ระหว่างใบข้าวโพดภายใต้สองสภาวะได้แก่ ให้น้ำปกติ (control) และสภาวะขาดน้ำ (treated) และพบแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏได้แก่ ACP2 กับ ACP12 และลำดับเบสพบมีความเหมือนกับ hypothethical proteins ผลจากการศึกษานี้ พบว่า ระดับการแสดงออกของยีนระหว่างสองสภาวะมีความแตกต่างกัน จึงได้ออกแบบไพรเมอร์ยีนทนแล้งจำนวน 5 ยีน ที่ได้มีการศึกษาก่อนหน้านี้ (ในการทดลองการศึกษาการแสดงออกของกลุ่มยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำในระดับอาร์เอ็นเอในข้าวโพดพันธุ์ทนแล้งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ) เพื่อนำมาใช้ศึกษากับยีนทนแล้งในข้าวโพดพันธุ์ลูกผสมนครสวรรค์ 3 อาจอาศัยเทคนิค RT-PCR เพื่อเปรียบเทียบแบบแผนการแสดงออกของยีนทนแล้งเพิ่มเติมที่ปรากฏกับพืชที่ได้มีการศึกษาก่อนหน้านี้ และเพื่อเป็นข้อมูลในการปรับปรุงพันธุ์ข้าวโพดต่อไป

2. สรุปเนื้อหา สาระสำคัญของผลงาน และข้อเสนอแนะในงานวิจัยเรื่องนั้นๆ ในอนาคต

การตอบสนองต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น ขาดน้ำ เย็นจัด หรือ เค็ม หรือสภาวะเครียดอื่นๆในพืช เป็นสิ่งที่พืชในแต่ละสปีชีส์แตกต่างกันในแง่ของการตอบสนอง เพื่อให้อยู่รอดภายใต้สภาวะที่ ไม่เหมาะสมต่างๆ เหล่านั้น ทั้งทางด้านสรีระวิทยา โครงสร้างของเซลล์ และชีวโมเลกุล แม้ว่าที่ผ่านมาได้มีการศึกษาถึงปัจจัยที่ควบคุมการตอบสนองต่อการแสดงออกของยีนที่เหนี่ยวนำในสภาวะที่ไม่เหมาะสมในพืชหลายๆ ชนิด เช่น อะราบิดอปซิส ข้าว บาร์เลย์และพืชอื่นๆ เป็นต้น แ ต่ในข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 ที่พัฒนาโดยนักวิชาการศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ 3 กรมวิชาการเกษตร ยังไม่มีการศึกษาในแง่ของการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองในสภาวะขาดน้ำ (stress inducible gene expression) จึงได้มีการนำ ACP-based Gene Fishing Techniques มาใช้ในการหายีนที่แสดงออกของยีนในสภาวะขาดน้ำ 7 วัน ในข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ลูกผสมพันธุ์นครสวรรค์ 3 จากการนำ arbitrary primers มาใช้จำนวน 20 เส้น ร่วมกับ ACP ไพรเมอร์ พบว่า ไพรเมอร์เส้นที่ ACP2 และ ACP12 มีการปรากฏ (up-regulated) จากการปฏิกิริยา PCR การตรวจสอบต่อไปโดยใช้วิธีการ northern

blot analysis หรือการวิเคราะห์หาการแสดงออกของยีนเชิงปริมาณ (quantitative real time PCR) จะเป็นประโยชน์ต่อไป

อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองพบว่า ยีนบางชนิดมีการแสดงออกของแบบ up-regulated ได้แก่ ยีน Extensin, Dehydrin, Dreb1, Dr4, Dhn1, SAD2, ARBE และ lea2 ผลการทดลองสังเกตพบแอมพลิคอนทุกชนิดยีนปรากฏจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ยกเว้นยีน ARBE, lea2 และ sad2 ทำการยืนยันยีนที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยวิธีการหาลำดับเบส พบมีความเหมือนกับชนิดยีนที่ต้องการ จากนั้น จึงนำยีนที่สนใจมาหาการแสดงออกของยีนด้วยวิธีการ quantitative realtime PCR ผลการทดลองเบื้องต้นพบว่ามีการแสดงออกของยีนบางชนิดในเชิงปริมาณของพืชในสภาวะขาดน้ำนาน 7 วัน ในงานวิจัยต่อเนื่อง จะได้นำวิธีการ quantitative real time PCR มาใช้ในการหาแสดงออกของยีนเชิงปริมาณที่ได้คัดเลือกได้จำนวน 5 ชนิดยีน และ อีก 3 ชนิดยีนที่แสดงในทุกสภาวะ (housekeeping genes) มาทดสอบซ้ำต่อไป

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

1.เนื่องจากเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรมีความเกี่ยวข้องกับสภาพแวดล้อมและสิ่งมีชีวิต การพัฒนาปรับปรุงพันธุ์พืชโดยอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพจึงมีความสำคัญ ในการโครงการวิจัยนี้กล่าว ถึงปัญหาและขอบเขตที่เกี่ยวข้องแตกต่างกัน เช่น ปัญหาด้านความแห้งแล้ง ทำให้ผลผลิตพืชลดลง การพัฒนาสีดอกเพื่อเพิ่มมูลค่าทางการเกษตร การเพิ่มปริมาณน้ำตาลในพืชเพิ่มมูลค่า การค้นหายีนเครื่องหมายใหม่ๆจาก โดยผลการวิจัยในภาพรวมของโครงการ ประกอบด้วยยีนยีนที่เกี่ยวข้อ งกับลักษณะการทนต่อสภาวะขาดน้ำในข้าวโพด ยีนเพิ่มสีดอกไม้ Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H) จากอัญชันและพิทูเนีย ยีน Sucrose Synthase ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์น้ำตาลในอ้อย ยีน DHS จากเบญจมาศ ยีนบางส่วนของเห็ดเรืองแสงและเทคนิคการถ่ายฝากยีนเข้าสู่พืชที่สนใจจากยีนที่ศึกษาดังกล่าว

โดยผลการวิจัยของโครงการได้ผลผลิตตรงตามเป้าประสงค์ของโครงการ ตามวัตถุประสงค์ดังต่อไปนี้ ได้แก่

1..ได้กลุ่มยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับความทนแล้งของข้าวโพดพันธุ์ทนแล้งนครสวรรค์ 3 เมื่อนำลำดับเบสของไปเทียบกับฐานข้อมูลชีวภาพสากล (NCBI database)

โดยสรุปจากผลการวิจัยดังกล่าว ตรงตามวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยฯ สามารถได้ยีนทนแล้งจากข้าวโพดพันธุ์ทนแล้ง ยีนเพิ่มสีดอกไม้ ยีนเพิ่มปริมาณน้ำตาล ยีนเรืองแสงบางส่วน และลักษณะสีดอกไม้ภายหลังระงับการแสดงออกของยีน DHS โดยอาศัยเทคนิคการโคลนยีน การถ่า ยฝากยีนและเทคนิค RNAi ตรงตามวัตถุประสงค์ที่ได้ตั้งไว้

2.สามารถนำงานวิจัยไปใช้ต่อยอดงานวิจัยได้ในอนาคต กับพืชชนิดอื่นๆ เป็นต้น หรือนักวิจัยสามารถนำเทคนิคเดียวกันไปประยุกต์ใช้กับเทคนิคอื่นๆที่มีความก้าวหน้าขึ้นในปัจจุบัน เพื่อให้ได้ผลลัพธ์ที่รวดเร็วและมีประสิทธิผลมากยิ่งขึ้น เป็นต้น

ในภาพรวมของโครงการได้ผลผลิต (output) ของโครงการดังต่อไปนี้

ปี พ.ศ.	ผลผลิตของโครงการแต่ละปี
2554	1.ได้ข้อมูลไพรเมอร์ยีนที่เกี่ยวข้องกับสภาวะขาดน้ำจากข้าวโพดพันธุ์ทนแล้งในรูปโคโลนีแบคทีเรีย จำนวน 4 ยีน
	2.ได้ยีนและทราบลำดับเบสของยีน Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H) ที่โคลนได้จากอัญชัน
	3.ได้ยีนและข้อมูลยีน sucrose synthase ในส่วนของยีนทั้งจีโนม (full length)
	4.ได้วิธีสกัดโปรตีนจากเห็ดเรืองแสงเพื่อนำไปหาลำดับกรดอะมิโน
2555	1.พลาสมิดดีเอ็นเอและ/หรือแอมพลิคอนยีนทนแล้งที่ได้จากการการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์และจากการออกแบบไพรเมอร์
	2.ได้ข้อมูลระดับอาร์เอ็นเอที่ตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำและสภาวะปกติเพื่อนำมาใช้ทำปฏิกิริยา PCR
	3.ได้ยีนและทราบลำดับเบสของยีน Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H) ที่โคลนได้จาก พิทูเนีย
	4.ได้ยีนและข้อมูลยีน sucrose synthase ในส่วนที่มีการแสดงออก สำหรับนำไปเชื่อมต่อเข้ากับ plant expression vector
	5.ได้ลำดับกรดอะมิโนจากเห็ดเรืองแสง
2556	1.กลุ่มยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับความทนแล้งของข้าวโพดพันธุ์ทนแล้งนครสวรรค์ 3 เมื่อนำลำดับเบสของไปเทียบกับฐานข้อมูลชีวภาพสากล (NCBI database)
	2.ได้ข้อมูลการแสดงออกของยีนโดยวิธี RT-PCR
	3.ได้ยีนและข้อมูลยีนที่ทนต่อสภาวะขาดน้ำในส่วนที่มีการแสดงออกสำหรับนำไปเชื่อมต่อเข้ากับ plant expression vector
	5.ได้ชุดยีน sucrose synthase ที่อยู่ในพลาสมิดสายผสม (plasmid construct) สำหรับนำไปถ่ายฝากเข้าสู่พืชต้นแบบ

	6.ได้เวคเตอร์ RNAi ที่มียีน DHS ใน *Agrobacterium tumefaciens*
	7.ได้ยีนเรืองแสงจากเห็ดเรืองแสงเพื่อเป็นเครื่องหมายโมเลกุล
2557	1.ได้ชุดยีนที่ทนต่อสภาวะขาดน้ำที่อยู่ในพลาสมิดสายผสม (plasmid construct) สำหรับนำไปถ่ายฝากเข้าสู่พืชต้นแบบ
	2.ได้ข้อมูลการแสดงออกของยีน Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H) ในยาสูบ
	3.ได้พืชต้นแบบที่มียีน DHS ด้วยเทคนิค RNAi
	4. ได้ขนาดแอมพลิคอนยีนทนแล้งที่ได้จากการการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์และจากการใช้ชุดไพรเมอร์จำแนก
	1.ได้ข้อมูลการยับยั้งการแสดงออกของยีน DHS ด้วยเทคนิค RNAi
2558	2.ได้กลุ่มยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับความทนแล้งของข้าวโพดพันธุ์ทนแล้งนครสวรรค์ 3 เมื่อนำลำดับเบสของไปเทียบกับฐานข้อมูลชีวภาพสากล (NCBI database)

ในภาพรวมของโครงการได้ผลลัพธ์ (outcome) ของโครงการดังต่อไปนี้

ปี พ.ศ.	ผลลัพธ์ของโครงการ
2554	ได้ข้อมูลไพรเมอร์ยีนที่เกี่ยวข้องกับสภาวะขาดน้ำของพืชและแอมพลิคอนยีนข้าวโพดพันธุ์ทนแล้งในรูปโคโลนีแบคทีเรีย จำนวน 5 ยีน
2554	ได้ยีน Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H) ที่โคลนได้จากอัญชัน สำหรับถ่ายเข้าสู่พืชเพื่อควบคุมสีดอก
2554	ได้ยีนและข้อมูลยีน sucrose synthase ในส่วนของยีนทั้งจีโนม (full length) และยีนในส่วนที่มีการแสดงออกครบทั้งยีน สำหรับนำไปสร้างชุดยีน (plasmid construct)
2554	ได้เทคโนโลยี RNAi และได้ชุดยีน DHS เพื่อถ่ายฝาก ยีน Deoxyhypusine Synthase (DHS) ที่ยับยั้งการเสื่อมสภาพในพืช ในการศึกษาหน้าที่ของยีนนี้
2554	ได้วิธีสกัดโปรตีนจากเห็ดเรืองแสงเพื่อนำไปหาลำดับกรดอะมิโน
2555	ได้โคโลนีแบคทีเรียจากซีดีเอ็นเอไลบรารี่ที่ได้จากข้าวโพดพันธุ์ NSW3 และข้าวโพดพันธุ์ไม่ทนแล้งอายุ 10 วัน และอาศัยหลักการพีซีอาร์ในการจำแนกความแตกต่างของกลุ่มยีนเบื้องต้น
2555	ได้ยีน Flavonoid 3', 5' hydroxylase (F3' 5'H) ที่โคลนได้จากพิทูเนีย สำหรับถ่ายเข้าสู่พืชเพื่อควบคุมสีดอก
2555	ได้ยีนและข้อมูลยีน sucrose synthase ในส่วนที่มีการแสดงออก สำหรับนำไปเชื่อมต่อเข้ากับ plant expression vector
2555	ได้เทคโนโลยี RNAi และได้ชุดยีน DHS เพื่อถ่ายฝากยีน Deoxyhypusine Synthase (DHS) ที่ยับยั้งการเสื่อมสภาพในพืช
2555	ได้ลำดับกรดอะมิโนจากเห็ดเรืองแสง
2556	ได้ข้อมูลลำดับเบสของยีนหรือกลุ่มของยีนคาดว่าเกี่ยวข้องกับลักษณะทนแล้งของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 เพื่อใช้ในการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์พืชต่อไป
2556	ได้ชุดของยีน Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H) ที่ถ่ายเข้าสู่เชื้อ Agrobacterium พร้อมสำหรับถ่ายเข้าสู่พืชเพื่อควบคุมสีดอก
2556	ได้ชุดยีน sucrose synthase ที่อยู่ในพลาสมิดสายผสม (plasmid construct) พร้อมสำหรับนำไปถ่ายฝากเข้าสู่พืชต้นแบบ เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนต่อไป
2556	ได้ชุดยีน DHS *Agrobacterium tumefaciens* พร้อมถ่ายฝากเข้าไปยังดอกเบญจมาศ เพื่อให้ดอกโตขึ้นและกลีบดอกอยู่คงทนเมื่อปักแจกันได้เทคโนโลยี RNAi และได้ชุดยีน DHS เพื่อถ่ายฝาก ยีน Deoxyhypusine Synthase (DHS) ที่ยับยั้งการเสื่อมสภาพในพืช
2556	ได้ยีนเรืองแสงจากเห็ดเรืองแสงเพื่อเป็นเครื่องหมายโมเลกุล
2557	ได้ข้อมูลการแสดงออกของยีน Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H) ในยาสูบ
2557	ได้ข้อมูลและแนวทางในการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการส่งสัญญาณ silencing เพื่อเพิ่มความต้านทานต่อไวรัสชนิดต่างๆ ในพืช และเพื่อส่งสัญญาณการยับยั้งการแสดงออกของยีน เช่นยีนที่เกี่ยวข้องกับสภาวะเครียดต่างๆ ของพืช เป็นต้น
2558	ได้ข้อมูลลำดับเบสของยีนหรือกลุ่มของยีนที่คาดว่าเกี่ยวข้องกับลักษณะทนแล้งของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 เพื่อใช้ในการคัดเลือกที่ตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำ

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

โครงการนี้ได้ผลผลิตและผลลัพธ์ตรงตามวัตถุประสงค์ สามารถได้ยีนที่สามารถนำมาใช้ในการถ่ายฝากยีน เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ ให้มีลักษณะที่ดีกว่าเดิม จากเทคนิคการโคลนยีน การถ่ายฝากยีน และการตรวจสอบยีนที่ปรากฏในพืชที่ได้รับการถ่ายฝาก

บรรณานุกรม

Abdallah, M., A. H. Fahmy, K. S. Abdalla and W. S. Maaty. 2004. Transformation of a High Molecular Weight (HMW) glutenin subunit Dy10 gene into maize. Arab J. Biotech. 7(2): 165-172.

Altschul,S.F., T.L. Madden, A.A., Schäffer, J, Zhang, W. Miller, and D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402.

Asano, M., Satoh, R., Mochizuki, A., Tsuda, S., Yamanaka,T., Nishiguchi, M., Hirai, K., Meshi, T., Naito, S. and Ishikawa, M. 2005. Tobamovirus-resistant tobacco generated by RNA interference directed against host genes. FEBS Letters 579(20): 4479-4484.

Barratt, D.H.P., Barber, L., Kruger, N.J., Smith, A.M., Wang, T.L., and Martin, C. (2001) Multiple, distinct isoforms of sucrose synthase in pea. Plant Physiol. 127: 655-664.

Biolley, J.P., M. Jay., G. Forkmann. 1994. Pigmentation patterns of modern rose mutants throw light on the flavonoid pathway in *Rosa x Hybrida***.** Phytochemisty 36: 1189-1196.

Birnboim H.C. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods in Enzymology*. 100: 243-55.

Birnboim H.C., Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7(6): 1513-23.

Brugliera F., G. Barri-Reweell., T.A. Holton and J.G. Mason. 1999. Isolation and characterization of a flavonoid 3'-hydroxylase cDNA clone corresponding to the Ht1 locus of *Petunia hybrida***.** The Plant Journal 19(4): 441-451.

Cellier, F.; Conejero, G.; Brietler,; J-C,Casse, F. 1998. Molecular and physiological responses to water deficit in drough-tolerant and drought-sensitive lines of sunflower. Plant Physiology. 116. 319-328.

Chourey, P.S. and Nelson, O.E. (1976). The enzymatic deficiency conditioned by the *shrunken-l* mutations in maize. Biochem. Genet. 14: 1041-1055.

Clonetech Laboratories, USA. In-Fusion® SMARTer® cDNA Library Construction Kit User Manual. Cat No. 634933. 40 p.

Dejardin, A., Rochat, C., Wuillem, S. and Boutin, J.P. (1997). Contribution of sucrose synthase, ADP-glucose pyrophosphorylase and starch synthase to starch synthesis in developing pea seeds. Plant Cell Environ. 20: 1421-1430.

Desjardin, D.E., B. A. Perry, D. J. Logde, C. V. Stevani and E. Nagasawa. 2010. Luminescent Mycena : new and noteworthy species. Mycoologia,(102):459-477.

Djilianov, D., Georgieva, T., Moyankova, D., Atanassov, A., Shinozaki, K., Smeeken, S.C.M., Verma, D.P.S., and Murata, N. 2005. Improved abiotic stress tolerance in plants by accumulation of osmoprotectants – Gene transfer approach. Biotechnol. Biotechnol. Equip. 19. (Special issue): 63-71.

Dombrowski, J.E., and Martin, R.C. 2009. Evaluation of reference genes for quantitative RT-PCR in *Lorium temurentum* under abiotic stress. Plant Science. 176:390-396.

Duguay J, Jamal S, Liu Z, Wang TW, Thompson JE. (2006) Leaf-specific suppression of deoxyhypusine synthase in Arabidopsis thaliana enhances growth without negative pleiotropic effects. Plant Physiol. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=Abstract&list_uids=16600425&query_hl=3&itool=pubmed_docsum

Dunoyer, P. 2006. Induction, suppression and requirement of RNA silencing pathways in virulent Agrobacterium tumefaciens infections. Nat Genet 38: 258–263.

emitter. Terahedron: (47):6215-6222.

Ferre, F. 1992. Quantitative or semi-quantitative PCR: Reality versus myth. *PCR Methods Applic*. 2, 1-9.

Gasser, C.S., Gunning, D.A., Budeller, K.A., and Brown, S.M. 1990. Structure and expression of cytosolic/cyclophilin peptidyl- prolyl *cis-trans* isomerase of higher plants and and production of active tomato cyclophilin in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87. 9519-9523.

Gause, W.C., and Admovicz, J. 1995. Use of PCR to quantitate relative differences in gene expression. *PCR PRIMER*, 293-311.

Giodani, Natali L, D'Ercole A, Pugliesi C, Fambrini M, Vernieri P, Vitagliano C, and Cavallini A. 1999. Expression of a dehydrin gene during embryo development and drought stress in ABA-deficient mutants of sunflower (*Helianthus annuus* L.). 39(4):739-48.

Hayashi, S., R. Fukushima and N. Wada. 2012. Extraction and purification of a luminiferous substance from the luminous mushroom *Mycena chlorophos*. Biophysic 111-114.

He, H., H. Ke., H. Keting., X. Qiaoyan., D. Silan. 2013. Flower color modification of chrysanthemum by suppression of *F3'H* and overexpression of the exogenous Senecio cruentus F3'5'H gene. PLOS ONE. Volume 8(11). E74395.

Hesse, H. and Willmitzer, L. (1996). Expression analysis of a sucrose synthase gene from sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Plant Mol Biol. 30: 863-872.

Holford, P and H.J. Newbury. 1992. The effect of antibiotic and their breakdown products on the in vitro growth of *Antirrhinum majus*. Plant Cell Rep. 11: 93-96.

Holton, T.A. and Cornish. E.C. 1995. Genetic and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. Plant Cell 7: 1071-1083.

Iba, K. 2002. Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. Annu. Rev. Plant. Biol. 53: 225-245.

Ingram, J. and D. Bartels. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Biol*. 47: 377 – 403.

Inoue, H., H. Nojima., and H. Okayama. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene. 96: 23-28.

International Rice Research Institute. Stress and disease tolerance. สืบค้นจาก: http://www.knowledgebank.irri.org/ricebreedingcourse/Breeding_for_drought_resistance.htm. [2553].

Johnson, E.T., S. Ryu., H. Yi., B. Shin., H. Chong and G. Choi. 2001. Alteration of single amino acid changes the substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase. The Plant Journal 25(3): 325-333.

Kaltenbach. M, G. Scroder., E. Schmelzer., V. Lutz and J. Schroder. 1999. Flavonoid hydroxylase from *Catharanthus roseus*: cDNA, heterologous expression, enzyme properties and cell-type specific expression in plant. The Plant Journal 19(2): 183-192.

Katsumoto, Y., M. Fukuchi-Mizutani., Y. Fukui., F. Brugliera., T.A. Holton., M. Karan., N. Nakamura., K. Yonekura-Sakakibara., J. Togami., A. Pigeaire., G.Q. Tao., N.S. Nehra., C.Y. Lu., B.K. Dyson., S. Tsuda., T. Ashikari., T. Kusumi., J.G. Mason and Y. Tanaka. 2007. Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hue flowers accumulation delphinidin. Plant Cell Physiol 48(11): 1589-1600.

Labhilili, M., Joudrier, P. and Gautier, M.F. 1995. Characterization of cDNA encoding *Triticum durum* dehydrins and their expression patterns in cultivars that differ in drought tolerance. Plant Science. 112: 219-30.

Latini, A., Raci,C., Sperandei, M, Cantale, C, Iannetta, M., Dettori, M., Ammar, K., and Galeffi, P. 2007. Identification of DREB- related gene in *Triticum durum* and its expression under water stress conditions*. Annals of Applied Biology*. 150: 187-195.

Latini, A., Sperandei, M., Cantale, C., Arcangeli, C., Ammar, K., and Galeffi, P. 2013. Variability and expression profile of the DRF1 gene in four cultivars of durum wheat and one triticale under moderate water stress conditions. Planta. 237(4):967-78.

Ling, H. Q., D. Kriseleit and M.W. Ganal.1998. Effect of ticarcillin/potassium clavulanate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Plant Cell Rep. 17: 843-847.

Lingle, S.E. and Dyer, J.M. (2001). Cloning and expression of sucrose synthase-1 cDNA from sugarcane. Plant Physiol. 158: 129-131.

Lukinac J., S. Jokie, M. Planinie, D. Magdic, M. Bilic, S. Tomas, D. Velie and A. Bucic-Kojic. 2009. An application of image analysis and colorimetric methods on color change of dehydrated asparagus (Asparagus maritimus L.). Agric. conspec. sci. Vol. 74 No. 3. pp. 233-237.

Mori, K., S. Kojima, S. Maki, T. Hirano and H. Niwa. 2011. Bioluminesecence characteristics of the fruiting body of Mycena chlorophos. Luminescence,26,604-610

luminiferous substance from the luminous mushroom *Mycena chlorophos*.

Mallory, A.C., Ely, L., Smith, T.H., Marathe, R., Anandalakshmi, R., Fagard, M., Vaucheret, H., Pruss, G., Bowman, L. and Vance, V.B. 2001. HC-Pro suppression of transgene

silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile silencing signal. Plant Cell 13:571-583.

Marana, C., Garcia-Olmedo, F. and Carbonero, P. (1990) Different expression of two types of sucrose synthase-encoding gene in wheat in response to anaerobiosis, cold shock and light. Gene 88: 167-172.

Martin, T., Frommer, W.B., Salanoubat, M. and Willmitzer, L. (1993). Expression of an *Arabidopsis* sucrose synthase gene indicates a role in metabolization of sucrose both during phloem loading and in sink organs. The Plant journal : for cell and molecular biology. Aug; 4(2): 367-77.

Mathias, R. Y. and L. A. Boyd. 1986. Cefotaxime stimulates callus growth, embryogensis and regeneration in hexaploid bread wheat (*Tritricum aestivum* L EM. Thell). Plant Science. 46 : 217-223.

McCormick, S. 1991. Transformation of tomato with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Tissue Culture Manual. B6: 1-9.

Meins, F. Jr. 2000. RNA degradation and models for post-transcriptional gene silencing. Plant Mol Biol 43: 261-273.

Mlotshwa, S., Voinnet O., Mette M. F., Matzke M., Vaucheret H., Ding S.W., Pruss G. and B. Vicki Vance. 2002. RNA Silencing and the Mobile Silencing Signal. The Plant Cell. S289–S301.

Mol. J.N.M., E. Grotewold and R.E. Koes. 1998. How genes paint flowers and seeds**.** Trends Plant Sci 3: 212-217.

Mori, K., S. Kojima, S. Maki, T. Hirano and H. Niwa. 2011. Bioluminesecence characteristics of the fruiting body of Mycena chlorophos. Luminescence, 26, 604-610.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15(3): 473-497.

Myung Hee Park, Young Ae Joe and Kee Ryeon Kang. (1998). Deoxyhypusine Synthase Activity Is Essential for Cell Viability in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The Journal of Biological Chemistry. 273: 1677-1683.

Ober, D. and T. Hartmann. 1999. Deoxyhypusine Synthase from Tobacco. The Journal of Biological Chemistry, Vol. 274, No.45. pp. 32040-32047**.**

Ogita, S., Uefuji, H., Yamaguchi, Y., Koizumi, N. and Sano, H. 2003.. Producing decaffeinated coffee plants. Nature 423: 823.

Peter S. Solomon, Simon, V.S., Ipcho, James, K. Hane, Kar-chun Tan, Richard P. Oliver. A quantitative PCR approach to determine gene copy number. 2008. Fungal Genetics Reports. 5- 8.

Plasmid isolation using Alkaline lysis. Plasmid Isolation Protocol. 2552. http://www.bio-protocol.org/wenzhang.aspx?id=30. (เข้าถึงข้อมูลทางระบบอินเทอร์เน็ต พ.ศ. 2552).

Pokhilko, A., J.A. Ramos, H. Holtan, D.R. Maszle, R. Khanna and A.J. Millar. 2011. Ubiquitin ligase switch in plant photomorphogenesis: a hypothesis. *Journal of Theoretical Biology*. 270: 31–41.

Qu F., Ye X., and T. J. Morris. 2008. Arabidopsis DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1**.** **PNAS,** vol. 105, no. 38. 14732–14737.

Raeymaekers, L. 1995. A complementary on the practical applications of competitive PCR. *PCR Methods Applic*, 5 91-94.

Salanoubat, M. and Belliard, G. (1987). Molecular cloning and sequencing of sucrose synthase cDNA from potato (Solanum tuberosum L.) : preliminary characterization of sucrose synthase mRNA distribution. Gene 60: 47-56.

Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3th ed.

Sarah, E. Lingle. and John, M. Dyer. 2004. Polymorphism in the Promoter Region of the Sucrose Synthase-2 Gene of *Saccharum* Genotypes. Journal American Society Sugar Cane Technologists, Vol. 24: 241-249.

Sharma, A.D., and Kaur, P. 2009. Combinded effect of drought stress and heat shock on cyclophilin protein expression in *Triticum aestivum*. General and Applied Plant Physiology. 35 (1-2). 88-92.

Shinozaki, K. and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2000. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signalling pathways. *Curr Opin Plant Biol*. 3: 217 – 223.

Skinner, J.S., von Zitszewitz, J., Szucs, P., Marquez-Cedillo, L., Filichkin, T., Amundsen, K., Stockinger, E.J., Thomasow, M.F., Chen, T.N.N., & Hayes, P.M. 2005. Structure,

functional and phylogenetic characterization of a large CBF gene family in Barley. Plant Molecular Biology. 59: 533-551.

Smirnoff, N. 1998. Plant resistance to environmental stress. *Curr Opin Biotech.* 9: 214 – 219.

Sonoda, Y., K. Sako, Y. Maki, N. Yamazaki, H. Yamamoto, A. Ikeda and J. Yamaguchi. 2009. Regulation of leaf organ size by the Arabidopsis RPT2a 19S proteasome subunit. *The Plant Journal*. 60: 68–78.

Sun, J.D, Loboda, T., Sung, S.J. and Black, C.C. (1992). Sucrose synthase in wild tomato, *Lycopersicon chmielewskii,* and tomato fruit sink strength. Plant Physiol. 98: 1163-1169.

Sung, S.J., Xu, D.P. and Black, C.C. (1989). Identification of actively filling sucrose sinks. Plant Physiol 89: 1117-1121.

Takahashi, H., M. Isobe and T. Goto. 1991 Chemical synthesis of lampteroflavin as

Tanaka, Y. and A. Ohmiya**.** 2008. Seeing is believing : Engineering anthocyanin and carotenoid biosynthetic pathways. Current Opinion in Biotechnology. 19:190-197. Terahedron: (66) 1367-1378.

Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., Heinen, E. 1999. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. J. Biotechnol. 75: 291-295.

Thomann, A., V. Brukhin, M. Dieterle, J. Gheyeselinck, M. Vantard, U. Grossniklaus and P. Genschik. 2005. Arabidopsis CUL3A and CUL3B genes are essential for normal embryogenesis. *The Plant Journal.* 43: 437–448.

Tzann-Wei Wang, Chun-Guang Zhang, Wendy Wu, Linda M. Nowack, Ewa Madey, and John E.Thompson. (2005). Antisence Suppression of Deoxyhypusine Synthase in Tomato Delays Fruit Softening and Alters Growth and Development. Plant Physiology. 138: 1372-1382.

Tzann-Wei Wang, Lily Lu, Denis wang, and John E. Thompson. (2001). Isolation and Characterization of Senescence-induced cDNAs Encoding Deoxyhypusine Synthase and Eucaryotic Translation Initiation Factor 5A from Tomato. The Journal of Biological Chemistry. 276:17541-17549

Tzann-Wei wang, Wendy Wu, Chun-Guang Zhang, Linda M.Nowack, Zhongda Liu and John E. Thompson.(2005). Antisense suppression of deoxyhypusine synthase by vacuum-infiltration of *Agrobacterium* enhances growth and seed yield of canola**.** Physiologia Plantarum**.** Vol. 124 Page 493.

Uyakul, D., M. Isobe and T. Goto, 1990. Lampteroflavin, the first riboflavinyl alpha ribofuranoside as light emitter in the luminous mushroom, L. japonicas. Terahedron: (66) 1367-1378.

Uyakul, D., M. Isobe and T. Goto, 1990. Lampteroflavin, the first riboflavinyl alpha

Vierling, E. 1991. The roles of heat-shock proteins in plants. *Annu Rev Plant Biol*. 42: 579 – 620.Vol 1–3.

Wang, AYYuWP., Juang, R.H., Huang, J.W., Sung, H.Y. and Su, J.C. (1992). Presence of three rice sucrose synthase gene as revealed by cloning and sequencing of cDNA. Plant Mol Biol 18: 191-1194.

Wang, M.B., Wesley, S.V., Finnegan, E.J., Smith, N.A. and Waterhouse, P.M. 2001. Replicating satellite RNA induces sequence-specific DNA methylation and truncated transcripts in plants. RNA 7: 16-28.

Werr, W., Frommer, W.B., Maas, C. and Starlinger, P. (1985). Structure of the sucrose synthase gene on chromosome 9 of *Zea mays* L. EMBO J 4: 1373-1380.

Yi, L., Shenjiao, Y., Shiqing, L., Xinping,C., and Fang, C. 2010. Growth and development of maize (*Zea mays* L.) in response to different field water management practices: Resource capture and use efficiency. Agriculture and Forest Meteorology. 150: 606-613.

Young Park, S. and Y. Kim. 2000. The expression of egg plant flavonoid 3’5’ hydroxylase gene in tobacco plant (Nicotiana tabacum cv. Xanthi). Plant Biotech 2(1):25-28.

Zhu, W., Zhang, L., Lv, H., Zhang, H., Zhang, D., Wang, X., and Chen, J. 2013. The dehydrin wzy2 promoter from wheat defines its contribution to stress tolerance. Funct Integr Genomics. 2013. [Epub ahead of print].

Zrenner, R., Salanoubat, M., Willmitzer, L. and Sonnewald, U. (1995). Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). Plant J 7: 97-107.

ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3. 2552. สืบค้นจาก:

http://www.food-resources.org/news/view.php?id=2646 [2552].

นิตย์ ศกุนรักษ์. 2541. สรีรวิทยาของพืช. มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 218 หน้า

ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 2542. เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมในการควบคุมสีและลักษณะของดอก. วารสารข่าวศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง 13(1): 9-13.

พีรเดช ทองอำไพ. 2537. ฮอร์โมนพืชและสารสังเคราะห์ : แนวทางการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.196 หน้า

ภาวะโลกร้อน. 2555. (ออนไลน์). สืบค้นจาก: http://www.baanjomyut.com/library/global_warming [มี.ค 2555].

วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 25 (3) : 201-207

สุมนทิพย์ บุนนาค และ เนริสา คุณประทุม. 1997. อิทธิพลของ timentin, cefotoxime และ carbenicilline ต่ออัตราการเจริญของแคลลัสถั่วพุ่ม และความสามารถในการกำจัด *Agrobacterium tumefuciens*.

สุรีย์พร บัวอาจและวีระศักดิ์ ศักดิ์ศิริรัตน์. 2552. การใช้ประโยชน์จากเห็ดเรืองแสง. ข่าวสารเทคโนโลยีชีวภาพ หน้า 14-15.

อัญจนา บุญชด. 2544. การถ่ายยีนเรพลิเคสที่ไม่สมบูรณ์ของ cucumber mosaic virus เข้าสู่มะเขือเทศ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 90 หน้า

(ส่วนประกอบเนื้อเรื่องของกิจกรรมงานวิจัย)

ชื่อกิจกรรมงานวิจัย(Title) ไทยและอังกฤษ

ชื่อผู้วิจัย

คำสำคัญ (Key words)

บทคัดย่อ (Abstracts) ไทยและอังกฤษ

บทนำ (Introduction)

การทบทวนวรรณกรรม (งานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ให้นำไปรวมในบทนำ)

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

ผลการวิจัย (Results)

อภิปรายผล (Discussion)

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

เอกสารอ้างอิง (References)*

ภาคผนวก (ถ้ามี) (Appendix)**

*** แสดงไว้ในบรรณานุกรม มีการแยกออกเป็นสำหรับของแต่ละบท**

**** แสดงไว้ในภาคผนวก มีการแยกออกเป็นสำหรับของแต่ละสาขา ให้ลำดับภาคผนวกเป็นตัวอักษร ก,ข,ค,.....**

คำอธิบายแนวทางการเขียนหัวข้อต่าง ๆ

ชื่อกิจกรรมงานวิจัย (ภาษาไทยและภาษาอังกฤษ TH SarabunPSK 16 ตัวหนา จัดกึ่งกลางหน้า) สำหรับการพิมพ์ชื่อเรื่องภาษาอังกฤษขึ้นต้นตัวแรกใช้อักษรตัวใหญ่ ส่วนคำบุพบท คำนำหน้านาม และคำสันธานใช้อักษรตัวเล็ก ยกเว้นถ้าขึ้นต้นประโยค (เช่น An Independent Measurement of the Amount of Nitrogen Fixed by a Legume Crop.)

ชื่อผู้วิจัย

เว้น 1 บรรทัดจากชื่อเรื่อง (ภาษาอังกฤษ) ใช้ชื่อเต็มทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ โดยแยกกันคนละบรรทัด จัดกึ่งกลางหน้า คำนำหน้าชื่อให้ใส่เฉพาะยศ ตำแหน่ง หรือบรรดาศักดิ์ ที่ได้รับโปรดเกล้าฯเท่านั้น หรือ ฐานันดร เช่น พ.ต.ท. , ศาสตราจารย์ , คุณ , คุณหญิง , ท่านผู้หญิง , ม.ร.ว. เป็นต้น

คำสำคัญ (keywords)

คำที่สื่อถึงความหมายของงานวิจัย เพื่อประโยชน์ในการสืบค้นเอกสาร

บทคัดย่อ (abstract)

ผู้วิจัยต้องเขียนบทคัดย่อภาษาไทยและภาษาอังกฤษ โดยมีรายละเอียดดังนี้

- ปัญหา วัตถุประสงค์ และวิธีดำเนินการโดยสังเขป
- ผลของการศึกษาค้นคว้า ได้แก่ การเสนอคำตอบให้แก่หัวข้อปัญหาที่ทำการศึกษาค้น คว้า และการค้นพบ ตลอดจนข้อเสนอแนะ (ถ้ามี) ที่เป็นประเด็นหลัก

ความยาวของบทคัดย่อภาษาไทยไม่ควรเกินกว่า 1 หน้ากระดาษพิมพ์ ขนาด A4

สำหรับบทคัดย่อภาษาอังกฤษให้แปลตามบทคัดย่อภาษาไทย

บทนำ (Introduction)

ประกอบด้วย

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา
2. การทบทวนวรรณกรรม(กรณีเป็นงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ให้นำไปรวมกับข้อ 1)
3. วัตถุประสงค์ที่เชื่อมโยงสัมพันธ์กับสาระของงานวิจัย
4. ขอบเขตการวิจัย (ถ้ามี)
5. สมมติฐาน (ถ้ามี)

ระเบียบวิธีการวิจัย (อุปกรณ์และวิธีการทดลอง)

เขียนเชิงพรรณนาประกอบด้วยหัวข้อต่อไปนี้

1. ประเด็นวิจัย (ทำอะไร)
2. สถานที่ทำการวิจัย (ที่ไหน)
3. ระยะเวลาดำเนินงาน (เมื่อไหร่)
4. วิธีการดำเนินการ (อย่างไร) (ชัดเจนในการทำวิจัย บอกให้ละเอียด จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ทำงานวิจัยต่อ)

ผลการวิจัย

แสดงให้เห็น ผลการ วิจัยที่เกิดขึ้น โดยอาจนำเสนอ ในรูป ของการบรรยายอย่างเดียว หรือการบรรยายร่วมกับ ตาราง หรือแผนภาพ หรือรูปภาพที่ ผ่านการวิเคราะห์ทา งสถิติ จัดลำดับ/จัดแบ่งผลการทดลองที่เกิดขึ้นให้สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ ที่ตั้งไว้ให้มากที่สุด (ผลการทดลองจะต้องตอบ วัตถุประสงค์ได้ทุกข้อทุกประเด็น) และต้องไม่มีการเสนอผลที่ซ้ำซ้อนกัน เช่น ข้อมูลเดียวกันไม่ควรนำเสนอทั้ง ตาราง และแผนภาพ เป็นต้น

อภิปรายผล

การอภิปรายผลอาจอภิปรายร่วม กับหัวข้อผลการวิจัย (โดยตั้งเป็นหัวข้อ “ผลการทดลองและอภิปราย”/ “Results and Discussion”) หรือจัดแยกออกมาต่างหาก

การอภิปร ายผลการวิจัยต้องใช้ เหตุผลและองค์ความรู้ทางวิชาการที่เกี่ยวข้อง มาอธิบาย เพื่อแสดงถึงความเกี่ยวเนื่อง/เกี่ยวพัน หรือโดยเปรียบเทียบ กับผลการวิจัยที่มีมาก่อน และผลการวิจัยนั้นอาจเป็นไปตามสมมติฐานหรือไม่เป็นไปตามสมมติฐานก็ได้ โดยต้องอธิบายเหตุผลประกอบเสมอ

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สาระ สำคัญของสรุปผลการ วิจัยให้ระบุถึง การ บรรลุ วัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ และการ นำไปใช้ประโยชน์ (บอกผลลัพธ์ที่เกิดจากการใช้ผลงานวิจัยนั้นด้วย) จุดอ่อน หรือจุดแข็ง และแนวทาง หรือข้อเสนอแนะในการทำ หรือพัฒนางานวิจัย ต่อไป สรุปผลการวิจัยไม่ใช่บทคัดย่อ

เอกสารอ้างอิง

1. วิธีการอ้างในเนื้อเรื่อง : วิธีการอ้างอิงมีหลายรูปแบบ แต่ทางสาขาวิทยาศาสตร์ ใช้ระบบชื่อและปี (Name and Year System) ตัวอย่าง

<u>ภาษาไทย</u> : ใช้ชื่อต้น-ปี พ.ศ.

- อานนท์ (2550).....หรือ .....(อานนท์, 2550)
- อานนท์และอนันต์ (2550)..... หรือ.....(อานนท์และอนันต์, 2550)

- กรณีที่มีผู้วิจัยตั้งแต่ 3 คนขึ้นไปให้ใช้ **และคณะ** ต่อท้ายผู้แต่งคนแรก

อานนท์และคณะ (2550)..... หรือ.....(อานนท์และคณะ, 2550)

(แต่ในการทำรายการเอกสารอ้างอิงให้ใส่ชื่อหมดทุกคน)

- กรณีที่เอกสารไม่ปรากฏผู้แต่งให้ใช้ **นิรนาม** (ภาษาไทย) หรือ **Anon.** (Anonymous) (ภาษาอังกฤษ)

ภาษาอังกฤษ : ใช้ชื่อสกุล-ปี ค.ศ.

- Arnold (2007).....หรือ .....(Arnold, 2007)

- Arnold and Schepers (2007).....หรือ (Arnold and Schepers, 2007) ควรใช้ **and** ไม่ควรใช้ **และ**)

- กรณีที่มีผู้วิจัยตั้งแต่ 3 คนขึ้นไปให้ใช้ **et al.** ต่อท้ายผู้แต่งคนแรก

Arnold et al. (2007)..... หรือ.....(Arnold et al., 2007)

(แต่ในการทำรายการเอกสารอ้างอิงให้ใส่ชื่อหมดทุกคน)

2. การทำรายการเอกสารอ้างอิง : ให้เรียงลำดับเอกสารภา ษาไทยก่อนภาษาอังกฤษ และเรียงตามอักษรโดยไม่ต้องใส่เลขที่

2.1. การอ้างอิงจากวารสารการวิจัย : ให้เรียงลำดับตามองค์ประกอบดังต่อไปนี้

1) ชื่อผู้วิจัย

2) ปีที่ตีพิมพ์ (ปี พ.ศ. สำหรับภาษาไทย ปี ค.ศ. สำหรับภาษาอังกฤษ)

3) ชื่อวารสาร (ชื่อเต็ม หรือคำย่อตามที่วารสารกำหนด)

4) ฉบับที่ (Volume number) และเล่มที่ (Issue number) (ถ้ามี)

5) หน้า (หมายเลขหน้าแรก-หน้าสุดท้ายของเรื่อง)

การพิมพ์ชื่อผู้วิจัยสำหรับวารสารภาษาไทยใช้ ชื่อ- นามสกุล ส่วนวารสารภาษาอังกฤษ เฉพาะคนแรกเท่านั้นขึ้นต้นด้วยนามสกุลแล้วคั่นด้วยเครื่องหมายจุลภาค ตามด้วยชื่อต้นและชื่อกลาง (ถ้ามี) และในกรณีที่มีผู้วิจัย หลายคนให้ใช้ **และ** (ภาษาไทย) หรือ **and** (ภาษาอังกฤษ) นำหน้าคนสุดท้าย

ตัวอย่าง :

จรูญโรจน์ จันทรศิริ และเฉลิมพล แซมเพชร. 2548. ผลิตภาพของแปลงหญ้าเมื่อปลูกหญ้ารูซี่ในระหว่างแถบกระถิน. วารสารเกษตร 21(1) : 55-62.

Souza, P.I., D.B. Egli, and W.P. Bruening. 1997. Water stress seed filling and leaf senescence in soybean. *Agron. J.* 89:807-812.

2.2 การอ้างอิงจากหนังสือ หรือตำรา ให้เรียงลำดับตามองค์ประกอบดังต่อไปนี้

1) ชื่อผู้แต่ง
2) ปีที่ตีพิมพ์
3) ชื่อหนังสือ
4) พิมพ์ครั้งที่ (Edition number) (ถ้ามี)
5) สำนักพิมพ์ และสถานที่พิมพ์
6) จำนวนหน้า

ตัวอย่าง :

เฉลิมพล แซมเพชร. 2542. สรีรวิทยาการผลิตพืชไร่. นพบุรีการพิมพ์: เชียงใหม่. 70 หน้า

Fageria, N.K., V.C. Baligar, and R.B. Clark. 2006. Physiology of Crop Production. The Haworth Press, Inc.: New York. 122 p.

กรณีเป็นบทหนึ่งของหนังสือ

Hill, S.E. 1996. Emultions. *In*: Hall, G.M. (ed.) Methods of testing protein functionality.

Chapman & Hall: London. pp. 153-185.

2.3 เอกสารรวมเล่ม หรือรายงานเสนอในการประชุมสัมมนา

1) ชื่อผู้วิจัย
2) ปีทีตีพิมพ์
3) ชื่อเรื่อง
4) ชื่อการประชุมสัมมนา
5) สถานที่และวัน เดือน ปีที่จัดประชุมสัมมนา

ตัวอย่าง :

เฉลิมพล แซมเพชร และวีระชัย ศรีวัฒนพงศ์. 2539. การตอบสนองของข้าวบาเลย์ชนิดสองแถวและหกแถวต่อปุ๋ยไนโตรเจน. รายงานวิจัยการประชุมทางวิชาการธัญพืชเมืองหนาว. ณ โรงแรมอมรินทร์ลากูน. พิษณุโลก, 16-18 มกราคม 2539.

Bouldin, D.R. 1988. Effect of green manure on soil organic matter content and nitrogen availability. Proceeding of a symposium on sustainable agriculture: The role of green manure crops in rice farming systems. IRRI, Philippines, May 25-29, 1987: 151-163.

3. วิทยานิพนธ์

ชื่อผู้แต่ง ปีที่ตีพิมพ์ ชื่อเรื่อง วิทยานิพนธ์ สาขาวิชา มหาวิทยาลัย ชื่อเมือง

ตัวอย่าง :

มนกฤตย์ บุญยฤทธิ์. 2538. การตรึงและการสะสมไนโตรเจนของถั่วเหลืองในแต่ละดับการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนและความหนาแน่นของต้นปลูก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาพืชไร่. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่: เชียงใหม่.

4. กรณีอ้างอิงจากเว็บไซต์

ชื่อผู้เขียน ปีที่พิมพ์ ชื่อเรื่อง แหล่งที่มาหรือเข้าถึงหรือชื่อเวปไซต์ วันเดือนปีที่สืบค้นข้อมูล

ตัวอย่าง :

ทิพยรัตน์ หาญสืบสาย. 2539. การดัดแปลงยีน...สำคัญไฉน. สืบค้นจาก: http://learn.in.th/god t.html [ก.ย. 2547].

Bryant, P. 1999. Biodiversity and Conservation. Retrieved October 4, 1999, from www.darwin.bio.uci.edu/sustain/bio65/Tiltpage.htm

การทำเอกสารอ้างอิงต้องตรวจสอบให้ครบถ้วนและถูกต้อง