

## 1. บทนำ

### การควบคุมรูปแบบของการเกิดสีในพืช

พืชจะมีรูปแบบการเกิดสีซึ่งเกิดจากการสะสมของ anthocyanins ที่เซลล์จำเพาะ การควบคุมชีวสังเคราะห์ anthocyanins จะควบคุมที่ระดับการถอดรหัสยีนเป็นส่วนใหญ่ ยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์ anthocyanins แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มของยีนโครงสร้างซึ่งทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาชีวสังเคราะห์ของสารในกลุ่มของ anthocyanins และกลุ่มของยีนควบคุม (Transcription factor) โดยจะให้โปรตีนซึ่งกำหนดการแสดงออกของยีนโครงสร้างและรูปแบบของการสะสมเม็ดสี โดยการแสดงออกของยีนควบคุม จะมีรูปแบบที่จำเพาะต่อรูปแบบของการเกิดสี (Holton and Cornish, 1995) ถึงแม้ว่าในพืชหลายชนิดจะมีความแตกต่างทางพันธุกรรม แต่ก็พบว่ายีนโครงสร้าง และยีนควบคุมซึ่งทำหน้าที่เดียวกันในชีวสังเคราะห์ anthocyanins นั้น จะมีบริเวณอนุรักษ์ของยีน (conserved region) ร่วมกัน และยีนเหล่านี้ยังถูกกระตุ้นการแสดงออกด้วยแสง การศึกษาถึงการควบคุมชีวสังเคราะห์ anthocyanins โดยเฉพาะเทคนิคการกลายพันธุ์นั้นพบว่าการควบคุมชีวสังเคราะห์ นี้ส่วนใหญ่เกิดจากการทำงานร่วมกันของยีนควบคุม ในการกำหนดรูปแบบการแสดงออกของยีนโครงสร้าง

มีการจำแนก ยีนควบคุมชีวสังเคราะห์ anthocyanins ในพืชหลายชนิด เช่น ในข้าวโพดพบว่ามียีนควบคุม 2 กลุ่ม คือ *r* และ *cl* ซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้างในเนื้อเยื่อต่างๆ สมาชิกของยีนในกลุ่ม *r* (*r*, *lc*, *sn*, *b*) จะแปลรหัสให้โปรตีนซึ่งมีกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็นกรดที่ปลาย N จำนวนมาก และที่ปลาย C จะมีส่วนของ basic helix-loop-helix (bHLH) ทำหน้าที่จับกับ DNA (DNA binding domain) ในขณะที่สมาชิกของกลุ่ม *cl* (*cl* และ *p1*) จะถอดและแปลรหัสให้โปรตีนซึ่งมีโดเมน MYB ที่มีส่วนของ helix-turn-helix สำหรับจับกับ DNA โดยในข้าวโพดพบว่ามียีนหลายยีนที่เป็นสมาชิกของทั้ง *r* และ *cl* แต่มีรูปแบบการแสดงออกที่แตกต่างกันไป (Ludwig and Wessler 1990; Cone *et al.*, 1993) ในปัจจุบันได้มีความพยายามที่จะอธิบายกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนในชีวสังเคราะห์ anthocyanin ในระดับการ Transcription ซึ่งพบว่าพืชแต่ละชนิดจะมีรูปแบบการควบคุมแตกต่างกัน เช่น มีรายงานการทำงานของยีนควบคุมในการควบคุมการแสดงออกของยีนบริเวณเหนือโปรโมเตอร์ของยีน *DFR* (Grotewold *et al.*, 1994; Sainz *et al.*, 1997)

## MYC transcription factor

สีส้มในพืชที่เรามองเห็นนั้นเป็นผลมาจากกลุ่มของรงควัตถุในพืช (Plant pigments) ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มหลักใหญ่ ๆ ที่ทำให้ออกสีส้มในพืช ได้แก่ betalains, carotenoids และ anthocyanins โดยรงควัตถุ anthocyanin ซึ่งสร้างขึ้นมาจาก flavonoid pathway เป็นรงควัตถุที่ทำให้เกิดสีส้ม, แดง, ม่วง และน้ำเงินในพืชชนิดต่าง ๆ

วิธีการสังเคราะห์รงควัตถุ anthocyanin ถูกใช้เป็นเป้าหมายหลักในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพและเทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรม เพื่อที่จะสร้างสารประกอบที่จะทำให้เกิดความแปลกใหม่หรือเปลี่ยนแปลงไปจากพันธุ์ที่มีอยู่ในธรรมชาติ การควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน เป็นระบบการควบคุมการแสดงออกของยีนในพืชที่มีการศึกษากันมากที่สุดระบบหนึ่ง (Grotewold, 2006) ปัจจัยหลักที่สำคัญอย่างหนึ่งในการควบคุมการแสดงออกในระดับการถอดรหัสของยีน ก็คือ transcription factors ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการกระตุ้นการเกิดกระบวนการถอดรหัส (transcription) โดยผ่านทาง การเข้าจับกับลำดับเบสในส่วนที่เป็นโปรโมเตอร์ของยีนโดยตรงหรือเข้าจับกับ RNA polymerase หรือโปรตีนอื่น ๆ ในกระบวนการเริ่มต้นการถอดรหัส (transcription initiation)

โปรตีน transcription factors ที่สำคัญชนิดหนึ่งที่ควบคุมการแสดงออกของยีนในวิธีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ได้แก่ bHLH (basic-helix-loop-helix) ซึ่งพบทั้งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ (Nicola *et al.*, 2003) bHLH เป็นโปรตีนในกลุ่มของ transcription factor MYC-like protein มีโครงสร้างทุติยภูมิและตติยภูมิที่ประกอบด้วย motif ที่มีลักษณะเป็น basic helix loop helix มีหน้าที่ควบคุมการถอดรหัสของยีนที่เข้ารหัสให้เอนไซม์ในขั้นตอน Late stage ของวิธีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินซึ่งเริ่มจากขั้นตอนที่เร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ dihydroflavonol reductase (DFR) (Quattrocchio *et al.*, 1999)

จากการศึกษาในข้าวโพด พบว่าโปรตีน bHLH และ MYB transcription factors สามารถกระตุ้นการถอดรหัสของยีนหลายตัวที่เข้ารหัสให้เอนไซม์ในวิธีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Roth *et al.*, 1991; Bodeau and Walbot, 1992; Lesnick and Chandler, 1998) เช่นเดียวกับในพืชใบเลี้ยงคู่ ที่มีการค้นพบโปรตีน bHLH ที่ควบคุมวิธีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ตัวอย่างเช่น โปรตีน DELILA ที่ทำหน้าที่ในการควบคุมสีที่ปรากฏในกลีบดอกของดอกลิ้นมังกร (Snapdragon) (Goodrich *et al.*, 1992) โปรตีน JAF13 และ AN1 ที่ควบคุมสีของดอกพิทูเนีย (Petunia) (Quattrocchio *et al.*, 1993, 1998, 2000) และโปรตีน

TT8 ที่ควบคุมการสร้างแอนโทไซยานินในต้นอ่อนของ *Arabidopsis* (Shirley *et al.*, 1995) และการสร้าง proanthocyanidin ในฝัก (siliques) (Nesi *et al.*, 2000)

ในปี ค.ศ. 1992 Lloyd และคณะ ได้ทำการส่งถ่ายยีน *Lc* ซึ่งเป็น bHLH ในข้าวโพดเข้าสู่ *Arabidopsis* พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณรงควัตถุแอนโทไซยานินและเพิ่มจำนวน trichomes ที่สร้างขึ้นในต้นอ่อนของ *Arabidopsis* ได้ นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษา ยีน *R* ซึ่งเป็น bHLH ที่ควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในข้าวโพดเช่นเดียวกันกับยีน *Lc* พบว่าสามารถแสดงออกได้ในพืชใบเลี้ยงคู่ เช่น *Arabidopsis*, พืชเนื้ย, ยาสูบ และมะเขือเทศได้ โดยทำให้เกิดการสะสมของรงควัตถุแอนโทไซยานินในพืชดังกล่าว (Lloyd *et al.*, 1992; Goldsbrough *et al.*, 1996; Bradley *et al.*, 1998) เช่นเดียวกันกับการแสดงออกของยีน *delila* ที่สามารถทำให้ปริมาณรงควัตถุแอนโทไซยานินเพิ่มขึ้นในต้นมะเขือเทศทั้งในส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อของลำต้น ใบ และดอก เมื่อทำการส่งถ่ายยีนดังกล่าวเข้าไปในพืชทั้งสองชนิด

จากการทดลองที่ได้กล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ว่าโปรตีนในกลุ่มของ bHLH หรือ MYC like proteins สามารถควบคุมการแสดงออกของยีนในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน การส่งถ่ายยีนที่เข้ารหัสให้โปรตีนในกลุ่มดังกล่าวเข้าสู่พืช สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการสร้างหรือการสะสมรงควัตถุแอนโทไซยานินในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของพืชได้ไม่ว่าจะเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวหรือพืชใบเลี้ยงคู่

ในเวลาต่อมามีรายงานการวิจัยต่างๆแสดงให้เห็นว่าการควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในพืชถูกควบคุมโดย Transcription factors 3 กลุ่มได้แก่ R2R3 Myb, basic helix-loop-helix (bHLH) และ WD40 โดย Transcription factors ทั้งสามนี้จะมารวมตัวกันเป็นโครงสร้างพิเศษและจะกระตุ้นการทำงานของยีนต่างๆในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Baudry *et al.*, 2004; Carey *et al.*, 2004; Morita *et al.*, 2006; Zimmermann *et al.*, 2004)

ในกลุ่มพืชชั้นสูง MYB transcription factor ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของ Super gene family โดยแบ่งออกเป็น 3 subfamilies ได้แก่ Myb1R, R2R3Myb และ Myb3R Myb domain ประกอบด้วยกรดอะมิโน 52 กรดอะมิโน ซึ่งจะไปจับกับดีเอ็นเอบริเวณที่จำเพาะเจาะจง ใน *Arabidopsis* นั้นพบว่ามีสมาชิกของ MYB transcription factor มากกว่า 100 ยีน ซึ่งในพืชและยีสต์จะพบ R2R3Myb เป็นส่วนใหญ่ และเป็นที่ทราบกันดีว่ากลุ่มของ R2R3Myb นั้นมีบทบาทควบคุมการสังเคราะห์รงควัตถุแอนโทไซยานิน (Martin and Paz-Ares 1997; Zhang *et al.*, 2000; Nesi *et al.*, 2001)

Transcription factor ในกลุ่ม basic helix-loop-helix (bHLH) เป็นกลุ่มที่พบมากที่สุดในพืชและสัตว์ (Riechmann *et al.*, 2000) โดย Transcription factor กลุ่มนี้จะมีบริเวณของ basic helix-loop-helix ซึ่งมีการระบุในสัตว์ว่าเป็นกลุ่มของ MycD และ Myc (Murre *et al.*, 1989)

WD40 โปรตีน ประกอบไปด้วย -propeller protein group โดยจะพบ กรดอะมิโน 40 อะมิโน ในบริเวณที่เรียกว่า glycine histidine (GH) dipeptide และ tryptophan-aspartate (WD) dipeptide จากการศึกษาพบว่าโปรตีน WD40 พบในเซลล์ยูคาริโอตเช่น สัตว์ พืช และฟังไจ

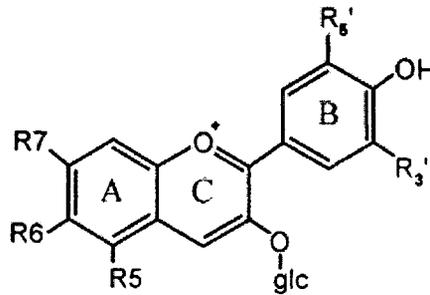
โดยจากการศึกษาต่างๆพบว่า Myb/bHLH/WD40-repeat model มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนต่างๆในวิถีสังเคราะห์แอนโทไซยานินในพืชหลายชนิดเช่น snapdragon (*Antirrhinum majus*) พิทูเนีย และ *Arabidopsis thaliana* (Mortier *et al.*, 2006; Quattrocchio *et al.*, 1999; Schwinn *et al.*, 2006; Spelt *et al.*, 2000; de Vetten *et al.*, 1997; Walker *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2003)

### โครงสร้างพื้นฐานของ flavonoids และ anthocyanins

โครงสร้างพื้นฐานของ flavonoids ประกอบไปด้วยคาร์บอนจำนวน 15 อะตอม (c6-c3-c6) ซึ่งมีวงแหวนอะโรมาติกสองวง (วงแหวน A และ B) ขนาบข้างวงแหวนวงกลางซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในรูปเฮเทอโรไซเคิล ยกเว้น chalcones และ dihydrochalcones (McIntosh *et al.*, 1990) การรวมของหมู่ไฮดรอกซิล, น้ำตาล, ออกซิเจน, หมู่เมทิล และอื่นๆ ที่ตำแหน่งคาร์บอนในระหว่างปฏิกิริยาตัดแปลง ทำให้เกิด flavonoids หลายชนิด เช่น flavones (apigenin และ lutein), flavonols (quercetin, myricetin และ kaempferol), flavonones (hesperetin และ naringenin), isoflavones (genistein และ daidzein) ส่วนโครงสร้างพื้นฐานของ anthocyanin นั้นประกอบไปด้วยโครงสร้างของ 2-phenylbenzopyrylium (flavylium) (Kuhnau, *et al.*, 1976) สารในกลุ่มของ anthocyanins มีประมาณ 200 หรือมากกว่า 200 ชนิด (Parkinson *et al.*, 1981) pelargonidin, cyanidin, delphinidin คือ anthocyanin ที่เกิดจากปฏิกิริยา hydroxylation, O-methylation, glycosylation และ acylation ซึ่ง anthocyanins เหล่านี้จะมีโครงสร้างที่คล้ายๆกัน ต่างกันที่วงแหวน B

Anthocyanins เป็นกลุ่มของรงควัตถุที่มีสีแดงไปจนถึงสีม่วงหรือสีน้ำเงิน (Mol *et al.*, 1998) เป็นรงควัตถุที่ละลายน้ำได้ ในพืชพบว่ามีโครงสร้างสารในกลุ่มของ anthocyanins มากกว่า 200 ชนิด (Liew *et al.*, 1998) รงควัตถุ anthocyanins จะมี flavan nucleus เป็นโครงสร้างหลัก แต่จะแตกต่างกันไปบ้างขึ้นอยู่กับ

กับ side chain ของ ring โดยเฉพาะตรงตำแหน่งของ B-ring ซึ่งเป็น ring ที่มี functional group ต่าง ๆ มาเกาะทำให้เกิดชนิดของ anthocyanins ที่แตกต่างกันไป (ภาพที่ 1) สามารถแบ่งออกได้เป็น 6 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ pelargonidin (ส้ม-แดง) cyanidin (แดง) peonidin (แดง - แดงเข้ม) delphinidin (ม่วงอ่อน - น้ำเงิน) petunidin (ม่วง - น้ำเงิน) และ malvidin (ม่วง) (Aida et al.,2000) ซึ่งแต่ละกลุ่มมีโครงสร้างที่ B-ring ต่างกัน

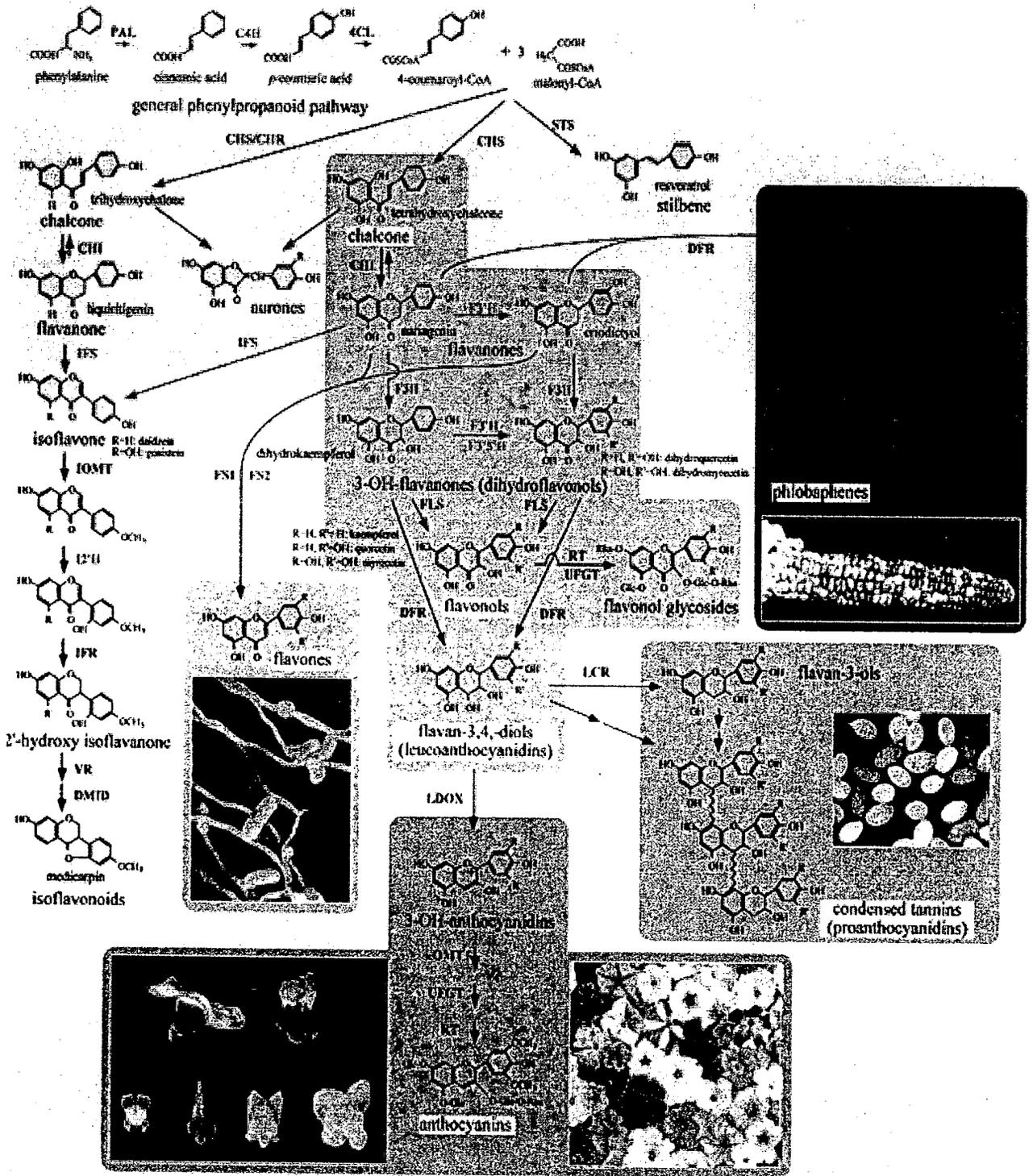


ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างพื้นฐานของ Flavonoids และ Anthocyanins

### ชีวสังเคราะห์ Anthocyanins

ชีวสังเคราะห์ anthocyanins (ภาพที่ 2) สามารถสรุปเป็นขั้นตอนได้โดยในขั้นตอนแรกจะเกิดการกระตุ้นให้มีการรวมตัวกันของ molonyl CoA 3 โมเลกุล และ *p*-coumaroyl CoA 1 โมเลกุล ด้วยเอนไซม์ chalcone synthase (CHS) ให้ผลผลิตเป็น naringenin chalcone ซึ่งมีสีเหลืองอ่อน ขั้นที่สองเป็นการเกิด isomerization ของ chalcone โดยการทำงานของเอนไซม์ chalcone isomerase (CHI) ให้ผลผลิตเป็น naringenin flavanone ซึ่งเป็นตัวกลางที่ไม่มีสี จากนั้นจะมีการเติมหมู่ไฮดรอกซี (OH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 โดยเอนไซม์ flavanone 3 - hydroxylase (F3H) ให้สารกลุ่ม dihydroflavonol คือ dihydrokaempferol (DHK) สารประกอบนี้อาจได้รับการเติมหมู่ไฮดรอกซี ที่ตำแหน่งต่างๆ เพิ่มเติม โดยการทำงานของเอนไซม์ flavonoid 3'- hydroxylase (F3' H) และ flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3' 5'H) และให้สารประกอบกลุ่ม dihydroflavonol ชนิดอื่นๆ ได้แก่ dihydroquercetin (DHQ) และ dihydromyricetin (DHM) จำนวนหมู่ไฮดรอกซีบนวงแหวน B-ring นี้มีบทบาทสำคัญต่อการกำหนดเฉดสีที่แตกต่างกัน สารในกลุ่ม dihydroflavonol ต้องการเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิดสำหรับเปลี่ยนเป็นสารมีสีกลุ่ม anthocyanins เริ่มจากการกระตุ้นการรีดิวซ์สารประกอบกลุ่ม dihydroflavonol ด้วยเอนไซม์ dihydroflavonol 4- reductase (DFR) และให้สารกลุ่ม leucoanthocyanidin ได้แก่ leucocyanidin, leucodelphinidin และ leucopelargonidin ซึ่งจะถูกรีดิวซ์, dehydration และ glycosylation ให้สาร

กลุ่ม anthocyanin ซึ่งให้เฉดสีแตกต่างกัน เช่น สีแดงของ cyanidin สีน้ำเงินของ delphinidin สีส้มของ pelargonidin นอกจากนี้ อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยปฏิกิริยาต่างๆ เพิ่มเติม เช่น glycosylation, methylation และ acylation และทำให้เกิดสีที่จำเพาะในพืชแต่ละชนิด สารประกอบ anthocyanin เหล่านี้ต้องการเอนไซม์ glutathione S-transferase (GST) และ transporters ซึ่งเรียกว่า glutathione pump สำหรับเคลื่อนย้ายสารจากไซโตพลาสซึมเข้าสู่แวคิวโอล



ภาพที่ 2 แสดงวิถีสังเคราะห์แอนโทไซยานิน (Anthocyanin biosynthesis pathway)

ที่มา [http://www.stanford.edu/group/dahlia\\_genetics/2008\\_reports/lab\\_5/lab\\_5\\_pics/flavonoid\\_biosynthesis.png](http://www.stanford.edu/group/dahlia_genetics/2008_reports/lab_5/lab_5_pics/flavonoid_biosynthesis.png)

จากวิถีสังเคราะห์ที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าในวิถีของการสังเคราะห์ anthocyanins มีเอนไซม์หลายชนิดที่เกี่ยวข้อง โดยเอนไซม์ที่สำคัญได้แก่ chalcone synthase (CHS) , chalcone-flavanone isomerase (CHI) , flavanone 3-hydroxylase (F3H) ; flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) ; flavonoid 3' , 5'-hydroxylase (F3' 5'H) ; dihydroflavonol-4-reductase (DFR) และ anthocyanin synthase (ANS) เอนไซม์ตามลำดับ ซึ่งในปัจจุบันยืนยันที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์เหล่านี้ถูกค้นพบและทำการศึกษากันแล้วในพืชหลายชนิด (Holton *et al.*, 1995) รวมทั้งมีรายงานถึงการประยุกต์ใช้ประโยชน์จากยีนดังกล่าวในการเปลี่ยนแปลงสีดอกไม้โดยวิธีทางพันธุวิศวกรรมด้วย ในการค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ anthocyanins นั้นมีรายงานการใช้วิธีการต่าง ๆ ที่ประสบผลสำเร็จ เช่น การใช้ homologous gene สามารถค้นหาโดยวิธี hybridization วิธีการเช่นนี้สามารถค้นหายีนที่ค่อนข้างมีบริเวณอนุรักษ์ (conserved) เช่น CHS Ueyama *et al.* (2002) สามารถแยกยีน flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) , flavonoid 3' , 5' - hydroxylase (F3' 5'H) และ flavone synthase II (FNSII) จากดอกสร้อยมยุรา โดยที่การสะสม anthocyanins หรือ flavonol เกิดจากหน้าที่ของเอนไซม์แต่ละตัวที่จะทำงานควบคุมซึ่งกันและกัน

### เอนไซม์สำคัญที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์ Anthocyanins

1. เอนไซม์ Chalcone synthase (CHS) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาในขั้นตอนการสร้าง Three acetate unit ซึ่งได้มาจาก malonyl -CoA 3 โมเลกุล รวมกับ p-coumaroyl 1 โมเลกุล ผลผลิตที่ได้คือ 2',4,4',6'-tetrahydroxychalcone (Holton *et al.*, 1995; Tanaka *et al.*, 1998)

ยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ CHS ถูกนำมาใช้ศึกษาทางพันธุวิศวกรรม และได้มีการทำ co-suppression ของยีนดังกล่าวเพื่อปรับปรุงสีของดอกไม้ให้เป็นสีขาว เนื่องจากจะทำให้ไม่มีการสังเคราะห์ flavonoids อย่างไรก็ตามการขัดขวางการสังเคราะห์ flavonoids สามารถทำให้เกิด pleiotropic เช่น ตัวผู้เป็นหมัน

2. เอนไซม์ Chalcones isomerase (CHI) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยา isomerization naringenin chalcones ทำให้เปลี่ยนเป็น flavonone naringenin (Holton *et al.*, 1995) ในพืชบางชนิดได้มีการศึกษาโดยทำให้เกิด mutation ของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ CHI เช่น เบญจมาศ คาร์เนชั่น ทำให้กลีบดอกมีสีเหลือง ใน Arabidopsis ทำให้เปลือกเมล็ดมีการเปลี่ยนสี (Forkmann and Heller , 1999) และยังพบว่าผิวมะเขือเทศมีการสร้าง naringenin chalcone ที่มีสีเหลือง (Muir *et al.*, 2001)

เอนไซม์ CHI มี 2 ชนิด คือ isomerizes 6'-hydroxyl เป็น 6'-deoxy chalcone และ เปลี่ยน 6'-hydroxy chalcone ไปเป็น flavonone

3. เอนไซม์ Flavonoid hydroxylase (F3H/F3'H/F3'5'H) เป็นเอนไซม์ กลุ่ม 2- oxoglutarate dependent dioxygenase มีการเติมหมู่ hydroxyl ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของ flavonone ทำให้เปลี่ยนเป็น dihydroflavonone ซึ่งได้มีการทดลองในพืชหลายชนิด ได้แก่ petunia snapdragon tomato และ maize (Britsch *et al.*, 1993) โดยมีการทำให้เกิด mutation ของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ F3H มีผลทำให้เอนไซม์ F3H ไม่ทำงาน ซึ่งพบว่าเป็นสาเหตุให้ทั้ง petunia และ Antirrhinum ไม่มีการสร้างแอนโทไซยานิน ทำให้กลีบดอกสีขาว (Martin *et al.*, 1991 ; Britsch *et al.*, 1992)

4. เอนไซม์ Dihydroflavonol 4-reductase (DFR) กระตุ้นการเกิดรีดิวซ์ dihydroflavonol ทำให้ได้สารกลุ่ม leucoanthocyanidin (flavan-3,4-diol) โดยใช้ NADH เป็นโคแฟกเตอร์ (Kristainsen and Rohde , 1991 ) สาร leucoanthocyanidin นี้ จะเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ anthocyanin และนอกจากนี้ยังเป็นสารตั้งต้นในการผลิต catechins และ PA ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

5. เอนไซม์ anthocyanidin synthase (ANS) เร่งปฏิกิริยาสารกลุ่ม leucoanthocyanidin ไปเป็นสาร anthocyanidin ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ 2-oxoglutarate dependent dioxygenase และมีลักษณะคล้ายกับเอนไซม์ F3H และ FLH (Martin *et al.*, 1991 ; Tanaka *et al.*, 1998) ได้มีการศึกษายีน ANS พบว่า ในพืชหลายชนิด ได้แก่ Arabidopsis , Antirrhinum , petunia , *Vitis vinifera* และ maize พบว่าเมื่อเอนไซม์ ANS ถูกทำให้เกิด mutation ก็จะมีผลต่อการแสดงออกของยีน ANS ในพืชเหล่านี้ ซึ่งจะส่งผลต่อกระบวนการสังเคราะห์ anthocyanin ต่อไป

6. เอนไซม์ Flavonoid 3-O-glucosyltransferase (3GT) ในธรรมชาติ Flavonoid และ anthocyanin จะไม่มีหมู่ hydroxyl ที่ heterocyclic ring ตำแหน่งที่ 3 (Forlman and Heller , 1999 ) ดังนั้นเอนไซม์ UDP-glucose flavonoid 3-O -glucosyltransferase จะทำการย้ายกลูโคสจาก UDP-glucose ไปยังหมู่ hydroxyl เพื่อทำให้สีมีความสามารถละลายน้ำได้ในแวคิวโอล

ดังนั้นเอนไซม์ 3GT จึงถือเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์ anthocyanin จากการทำให้เกิด mutation ของยีน 3GT พบว่าการทำงานของเอนไซม์ DFR และเอนไซม์ ANS ลดลง และ

การทำงานของเอนไซม์ 3GT ก็ลดลงเช่นกันแสดงว่า ยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ anthocyanin ในขั้นตอนสุดท้ายมีกลไกการควบคุมร่วมกัน (Hrazdina and Wagner, 1985; Hrazdina and Jensen; 1992)

การเกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่ hydroxyl ที่ B-ring ทำให้ได้สารสี anthocyanin 3 ชนิดที่แตกต่างกันทางด้านลักษณะของสี ได้แก่

- Pelargonidin 3-glucoside ทำให้เกิดเป็นสีส้ม , ชมพู หรือ แดง
- Cyaniding 3-glucoside ทำให้เกิดสีแดง หรือ แดงเข้ม
- Delphinidin 3-glucoside ทำให้เกิดสีน้ำเงิน หรือ ม่วง (Zucker *et al.*, 2002)

### การควบคุมรูปแบบของการเกิดสี

พืชจะมีรูปแบบการเกิดสีซึ่งเกิดจากการสะสมของ anthocyanins ที่เซลล์จำเพาะ การควบคุมชีวสังเคราะห์ anthocyanins จะควบคุมที่ระดับการถอดรหัสยีนเป็นส่วนใหญ่ ยีนที่เกี่ยวข้องกับชีวสังเคราะห์ anthocyanins แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มของยีนโครงสร้างซึ่งทำให้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาชีวเคมี การสร้างสาร anthocyanins และกลุ่มของยีนควบคุม จะให้โปรตีนซึ่งกำหนดการแสดงออกของยีนโครงสร้างและรูปแบบของการสะสมเม็ดสี โดยการแสดงออกของยีนควบคุม จะมีรูปแบบที่จำเพาะต่อรูปแบบของการเกิดสี (Holton T.A. และ Cornish E.C. 1995) ถึงแม้ว่าในพืชหลายชนิดจะมีความแตกต่างทางพันธุกรรม แต่ก็พบว่ายีนโครงสร้าง และยีนควบคุมซึ่งทำหน้าที่เดียวกัน ในชีวสังเคราะห์ anthocyanins นั้น จะมีบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ร่วมกัน และยีนเหล่านี้ยังถูกกระตุ้นการแสดงออกด้วยแสง การศึกษาถึงการควบคุมชีวสังเคราะห์ anthocyanins โดยเฉพาะเทคนิคการกลายพันธุ์ นั้นพบว่าการควบคุมชีวสังเคราะห์ นี้ส่วนใหญ่เกิดจากการทำงานร่วมกันของยีนควบคุม ในการกำหนดรูปแบบการแสดงออกของยีนโครงสร้าง

มีการจำแนก ยีนควบคุมชีวสังเคราะห์ anthocyanins ในพืชหลายชนิด เช่นในข้าวโพดพบว่ามียีนควบคุม 2 กลุ่ม คือ *r* และ *cl* ซึ่งควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้างในเนื้อเยื่อต่างๆ สมาชิกของยีนในกลุ่ม *r* (*r*, *lc*, *sn*, *b*) จะถอดและแปลรหัสให้โปรตีนซึ่งมีกรดอะมิโนที่เป็นกรดที่ปลาย N จำนวนมาก และที่ปลาย C มีส่วนของ basic helix-loop-helix (bHLH) ทำหน้าที่จับกับ DNA (DNA binding domain) ในขณะที่สมาชิกของกลุ่ม *cl* (*cl* และ *pl*) จะถอดและแปลรหัสให้โปรตีนซึ่งมีโดเมน MYB ที่มีส่วนของ helix-turn-helix สำหรับจับกับ DNA ในข้าวโพดจะมีสองกลุ่มนี้หลายยีน แต่มีรูปแบบการแสดงออกที่แตกต่างกันไป (Ludwig and Wessler 1990), (Cone *et al.*, 1993) กลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนในชีวสังเคราะห์นี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่มีรายงานการทำงานของยีนควบคุมในการควบคุมการแสดงออกที่เหนือโปรโมเตอร์ของ DFR (Grotewold *et al.*, 1994), (Sainz *et al.*, 1997)

## 2. วัสดุและอุปกรณ์

### 2.1 ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการวิจัย

- ข้าวหอมมะลิ 105 สายพันธุ์ปกติ
- ข้าวหอมมะลิ 105 พันธุ์กลายสายพันธุ์ BKOS
- ยาสูบ (Tobacco)
- พืชเนี่ย

### 2.2 สารเคมี

1. Liquid nitrogen
2. TRIZOL<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen)
3. RevertAid<sup>™</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit (Ferment, U.S.A.)
4. QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction Kit (QIAGEN Inc.)
5. Inst/Aclone<sup>™</sup> PCR Product Cloning Kit (Fermentus, U.S.A)
6. Sodium chloride (NaCl)
7. Ethylenediaminetetra acetic acid (EDTA)
8. Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris)
9. Chloroform
10. Isopropanal
11. Ethyl alcohol (EtOH)
12. RNaseONE<sup>™</sup> ribonuclease (Promega, U.S.A.)
13. PCR buffer (Fermentas, U.S.A.)
14. Magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub>) (Invitrogen ,BRAZIL)
15. Deoxyribonucleotide triphosphate mix (dNTPs) (Fermentas, U.S.A.)
16. Primers (Primer ; Operon Technology, Alamada, U.S.A.)
17. Platinum<sup>®</sup> Taq DNA polymerase (Invitrogen ,BRAZIL)
18. GeneRuler<sup>™</sup> 100bp DNA Ladder (Fermentas, U.S.A.)
19. Amplicilin
20. Glycerol oil
21. pJET<sup>™</sup> Vector (Fermentas, U.S.A)
22. T4 DNA Ligase (Sigma, U.S.A.)
23. Ligase Buffer (Promega, U.S.A)

24. Deionize H<sub>2</sub>O (dH<sub>2</sub>O)
25. Hydrochloric acid (HCl)
26. Sodium hydroxide (NaOH)
27. Sodium dodecyl sulfate (SDS)
28. Potassium acetate
29. Bromophenol blue
30. Xylene cyanol FF
31. Sucrose
32. Boric acid
33. Tris base
34. Ethidium bromide
35. Agarose
36. Agar
37. Tryptone
38. Yeast extract
39. Dideoxyribonucleotide triphosphate (d/ddNTPs) (Promega, U.S.A.)
40. Ultrapure water
41. DNA sequencing Taq DNA polymerase (Promega, U.S.A.)
42. DNA Sequencing Stop Solution (Promega, U.S.A.)
43. Acrylamide
44. N,N'-methylene-bisacrylamide (Bis)
45. Urea
46. 3-(Trimethoxysilyl),propylmethacrylate (Bind Silane) (sigma, U.S.A.)
47. Clear view ( Dietham Trading Co.,Ltd, Thailand)
48. Ammonium persulphate (APS)
49. N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine(TEMED)(BIO-RAD, U.S.A)
50. Glacial acetic acid
51. Silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>)
52. 37% Formaldehyde (HCOH)
53. Sodium carbonate (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)
54. Sodium thiosulfate (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)

55. 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (X-gal)
56. Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG)  
N,N' -dimethyl-formamide

### 2.3 เครื่องมือวิทยาศาสตร์

1. เครื่องฆ่าเชื้อหรือตะเกียงแอลกอฮอล์
2. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) ที่ 37 องศาเซลเซียส (Memmert, Germany)
3. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
4. Adjustable automatic pipette และ white, yellow และ blue tip
5. Eppendorf tube ขนาด 1.5 ml ,Multi Ultra PCR tube (Sorenson<sup>TM</sup> Bioscience, Inc., U.S.A.) และ centrifuge tube
6. เครื่อง DNA Thermal Cycler (ThermoHybaid PCR Sprint, UK)
7. ชุดอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ชนิดแวนอน (BIO-RAD, U.S.A.)
8. ชุดอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ชนิดแวนอนตั้ง (Sequi-Gen<sup>®</sup> GT, Sequencing cell ; (BIO-RAD, U.S.A.)
9. เครื่องจ่ายกระแสไฟ (power supply ; (BIO-RAD, U.S.A.)
10. เครื่องถ่ายภาพดีเอ็นเอโดยแสง UV (UV transilluminator, BIO-RAD, U.S.A.)
11. เครื่องวัดค่าการดูดแสง (Spectrophotometer)
12. เครื่องปั่นหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge)
13. เครื่องเขย่า (shaker)
14. เครื่องอบเครื่องแก้ว (hot air oven)
15. เครื่องทำความเย็น (freezer) ได้แก่ 4°C, -20°C และ -80 °C
16. เครื่องปรับอุณหภูมิด้วยน้ำ (water bath)
17. เครื่อง electroporater
18. คิวเวต (cuvette)
19. เครื่องผสม (vortex)
20. เครื่องชั่งแบบละเอียด (analytical balance)
21. เตาไมโครเวฟ (microwave)
22. เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)
23. ถังบรรจุไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank)

24. ชุดโคร่งบดตัวอย่าง (mortar and pestle)
25. เครื่องแก้วต่าง ๆ ได้แก่ บีกเกอร์ขนาดต่าง ๆ (beakers) ขวดรูปชมพู่ (flasks) กระบอกตวง (cylinder) ปิเปต (pipettes) แท่งแก้วคนสาร (stirrer) เพลท (plate) spreader ฯลฯ
26. วัสดุอื่น ๆ ได้แก่ ซ้อนดักสาร กระดาษขังสาร กระดาษติดฉลาก กระดาษเทปใส กระดาษทิชชู กระดาษเช็ดกระจก (Kimwipe<sup>®</sup> tissue) ฟลอยด์อะลูมิเนียม ถุงพลาสติกใสชนิดทนร้อน กระดาษพาราฟิล์ม ปากคีบ ถุงมือ กล่องโฟม มีดคัตเตอร์ กรรไกร ภาดพลาสติกกันชื้น ฯลฯ
27. กล้องดิจิทัล

### 3. วิธีการทดลอง

#### การโคลนยีน MYC transcription factors จากข้าวหอมมะลิพันธุ์กล้วย BKOS

##### 1. การเตรียม Total RNA จากใบข้าวหอมมะลิโดยวิธีของ Van Derstaeten et al., 1977

- นำตัวอย่างใบข้าวที่บดละเอียด 50-100 มิลลิกรัม ใส่ใน eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี RNA extraction buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และนำไปผสม (vortex) ให้เข้ากัน
- เติม phenol chloroform (1:1 , v/v) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับไปมาให้เข้ากันประมาณ 10 ครั้ง จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที
- นำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และดูเอาเฉพาะส่วนใสด้านบน (supernatant) ใส่หลอดใหม่
- เติม phenol chloroform (1:1 , v/v) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับไปมาให้เข้ากันประมาณ 10 ครั้ง จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที
- นำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และดูเอาเฉพาะส่วนใสด้านบน (supernatant) ใส่หลอดใหม่
- เติม chloroform ปริมาตร 400 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับไปมาให้เข้ากันประมาณ 10 ครั้ง จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที
- นำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และดูเอาเฉพาะส่วนใสด้านบน (supernatant) ใส่หลอดใหม่
- เติม Ethanol ปริมาตร 1188 ไมโครลิตร (ภาคผนวก) แล้วเติม 0.3 M NaOAc (ภาคผนวก) ปริมาตร 62.5 ไมโครลิตร (ภาคผนวก) พลิกหลอดกลับไปมาให้เข้ากันประมาณ 10 ครั้งและนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

- นำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเทสารละลายทิ้ง ให้เหลือเพียงตะกอนอาร์เอ็นเอก้อนหลุดเท่านั้น
- เติมน้ำกลั่น (ผ่านการฆ่าเชื้อเป็นเวลา 40 นาที) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร (ภาคผนวก) พลิกหลอดกลับไปมาให้เข้ากันประมาณ 10 ครั้ง จากนั้นเติม 8 M LiCl และนำไปแช่ไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- นำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเทสารละลายทิ้ง ให้เหลือเพียงตะกอน RNA ก้อนหลุดเท่านั้น
- เติม 70 เปอร์เซ็นต์ EtOH ปริมาตร 200 ไมโครลิตร
- นำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที และเทส่วนใสด้านบน (supernatant) ทิ้ง ให้เหลือเพียงตะกอน RNA ก้อนหลุดเท่านั้น
- นำตะกอนอาร์เอ็นเอมาทำให้แห้งโดยวิธี air dry ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที จากนั้นละลายตะกอนอาร์เอ็นเอในน้ำที่ปราศจาก RNase (Rnase-free water) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร
- ตรวจสอบอาร์เอ็นเอทั้งหมดด้วยวิธี Agarose Gel electrophoresis

## 2. การสังเคราะห์ First Strand cDNA (RevertAid™ First Strand cDNA Kit, Fermentas, U.S.A)

เตรียมสารละลายปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงใน eppendorf tube ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยอาร์เอ็นเอทั้งหมด 0.1-5 ไมโครกรัม , oligo (dT)<sub>18</sub> primer 0.5 ไมโครกรัม และ deionized water ให้ครบ 12 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบา ๆ แล้วนำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปแช่บนน้ำแข็งแล้วเติม 1x reaction buffer, RiboLock™ Ribonuclease Inhibiter (20 Unit/reaction) , 10 mM dNTPs Mix , RevertAid™ M-MuLVReverse Transcriptase (200 Unit/reaction) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยความร้อนที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และเก็บ First Strand cDNA ที่ -20 องศาเซลเซียส

ทำการตรวจสอบคุณภาพของ First Strand cDNA ที่เตรียมได้ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Actin จากนั้นจึงนำไปตรวจสอบด้วย Agarose Gel electrophoresis

### 3. การโคลน Transcription Factor genes MYC ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์รงควัตถุแอนโทไซยานินจากข้าวหอมมะลิพันธุ์กลาย BKOS

#### 3.1 การออกแบบไพรเมอร์

ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในการโคลนยีน MYC ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์รงควัตถุแอนโทไซยานิน โดยออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ (Conserve Domain) ของยีน MYC ของพืชชนิดต่างๆ ในฐานข้อมูล GenBank ได้แก่ ข้าว (R-type basic helix-loop-helix protein [Plw-OSB2]), ข้าวโพด (Regulatory protein [B-Peru], SN protein, Anthocyanin regulatory R-S protein [R-S], Anthocyanin regulatory LC protein [lc1] ) โดยออกแบบในลักษณะ Degenerated primers ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยา PCR แล้ว คาดว่าจะได้ชิ้นส่วนของยีน MYC ที่มีขนาดประมาณ 351 คู่เบส โดยลำดับเบสของ Primers แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงรายชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการแยก MYC transcription factor gene จากข้าวพันธุ์กลาย BKOS ด้วยเทคนิค RT-PCR

รายชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5' → 3'
degenerate primer (forward primer)	5' – GGNGCCGYCTTNCTGCRGCTG– 3'
degenerate primer (reward primer)	5' – RTYACTWCTTCTNCAGACGA– 3'

#### 3.2 การทำปฏิกิริยา RT-PCR

##### องค์ประกอบในปฏิกิริยา PCR

เตรียมสารละลายปริมาตร 20 ml ลงใน eppendorf tube ขนาด 0.2 ml ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

- 10x buffer 2.0 µl of 10X
- Mgcl<sub>2</sub> 1.2 µl of 25 mM
- First strand cDNA (DNA Template) 50 ng

- primer (Primer ; Operon Technology, Alamada, U.S.A.)
  - MYC forward 0.5µl of 20 pMol
  - MYC reward 0.5µl of 20 pMol
- 10 mM dNTP 2.5 µl of 10 mM
- *PfxTaq* DNA polymerase (Invitrogen) 2 unit
- dH<sub>2</sub>O ได้ปริมาตร 20 µl

เงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR (PCR condition) ในเทคนิค RT-PCR

ตารางที่ 2 แสดงเงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR ในเทคนิค RT-PCR เพื่อแยกดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 คู่เบส

อุณหภูมิ	94 °C	94 °C	55 °C	72 °C	72 °C	4 °C
ระยะเวลา	2 min	30 sec	30 sec	1 min	5 min	forever
จำนวนรอบ						

### 3.3 การวิเคราะห์โดย Agarose electrophoresis

- เตรียม agarose ความเข้มข้น 1.4 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่ง agarose ผสมลงใน 1 x TBE buffer (ภาคผนวก) แล้วนำไปต้มจน agarose ละลายตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส
- ทำความสะอาดถาดเจล และหัวเสียบ (comb) ให้สะอาดด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ ethanol แล้วนำถาดเจลไปประกอบเข้ากับบล็อก
- วางหัวเสียบลงที่ปลายด้านหนึ่งของถาดเจล เพื่อให้เกิดช่องเล็กๆ สำหรับหยอดสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ

- เท agarose ลงในภาตเจลที่เตรียมไว้โดยให้แผ่น agarose มีความหนาประมาณ 3-5 มิลลิเมตร ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว
- เททับผิวหน้าของเจลด้วย 1 x TBE buffer เพื่อไม่ให้เจลแห้ง และสะดวกต่อการดึงหัวเสียบออก
- นำภาต agarose gel ออกจากบล็อกลแล้ววางภาตลงในอ่าง electrophoresis โดยให้ด้านที่หัวเสียบอยู่ทางซ้าย
- เท 1 x TBE buffer ลงในอ่างให้ท่วมแผ่น agarose gel โดยให้ระดับ 1 x TBE buffer อยู่เหนือผิวเจลประมาณ 1-3 มิลลิเมตร
- ผสม 1 x loading buffer (ภาคผนวก) กับสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ และดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) ให้เข้ากัน ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลาย แล้วค่อยๆ หยดลงในช่องของ agarose gel
- ปิดฝาอ่าง electrophoresis แล้วต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า แล้วปล่อยกระแสไฟฟ้า โดยให้กระแสไฟฟ้าวิ่งจากซ้ายไปขวา ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 50 นาที หรือเมื่อแถบสีล่างของ loading buffer เคลื่อนที่ไปอยู่อีกปลายด้านหนึ่งของเจลโดยห่างจากด้านล่างภาตประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วจึงปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
- ย้อมดีเอ็นเอโดยนำแผ่น agarose gel ไปแช่ใน EtBr นาน 10 นาที จากนั้นย้ายไปแช่น้ำอีก 5 นาที เพื่อล้าง EtBr ส่วนเกิน
- นำแผ่น agarose gel ไปตรวจดูแบนดีเอ็นเอด้วย UV transilluminator พร้อมกับบันทึกภาพไว้
- ตัดแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการโดยดูขนาดเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน เก็บไว้ใน eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาแยกเอาดีเอ็นเอออก (elute)

3.4 การ clone ชิ้นส่วน MYC transcription factor gene (Inst/Aclone™ PCR Product Cloning Kit, Fermentus, U.S.A)

#### 3.4.1 องค์ประกอบในปฏิกิริยาการเชื่อม (ligation)

เตรียมสารละลายปริมาตร 30 ไมโครลิตร ประกอบด้วย plasmid vector pTZ57/7™ (ภาคผนวก) 0.165 ไมโครกรัม, purified PCR fragment 0.54 พิโคโมล, 1x ligation, PEG 4000 solution, T4 DNA ligase 5 Unit และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย deionized water จากนั้นบ่มที่ 22 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง

#### 3.4.2 Transformation โดยใช้ The TransformAid™ Bacterial Transformation System

- เตรียม *E.coli* สายพันธุ์ DH5- $\alpha$  โดยเลี้ยงเซลล์ใน TransformAid™ C-Medium ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง
- เติมน้ำเกลือที่เรียกว่าที่เลี้ยง 12 ชั่วโมง ปริมาตร 1/10 ของ TransformAid™ C-Medium จากนั้นบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
- บ่ม LB-Ampicillin/X-gal agar plate ที่ 37 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 20 นาที
- เตรียม TransformAid™ T-Solution โดยการผสม T-solution (A) กับ T-solution (B) ใน ปริมาตร 1:1 จากนั้นเก็บ TransformAid™ T-Solution ไว้บนน้ำแข็ง
- เก็บเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ 20 นาที โดยใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และนำไป centrifuge ที่ความเร็วสูงสุด 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
- ทิ้งส่วนใสและ resuspend ตะกอนเซลล์ด้วย TransformAid™ T-Solution ปริมาตร 300 ไมโครลิตร จากนั้นวางบนน้ำแข็งนาน 5 นาที
- centrifuge เซลล์อีกครั้งที่ความเร็วสูงสุด 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทิ้งส่วน ใส
- resuspend ตะกอนเซลล์ด้วย TransformAid™ T-Solution ปริมาตร 120 ไมโครลิตร จากนั้นวางบนน้ำแข็งนาน 5 นาที
- เตรียม ligation mixture โดยแบ่งใส่ eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 15 ไมโครลิตร และวางบนน้ำแข็งนาน 2 นาที
- เติมน้ำที่แขวนลอยปริมาตร 60 ไมโครลิตร ในแต่ละหลอดของ ligation mixture จากนั้น วางบนน้ำแข็งนาน 5 นาที

- Spread Plate เซลล์บน LB-Ampicillin/x-gal agar plate ที่อุณหภูมิ 37°C จากนั้นบ่มเซลล์ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง

### 3.5 การตรวจสอบแบคทีเรียที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA)

#### 3.5.1 การแยกพลาสมิดโดยวิธี Alkaline (Maniatis et., al 1982)

- เลือกโคโลนีสีขาวจาก LB-Ampicillin/x-gal agar plate โดยเลี้ยงใน LB- Ampicillin both ที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่านาน 12 ชั่วโมง
- นำเชื้อ 1.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในไมโครทิว ปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทิ้งส่วนใสเก็บเฉพาะตะกอนเซลล์
- นำตะกอนเซลล์มาเติม solution I (ภาคผนวก) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร vortex ให้เข้ากัน จากนั้นเติม solution II (ภาคผนวก) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และกลับหลอดไปมาเบา ๆ 4 ครั้ง และเติม solution III (ภาคผนวก) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันเบา ๆ จะเห็นตะกอนสีขาว ๆ เกิดขึ้น แช่ต่อในน้ำแข็งอีก 10 นาที
- นำไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อแยกตะกอนทิ้ง เก็บส่วนใสมาเติมด้วย absolute ethanol ที่เย็น ปริมาตร 2 เท่าของน้ำใส
- ผสมให้เข้ากันนำไปแช่ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และแยกเอาตะกอน พลาสมิดมาละลายด้วย 0.05 โมล Tris, 0.1 โมล NaOAc (pH 8)
- เติม absolute ethanol ที่เย็น 2 เท่าของปริมาตรน้ำใส เขย่าให้เข้ากันนำไปไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศา-เซลเซียส นาน 10 นาที
- ทิ้งส่วนใส และนำตะกอนพลาสมิดล้างด้วย 70 % ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาปั่นที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที
- นำตะกอนพลาสมิดมาทำให้แห้งโดยวิธี air dry แล้วละลายด้วย TE ปริมาตร 20 ไมโครลิตร
- ตรวจสอบพลาสมิดโดยการทำ agarose gel electrophoresis
- ตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดด้วยเทคนิค PCR

3.6. หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing) ของชิ้นส่วนMYC transcription factor gene ที่แยกได้

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing) ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แยกได้เบื้องต้น โดยทำการส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing) ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd (604911-x) No. 23 Jalan U1/19, HICOM Glenmarie Industrial Park 40150 Shah Alam, Selangor Darul Ehsan, Malaysia

#### 4. การโคลนชิ้นส่วน WD-40 transcription factor gene โดยเทคนิค cDNA Fingerprint

4.1 เตรียม Total RNA จากใบอ่อนของข้าวหอมมะลิ 105 และ ข้าวหอมมะลิพันธุ์กลายสายพันธุ์ BKOS และเปลี่ยนเป็น 1<sup>st</sup> cDNA ตามวิธีการในข้อ 1 และ 2

4.2 ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ primers แบบสุ่มขนาด 10 คู่เบสจากบริษัท Operon โดยใช้ DNA template จากข้อ 4.1 โดยทำการเปรียบเทียบลายพิมพ์ DNA ระหว่างข้าวพันธุ์ปกติและข้าวพันธุ์กลาย

4.3 คัดเลือกแถบ DNA ที่แตกต่างกันระหว่างข้าวทั้งสองสายพันธุ์ และทำการโคลนเพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อ

#### 5. การโคลน Full length ของ MYC และ WD40 transcription factor gene โดยเทคนิค 5'RACE และ 3'RACE (Takara)

5.1 เตรียม Total RNA และ 1<sup>st</sup> cDNA จากใบข้าวพันธุ์กลายสายพันธุ์ BKOS ตามวิธีการในข้อ 1 และ 2

5.2 ออกแบบ Primers ที่ใช้ในการทำโคลนชิ้นส่วนของยีน MYC และ WD40 ทั้งด้านปลาย 5' และ 3' ตามวิธีการจากบริษัท Takara (ภาคผนวก) โดยใช้ลำดับเบสที่ได้จากชิ้นส่วนของยีน MYC ที่โคลนได้

5.3 ทำ 1<sup>st</sup> Amplification และ 2<sup>nd</sup> Amplification ด้วยปฏิกิริยา PCR ตามวิธีการจากบริษัท Takara

5.4 ตรวจสอบผลด้วย Agarose gel electrophoresis

5.5 ทำการแยกชิ้นส่วนของยีน MYC ออกจาก Agarose gel และโคลนชิ้นส่วนดังกล่าวเข้าพลาสมิด pTZ57R/T (Fermentas) เพื่อทำการหาลำดับเบสต่อไป

5.6 วิเคราะห์ลำดับเบสที่ได้กับฐานข้อมูล GenBank เพื่อยืนยันความถูกต้อง

## 6. การสร้างพลาสมิดเพื่อตรวจสอบหน้าที่ของยีน MYC และ WD-40 Transcription factor

เพื่อศึกษาหน้าที่ของ MYC gene ที่โคลนได้ ผู้วิจัยได้ทำการโคลนชิ้นส่วนของ MYC gene เข้าสู่พลาสมิดเวกเตอร์ pSTART ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น Binary vector โดยยีนหรือชิ้นส่วนของยีนที่โคลนเข้าสู่พลาสมิดนี้จะถูกควบคุมการแสดงออกในระดับการ Transcription ด้วย 35S promoter ที่ถูกดัดแปลงให้สามารถกระตุ้นการ Transcription ได้ดีกว่าปกติ โดยในการทดลองนี้ได้ทำการโคลนชิ้นส่วนของ MYC gene ในทิศทาง Antisense (pSTART-antiMYC), Sense (pSTART-MYC) และ โคลนร่วมกับ WD40 (pSTART-MYC-WD40)

## 7. การส่งถ่ายยีนเข้าสู่ข้าว พืชเนย และยาสูบ ด้วยเทคนิค Agrobacterium Transformation

### ข้าว

1. ทำการชักนำข้าวพันธุ์กลายสายพันธุ์ BKOS ให้เกิดเป็นแคลลัสโดยทำการเพาะเลี้ยงข้าวในสภาพปลอดเชื้อบนอาหารแข็งสูตร LS ดัดแปลง ที่มี 2,4-D 2 mg/l เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส โดยเลี้ยงในสภาพที่ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวันและอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน
2. นำเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* ที่มีพลาสมิด pSTART-antiMYC โดยทำการเลี้ยงในอาหารเหลว LB-medium ที่มี 50 mg/l Rifampicin + 100 mg/l Kanamycin เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
3. ละลายเซลล์ของ *Agrobacterium* ในอาหารสูตร MS ปริมาตร 20 ml แล้วนำไปเขย่าที่ 150 rpm ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3- 5 ชั่วโมง นำสารละลายเซลล์มาวัดค่า OD โดยให้ได้ค่าประมาณ 0.1 – 0.2
4. นำแคลลัสของข้าวมาทำให้เกิดบาดแผล จากนั้นนำมาแช่ในสารละลายเซลล์ โดยเขย่าที่ 100 rpm ที่อุณหภูมิห้อง
5. นำชิ้นส่วนแคลลัสมาซับด้วยกระดาษกรองฆ่าเชื้อแล้วเป็นเวลา 2-3 นาที นำชิ้นส่วนแคลลัสมาเลี้ยงบนอาหาร LS + AS (Coculture medium) เป็นเวลา 2 วันในที่มืด
6. นำชิ้นส่วนที่เลี้ยงไว้มาล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 50 ml + 500 mg/l Cefotexime 3-5 ครั้ง นาน 30 นาที เพื่อกำจัดเชื้อ *Agrobacterium* ส่วนเกิน
7. นำชิ้นส่วนพืชมาซับด้วยกระดาษทิชชูฆ่าเชื้อ จากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหาร LS + 500 mg/l Cefotexime + 50 mg/l Kanamycin (Selective medium) ที่มีฮอร์โมน BAP (0.5 mg/l) + IAA (0.2 mg/l) เพื่อชักนำให้เกิดต้น

### พิทูเนีย

1. นำเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* ที่มีพลาสมิดที่ต้องการส่งถ่าย โดยทำการเลี้ยงในอาหารเหลว LB-medium ที่มี 50 mg/l Rifampicin + 100 mg/l Kanamycin เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
2. นำเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* 1 ml มาเลี้ยงในอาหาร LB medium 20 ml ที่มี 50 mg/l Rifampicin + 100 mg/l Kanamycin + AS เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 150 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. บั่นเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 6,000 g เป็นเวลา 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส
4. ละลายเซลล์ของ *Agrobacterium* ในอาหารสูตร MS ปริมาตร 20 ml แล้วนำไปเขย่าที่ 150 rpm ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3- 5 ชั่วโมง นำสารละลายเซลล์มาวัดค่า OD โดยให้ได้ค่าประมาณ 0.1 – 0.2
5. นำชิ้นส่วนใบของต้นพิทูเนีย มาทำให้เกิดบาดแผลโดยการใช้มีดตัดเนื้อเยื่อให้เป็นสี่เหลี่ยม หลังจากนั้นนำมาแช่ในสารละลายเซลล์ โดยเขย่าที่ 100 rpm ที่อุณหภูมิห้อง
6. นำชิ้นส่วนพืชมาซบด้วยกระดาษกรองมาเชื้อแล้วเป็นเวลา 2-3 นาที นำชิ้นส่วนพืชมาเลี้ยงบนอาหาร MS + AS (Coculture medium) เป็นเวลา 2 วันในที่มืด
7. นำชิ้นส่วนที่เลี้ยงไว้มาล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 50 ml + 500 mg/l Cefotexime 3-5 ครั้ง นาน 30 นาที เพื่อกำจัดเชื้อ *Agrobacterium* ส่วนเกิน
8. นำชิ้นส่วนพืชมาซบด้วยกระดาษทิชชูฆ่าเชื้อ จากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหาร MS + 500 mg/l Cefotexime + 50 mg/l Kanamycin (Selective medium) ที่มีฮอร์โมน BAP + NAA เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสและชักนำให้เกิดยอด เป็นเวลา 3 สัปดาห์และ Sub-culture ทุกๆ สัปดาห์
9. หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหารชักนำให้เกิดราก (MS + 500 mg/l Cefotexime + 50 mg/l Kanamycin) ที่มีฮอร์โมน NAA (root medium)

### ยาสูบ

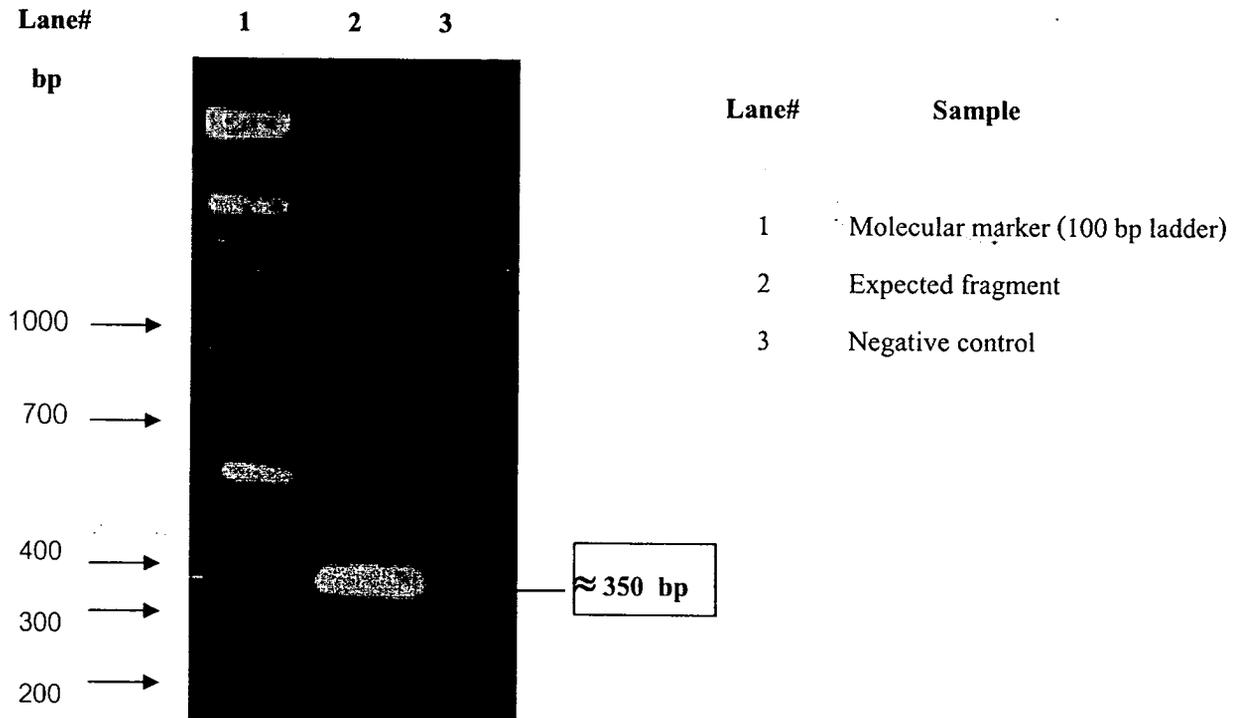
1. เตรียมเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* ที่มีพลาสมิดที่ต้องการส่งถ่าย โดยทำการเลี้ยงในอาหารเหลว LB-medium เลี้ยงเชื้อจนสารละลายของเชื้อสามารถวัดค่า OD ประมาณ 0.5 – 1.0
2. นำชิ้นส่วนใบของยาสูบที่ทำให้เกิดบาดแผลแล้วแช่ในสารละลายเซลล์โดยเขย่าที่ 100 rpm ที่อุณหภูมิห้อง
3. นำชิ้นส่วนพืชมาซบด้วยกระดาษทิชชูฆ่าเชื้อ แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหาร MS+AS (Coculture medium) เป็นเวลา 3 วันในที่มืด

4. นำชิ้นส่วนที่เลี้ยงไว้มาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 100 ml 4 ครั้ง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 50 ml + 500 mg/l Cefotaxime 5 นาที เพื่อกำจัดเชื้อ Agrobacterium ส่วนเกินออก
5. นำชิ้นส่วนพืชมาซับด้วยกระดาษทิชชูฆ่าเชื้อ แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร MS + 50 mg/l Kanamycin + 500 mg/l Cefotaxime (Selective Medium) ที่มีฮอร์โมน BAP + NAA เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัสและชักนำให้เกิดยอดเป็นเวลา 2 สัปดาห์ โดย Subculture ทุกๆ สัปดาห์
6. หลังจากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหารที่ชักนำให้เกิดราก (50 mg/l Kanamycin + 500 mg/l Cefotaxime) ที่มีฮอร์โมน NAA (root medium)

#### 4. ผลการทดลอง

##### 1. ผลการโคลน Transcription factor gene MYC (bHLH) ด้วยเทคนิค RT-PCR

จากการโคลนชิ้นส่วนของ MYC transcription factor gene จากข้าวพันธุ์กลายสายพันธุ์ BKOS ด้วยปฏิกิริยา PCR ที่กำหนดไว้พบว่าสามารถแยกชิ้นส่วนของ DNA ขนาดประมาณ 350 คู่เบส



ภาพที่ 3 แสดงการแยก transcription factor gene MYC (bHLH) จากข้าวพันธุ์กลายสายพันธุ์ BKOS ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ Degenerate primers

จาก ภาพที่ 3 แสดงให้เห็นว่าการแยก transcription factor gene MYC (bHLH) ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ degenerate primers ปรากฏแถบดีเอ็นเอ 1 แถบโดยมีขนาดประมาณ 350 คู่เบส จากนั้นได้ทำการโคลนชิ้นส่วน DNA ดังกล่าวเข้าสู่พลาสมิด pTZ57R/T เพื่อทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดังกล่าว ซึ่งผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงดังภาพที่ 4

AGGAGCATCAGTTGGAGTTACACCATCTTTTGGTCCACTTCAACCAGTCTCCCAGGAGTTCT  
 GACTTGGAACGATGGATTCTACAACGGCGAGGTAAGACGAGGAAGATATCCAACCTTAGAG  
 GACCTCACCGCTGACCAGCTCGTCCTGCGGAGAAGCGAGCAACTGAGCGAGCTCTACTACT  
 CTCTCCTGTCCGGCGAGTGCGACCACCGGGCAAGGAAGCCCGTCGCCGCACTGTCCGCCGG  
 AAGATATCGCGGACACAGAATGGTACTACGTTGTCTGCATGACCTACGCCTTTCGACCCGG  
 CCAAGGGTTACCCGGCAGAAGCTATGCAAGCAATCGATCTGTTTGGTTGTGCAATGCTCAGT  
 CTGCAGATAGCAAAACCTTTCTACGTGCGCTC

ภาพที่ 4 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA Putative transcription factor gene MYC ขนาด 351 คู่เบส ที่แยกได้จากข้าวพันธุกรรมสายพันธุ์ BKOS

RSISWSYTIWFSTSTSLPGVLTWNDGFYNGEVKTRKISNLEDLTADQLVLRREQLSELYSLLS  
 GECDFHRARKPVAALSPEDIADTEWYYVVCMTYAFRPGQGLPGRSYASNRSVWLCNAQSADSK  
 TFLRAL

ภาพที่ 5 แสดงลำดับกรดอะมิโนขนาด 117 อะมิโนที่แปลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA Putative transcription factor gene MYC จากข้าวพันธุกรรมสายพันธุ์ BKOS

ผลจากการทำ DNA Sequencing สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ 351 นิวคลีโอไทด์ และเมื่อแปลลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นกรดอะมิโนได้ 117 อะมิโน (ภาพที่ 5) ทำการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม BLAST SEARCH พบว่า ลำดับกรดอะมิโนจาก reading frame ที่ 1 ซึ่งอ่านจากปลาย 5' ไปด้าน 3' ของ Putative transcription factor gene MYC (bHLH) ที่แยกจากข้าว BKOS มีความคล้ายกับ transcription factor gene MYC (bHLH) จากข้าว (R-type basic helix-loop-helix protein [Plw-OSB2]) มากที่สุด (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงระดับความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน ของ Putative transcription factor gene MYC (bHLH) ที่แยกจากข้าวกลายพันธุ์ BKOS ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับ transcription factor gene MYC (bHLH) จากพืชสปีชีส์อื่น ๆ

Plant species	Common name	Gene	Amino acid identity (%)	GenBank accession number
<i>Oryza sativa</i>	Rice	R-type basic helix-loop-helix protein	90	Q948Y2
<i>Hordeum vulgare</i>	Barley	Putative bHLH domain protein [bHLH1]	69	E5FCX9
<i>Oryza sativa</i>	Rice	Ra	69	Q40643
<i>Sorghum bicolor</i>	Sorghum	B1-2	65	Q6JAH4
<i>Zea mays</i>	Maize	Regulatory protein [B-Peru]	64	Q41780

จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนของ Transcription factor gene MYC ที่โคลนได้ ทำการออกแบบ Primers ตามวิธีการของบริษัท Takara (ภาพผนวก) เพื่อทำการโคลน Full length cDNA ด้วยเทคนิค 5' และ 3' RACE โดยจากการทำปฏิกิริยา PCR สามารถโคลนยีนที่มีขนาด 1,353 คู่เบส และแปลงเป็นกรดอะมิโนได้ 451 อะมิโน ทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนที่โคลนได้กับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม Blast n และ ทำ Multiple sequence alignment พบว่ามีความคล้ายกับยีน R-type basic helix-loop-helix (Plw-OSB2) ของข้าวมากที่สุดถึง 92% (ตารางที่ 4) และมีความคล้ายคลึงกับกลุ่มของ Transcription factor gene MYC ในพืชชนิดอื่นๆที่มีรายงานแล้วว่าเกี่ยวข้องกับการควบคุมการสังเคราะห์รงควัตถุแอนโทไซยานิน นอกจากนี้ได้นำลำดับกรดอะมิโนของ Transcription factor gene MYC ของข้าว BKOS มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับ Transcription factor gene MYC ของพืชชนิดต่างๆโดยการสร้าง Dendrogram (ภาพที่ 7) ซึ่งจาก Dendrogram จะเห็นได้ว่า Transcription factor gene MYC ของข้าวสายพันธุ์ BKOS ได้ถูกจัดรวมกลุ่มกับ MYC gene ที่โคลนได้จากข้าวชนิดอื่นๆ แสดงให้เห็นว่ายีน MYC ที่โคลนได้จากข้าว BKOS มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับข้าว

ตารางที่ 4 แสดงระดับความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน ของ Putative transcription factor gene MYC (bHLH) ที่แยกจากข้าวกลายพันธุ์ BKOS ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับ transcription factor gene MYC (bHLH) จากพืชสปีชีส์อื่น ๆ

Plant species	Gene name	Amino acid Identity (%)	GenBank accession number
<i>Oryza sativa</i>	R-type basic helix-loop-helix protein [Plw-OSB2]	92	Q948Y2
<i>Oryza sativa</i> subsp. japonica	Putative anthocyanin regulatory Lc protein [Ra]	63	B2KQN4
<i>Zea mays</i>	Regulatory protein [B-Peru]	62	Q41780
<i>Zea mays</i>	SN protein	59	Q41854
<i>Zea mays</i>	Anthocyanin regulatory R-S protein [R-S]	60	P13027
<i>Zea mays</i>	Anthocyanin regulatory LC protein [lc1]	59	Q0GZN8
<i>Sorghum vulgare</i>	B1-1	62	Q6JAH5
<i>Cornus alternifolia</i>	Myc-like anthocyanin regulatory protein	49	Q675M4
<i>Ipomoea quamoclit</i>	Putative anthocyanin regulator [bHLH1]	49	A9YF17
<i>Perilla frutescens</i>	MYC-RP [myc-rp]	49	Q9ZQS4

## MYC-BKOS

```
tr|Q948Y2|Q948Y2_ORYSA
tr|Q40643|Q40643_ORYSA
tr|Q6JAH4|Q6JAH4_SORBI
tr|Q41854|Q41854_MAIZE
sp|P13027|ARRS_MAIZE
sp|P13526|ARLC_MAIZE
tr|Q675N0|Q675N0_CORSU
```

```
-----MASAPPVQEEALQPGTNHFRSRLAAAVRSISWSYTIWFSTSTSLP
-----MASAPPVQEEALQPGTNHFRSRLAAAVRSISWSYTIWFSTSTSLP
-----MEETPLPSGKNFRSQLAAAARSINWTYAIFWSISTSRP
---MALASASVQVEELQQAERQLMRNQLAAAARSINWTYALFWSISSTRP
MALSASRVQQAEEELQRPAPERQLMRSQLAAAARSINWSYALFWSISDTQP
MAVSASRVQQAEEELQRPAPERQLMRSQLAAAARSINWSYALFWSISDTQP
MALSASRVQQAEEELQRPAPERQLMRSQLAAAARSINWSYALFWSISDTQP
-----MASSGEQNVGLLENLKNQLAIAVRSIQWSYAI FWSISSRQP
: : : : * * . * * * . * : : * * * *
```

## MYC-BKOS

```
tr|Q948Y2|Q948Y2_ORYSA
tr|Q40643|Q40643_ORYSA
tr|Q6JAH4|Q6JAH4_SORBI
tr|Q41854|Q41854_MAIZE
sp|P13027|ARRS_MAIZE
sp|P13526|ARLC_MAIZE
tr|Q675N0|Q675N0_CORSU
```

```
GVLTWNDGFYNGEVKTRKISNLEDLTADQLVLRSEQLSELYYSLLSGEC
GVLTWNDGFYNGEVKTRKISNLEDLTADQLVLRSEQLSELYYSLLSGEC
GVLTKDGFYNGEIKTRKITSNMLTADQLVLRSEQLRELYDSLLSGEC
GVLTWTDGFYNGEVKTRKISNSVELTADQLVMQRSDQLRELYEALLSGEG
GVLTWTDGFYNGEVKTRKISNSVELTSDQLVMQRSDQLRELYEALLSGEG
GVLTWTDGFYNGEVKTRKISNSVELTSDQLVMQRSDQLRELYEALLSGEG
GVLTWTDGFYNGEVKTRKISNSVELTSDQLVMQRSDQLRELYEALLSGEG
GVLEWGDGYNGDIKTRKTVQAVEFNADQLGLQRSEQLKELYESLVVTES
*** * ** : * * * : * * * : * * * * * * * * * * * * * *
```

## MYC-BKOS

```
tr|Q948Y2|Q948Y2_ORYSA
tr|Q40643|Q40643_ORYSA
tr|Q6JAH4|Q6JAH4_SORBI
tr|Q41854|Q41854_MAIZE
sp|P13027|ARRS_MAIZE
sp|P13526|ARLC_MAIZE
tr|Q675N0|Q675N0_CORSU
```

```
DH--RARKPVAALSPEDIADTEWYYVVCMTYAFRPGQLPGRSYASNRSV
DH--RARKPVAALSPEDIADTEWYYVVCMTYAFRPGQLPGRSYASNRSV
G--HRARRPVAALLPEDLGDTEWYYVVCMTYAFRPGQLPGRSFGSNEFV
DR--RAARPVGSLSPELDLGDTEWYYVVCMTYAFRPGQLPGRSFGSNEHV
DRRAAPARPAGSLSPELDLGDTEWYYVVCMTYAFRPGQLPGRSFGSNEHV
DRRAAPARPAGSLSPELDLGDTEWYYVVCMTYAFRPGQLPGRSFGSNEHV
DRRAAPARPAGSLSPELDLGDTEWYYVVCMTYAFRPGQLPGRSFGSNEHV
NP--QARKSSAALSPEDLTDTEWYYLVCMSFVFNIGQLPGRTFANGQPI
. . . : * * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
```



```

MYC-BKOS
tr|Q948Y2|Q948Y2_ORYSA
tr|Q40643|Q40643_ORYSA
tr|Q6JAH4|Q6JAH4_SORBI
tr|Q41854|Q41854_MAIZE
sp|P13027|ARRS_MAIZE
sp|P13526|ARLC_MAIZE
tr|Q675N0|Q675N0_CORSU

ELESS-----SREPSRWRPTEIGQGKAP-----
ELESS-----SREPSRWRPTEIGQGKAP-----
ELESSSQSPSCP-----LETRSRRKCREITGKKVSAGAKRKAPAPEVAS
ELESSRELTTPSETTTR--TTRPRGISNESARKKLCAGSKRESPALEVDG
ELESSREPASRPSETTTRLITRPSRGNNESVRKEVCAGSKRKSPELGRD-
ELESSREPASRPSETTTRLITRPSRGNNESVRKEVCAGSKRKSPELGRD-
ELESSREPASRPSETTTRLITRPSRGNNESVRKEVCAGSKRKSPELGRD-
GSECLAARTRSKPQGTAEARTSANYENDRIGIGKKPLINKRKACDIVEAEL
* . . . .

MYC-BKOS
tr|Q948Y2|Q948Y2_ORYSA
tr|Q40643|Q40643_ORYSA
tr|Q6JAH4|Q6JAH4_SORBI
tr|Q41854|Q41854_MAIZE
sp|P13027|ARRS_MAIZE
sp|P13526|ARLC_MAIZE
tr|Q675N0|Q675N0_CORSU

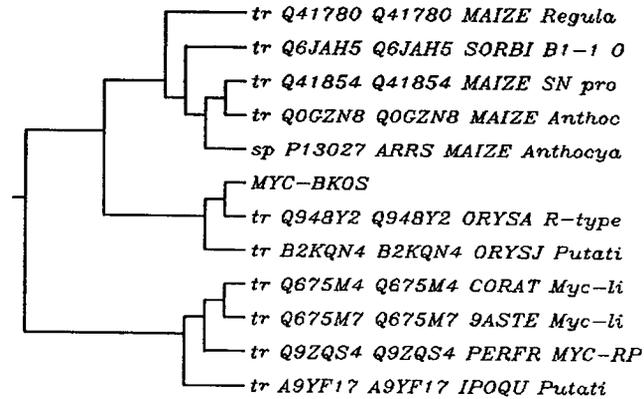
-----
----DDTDGERRHCVSNVNTIMDNKEVLLELQCQWKELLMTRVFDAIK
DVVNKEHPVLPKDGTSNVTVTVAN-TDVLLEVQCRWEELLMTRVFDAIK
--DVERPPVLTMDAGTSNVTVTVSD-KDVLLEVQCRWEELLMTRVFDAIK
--DVERPPVLTMDAGSSNVTVTVSD-KDVLLEVQCRWEELLMTRVFDAIK
--DVERPPVLTMDAGTSNVTVTVSD-KDVLLEVQCRWEELLMTRVFDAIK
----EINLVQLKDSSTDDVSIRIID-KDVFIEIRCPWRERLLEIMDAIS

MYC-BKOS
tr|Q948Y2|Q948Y2_ORYSA
tr|Q40643|Q40643_ORYSA
tr|Q6JAH4|Q6JAH4_SORBI
tr|Q41854|Q41854_MAIZE
sp|P13027|ARRS_MAIZE
sp|P13526|ARLC_MAIZE
tr|Q675N0|Q675N0_CORSU

-----
GVSLDVLSVQASTSDGLLGLKIQAKFASSAAVEPGMITEALRKAIAS-
SLHLDVLSVQASTPDGFMGLKIRAQFAGSGAVVPWMISEALRKAIGKR
SLHLDVLSVQASAPDGMGLKIRAQFAGSGAVVPWMISEALRKAIGKR
SLHLDVLSVQASAPDGMGLKIRAQFAGSGAVVPWMISEALRKAIGKR
SLHLDVLSVQASAPDGMGLKIRAQFAGSGAVVPWMISEALRKAIGKR
NFHLDSHSVQSSNIDGILSLSIKSKFKGSTVASTGMIIQALQRIICKC

```

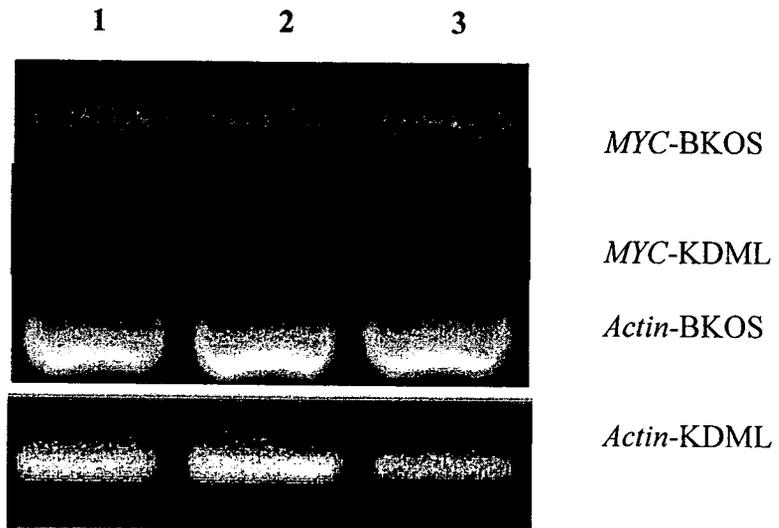
ภาพที่ 6 แสดงการทำ Multiple sequence alignment ระหว่าง Putative transcription factor gene MYC (bHLH) ของข้าวพันธุศาสตร์ (BKOS) กับพืชอื่น ๆ ในฐานข้อมูล GenBank



ภาพที่ 7 Dendrogram แสดงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างลำดับกรดอะมิโนของ MYC gene จากข้าวพันธุ์กลาย BKOS กับลำดับกรดอะมิโนของยีน MYC ที่ชนิดต่างๆจากฐานข้อมูล GenBank

## 2. การศึกษาแบบแผนการแสดงออกของ MYC transcription factor gene ในข้าวพันธุ์กลาย BKOS

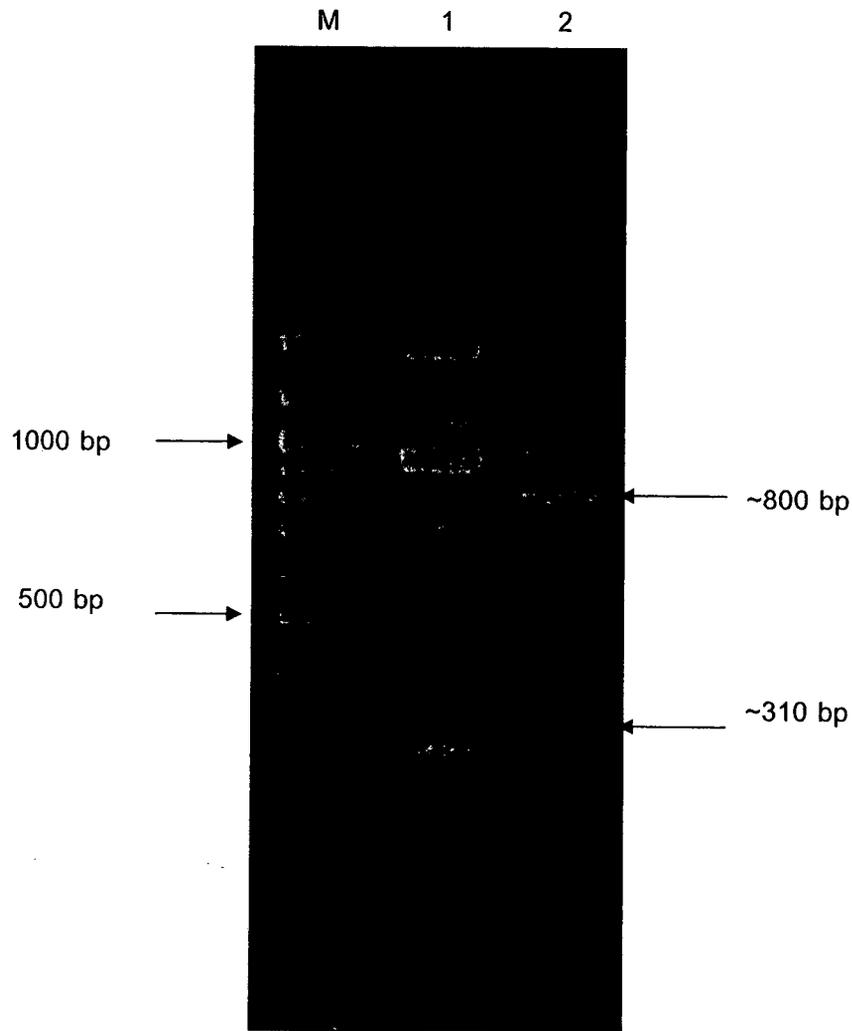
ทำการตรวจสอบแบบแผนการแสดงออกของยีน MYC ในเนื้อเยื่อส่วนใบ ลำต้น และรากของข้าวขาวดอกมะลิกลายพันธุ์ เปรียบเทียบกับข้าวสายพันธุ์ปกติ โดยได้ทำการสกัด Total RNA จากส่วนต่างๆ และเปลี่ยนเป็น cDNA จากนั้นตรวจสอบการแสดงออกของ MYC gene ด้วยเทคนิค RT-PCR (ภาพที่ 4) โดยใช้ Primers ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีนดังกล่าว ซึ่งพบว่ามีการแสดงออกของยีน MYC ในระดับการ Transcription ในเนื้อเยื่อทุกส่วนของข้าวขาวดอกมะลิกลายพันธุ์ที่ได้นำมาทำการศึกษาในขณะที่ไม่พบการแสดงออกของ mRNA ของยีนดังกล่าวในส่วนต่างๆของข้าวขาวดอกมะลิปกติ ซึ่งผลการวิจัยในส่วนนี้สามารถสรุปได้ว่ามีความเป็นไปได้ที่ยีน MYC ที่โคลนได้มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการชักนำให้เกิดการสร้าง Anthocyanins ในข้าวกลายพันธุ์



ภาพที่ 8 แสดงแบบแผนการแสดงของยีน MYC Transcription factor ในระดับการ Transcription ทำ การตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR จาก mRNA ที่เตรียมจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของข้าวขาวดอกมะลิปกติ (KDML) และ ข้าวขาวดอกมะลิกลายพันธุ์ (BKOS) ได้แก่ช่องที่1 ส่วนใบ: ช่องที่ 2 ลำต้น : ช่องที่ 3 ราก

## 2. ผลการโคลน Transcription factor WD40 gene จากข้าวขาวดอกมะลิพันธุ์กลายสายพันธุ์ BKOS

จากการทำ cDNA fingerprint เพื่อเปรียบเทียบแบบแผนการแสดงออกของยีนต่างๆระหว่างข้าวพันธุ์กลายและข้าวสายพันธุ์ปกติโดยใช้ primers แบบสุ่ม พบว่าจากการใช้ primer OPW14 จะให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 9) โดยพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 310 และ 800 นิวคลีโอไทด์ปรากฏเฉพาะในข้าวพันธุ์กลายเท่านั้น จึงได้ทำการโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้งสองเข้าสู่พลาสมิดเวกเตอร์และทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป



ภาพที่ 9 cDNA fingerprint ระหว่างข้าวขาวดอกมะลิ 105 ปกติ (1) และข้าวขาวดอกมะลิพันธุ์กลาย BKOS (2) จากการให้ primer OPW14

ผลจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้งสองชิ้นซึ่งมีขนาดประมาณ 800 และ 310 นิวคลีโอไทด์ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนขนาด 310 นิวคลีโอไทด์มีความคล้ายกับ MYC transcription factor gene ที่ผู้วิจัยโคลนได้ในการทดลองแรกถึง 100 % ในขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนที่สองขนาด 840 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่) และเมื่อทำการแปลไปเป็นกรดอะมิโนได้ 280 อะมิโน (ภาพที่) ซึ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blast n พบว่าชิ้นส่วนนี้มีความคล้ายกับ putative WD-40 repeat protein 100 %

GGGAATCCAATGCTTCGTAATGGTGAGACTGGAGATTGGATTGGGACTTTCCAAGGTCATAA  
 AGGGGCTGTCTGGAGCTGCTGCCTAGACACAAATGCTCTGCGTGCTGCATCTGGTTCTGCT  
 GACTTTTCAGCCAAAGTTTGGGATGCACTAACAGGTGATGAGCTACATTCATTTGAACACAA  
 GCACATTGTCCGTGCATGCGCGTTTTCTGAGGATACCCACCTGTTGCTCACTGGAGGCGTA  
 GAAAAGATTTTTCGCTGTCTATGATATGAATCGTCCAGATGCAGCACCAAGAGAAGTTGACAA  
 AGCACCTGGTAACGTGCGAAGTGTGCTTGGCTTCATAGTGATCAAACAATACTAAGCTCGT  
 GCTCTGATATGGGAGGAGTAAGATTGTGGGATGTGAGGACTGGAAAAATTGTCCAAACTCTT  
 GAAACCAAGGCGCCTGTGACTAGCGCAGAAGTAAGTCAAGACAGCAGGTTTCATCACTACAG  
 CTGATGGCTCGAGTGTTAAATTTTGGGATGCTAATCACTTTGGGCTTGTTAAAAGCTATGATA  
 TGCCTTGCACTGTGGAGTCAGCTTCCCTGGAACCAAAATCTGGGAGCAAATTTATTGTTGGG  
 GGAGAAGATATGTGGGTTTCATGTATTTGATTTCTTCACTGGTGAAGAAATAACCTGTAACAAG  
 GGGCATCATGGTCCTGTCCACTGTGTCCGCTTTGCACCTGGCGGTGAATCTTATGCATCAG  
 GATCAGAAGATGGCACCATCCGGATCTGGCAGCTGAGCCCACCTAACGCTGATGACAATGA  
 GGCGGTCAATTCAAATGGCAAACCAACAGTTGGGGTA

ภาพที่ 10 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 840 นิวคลีโอไทด์ของ cDNA Putative transcription factor WD-40 ที่แยกได้จากข้าวพันธุกรรมสายพันธุ์ BKOS

GNPMLRNGETGDWIGTFQGHKGAVWSCCLDTNALRAASGSA  
 DLSAKVWDALTGDELHSFEHKHIVRACAFSEDTHELLLTGGVEK  
 ILRVYDMNRPDAAPRELDKAPGNVRTVAWLHSDQITLSSCSDM  
 GGVRLWDVRTGKIVQTLETKAPVTSAEVSQDSRFITTADGSSV  
 KFW DANHFGLVKSYDMPCTVESASLEPKSGSKFIVGGEDMWV  
 HVFDFFFTGEEITCNKGHHGPVHCVRFAPGGESYASGSEDGTIR  
 IWQLSPPNADDNEAVNSNGKPTVGV

ภาพที่ 11 แสดงลำดับกรดอะมิโนขนาด 280 อะมิโนที่แปลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA Putative transcription factor WD-40 จากข้าวพันธุกรรมสายพันธุ์ BKOS

จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนของ Transcription factor WD-40 gene ที่โคลนได้ นำมาใช้ในการออกแบบ Primers ตามวิธีการของบริษัท Takara (ภาพผนวก) เพื่อทำการโคลน Full length cDNA

ด้วยเทคนิค 5' และ 3' RACE โดยจากการทำปฏิกิริยา PCR สามารถโคลนยีนที่มีขนาด 1,035 คู่เบส (ภาพที่) และทำการแปลเป็นกรดอะมิโนได้ทั้งสิ้น 345 อะมิโน (ภาพที่)

ATGGAGAAGAAGAAGGTGGCGGTGCCGCTGGTGTGCCACGGCCACTCGCGCCCGGTTCGTC  
 GACCTGTTCTACAGCCCCGTCACGCCCCGACGGGTA CTTCCTCATCAGCGCCAGTAAGGATG  
 GGAATCCAATGCTTCGTAATGGTGAGACTGGAGATTGGATTGGGACTTTCCAAGGTCATAAA  
 GGGGCTGTCTGGAGCTGCTGCCTAGACACAAATGCTCTGCGTGCTGCATCTGGTTCTGCTG  
 ACTTTTCAGCCAAAGTTTGGGATGCACTAACAGGTGATGAGCTACATTCATTTGAACACAAG  
 CACATTGTCCGTGCATGCGCGTTTTCTGAGGATACCCACCTGTTGCTCACTGGAGGCGTAG  
 AAAAGATTTTGC GTGTCTATGATATGAATCGTCCAGATGCAGCACCAAGAGA ACTTGACAAA  
 GCACCTGGTAACGTGCGAACTGTTGCTTGGCTTCATAGTGATCAAACAATACTAAGCTCGTG  
 CTCTGATATGGGAGGAGTAAGATTGTGGGATGTGAGGACTGGAAAAATTGTCCAAACTCTTG  
 AAACCAAGGCGCCTGTGACTAGCGCAGAAGTAAGTCAAGACAGCAGGTTTCATCACTACAGC  
 TGATGGCTCGAGTGTTAAATTTTGGGATGCTAATCACTTTGGGCTTGTTAAAAGCTATGATAT  
 GCCTTGCACTGTGGAGTCAGCTTCCCTGGAACCAAAATCTGGGAGCAAATTTATTGTTGGGG  
 GAGAAGATATGTGGGTTTCATGTATTTGATTTCTTCACTGGTGAAGAAATAACCTGTAACAAGG  
 GGCATCATGGTCCTGTCCACTGTGTCCGCTTTGCACCTGGCGGTGAATCTTATGCATCAGGA  
 TCAGAAGATGGCACCATCCGGATCTGGCAGCTGAGCCACCTAACGCTGATGACAATGAGG  
 CGGTCAATTCAAATGGCAAACCAACAGTTGGGGTAAATGAGGTTGCACGCAAGATCGAAGG  
 CTTCACATTCCAAGGAGGAGGAGCAGCAGCAGCAGCAGGCTGAGGGGTAG

ภาพที่ 12 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Full length cDNA Putative transcription factor WD-40 gene  
 ขนาด 1,035 นิวคลีโอไทด์ ที่แยกได้จากข้าวพันธุ์กลายสายพันธุ์ BKOS

MEKKKVAVPLVCHGHSRPVVDLFYSPVTPDGYFLISASKDGNP  
 MLRNGETGDWIGTFQGHKGAVWSCCLDTNALRAASGSADFS  
 KVWDALTGDELHSFEHKHIVRACAFSEDTHLLLTGGVEKILRV  
 YDMNRPDAAPRELDKAPGNVRTVAWLHSDQTILSSCSDMGGV  
 RLWDVVRTGKIVQTLETKAPVTSAEVSQDSRFITTADGSSVKFW  
 DANHFGLVKSYDMPCTVESASLEPKSGSKFIVGGEDMWWHVF  
 DFFTGEEITCNKGHHGPVHCVRFPAGGESYASGSEDGTIRIWQ  
 LSPPNADDNEAVNSNGKPTVGVNEVARKIEGFHIPKEEQQQ  
 QQAEG

ภาพที่ 13 แสดงลำดับกรดอะมิโนขนาด 345 อะมิโนที่แปลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Full length cDNA Putative transcription factor WD-40 gene ที่แยกได้จากข้าวพันธุ์กลายสายพันธุ์ BKOS

ได้ทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนที่โคลนได้กับฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม Blast n และ ทำ Multiple sequence alignment (ภาพที่) พบว่ามีความคล้ายกับยีน putative WD-40 repeat protein ของข้าวมากที่สุดถึง 97% (ตารางที่ 5) นอกจากนี้ได้นำลำดับกรดอะมิโนของ Transcription factor WD-40 gene ของข้าว BKOS มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับ Transcription factor WD-40 gene ของพืชชนิดต่างๆโดยการสร้าง Dendrogram (ภาพที่) ซึ่งจาก Dendrogram จะเห็นได้ว่า Transcription factor WD-40 gene ของข้าวสายพันธุ์ BKOS ได้ถูกจัดรวมกลุ่มกับ WD-40 gene ที่โคลนได้จากข้าวชนิดอื่นๆ แสดงให้เห็นว่ายีน WD-40 ที่โคลนได้จากข้าว BKOS มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมกับข้าวมากที่สุด

ตารางที่ 5: แสดงระดับความเหมือนของลำดับกรดอะมิโน ของ Putative transcription factor WD-40 gene ที่แยกจากข้าวกลายพันธุ์ BKOS ซึ่งคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับ transcription factor WD-40 gene จากพืชชนิดอื่น ๆ

Plant species	Gene name	Amino acid Identity (%)	GenBank accession number
<i>Oryza sativa</i>	Putative WD-40 repeat protein	97	Q69X61
<i>Zea mays</i>	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	92	B6T3R6
<i>Zea mays</i>	Predicted protein	89	F2DAB2
<i>Populus balsamifera</i> subsp. <i>trichocarpa</i>	Predicted protein	83	B9GWN6
<i>Ricinus communis</i>	Serine-threonine kinase receptor-associated protein	83	B9STP9

BKOS-WD40

tr|Q69X61|Q69X61\_ORYSJ  
tr|B4G1G6|B4G1G6\_MAIZE  
tr|B6T3R6|B6T3R6\_MAIZE  
tr|B9STP9|B9STP9\_RICCO  
tr|B9RUZ3|B9RUZ3\_RICCO

MEKKKVAVPLVCHGHSRPVVDFYSPVTPDGYFLISASKDGNPMLRNGET  
MEKKKVAVPLVCHGHSRPVVDFYSPVTPDGYFLISASKDGNPMLRNGET  
MEKKKVAIPLVCHGHSRPVVDFYSPVTPDGYFLISASKDTPMLRNGET  
MEKKKVAIPLVCHGHSRPVVDFYSPVTPDGYFLISASKDTPMLRNGET  
MDKKRVAVPLVCHGHSRPVVDFYSPVTPDGFLLISASKDSSPMLRNGET  
MDKKRVAVPLVCHGHSRPVVDFYSPVTPDGFLLISASKDSSPMLRNGET  
\*:\*:\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\* .\*\*\*\*\*

BKOS-WD40

tr|Q69X61|Q69X61\_ORYSJ  
tr|B4G1G6|B4G1G6\_MAIZE  
tr|B6T3R6|B6T3R6\_MAIZE  
tr|B9STP9|B9STP9\_RICCO  
tr|B9RUZ3|B9RUZ3\_RICCO

GDWIGTFQGHKGAVWSCCLDTNALRAASGSADFSAKVWDALTGDELHSFE  
GDWIGTFQGHKGAVWSCCLDTNALRAASGSADFSAKVWDALTGDELHSFE  
GDWIGTFQGHKGAVWSCCLDRNALRAASASADFSAKVWDALTGDELHSFE  
GDWIGTFQGHKGAVWSCCLDRNALRAASASADFSAKVWDALTGDELHSFE  
GDWIGTFEGHKGAVWSCCLDTNALRAASGSADFTAKVWDALTGDELHSFE  
GDWIGTFEGHKGAVWSCSLDTKALRAASASADFTAKLWDALTGDELHSFE  
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*.\*\* :\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*\*\* \*\*\*\*\*

BKOS-WD40

tr|Q69X61|Q69X61\_ORYSJ  
tr|B4G1G6|B4G1G6\_MAIZE  
tr|B6T3R6|B6T3R6\_MAIZE  
tr|B9STP9|B9STP9\_RICCO  
tr|B9RUZ3|B9RUZ3\_RICCO

HKHIVRACAFSEDTHLLLTGGVEKILRVYDMNRPDAAPRELDKAPGNVRT  
HKHIVRACAFSEDTHLLLTGGVEKILRVYDMNRPDAAPRELDKAPGNVRT  
HKHIVRACAFSEDTHLLLTGGMEKILRVYDMNRPDAAPRELDKSPGSVRT  
HKHIVRACAFSEDTHLLLTGGMEKILRVYDMNRPDAAPRELDKSPGSVRT  
HKHIVRASAFSEDTHLLLTGGIEKVLRIFDLNRPDAPPREVDKSPGSVRT  
HRHIVRACAFSEDTHLLLTGGMEKILRLFDLNRPDAPPREVNSSPGSIRT  
\*:\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*:\*:\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*

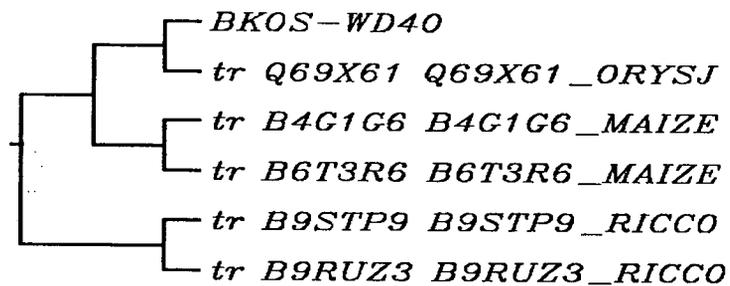
BKOS-WD40

tr|Q69X61|Q69X61\_ORYSJ  
tr|B4G1G6|B4G1G6\_MAIZE  
tr|B6T3R6|B6T3R6\_MAIZE  
tr|B9STP9|B9STP9\_RICCO  
tr|B9RUZ3|B9RUZ3\_RICCO

VAWLHSDQITILSSCSDMGGVRLWDVVRTGKIVQTLETKAPVTSAEVSDQR  
VAWLHSDQITILSSCSDMGGVRLWDVVRTGKIVQTLETKAPVTSAEVSDQR  
AAWLHSDQITILSSCTDMGGVRLWDVVRTGKIVQTLETKASVTSAEVSDQR  
AAWLHSDQITILSSCTDMGGVRLWDVVRTGKIVQTLETKASVTSAEVSDQR  
VAWLHSDQITILSSCTDMGGVRLWDVRSKIVQTLETKSVTSAEVSDQR  
VAWLHSDQITILSSCTDMGGVRLWDVRSKIVQTLETKSPVTSAEVSDQR  
\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*.\*\*\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*.\*\*\*\*\*:\*\*\*

BKOS-WD40		FITTADGSSVKFWDANHFGLVKS YDMPCTVESASLEPKSGSKFIVGGEDM
tr Q69X61 Q69X61_ORYSJ		FITTADGSSVKFWDANHFGLVKS YDMPCTVESASLEPKSGSKFIVGGEDM
tr B4G1G6 B4G1G6_MAIZE		FITTADGSSVKFWDANHFGLVKS YDMPCNVESASLEPKSGSKFVAGGEDL
tr B6T3R6 B6T3R6_MAIZE		FITTADGSSVKFWDANHFGLVKS YDMPCNVESASLEPKSGSKFVAGGEDL
tr B9STP9 B9STP9_RICCO		YITTCDGSTVKFWDANHFGLVKS YDMPCTVESASLEPKYGNKFIAGGEDM
tr B9RUZ3 B9RUZ3_RICCO		YITTCDGSTVKFWDANHFGLVKS YNMPCNVESASLEPKLGNK FVAGGEDM
		:***.***:*****:***.***** *.**:.****:
BKOS-WD40		WVHVDFFFTGEEITCNKGHHGPVHCVRFPAGGESYASGSEDGTIRIWQLS
tr Q69X61 Q69X61_ORYSJ		WVHVDFFFTGEEITCNKGHHGPVHCVRFPAGGESYASGSEDGTIRIWQLS
tr B4G1G6 B4G1G6_MAIZE		WVHVDFFFTGEEIACNKGHHGPVHCVRFPAGGESYASGSEDGTIRIWQLS
tr B6T3R6 B6T3R6_MAIZE		WVHVDFFFTGEEIACNKGHHGPVHCVRFPAGGESYASGSEDGTIRIWQLS
tr B9STP9 B9STP9_RICCO		WIHVDFHTGDEIACNKGHHGPVHCVRFPAGGESYASGSEDGTIRIWQTG
tr B9RUZ3 B9RUZ3_RICCO		WIHVDFHTGDEIQICNKGHHGPVHCLRFSPAGGESYASGSEDGTIRIWQTG
		*:****.***:* *****:***:* *****
BKOS-WD40		PPNADDNEAVNSN---GKPTVGVNEVARKIEGFHIPKEEQQQQAEG--
tr Q69X61 Q69X61_ORYSJ		PPNADDNEAVNSN---GKPTVGVNEVARKIEGFHIPKEEQQQQAEG--
tr B4G1G6 B4G1G6_MAIZE		PANADDNEAVANAN---GKTTAGVNEVTTKIEGFHIPKEGQTEG-----
tr B6T3R6 B6T3R6_MAIZE		PANADDNEAVANAN---GKTTAGVNEVTTKIEGFHIPKEGQTEG-----
tr B9STP9 B9STP9_RICCO		PLIQDDEGLAANGSVGKVKVTAEEVTHKIEGFHIADGGKAKDKKEAAKE
tr B9RUZ3 B9RUZ3_RICCO		PQNHDE-----NGPTGKAMASADDVTQKIKGKGGKTAGTDP-----
		* * : * ** . . :*: **:

ภาพที่ 14 แสดงการทำ Multiple sequence alignment ระหว่าง Putative transcription factor WD-40 gene ของข้าวพันธุ์กลาย (BKOS) กับพืชอื่นๆในฐานข้อมูล GenBank



ภาพที่ 15 Dendrogram แสดงความใกล้ชิดทางพันธุกรรมระหว่างลำดับกรดอะมิโนของ WD-40 gene จากข้าวพันธุ์กลาย BKOS กับลำดับกรดอะมิโนของยีนต่างๆจากฐานข้อมูล GenBank

### 3. การตรวจสอบหน้าที่ของยีน *MYC* และ *WD-40* Transcription factor genes

เพื่อศึกษาหน้าที่ที่แท้จริงของ Transcription factor *MYC* gene ที่โคลนได้จากข้าวพันธุ์กลายสายพันธุ์ BKOS ผู้วิจัยได้ทำการโคลน *MYC* gene เข้าสู่พลาสมิดเวกเตอร์ที่สามารถกระตุ้นให้ยีนที่ได้รับการส่งถ่ายสามารถแสดงออกได้ในพืชโดยการทดลองนี้ได้เลือกใช้พลาสมิด pSTART ซึ่งมี 35S promoter ที่ควบคุมการแสดงออกของยีนในพืช ในทิศทาง sense (pSTART-*MYC*) และ anti-sense (pSTART-*antiMYC*) นอกจากนี้ยังได้ทำการโคลน *MYC* gene เข้าสู่พลาสมิด pSTART ร่วมกับ *WD-40* gene (pSTART-*MYC-WD40*) ซึ่งยีนทั้งสองถูกควบคุมการแสดงออกด้วย 35S promoter เช่นเดียวกัน

หลังจากโคลนยีนทั้งหมดได้แล้ว ทำการส่งถ่ายพลาสมิดทั้งสามเข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL1 และ LBA4404 ตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดโดยการตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อเตรียมการส่งถ่ายเข้าสู่พืชต่อไป

#### 3.1 การส่งถ่ายพลาสมิด pSTART-*MYC*, pSTART-*antiMYC*, pSTART-*MYC-WD40* เข้าสู่เนื้อเยื่อข้าว ยาสูบ และพืชมุข ด้วยเทคนิค *Agrobacterium* Transformation

ทำการส่งถ่ายพลาสมิดทั้งสามเข้าสู่เนื้อเยื่อข้าว ยาสูบและพืชมุข โดยในเบื้องต้นได้หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการส่งถ่ายพลาสมิดทั้งหมดเข้าสู่พืชแต่ละชนิด โดยผลการทดลองมีดังนี้

##### ข้าวหอมมะลิพันธุ์กลายสายพันธุ์ BKOS

ในการตรวจสอบหน้าที่ของยีน *MYC* ได้ทำการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ของข้าว BKOS ด้วยเทคนิค *Agrobacterium* transformation โดยใช้ พลาสมิด pSTART-*antiMYC* ที่มียีน antisense *MYC* เข้าสู่เนื้อเยื่อเซลล์ของข้าว BKOS ซึ่งในการทดลองนี้ได้ใช้เชื้อ *Agrobacterium* สองสายพันธุ์ได้แก่ AGL1 และ LBA4404 ในการส่งถ่ายพลาสมิด โดยผลการทดลองแสดงในตารางที่

ตารางที่ 6 แคลลัสของข้าว BKOS ดัดแปลงพันธุกรรมที่ต้านทานต่อ Kanamycin และมีกิจกรรมของยีน *gus* ภายหลังจากการส่งถ่ายด้วยเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL1 และ LBA4404

<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	การทดลอง ครั้งที่	จำนวนแคลลัส		เปอร์เซ็นต์การส่ง ถ่ายยีน (%)
		เริ่มต้น	ต้านทานต่อ Kanamycin และมีการ แสดงออกของยีน <i>gus</i>	
AGL1	1	250	0	0
	2	250	0	0
	3	250	1	0.004
LBA4404	1	250	1	0.004
	2	250	3	0.012
	3	250	3	0.012

จากผลการทดลองพบว่าประสิทธิภาพในการส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ข้าว BKOS ด้วยเชื้อ *Agrobacterium* ทั้งสองสายพันธุ์คือ AGL1 และ LBA4404 มีประสิทธิภาพต่ำมาก (0.004 และ 0.012 % ตามลำดับ) โดยหลังจากทดสอบการแสดงออกของยีน *gus* แล้ว ผู้วิจัยได้ย้ายแคลลัสดังกล่าวไปเลี้ยงบนอาหารที่ชักนำไปเกิดต้นและราก ซึ่งจากการเลี้ยงไว้เป็นเวลา 4 เดือน พบว่าแคลลัสดังกล่าวไม่มีการพัฒนาเป็นต้น และเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตายลงทั้งหมดในสัปดาห์ที่สองของเดือนที่ 5 จึงไม่สามารถที่จะตรวจสอบการยับยั้งการแสดงออกของยีน *MYC* ในระดับการ Transcription ได้

### ยาสูบ

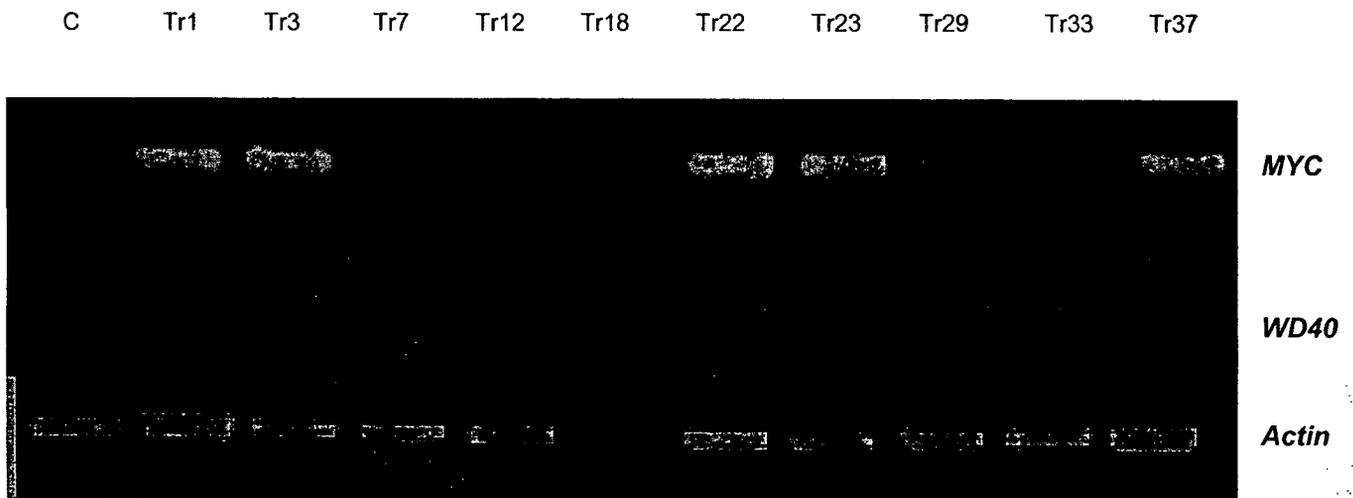
จากการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART-MYC และ pSTART-MYC-WD40 เข้าสู่ยาสูบโดยเทคนิค *Agrobacterium* transformation โดยใช้ *Agrobacterium* สองสายพันธุ์ได้แก่ AGL1 และ LBA4404 เพื่อศึกษาหน้าที่ของยีน *MYC* และการทำงานร่วมกับยีน *WD40* โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำซึ่งผลของการส่งถ่ายยีนแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ผลการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART-MYC และ pSTART-MYC-WD40 เข้าสู่ยาสูบโดยเทคนิค Agrobacterium transformation โดยใช้ Agrobacterium สองสายพันธุ์ได้แก่ AGL1 และ LBA4404

<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Plasmid	การทดลอง ครั้งที่	จำนวนแคลลัส		เปอร์เซ็นต์การ ส่งถ่ายยีน (%)
			เริ่มต้น	ต้านทานต่อ Kanamycin	
AGL1	pSTART-MYC	1	105	22	20.9
		2	105	18	17.1
		3	105	15	14.3
	pSTART-MYC- WD40	1	105	18	17.1
		2	105	10	9.5
		3	105	12	11.4
LBA4404	pSTART-MYC	1	115	65	56.5
		2	115	68	59.1
		3	115	72	62.6
	pSTART-MYC- WD40	1	115	43	37.4
		2	115	47	40.9
		3	115	46	40.0

จากผลการส่งถ่ายพลาสมิดทั้งสองเข้าสู่ยาสูบ พบว่าการส่งถ่ายพลาสมิดด้วยเชื้อ Agrobacterium สายพันธุ์ LBA4404 จะมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้เชื้อ AGL1 โดยในการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART-MYC ด้วยเชื้อ LBA4404 มีเปอร์เซ็นต์การส่งถ่ายอยู่ในช่วง 50 – 60 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การส่งถ่ายด้วยเชื้อ AGL1 อยู่ในช่วง 14 – 20 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับผลการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART-MYC-WD40 ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าพลาสมิด pSTART-MYC ประมาณ 1.5 kb ซึ่งการส่งถ่ายด้วยเชื้อ Agrobacterium สายพันธุ์ LBA4404 มีประสิทธิภาพดีกว่าการส่งถ่ายด้วย AGL1

เนื้อเยื่อของยาสูบที่สามารถเจริญได้ในอาหารคัดเลือกจะถูกสุ่มมาทดสอบการแสดงออกของยีน *gus* ซึ่งพบว่าเนื้อเยื่อของยาสูบทุกชิ้นที่สุ่มมาพบจุดสีน้ำเงินเกิดขึ้นทั้งหมดเมื่อทำการทดสอบ (ภาพที่) จากนั้นได้ทำการทดสอบการแสดงออกของยีนในระดับการ Transcription ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยได้ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *MYC* และ *WD-40* ในเนื้อเยื่อที่คัดเลือกแบบสุ่ม โดยจากภาพที่ พบว่าสามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน *WD40* ได้ในทุกตัวอย่างที่เลือกมา ในขณะที่การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *MYC* พบมีการแสดงออกในทุกตัวอย่างยกเว้นในตัวอย่าง Tr7 และ Tr12



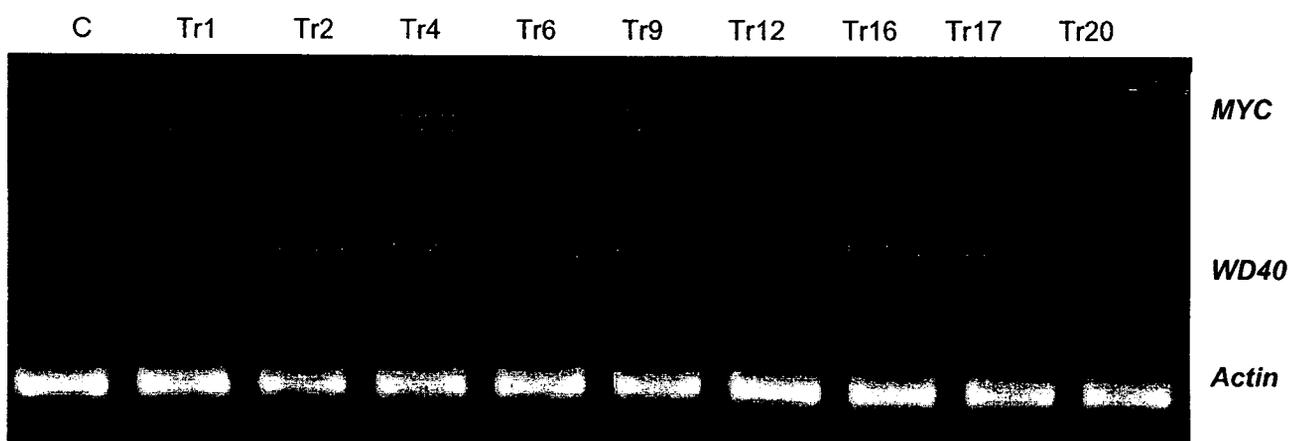
ภาพที่ 16 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน MYC และ WD40 ในเนื้อเยื่อของยาสูบที่ได้รับการส่งถ่ายยีนด้วยเทคนิค RT-PCR โดย C คือ พืชควบคุม (ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน) Tr1 – Tr37 คือพืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีน

### พืชเนียบ

เช่นเดียวกับในการทดลองในยาสูบ ได้ทำการศึกษาหน้าที่ของยีน MYC และศึกษาการทำงานร่วมกับยีน WD40 โดยทำการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART-MYC และ pSTART-MYC-WD40 เข้าพืชเนียบ โดยใช้ Agrobacterium สองสายพันธุ์ได้แก่ AGL1 และ LBA4404 โดยในพืชเนียบนั้นนอกจากจะติดตามการแสดงออกของยีน *gus* แล้ว ได้ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน MYC และ WD40 ในระดับการ Transcription ด้วยเทคนิค RT-PCR ซึ่งหลังจากนั้นจะได้ทำการย้ายต้นพืชเนียบที่คัดเลือกแล้วออกปลูกในสภาพแวดล้อมปกติเพื่อสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่อไป สำหรับผลการทดลองในการส่งถ่ายพลาสมิดทั้งสอง แสดงได้ในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ผลการส่งถ่ายพลาสมิด pSTART-MYC และ pSTART-MYC-WD40 เข้าสู่พืชเนยโดยเทคนิค Agrobacterium transformation โดยใช้ Agrobacterium สองสายพันธุ์ได้แก่ AGL1 และ LBA4404

<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Plasmid	การทดลอง ครั้งที่	จำนวนแคลลัส		เปอร์เซ็นต์การ ส่งถ่ายยีน (%)
			เริ่มต้น	ต้านทานต่อ Kanamycin	
AGL1	pSTART-MYC	1	50	10	20
		2	50	12	24
		3	50	11	22
	pSTART-MYC- WD40	1	50	8	16
		2	50	8	16
		3	50	7	14
LBA4404	pSTART-MYC	1	50	22	44
		2	50	20	40
		3	50	20	40
	pSTART-MYC- WD40	1	50	18	36
		2	50	21	42
		3	50	20	40

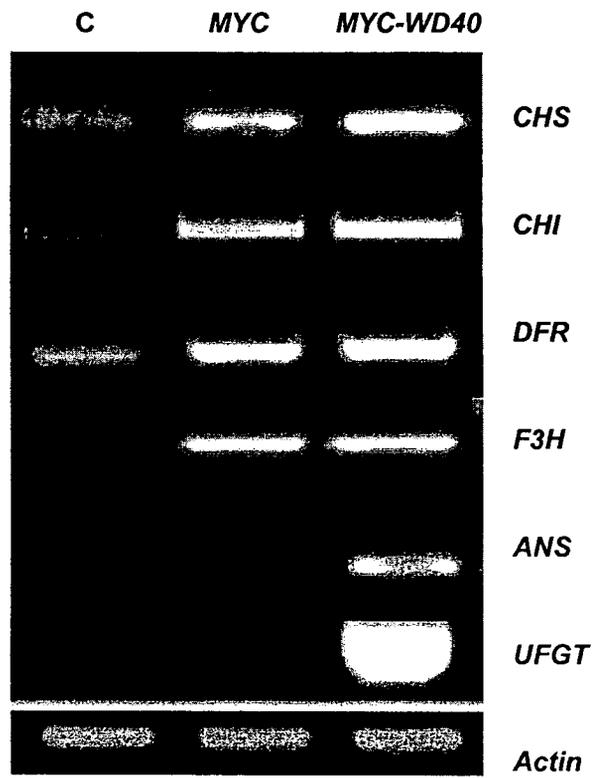


ภาพที่ 17 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน MYC และ WD40 ในเนื้อเยื่อของพืชเนยที่ได้รับการส่งถ่ายยีนด้วยเทคนิค RT-PCR โดย C คือ พืชควบคุม (ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน) Tr1 – Tr20 คือพืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีน

จากเนื้อเยื่อของพืชเนียบที่สามารถเจริญได้ในอาหารคัดเลือกจะถูกนำมาทดสอบการแสดงออกของยีน *gus* ซึ่งพบว่าเนื้อเยื่อของพืชเนียบทุกชิ้นที่สุ่มมานั้นเมื่อทำการทดสอบ พบจุดสีน้ำเงินเกิดขึ้นทั้งหมด (ภาพที่) จากนั้นได้ทำการทดสอบการแสดงออกของยีนในระดับการ Transcription ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยได้ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *MYC* และ *WD-40* ในเนื้อเยื่อที่คัดเลือกแบบสุ่ม โดยจากภาพที่สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน *MYC* และ *WD40* ได้ในทุกตัวอย่างที่เลือกมาทดสอบ

### 3.2 การศึกษาหน้าที่ของยีน *MYC* และ การทำงานร่วมกันระหว่างยีน *MYC-WD40* ในพืชดัดแปลงพันธุกรรม

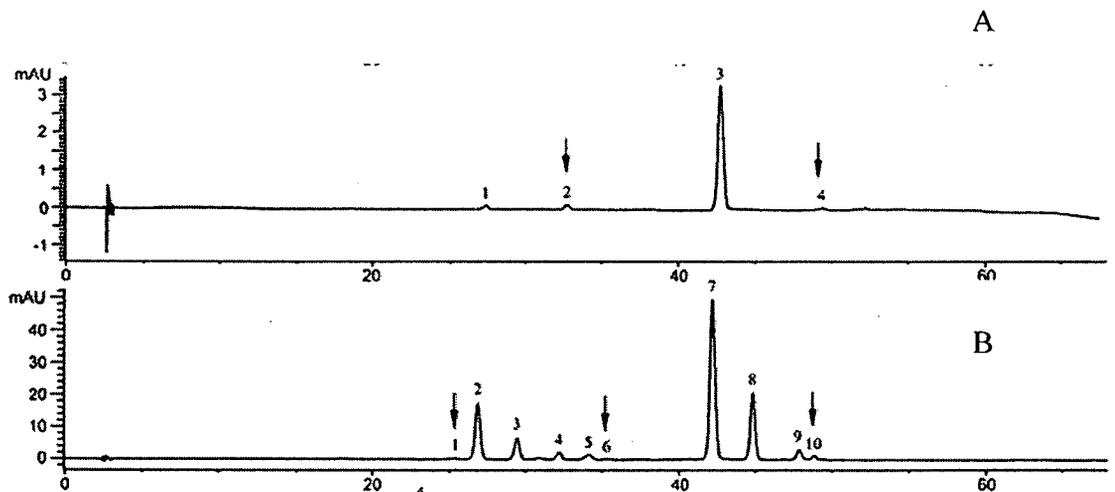
ในการศึกษาหน้าที่การทำงานของยีน *MYC* ที่โคลนได้จากข้าวขาวดอกมะลิพันธุ์กลายสายพันธุ์ BKOS ได้ทำการติดตามการแสดงออกของยีนที่อยู่ในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน เปรียบเทียบกับการทำงานร่วมกันระหว่างยีน *MYC* และ *WD40* ในต้นยาสูบที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรม โดยได้ติดตามระดับการแสดงออกของยีน *CHS* *CHI* *DFR* *F3H* *ANS* และ *UGT* เปรียบเทียบกับต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีนดังภาพที่ โดยจากภาพจะเห็นได้ว่าในยาสูบที่ได้รับการส่งถ่ายยีน *MYC* และ *MYC-WD40* พบระดับการแสดงออกของยีน *CHS* *CHI* *DFR* *F3H* สูงกว่าในยาสูบที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน ในขณะที่พบระดับการแสดงออกของยีน *ANS* และ *UGT* สูงที่สุดในพืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีน *MYC-WD40* ซึ่งมากกว่าการส่งถ่ายเฉพาะยีน *MYC* เพียงยีนเดียว



ภาพที่ 18 การตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนในวิถีสังเคราะห์แอนโทไซยานินในยาสูบที่ได้รับการส่งถ่ายยีน MYC และ MYC-WD40 เปรียบเทียบกับยาสูบที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน (C)

#### 4. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารในกลุ่มแอนโทไซยานินในพืชตัดแปลงพันธุกรรม

ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารในกลุ่มแอนโทไซยานิน จากใบของยาสูบที่ได้รับการส่งถ่ายยีน *MYC-WD40* เปรียบเทียบกับยาสูบที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีนด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) ตามวิธีการของ Kuwayama *et al.*, 2005 โดยเริ่มจากการเตรียมตัวอย่างด้วยการบดใบของยาสูบด้วย Liquid Nitrogen แล้วเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  ทำการสกัดตัวอย่างที่บดด้วย เมทานอลและน้ำใน อัตราส่วนโดยปริมาตรเท่ากับ 70:30 ปริมาณ 100 มิลลิลิตร แล้วทำการเขย่าด้วยเครื่องเขย่า โดยใช้ความเร็ว 140 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในที่ ไม่มีแสง เก็บสารตัวอย่างที่สกัดได้ทุกๆ 1 ชั่วโมง จนครบ 7 ชั่วโมง และที่ 24 ชั่วโมง กรองสารสกัดที่ได้ผ่าน Millipore filter ขนาด 45 ไมครอนและนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-25, Sephadex LH-20 และ Amberlite CG-50 จากนั้นนำไปฉีดวิเคราะห์ชนิดของสารในกลุ่ม แอนโทไซยานิน ได้แก่ 1- delphinidin 3-galactoside; 2 – delphinidin 3-glucoside; 3 – cyanidin 3-galactoside; 4 – delphinidin 3-arabinoside; 5 – cyanidin 3-glucoside; 6 – petunidin 3-galactoside; 7 – cyanidin 3-arabinoside; 8 – petunidin 3-glucoside; 9 – peonidin 3-galactoside; 10 – petunidin 3-arabinoside ด้วย HPLC โดยกำหนด Flow rate 1.0 Lpm ที่ 510 นาโนเมตร



ภาพที่ 19 HPLC-Chromatogram ของสารในกลุ่มแอนโทไซยานินจากยาสูบที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน (A) และ ยาสูบที่ได้รับการส่งถ่ายยีน *MYC* และ *WD40* (B)

จากการตรวจสอบองค์ประกอบของสารสกัดในกลุ่มแอนโทไซยานินด้วยเทคนิค HPLC จากยาสูบที่ได้รับการส่งถ่ายยีน *MYC-WD40* (ภาพที่ A) เปรียบเทียบกับยาสูบที่ไม่ได้รับการส่งถ่ายยีน (ภาพที่ B) พบว่ายีน *MYC-WD40* สามารถทำให้เกิดการสังเคราะห์สารประกอบต่างๆที่อยู่ในวิถีสังเคราะห์แอนโทไซยานินที่แตกต่างไปจากพืชควบคุม โดยจากภาพที่ 19 พบว่ามี peak ที่ปรากฏเฉพาะในพืชที่ได้รับการส่งถ่ายยีน 6 ตำแหน่งได้แก่ peak ที่ 1- delphinidin 3-galactoside; 3- cyanidin 3-galactoside; 5 - cyanidin 3-glucoside; 6 - petunidin 3-galactoside; 8 - petunidin 3-glucoside และ 9 - peonidin 3-galactoside ในขณะที่พบสารที่เหมือนกันในพืชทั้งสองได้แก่ peak ที่ 2 - delphinidin 3-glucoside; 4 - delphinidin 3-arabinoside; 7 - cyanidin 3-arabinoside และ 10 - petunidin 3-arabinoside

ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้นี้ซึ่งพิจารณาจาก Chromatogram แสดงให้เห็นว่าการทำงานร่วมกันของยีน *MYC* และ *WD40* สามารถกระตุ้นให้ยาสูบสามารถสร้างสารสำคัญในกลุ่มแอนโทไซยานินได้หลากหลายมากกว่าการทำงานของยีน *MYC* เพียงตัวเดียว (ไม่ได้แสดงผลการวิจัย) ซึ่งผลการตรวจสอบจาก HPLC พบว่าไม่มีความแตกต่างของจำนวนชนิดของสารเมื่อเปรียบเทียบกับพืชควบคุม