บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงการวิจัย

ฮอร์โมนลอกคราบหรือเอคไดโซน (ecdysone) เป็นสเตอรอยด์ฮอร์โมนที่ทำหน้าที่กระตุ้นการลอกคราบและการเปลี่ยนแปลงของตัวอ่อนในสัตว์จำพวกอาร์โธรพอด (arthropods) ฮอร์โมนลอกคราบในกลุ่มเอคไดโซนมีหลายชนิดด้วยกัน แต่ที่น่าสนใจและพบมากในธรรมชาติคือ เบตา-เอคไดโซน (beta-ecdysone) หรือ 20-ไฮดรอกซีเอคไดโซน (20-hydroxyecdysone) และ แอลฟา-เอคไดโซน (alpha-ecdysone) ในปัจจุบันฮอร์โมนลอกคราบสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ ฮอร์โมนลอกคราบจากสัตว์ (zooecdysone) และฮอร์โมนลอกคราบจากพืช (phytoecdysone) การสังเคราะห์ฮอร์โมนลอกคราบจากพืชนั้นพบว่าขั้นตอนที่มีความสำคัญมากคือปฏิกิริยาการเปลี่ยนแอลฟา-เอคไดโซนไปเป็นเบตา-เอคไดโซน เร่งปฏิกิริยาโดยอาศัยเอนไซม์ ecdysone 20-monooxygenase ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับวิถีการสังเคราะห์ฮอร์โมนลอกคราบจากสัตว์และเอนไซม์นี้จัดเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม cytochrome P450 เช่นกัน

ในปัจจุบันได้มีการนำฮอร์โมนลอกคราบที่แยกสกัดได้จากพืชและสัตว์ไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางโดยเฉพาะทางด้านเกษตร มีการศึกษาผลของสารเบตา-เอคไดโซนต่อการลอกคราบของสัตว์จำพวกอาร์โธรพอด พบว่าสารเบตา-เอคไดโซนมีผลต่อการเจริญและการสืบพันธุ์ในสัตว์จำพวกแมลง โดยไปกระตุ้นให้เกิดการสะสมของแคลเซียมที่ใช้สร้างชั้นเปลือกนอกของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ การพัฒนาการของไข่แมลง การสร้างตัวอสุจิ การเกิดสีของตัวอ่อน นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงการนำสารเบตา-เอคไดโซนที่แยกสกัดได้จากพืชไปเสริมกับอาหารสูตรสำเร็จเพื่อใช้เลี้ยงกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนและวัยรุ่น ซึ่งผลการศึกษาพบว่ากุ้งมีอัตราการเจริญเติบโตสูงขึ้น โดยสารเบตา-เอคไดโซนไปช่วยกระตุ้นให้กุ้งก้ามกรามลอกคราบได้สูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากกุ้งก้ามกรามแล้ว ยังพบว่าสารเบตา-เอคไดโซน มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเจริญของกุ้งชนิดอื่นๆ อีกเช่น กุ้งกุลาดำ กุ้งแช่บ๊วย เป็นต้น นอกจากการนำไปใช้กระตุ้นการเจริญของสัตว์ชนิดต่างๆ แล้ว ยังมีการนำสารเบตา-เอคไดโซนไปใช้เป็นยาฆ่าแมลง ซึ่งพบว่ามีข้อได้เปรียบกว่าการใช้สารปราบแมลงชนิดที่สังเคราะห์ขึ้นมาโดยวิธีทางเคมี กล่าวคือ สารเหล่านี้มีความจำเพาะต่อแมลงสูงกว่าและแมลงไม่สามารถปรับตัวเพื่อต่อต้านได้ จึงมีการตื่นตัวและคาดหวังว่าสารกำจัดแมลงในกลุ่มฮอร์โมนชนิดนี้น่าจะเป็นความหวังของการใช้เป็นยาฆ่าแมลงต่อจากยุคของการใช้สาร ดี.ดี.ที.

นอกจากประโยชน์ทางด้านการเกษตรแล้ว พบว่าสารเบตา-เอคไดโซนยังมีคุณสมบัติทางยา กล่าวคือสามารถนำไปใช้เป็นสารต่อต้านการเกิดแผลพุพอง สารแก้อาการรูมาติซั่ม (antirheumatic

agenys) สารควบคุมฮอร์โมนอินซูลิน เป็นยาขับปัสสาวะและยาบำรุงร่างกาย (Kosovskii *et al.*, 1989; Syrov et al., 1989) เป็นต้น

จากความสำคัญดังกล่าวข้างต้น ทำให้มีการวิจัยเพื่อแยกสกัดสารจากเซลล์สัตว์และพืชมากขึ้น รวมไปถึงแนวทางในการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคต่างๆ แต่อย่างไรก็ตามจากผลการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าฮอร์โมนลอกคราบที่แยกสกัดได้จากสัตว์โดยเฉพาะพวกอาร์โธพอดมีระดับต่ำมากประมาณ 10^{-5} ถึง 10^{-9} เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ในขณะที่พืชสามารถแยกสกัดสารได้สูงกว่า ดังนั้นพืชจึงน่าจะเป็นแหล่งที่สำคัญในการผลิตฮอร์โมนลอกคราบ

ต้นไข่เน่า (*Vitex grabata*) หรือบางพื้นที่เรียกว่า คมหวาน หรือฝรั่งโคก จัดเป็นพืชพื้นเมืองของไทย อยู่ในวงศ์ Verbenaceae ลักษณะโดยทั่วไปจัดเป็นไม้ยืนต้น ขนาดต้นสูงประมาณ 15-20 เซนติเมตร มีใบประกอบแบบฝ่ามือชนิด 5 ใบย่อย สีเขียวเข้ม มีดอกสีม่วง ผลรูปไข่ ยาวประมาณ 2-3 เซนติเมตร เมื่อสุกจะมีสีดำ เนื่องจากเนื้อไม้ของต้นไข่เน่าค่อนข้างแข็งจึงมีการนำไปใช้ประโยชน์โดยทำเป็นเครื่องเรือนและของใช้ต่างๆ นอกจากนี้ยังพบว่าต้นไข่เน่ายังมีสารบางอย่างที่มีสรรพคุณทางยาจึงมีการนำเอาส่วนต่างๆ ของต้นไข่เน่า เช่น เปลือก และราก ไปใช้ประโยชน์เป็นยาแก้ท้องเสีย แก้บิด แก้ไข้ รวมไปถึงใช้เป็นยาเจริญอาหาร เป็นต้น อย่างไรก็ตามก็มีรายงานถึงการค้นพบสารเบตา-เอคไดโซนในพืชสกุล *Vitex* เช่นกัน และสำหรับประเทศไทยมีรายงานการวิจัยที่พบว่าต้นไข่เน่าสามารถผลิตสารเบตา-เอคไดโซนได้ การวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาถึงการโคลนและศึกษาคุณลักษณะบางประการของ cytochrome P450 gene ที่เกี่ยวข้องกับวิถีการสังเคราะห์สารเอคไดโซนในต้นไข่เน่า โดยคาดหวังว่าจะสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปประยุกต์ใช้เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาทางด้านนี้ต่อไปในอนาคต และเพื่อการพัฒนาแนวทางในการเพิ่มผลผลิตของฮอร์โมนลอกคราบเบตา-เอคไดโซนจากพืชต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 เพื่อแยกสกัดและทำการโคลนยีน cytochrome P450 ที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ Ecdysone 20-monooxygenase จากเซลล์พืชไข่เน่าเพาะเลี้ยง

1.2.2 เพื่อศึกษาคุณสมบัติบางประการของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ Ecdysone 20-monooxygenase จากเซลล์พืชไข่เน่าเพาะเลี้ยง

1.2.3 เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนดังกล่าวในระยะต่างๆ ของการพัฒนาการของเซลล์พืชไข่เน่าเพาะเลี้ยง

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1.3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์แคลลัสพืชไข่เน่า

ในการทดลองครั้งนี้ใช้เซลล์แคลลัสจากต้นไข่เน่า ซึ่งได้รับการชักนำขึ้นในห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางพืช ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยแคลลัสเหล่านั้นเจริญอยู่บนอาหาร ½ MS ที่เสริมด้วย 2,4-D และ BAP ปริมาณ 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

1.3.2 การศึกษารูปแบบการเจริญของเซลล์แคลลัสพืชไข่เน่า

ติดตามอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์แคลลัสต้นไข่เน่าที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร ½ MS ด้วยวิธีชั่งหาน้ำหนักแห้ง

1.3.3 การแยกและศึกษาคุณลักษณะบางประการของ cytochrome P450 gene ที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ Ecdysone 20-monooxygenase จากเซลล์พืชไข่เน่าเพาะเลี้ยง

1. ทำการโคลนยีนบางส่วนของ cytochrome P450 gene ในเซลล์พืชไข่เน่าเพาะเลี้ยง โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะที่สังเคราะห์จากบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ของยีนกลุ่มนี้ในแมลงและสิ่งมีชีวิตในกลุ่มที่ใกล้ชิดกัน
2. ศึกษาคุณสมบัติบางประการของ cytochrome P450 gene ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ ecdysone 20-monooxygenase ในต้นไข่เน่า โดยทำการศึกษาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ลำดับกรดอะมิโน และค่าความเหมือนหรือคล้ายคลึงของลำดับนิว คลีโอไทด์หรือกรดอะมิโนของยีนดังกล่าวนี้กับยีนอื่นๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม Blast และ Clustal W
3. ศึกษาการแสดงออกของ cytochrome P450 gene ในระยะต่างๆ ของการเจริญของเซลล์พืชไข่เน่าเพาะเลี้ยงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในระดับห้องปฏิบัติการ ไม่รวมการศึกษาการแสดงออกของยีนในเซลล์พืชไข่เน่าที่อยู่ในธรรมชาติ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากโครงการวิจัย

1.4.1 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากโครงการวิจัย

1. ทราบถึงยีน คุณสมบัติบางประการ ตลอดจนการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ Ecdysone 20-monooxygenase จากเซลล์พืชไข่เน่าเพาะเลี้ยง
2. ได้ข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญทางชีวเคมีที่ช่วยให้เข้าใจกลไกการควบคุมการสังเคราะห์และการแสดงออกของยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ Ecdysone 20-monooxygenase จากเซลล์พืช ซึ่งข้อมูลที่ได้ยังสามารถนำไปประ ยุกต์ใช้เพื่อการศึกษาทางด้านนี้ต่อไปในอนาคต โดยเฉพาะเพื่อการพัฒนาแนวทางในการเพิ่มผลผลิตของฮอร์โมน

ลอกคราบเบตา-เอคไดโซน หรือเพื่อการโคลนยีนดังกล่าวเข้าสู่สิ่งมีชีวิตอื่นที่มีวงจรชีวิตสั้นเพื่อให้มีความสามารถในการผลิตฮอร์โมนลอกคราบเบตา-เอคไดโซนได้ ซึ่งจะทำให้ระยะเวลาในการผลิตสั้นกว่าวิธีการผลิตจากเซลล์พืชหรือสัตว์

1.4.2 หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. หน่วยงานวิจัยและพัฒนาแมลงเศรษฐกิจ และกรมประมง โดยเฉพาะหน่วยงานวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้ง ซึ่งสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปใช้เป็นแนวทางในการผลิตฮอร์โมนลอกคราบเบตา-เอคไดโซนต่อไป
2. หน่วยงาน/สถาบันการศึกษาต่างๆหรือภาคอุตสาหกรรมที่มีการวิจัยเกี่ยวข้องกับการใช้เทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรมในการพัฒนาสิ่งมีชีวิตแปลงยีนเพื่อการผลิตสารในระดับอุตสาหกรรม
3. โครงการผลิตบัณฑิตระดับบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่สามารถใช้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิทยานิพนธ์สำหรับผลิตนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาของมหาวิทยาลัยขอนแก่นได้