สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	**ก**
บทคัดย่อภาษาไทย	**ข**
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	**ค**
สารบัญเรื่อง	**ง**
สารบัญรูปภาพ	**ช**
สารบัญตาราง	**ฌ**
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาของโครงการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากโครงการวิจัย	3
บทที่ 2 ทฤษฎี	5
2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับฮอร์โมนแอคไดโซน	5
2.2 ต้นไข่เน่า	8
2.3 งานวิจัยเกี่ยวกับการผลิตสารเอคไดโซนจากต้นไข่เน่า	9
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย	11
3.1 วัสดุและอุปกรณ์	11
3.1.1 อุปกรณ์การทดลอง	11
3.1.2 วัสดุการทดลอง	11
3.2 วิธีการวิจัย	13
3.2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์แคลลัสพืชไข่เน่า	13
3.2.2 การศึกษารูปแบบการเจริญของแคลลัสพืชไข่เน่า	13
3.2.3 การแยกและศึกษาคุณลักษณะบางประการของ cytochrome P450 gene ที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ ecdysone 20-monooxygenase จากเซลล์พืชไข่เน่าเพาะเลี้ยง	13

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

หน้า

3.2.4 การศึกษาการแสดงออกของ cytochrome P450 gene ในระยะต่างๆ ของการเจริญของเซลล์แคลลัสต้นไข่เน่าด้วยเทคนิค RT-PCR 20

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง 22

4.1 การศึกษาการเจริญของเซลล์แคลลัสพืชไข่เน่าเพาะเลี้ยง 22

4.2 การโคลนยีนบางส่วนและศึกษาคุณลักษณะบางประการของ cytochrome P450 gene ที่ควบคุมการสังเคราะห์สารเอคไดโซนในต้นไข่เน่า 23

4.2.1 การออกแบบไพรเมอร์จำเพาะสำหรับเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของ Cytochrome P450 gene จากต้นไข่เน่า 23

4.2.2 การแยกสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากเซลล์พืชและการทำให้บริสุทธิ์ 24

4.2.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของ cytochrome P450 gene จากเซลล์แคลลัสพืชไข่เน่าเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค PCR 25

4.2.4 การโคลนชิ้น PCR product และการคัดเลือกโคลนที่ต้องการ 25

4.2.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR 28

4.2.6 การติดตามการสังเคราะห์ cytochrome P450 gene ในเซลล์พืช 32

4.3 การศึกษาการแสดงออกของ cytochrome P450 gene ในระยะต่างๆ ของการเจริญของเซลล์แคลลัสต้นไข่เน่า 33

4.3.1 การแยกสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากเซลล์แคลลัสต้นไข่เน่าที่เจริญในระยะต่างๆ 33

4.3.2 การศึกษาการแสดงออกของ cytochrome P450 gene จากเซลล์แคลลัสต้นไข่เน่าที่เจริญในระยะต่างๆ ด้วยเทคนิค RT-PCR 34

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 36

5.1 การศึกษาการเจริญของเซลล์แคลลัสพืชไข่เน่าเพาะเลี้ยง 36

5.2 การโคลนยีนบางส่วนและศึกษาคุณลักษณะบางประการของ cytochrome P450 gene ที่ควบคุมการสังเคราะห์สารเอคไดโซนในต้นไข่เน่า 36

5.3 การศึกษาการแสดงออกของ cytochrome P450 gene ในระยะต่างๆ ของการเจริญของเซลล์แคลลัสต้นไข่เน่า 37

สารบัญเรื่อง (ต่อ)

	หน้า
เอกสารอ้างอิง	38
ภาคผนวก	40
ภาคผนวก ก	41
ภาคผนวก ข	43
ภาคผนวก ค	48
ภาคผนวก ง	49

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของฮอร์โมนลอกคราบแอลฟาและเบตา-เอคไดโซน 5

รูปที่ 2 วิถีที่เป็นไปได้ในการสังเคราะห์สารเบตา-เอคไดโซนในแมลง 7

รูปที่ 3 วิถีการสังเคราะห์ฮอร์โมนลอกคราบที่เป็นไปได้ในพืช 8

รูปที่ 4 ลักษณะของต้นไข่เน่า 9

รูปที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ (น้ำหนักแห้ง (กรัม)) กับ ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (วัน) 23

รูปที่ 6 ลักษณะของเซลล์แคลลัสจากต้นไข่เน่าที่เจริญอยู่บนอาหารสูตร ½ MS 23

รูปที่ 7 แสดงแถบดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้จากเซลล์พืชไข่เน่าเพาะเลี้ยง 24

รูปที่ 8 ผลการวิเคราะห์ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นยีน cytochrome P450 Gene ด้วยเทคนิค PCR ภายหลังที่แยกขนาดด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis 25

รูปที่ 9 แถบพลาสมิดดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้จากโคโลนีสีขาวซึ่งคาดว่าน่าจะมีชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่บนโมเลกุลของพลาสมิด 27

รูปที่ 10 แถบพลาสมิดดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้จากโคโลนีสีขาวภายหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI 28

รูปที่ 11 โครมาโตแกรมแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR ของ cytochrome P450 gene จากเซลล์แคลลัสพืชไข่เน่าในส่วนของไพร์เมอร์เส้นฟอร์เวอร์ส 29

รูปที่ 12 โครมาโตแกรมแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR ของ cytochrome P450 gene จากเซลล์แคลลัสพืชไข่เน่าในส่วนของไพร์เมอร์เส้นรีเวอร์ส 30

รูปที่ 13 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR ของ cytochrome P450 gene จากเซลล์แคลลัสพืชไข่เน่า 31

รูปที่ 14 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากเซลล์แคลลัสต้นไข่เน่าที่เกิดปฏิกิริยาไฮบริไดเซชั่น (hybridization pattern) กับดีเอ็นเอตรวจติดตามภายหลังจากการตัดแบบ single Digestion ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด 33

รูปที่ 15 ผลการวิเคราะห์อาร์เอ็นเอรวมที่แยกสกัดได้จากแคลลัสต้นไข่เน่าที่เจริญในระยะต่างๆ 34

รูปที่ 16 ผลการศึกษาการแสดงออกของ cytochrome P450 gene ในแต่ละระยะการเจริญของแคลลัสต้นไข่เน่าด้วยเทคนิค RT-PCR 35

รูปที่ 17 แผนที่ของพลาสมิด pGEM T-easy vector 48

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 18 แสดงการรินเจลและการนำเจลที่แห้งแล้วไปเข้าเครื่อง electrophoresis 50
รูปที่ 19 แสดงภาพถ่ายอะกาโรสเจล ลักษณะของ band และ lane ที่เกิด 50
รูปที่ 20 รูปแสดงภาพถ่ายอะกาโรสเจลหลังผ่านกระบวนการ electrophoresis 51

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 รายชื่ออุปกรณ์ รุ่น/ยี่ห้อ และบริษัทผลิตอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัย 11

ตารางที่ 2 ค่าการเจริญ (น้ำหนักแห้ง) ของเซลล์แคลลัสพืชไข่เน่าที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร 1/2MS 22

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับใช้เป็นไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน Cytochrome P450 gene 24

ตารางที่ 4 แสดงผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Cytochrome P450 gene จากต้นไข่เน่ากับสิ่งมีชีวิตอื่น 31

ตารางที่ 5 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง 41

ตารางที่ 6 ครุภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง 41