ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

ปริญญา

พันธุศาสตร์	พันธุศาสตร์
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง การขยายพันธุ์สบู่ดำโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *APETALA2* ในอะราบิดอปซิสและสบู่ดำ

Plant Propagation in *Jatropha curcas* L. by Tissue Culture and Alteration of *APETALA2* Expression in *Arabidopsis thaliana* and *Jatropha curcas* L.

นามผู้วิจัย นายเฉลิมพล ศรีอุลย์พันธุ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(อาจารย์สมพิศ สามิภักดิ์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(อาจารย์ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(รองศาสตราจารย์สมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช, Dr.Agr.Sci.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การขยายพันธุ์สบู่ดำโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *APETALA2* ในอะราบิดอปซิสและสบู่ดำ

Plant Propagation in *Jatropha curcas* L. by Tissue Culture and Alteration of *APETALA2* Expression in *Arabidopsis thaliana* and *Jatropha curcas* L.

โดย

นายเฉลิมพล ศรีอดุลย์พันธุ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)
พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เฉลิมพล ศรีอคุลย์พันธุ์ 2555: การขยายพันธุ์สบู่ดำโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *APETALA2* ในอะราบิดอปซิสและสบู่ดำ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์) สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพันธุศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์สมพิศ สามิภักดิ์, Ph.D. 114 หน้า

Jatropha curcas L. อยู่ในวงศ์ EUPHORBIACEAE เป็นพืชน้ำมันสามารถนำมาหีบได้เป็นน้ำมัน และใช้เป็นพลังงานทดแทน เนื่องจากปริมาณผลผลิตต่อไร่ของสบู่ดำยังน้อยอยู่ จึงได้เริ่มทำการทดลองศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำสายพันธุ์ KUBP 78-9 โดยสร้างแคลลัสจากใบอ่อน ก้านใบ และลำต้น ได้ภายใน 1-2 สัปดาห์ บนอาหารสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร, 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ผลที่ได้เกิดกลุ่มก้อนแคลลัสมีสีเขียว และมีการแพ็คตัวกันอย่างหนาแน่น จากนั้นนำมาชักนำให้เกิดเป็นปลายยอดทวีคูณได้สำเร็จบนสูตรอาหาร MS ที่เติม BAP ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 4-6 สัปดาห์ และสามารถชักนำให้เกิดรากได้สำเร็จ บนสูตรอาหาร ½MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้เวลา 5-6 สัปดาห์ ส่วนงานทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลมีรายงานมาจากหลายงานวิจัยได้กล่าวไว้ว่ายีน *APETALA2* นั้นมีบทบาทที่สำคัญในการควบคุมขนาดของเมล็ด, น้ำหนักของเมล็ด, การสะสมของน้ำมัน และโปรตีนในเมล็ด, จำนวนเซลล์ของเอ็มบริโอ และขนาดของเซลล์ จึงทำการสร้าง RNAi silencing construct เพื่อลดการแสดงออกของยีน *APETALA2* ในอะราบิดอปซิส โดยออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะ 3 คู่ เพื่อจะเพิ่มปริมาณชิ้นยีน 3 ส่วนของยีน *APETALA2* และสร้าง RNAi construct ได้สำเร็จ 2 construct โดยได้เชื่อมเข้าไปในเวกเตอร์ pHellsgate8 แล้วทำการถ่ายฝากโครงสร้างยีนเข้าไปในอะโกรแบคทีเรียม จากนั้นจึงดำเนินการถ่ายฝากโครงสร้างเข้าไปในต้นอะราบิดอปซิสด้วยวิธี floral dip เพื่อที่จะทำ Homologous gene silencing จากนั้นทำการคัดเลือกเมล็ดบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน แล้วตรวจสอบโดยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับโครงสร้าง แล้วมาตรวจสอบการแสดงออกด้วยการทำปฏิกิริยา Semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ *Actin* เป็นยีนอ้างอิง ผลการตรวจสอบพบว่าต้นอะราบิดอปซิสในรุ่น T_1 ที่มีชิ้นส่วน pJC2/14 และ pF2/4/2 มีการแสดงออกของยีน *AP2* ที่น้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับ wild type ขณะที่ต้นที่มีชิ้นส่วน pF1/3/1 พบว่ายังคงมีการแสดงออกเท่าเดิม นอกจากนั้นได้ดำเนินการถ่ายฝาก RNAi construct เข้าสู่เนื้อเยื่อสบู่ดำแต่ไม่ประสบความสำเร็จ

_____ _____ ____/ ____/ _____

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Charlermpon Sriadunphan 2012: Plant Propagation in *Jatropha curcas* L. by Tissue Culture and Alteration of *APETALA2* Expression in Arabidopsis thaliana and *Jatropha curcas* L.
Master of Science (Genetics), Major Field: Genetics, Department of Genetics.
Thesis Advisor: Ms. Sompid Samipak, Ph.D. 114 pages.

Jatropha curcas L. is a plant in family EUPHORBIACEAE whose oil can be sqeezed out and used directly in low power water pump. The yield of this plant per unit area is low. First experiment was to find suitable tissue culture media recipe for *J. curcas* cv KUBP 78-9. Callus formation from young leaf, leaf petiole and young shoot within 1-2 weeks was achieved on MS medium supplemented with 0.5 mg/l BAP, 1.0 mg/l 2,4-D and 1.0 mg/l IAA. These calli were green and tightly packed. Multiple shoot proliferation was successfully carried out on MS supplemented with 0.5 mg/l BAP and 1 mg/l IBA while root initiation was successfully induced on ½MS supplemented with 10 mg/l IBA. Another experiment was to decrease *APETELA* 2 expression. *APETELA* 2 gene was reported to have important roles in controlling seed size, seed weight, embryo cell numbers and size of the cell. To lower the expression of this gene in *J. curcas* three pairs of primers were designed to amplify three regions of the *AP2* gene and used to successfully construct two RNAi silencing vectors by linking into pHellsgate8. These constructs were transferred into *Agrobacterium tumefaciens*. Floral dip method was performed to transfer these constructs into Arabidopsis to do homologous gene silencing. Seeds were obtained and selected on Kanamycin containing media. Then the survived plants were checked with Polymerase Chain Reaction using primers specific for the construct and transformants were identified. Expression analysis was done using semi-quantitative RT-PCR with primers specific *AP2* gene. *Actin* gene expression was used as a loading control. T_1 Arabidopsis plant containing pJC2/14 and pF2/4/2 constructs showed reduced *AP2* expression while plant containing pF1/3/1 showed normal expression. Transformation into *J. curcas* tissues was performed but not successful.

_____ _____ ____ / ____ / _____

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ดร.สมพิศ สามิภักดิ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา และ ดร.ชัชวาล จันทราสุริยารัตน์ กรรมการที่ปรึกษาที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ ตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ จนงานวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์และคอยถามไถ่ด้วยความห่วงใยมาโดยตลอดพร้อมทั้งการกระตุ้นในการดำเนินปฏิบัติการ และการเขียนวิทยานิพนธ์เพื่อให้ทันตามเวลาที่ตั้งเป้าหมายไว้ ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ และผศ.นฤมล ธนานันต์ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัยที่กรุณาให้คำปรึกษา และตรวจสอบวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.ศิริวรรณ บุรีคำ ที่ได้แนะนำเกี่ยวกับงานวิจัยด้านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของสบู่ดำ และคณะกรรมการตรวจโครงการพิเศษที่ช่วยชี้แนะข้อบกพร่องซึ่งเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยเป็นอย่างมาก ขอขอบคุณ คุณกิตติยา แสงสว่าง ที่ให้ความอนุเคราะห์ชิ้นยีนที่แยกมาจากสบู่ดำ และดร.ศุภชัย วุฒิพงศ์ชัยกิจ ที่ให้ความอนุเคราะห์เวกเตอร์ pHellsgate 8 รวมถึงขอขอบคุณสมาชิกห้องปฏิบัติการ 4615 นิสิตภาควิชาพันธุศาสตร์ อาจารย์ทุกท่านในภาควิชาพันธุศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือเมื่อพบกับปัญหาบางประการ และให้คำแนะนำใน การวิจัยเป็นอย่างดี

สุดท้ายนี้ผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวของผู้จัดทำที่คอยเป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนทุกด้าน จนสำเร็จการศึกษา และเพื่อนๆ ร่วมคณะทุกคนที่คอยตักเตือนกันในยามที่ผิดพลาด และคอยเป็นกำลังใจจนทำให้ผ่านอุปสรรคนั้นไปได้ ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้งานวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์ไปได้ด้วยดี

เฉลิมพล ศรีอดุลย์พันธุ์

เมษายน 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ (1)

สารบัญตาราง (2)

สารบัญภาพ (3)

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (7)

คำนำ 1

วัตถุประสงค์ 4

การตรวจเอกสาร 5

อุปกรณ์และวิธีการ 25

อุปกรณ์ 25

วิธีการ 25

ผลและวิจารณ์ 45

สรุปและข้อเสนอแนะ 79

เอกสารและสิ่งอ้างอิง 81

ภาคผนวก 88

ภาคผนวก ก การแบ่งชิ้นยีน *AP2* เป็น 3 ส่วน และจำนวน coding region 89

ภาคผนวก ข ภาพโครงสร้าง pENTR™ Directional TOPO® วิธีสร้างพลาสมิดสายผสมและส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ 91

ภาคผนวก ค ภาพโครงสร้าง pHellsgate8 และวิธีสร้างพลาสมิดสายผสม 96

ภาคผนวก ง ขั้นตอนโดยรวมของเทคนิค Floral dip 99

ภาคผนวก จ โครงสร้างของต้น และดอกจากต้นอะราบิดอปซิส และเปรียบเทียบยีนที่มีผลต่อการสร้างดอก 101

ภาคผนวก ฉ ขั้นตอนการดูแลตลอดจนการเก็บเมล็ดต้นอะราบิดอปซิส 104

ภาคผนวก ช วิธีเตรียมสาร 107

ประวัติการศึกษาและการทำงาน 114

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1	ทดสอบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดอวัยวะต่างๆของสบู่ดำ	26
2	คู่ไพรเมอร์สำหรับโคลนลำดับนิวคลีโอท์ที่สมบูรณ์ของยีนเป้าหมาย	27
3	คู่ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณของยีนเป้าหมายสำหรับใช้กับ Gateway Vector® System	32
4	อัตราส่วนการทำปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Xho*I	37
5	คู่ไพรเมอร์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากบนเวกเตอร์ pStargate	37
6	แสดงลำดับเบสของคู่ไพร์เมอร์ที่จำเพาะบนเวกเตอร์ pHellsgate8	42
7	คู่ไพรเมอร์ลำดับนิวคลีโอท์จากยีน *Actin* ของต้นอะราบิดอปซิส	43
8	คู่ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณของยีนเป้าหมายจากพืชสบู่ดำ	44
9	ผลการวัดค่าความเข้มข้นของ pENTR™ Directional TOPO® vector: Fragment	56
10	ผลการวัดค่าความเข้มข้นของ RNAi Construct	59
11	จำนวนเมล็ดที่ได้จากการถ่ายยีนในรุ่น T_1	66
12	ผลการวัดค่าความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่แยกสกัดมาได้จากต้นอะราบิดอปซิสรุ่น T_1	72

ตารางผนวกที่

ช3	สารเคมีในอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)	113

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กลไลการแลกเปลี่ยน Entry clone กับ pHellsgate8 ของ LR Clonase™ II Enzyme	36
2	ผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากก้าน ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 2 สัปดาห์	46
3	ผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากลำต้น ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 2 สัปดาห์	46
4	ผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากลำต้นและก้าน ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 3 สัปดาห์	46
5	ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 2 สัปดาห์	47
6	ผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากใบอ่อน ในอาหารแข็งสูตร CI/L: MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 2 สัปดาห์	47
7	ผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากแคลลัส ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 4-5 สัปดาห์	48
8	ผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากต้นสบู่ดำ ในอาหารแข็งสูตร ½MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 5-6 สัปดาห์	48
9	แสดงลำดับเบสของยีน *AP2* ที่มาจาก GenBank accession number: NM_119856.2	50
10	เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของอาร์เอ็นเอจากใบอ่อนของต้นอะราบิดอปซิส	51
11	เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของการสกัดอาร์เอ็นเอของสบู่ดำด้วยวิธี PureLink™ Plant RNA Reagent	51
12	เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนทั้ง 3 ชิ้นส่วน	52
13	ผลของโคโลนีพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบการเชื่อมต่อชิ้นยีนส่วนที่ 1 กับ pENTR™ vector	53
14	ผลของโคโลนีพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบการเชื่อมต่อชิ้นยีนส่วนที่ 2 กับ pENTR™ vector	54
15	ผลของโคโลนีพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบการเชื่อมต่อชิ้นยีนส่วนที่ 3 กับ pENTR™ vector	54

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
16	เจลแสดงผลการสกัดพลาสมิดจากโคลนที่คัดเลือก ชิ้นส่วนที่ 1 คือ โคโลนีที่ 1 และ 4 ชิ้น ส่วนที่ 2 จากโคโลนีที่ 4 และ 6 ชิ้น ส่วนที่ 3 จากโคโลนีที่ 12 และ 13	55
17	เจลแสดงผลการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จากโคโลนีที่คัดเลือกมาโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ	55
18	ผลของการตรวจสอบความสำเร็จในการเคลื่อนย้ายชิ้นส่วนยีนระหว่างเวกเตอร์ pENTR กับ pHellsgate8 ด้วยโคโลนีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ	58
19	เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแสดงผลการสกัดพลาสมิด จาก pHellsgate8 ที่มียีน *AP2*	59
20	โครงสร้างการเกิด hpRNA แบบที่ 1 ในการแทรกของชิ้นส่วนแบบโดยตรง และตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *XhoI*	61
21	โครงสร้างการเกิด hpRNA แบบที่ 2 ในการแทรกของชิ้นส่วนแบบจุดตัดเกิดการคร่อมของชิ้นอินทรอน และตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *XhoI*	61
22	เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ *Xba*I เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของ RNAi construct	62
23	เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ *Xho*I เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของ RNAi construct	63
24	เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ Star-F และ Star-R	64
25	แผนภาพแสดงทิศทางของชิ้นส่วนที่ pF1C3 pHells	65
26	แผนภาพแสดงทิศทางของชิ้นส่วนที่ pF2C4 pHells	65
27	การคัดเลือกต้นอะราบิดอปซิสที่ได้รับการถ่ายชิ้น T-DNA เข้าไปในจีโนม โดยเลี้ยงบนอาหาร ½MS ที่เติมยาปฏิชีวนะกานามัยซิน	67
28	ต้นอะราบิดอปซิสที่ผ่านการถ่ายยีน T-DNA ในรุ่น T_1 เมื่อมีการย้ายลงปลูกในดิน	68
29	เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากต้นอะราบิดอปซิส	68
30	เจลแสดงผลการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบการมีโครงสร้างพลาสมิดในจีโนมพืชโดยใช้ไพรเมอร์	69
31	เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของการสกัดอาร์เอ็นเอจากต้นอะราบิดอปซิสที่ได้รับการถ่ายฝาก	70
32	เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของการสกัดอาร์เอ็นเอจากต้นอะราบิดอปซิสที่ได้รับการถ่ายฝาก	71

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

33 เจลแสดงการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ AtActin2-F และ AtActin2-R บนดีเอ็นเอจากต้นอะราบิดอปซิสที่ได้รับการถ่ายฝาก 73

34 เจลแสดงผลปฏิกิริยา Semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อชิ้นส่วนที่ pJC2/14 74

35 เจลแสดงผลปฏิกิริยา Semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อชิ้นส่วนที่ pF1/3/1 75

36 เจลแสดงผลปฏิกิริยา Semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อชิ้นส่วนที่ pF2/4/2 76

37 แสดงการถ่ายฝาก RNAi construct เข้าไปในเนื้อเยื่อใบอ่อน ลำต้น และก้านของสบู่ดำ 78

38 แสดงผลเนื้อเยื่อที่ทำการถ่ายฝากเข้าต้นสบู่ดำหลังจากของวิกฤตการณ์น้ำท่วมกรุงเทพมหานคร 78

ภาพผนวกที่

ก1 ลำดับเบสของยีน *AP2* ในส่วนที่เป็น complete coding sequence แยกออกเป็น 3 ชิ้นส่วน โดยส่วนที่เป็นสีแดง คือ ชิ้นยีนส่วนที่ 1, ส่วนที่เป็นสีเหลือง คือ ชิ้นยีนส่วนที่ 2 และส่วนที่เป็นสีฟ้า คือ ชิ้นยีนส่วนที่ 3 90

ก2 ส่วนประกอบของยีน *AP2* ประกอบด้วย 10 เอกซอน 9 อินทรอน 90

ข1 ตำแหน่งของชิ้นยีนที่จะเข้าจับกับ pENTR™ Directional TOPO® vector 92

ข2 โครงสร้างของ pENTR™ Directional TOPO® vector 92

ข3 แสดงโคโลนีของยีน *AP2* ทั้ง 3 ส่วนจากต้นอะราบิดอปซิสที่ผ่านการโคลนด้วย One Shot® chemically competent 93

ข4 ส่งหาลำดับเบสจากชิ้นยีน *AP2* ในส่วนที่ 1 93

ข5 ส่งหาลำดับเบสจากชิ้นยีน *AP2* ในส่วนที่ 2 94

ข6 ส่งหาลำดับเบสจากชิ้นยีน *AP2* ในส่วนที่ 3 94

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่ **หน้า**

ข7 ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อตรวจสอบทิศทางของยีน *AP2* ที่อยู่ในเวกเตอร์ pHellsgate8 95
ค1 โครงสร้างของเวกเตอร์ pHellsgate8 97
ค2 แสดงผลการโคลนทั้ง 2 ชิ้นยีนจากต้นอะราบิดอปซิสที่ถ่ายฝากเข้าไปในอะโกรแบคทีเรียม 98
ค3 แสดงผลการโคลนทั้ง 3 ชิ้นยีนจากสบู่ดำที่ถ่ายฝากเข้าไปในอะโกรแบคทีเรียม 98
ค4 การตรวจหาตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *XhoI* บนชิ้นยีนส่วนที่ 2 ด้วยโปรแกรม NEB cutter version 2.0 98
ง1 ขั้นตอนโดยรวมของการถ่ายยีนด้วยเทคนิค Floral dip 100
จ1 โครงสร้างของต้นอะราบิดอปซิส 102
จ2 เปรียบเทียบความกว้างที่มีผลต่อการแสดงออกของแต่ละยีนในการสร้างดอก 102
จ3 โครงสร้างและส่วนประกอบของดอกอะราบิดอปซิส 103
ช1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษา คือ Fermentas GeneRuler™ 1 Kb Ladder (Fermentus, USA) 111
ช2 แถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษา คือ VC 100 bp Plus DNA Ladder (Vivantis, Canada) 111

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

bp	=	base pair
$CaCl_2$	=	calcium chloride
CaMV	=	cauliflower mosaic virus
ccdB	=	colorado criminal defense Bar
cDNA	=	complementary deoxyribonucleic acid
CTAB	=	cetyltrimethylammonium bromide
DEPC	=	diethyl pyrocarbonate
DNA	=	deoxyribonucleic acid
DNase	=	deoxyribonuclease
dNTP	=	deoxynucleotide-5'-triphosphate
E. coli	=	*Escherichia coli*
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetic acid
KCl	=	potassium chloride
LiCl	=	lithium chloride
NaCl	=	sodium chloride
PCR	=	polymerase Chain Reaction
PVP	=	polyvinylpyrrolidone
RNA	=	ribonucleic acid
RNAi	=	ribonucleic acid interferance
RNase	=	ribonuclease
rRNA	=	ribosomal ribonucleic acid
Taq	=	*Thermus aquaticus*
Tris	=	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การขยายพันธุ์สบู่ดำโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *APETALA2* ในอะราบิดอปซิสและสบู่ดำ

Plant Propagation in *Jatropha curcas* L. by Tissue Culture and Alteration of *APETALA2* Expression in *Arabidopsis thaliana* and *Jatropha curcas* L.

คำนำ

ในปัจจุบันประเทศไทยต้องนำเข้าเชื้อเพลิงเกือบทั้งหมด ทำให้สูญเสียเงินตราในการนำเข้าน้ำมันดิบปีละหลายแสนล้านบาท และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี ซึ่งเป็นผลกระทบที่สำคัญต่อระบบเศรษฐกิจภายในประเทศ ดังนั้นจึงควรต้องหาพลังงานที่จะมาทดแทนพลังงานจากปิโตรเลียม ซึ่งนอกจากจะช่วยลดการนำเข้าพลังงานเชื้อเพลิงจากต่างประเทศ ยังคงมีเงินตราหมุนเวียนอยู่ภายใน ประเทศมากขึ้นด้วย

ไบโอดีเซล เป็นเชื้อเพลิงเหลวที่ผลิตมาจากน้ำมันพืชหรือไขมันสัตว์ โดยผ่านกระบวนการทางเคมีที่ทำให้ขนาดโมเลกุลเล็กลง เรียกว่า “Transesterification” เพื่อทำให้น้ำมันไบโอดีเซลมีคุณสมบัติคล้ายกับน้ำมันดีเซลปกติให้มากที่สุด น้ำมันไบโอดีเซลสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบหลายชนิด เช่น ปาล์มน้ำมัน สบู่ดำ น้ำมันจากมะพร้าว ถั่วเหลือง ละหุ่ง งา ทานตะวัน หรือแม้แต่น้ำมัน ที่เหลือจากการทอด เป็นต้น ผลพลอยได้จากการใช้น้ำมันไบโอดีเซล คือ สามารถลดปริมาณการนำเข้า เชื้อเพลิงจากต่างประเทศ ลดมลภาวะทางอากาศ ช่วยบรรเทาภาวะโลกร้อน อีกทั้งยังเป็นเชื้อเพลิงทางเลือกสำหรับประเทศไทย แต่ยังพบปัญหาบางประการเกี่ยวกับไบโอดีเซล เช่น บางชนิดจะมี ความหนืดทำให้ไส้กรองน้ำมันรถยนต์อุดตัน อันเป็นสาเหตุใหญ่สำหรับรถยนต์ที่ใช้น้ำมันไบโอดีเซล

สบู่ดำเป็นพืชน้ำมันชนิดหนึ่งอยู่วงศ์เดียวกับยางพารา พญาไร้ใบ สลัดได โป๊ยเซียน คริสต์มาส หญ้ายาง สบู่ดำ มีชื่อเรียกแตกต่างกันไปตามภูมิภาค เช่น ภาคเหนือ เรียก มะหุ่งฮั้ว ภาคอีสาน เรียกหมากเยา มะเยา หรือ สีหลอด (เพราะเป็นยาถ่ายคล้ายสลอด) ในขณะที่ภาคใต้เรียกว่า หงเทศ หรือ หุ่งเทศ (ละหุ่งต่างประเทศ) สบู่ดำมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Jatropha curcas* L.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae เมล็ดมีลักษณะคล้ายเมล็ดละหุ่ง ผลมีสีเขียว เมื่อสุกจะสีเหลือง แต่เมื่อ ผลแห้งจะมี สีน้ำตาลดำ ซึ่งที่ผ่านมามักจะถูกปลูกอยู่ริมรั้วบ้าน เพื่อป้องกันสัตว์เข้ามากิน พืชผลที่ปลูกไว้ แต่เมื่อ ราคาน้ำมันเริ่มสูงคนจึงหันกลับมาให้ความสนใจกันอย่างจริงจังมากขึ้น น้ำมันที่สกัด หรือน้ำมันที่หีบ ที่ได้จากสบู่ดำนั้น เมื่อนำไปผ่านกระบวนการทางเคมีในการทำ ไบโอดีเซลหรือที่เรียกว่า กระบวน การทรานเอสเตอริฟิเคชั่น (Transesterification) นั้นจะทำให้ ได้น้ำมันไบโอดีเซล 100 เปอร์เซ็นต์ (B100) ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลมากที่สุด เมื่อเทียบกับไบโอดีเซลจากพืชชนิดอื่น โดยผลการทดสอบการใช้น้ำมัน B100 จากสบู่ดำ ปรากฏว่า ได้ผลดีและเป็นที่น่าพอใจมาก ทั้งยังไม่ส่ง ผลกระทบต่อเครื่องยนต์ แต่การที่จะพัฒนาให้น้ำมันสบู่ดำให้สามารถใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลรอบจัดได้ ต้องมีการปรับโครงสร้างให้เหมาะสมกับเครื่องยนต์ด้วยการนำน้ำมันสบู่ดำมาเข้าสู่กระบวนการ ทรานเอสเตอริฟิเคชั่น เพื่อตัดทอนสายโมเลกุลที่ยาวของน้ำมันลง นอกจากนั้นการที่สบู่ดำเป็นพืชที่ ไม่สามารถรับประทานได้เหมือนปาล์มน้ำมัน จึงทำให้ราคาของสบู่ดำไม่เกิดความผันผวนไปตาม การบริโภคในตลาด และสบู่ดำก็ยังมีคุณภาพดีกว่าน้ำมันปาล์มหลายประการ ที่เห็นชัดคือ จุดแข็งตัว หรือเป็นไขต่ำกว่า โดยจุดแข็งตัวของน้ำมันปาล์มมีค่าประมาณ 18 องศาเซลเซียส ในขณะที่น้ำมันดิบสบู่ดำ ความแข็งตัวจะอยู่ที่อุณหภูมิ -7 องศาเซลเซียส ซึ่งเพียงพอต่อการใช้งานในประเทศเขตร้อน อีกทั้ง ค่าความหนืดที่มีค่าต่ำกว่าน้ำมันปาล์มและ ไม่เป็นผลเสียต่อเครื่องยนต์แต่ข้อด้อยของสบู่ดำ คือ มีปริมาณผลผลิตต่อไร่ต่ำ เมื่อเทียบกับพืชน้ำมันชนิดอื่น เนื่องจากมีทั้งดอกเพศผู้และดอกเพศเมีย ในช่อดอกเดียวกัน โดยมีปริมาณดอกเพศผู้มากกว่าดอกเพศเมีย

การปรับปรุงพันธุ์สบู่ดำให้มีศักยภาพการให้ผลผลิตและองค์ประกอบผลผลิตที่ดี เป็นแนวทางหนึ่งในการแก้ไขปัญญหาซึ่ง จากรายงานของแอนนา และคณะ (2549) รวบรวมพันธุ์สบู่ดำจากแหล่งต่างๆ ปลูกทดสอบผลผลิตที่ได้มีความแตกต่างกันมาก พบว่ามีความแปรปรวนขององค์ประกอบ ผลผลิตด้านจำนวนช่อดอก ขนาดเมล็ด จำนวนกิ่งแรก และกิ่งรอง พบว่าพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงสุด มีจำนวนผลต่อต้นมากถึง 818 ผล ขนาดของเมล็ดปานกลาง (น้ำหนักเมล็ด 100 เมล็ด 76 กรัม) จำนวนกิ่งแรก และกิ่งรองมากที่สุดทำนองเดียวกัน (จเร, 2527) แยกความแตกต่างของพันธุ์สบู่ดำจากลักษณะผลได้ 3 กลุ่ม 1. กลุ่มที่มีทรงผลกลม 2. กลุ่มที่มีทรงผลกลมยาว และมีเปลือกหนากว่า 3. กลุ่มที่มีทรงผลกลมแต่มีขนาดเล็กกว่า 2 กลุ่มแรก โดยกลุ่มที่มีทรงผลกลมจะให้ผลผลิตดีที่สุด

รายงานจากหลายงานวิจัยได้กล่าวไว้ว่ายีน *APETALA2* ที่พบในพืชอะราบิดอปซิส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นั้นมี บทบาทที่สำคัญ ในการควบคุมขนาดของเมล็ด, น้ำหนักของเมล็ด, การสะสมน้ำมัน และโปรตีน ในเมล็ด, จำนวนเซลล์ในเอ็มบริโอ และขนาดของเซลล์ จึงสนใจที่จะศึกษายีน *APETALA2* ในสบู่ดำ นำไปสู่การลดการแสดงออก เพื่อให้ไปเพิ่มของขนาดเมล็ด
และปริมาณน้ำมันจาก เมล็ดของสบู่ดำ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสบู่ดำ ชักนำให้เกิดต้น

2. เพาะเลี้ยง ใบ ก้าน ลำต้น และแคลลัส ชักนำให้เป็นต้น เพื่อให้เกิดยอดหลายยอด และยอดชักนำให้เกิดราก

3. สร้างโครงสร้าง RNAi ที่ชักนำให้เกิดการลดแสดงออกของยีน *AP2*

4. ถ่ายฝากโครงสร้าง RNAi เข้าอะราบิดอปซิสและสบู่ดำและทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *AP2*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

สบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) หรือ Physic Nut

Jatropha มีรากศัพท์มาจากทางการแพทย์ของภาษากรีก 2 คำ คือ iatros แปลว่า หมอ และ trophe แปลว่า อาหาร (พรชัย, 2549) ส่วนคำว่า curcas เป็นชื่อเรียกของสบู่ดำ บริเวณเมือง Malabar ในประเทศอินเดีย

ชื่อพื้นเมือง

สบู่ดำมีชื่อพื้นเมืองหลายชื่อ เช่น มักเยา มะเยา มะหัว มะหุ่งฮั้ว มะโห่ง หงเทก สลอดดำ สบู่หัวเทศ สลอดป่า สลอดใหญ่ สี่หลอด มาเคาะ อยู่ในวงศ์ EUPHORBIACEAE วงศ์เดียวกับยางพารา สบู่แดง ปัตตาเวีย ฝิ่น ต้นหรือมะละกอฝรั่ง หนุมานนั่งแท่น โป๊ยเซียน มันสำปะหลัง มะยม มะขามป้อม และผักหวานบ้าน สบู่ดำ เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางสูงประมาณ 2-7 เมตร อายุยืนไม่น้อยกว่า 20 ปี (ระพีพันธุ์, 2525) มีจำนวนโครโมโซมแบบดิพลอยด์ 2n = 22 ซึ่งโครโมโซมของสบู่ดำมีขนาดเล็กมาก (Timir *et al*., 2007)

สายพันธุ์สบู่ดำที่พบในประเทศไทย สามารถจำแนกตาม ลักษณะทางกายภาพได้ 3 สายพันธุ์ (จเร, 2527) คือ

1. สายพันธุ์ที่มีผลทรงกลม ขนาดปานกลาง มีเปลือกหนาปานกลาง ปลูกทาง ภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้
2. สายพันธุ์ที่มีผลทรงกลมแต่ยาวกว่าสายพันธุ์แรก เล็กน้อย ปลูกทางภาคเหนือ
3. สายพันธุ์ที่มีผลทรงกลม แต่ขนาดเล็กกว่าสองสายพันธุ์แรก ปลูกทางภาคเหนือ และภาคใต้บางจังหวัด

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำต้น เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง มีอายุไม่น้อยกว่า 20 ปี ความสูงประมาณ 6 เมตร ทรงพุ่มมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 เมตร ยอดและใบอ่อนมีสีม่วงแกมเขียว ลำต้นส่วนที่อายุน้อยจะมี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สีเขียวผิวเรียบ อวบน้ำ เปราะหักง่ายเพราะเป็นไม้เนื้ออ่อน และไม่มีแก่น เมื่อมีอายุมากขึ้นโคนต้นมีสีน้ำตาลอมเทา และลำต้นจะเริ่มแตกพุ่ม มีความสูงจากระดับพื้นดินประมาณ 12 เมตร โดยมีกิ่งแตกแขนงออกด้านข้าง

ใบ เป็นแบบใบเดี่ยว แผ่นใบเป็นแบบ palmately compound, orbicular-cardate (broadyovate) คล้ายๆ ใบพุดตาลหรือใบฝ้าย แต่หนากว่าเพราะมีพวกไขเคลือบอยู่ที่ผิวใบ ขอบใบมีรอยหยักตื้นๆตั้งแต่ 3-7 หยัก กว้างและยาวประมาณ 6-15 เซนติเมตร ใบสบู่ดำมีส่วนของก้านใบเชื่อมติดกับส่วนของลำต้น ก้านใบสีเขียว ตำแหน่งของการเกิดใบจะเกิดสลับกัน สบู่ดำมักจะทิ้งใบในฤดูแล้ง โดยเมื่อแล้งจะทิ้งใบหมดทั้งต้น (สมบัติ, 2548)

ดอก พบบริเวณซอกใบใกล้ปลายกิ่ง ลักษณะเป็นช่อคล้ายช่อเชิงหลั่น มักออกเป็นคู่ๆ ช่อยาวได้ถึง 12 เซนติเมตร ดอกย่อยแยกเพศ ดอกเพศผู้ และดอกเพศเมียอยู่แยกกัน แต่อยู่ภายในช่อเดียวกันดอกเพศผู้มีกลีบเลี้ยงเชื่อมติดกัน ปลายแยกเป็นแฉก รูปไข่ สีเหลืองแกมเขียวกว้าง 1.5 มิลลิเมตร โดยประมาณ ปลายกลมด้านในมีขนยาวห่าง เกสรเพศผู้มี 10 อัน แบ่งออกเป็น 2 วง วงนอกแยกออกจากกัน วงในเชื่อมติดกัน อับเรณูยาว 1.5 มิลลิเมตร มีสีเหลือง ดอกเพศเมียมีขนาดใหญ่กว่าดอกเพศผู้และอยู่กลางช่อย่อยมีกลีบเลี้ยงเชื่อมติดกัน ปลายแยกเป็นแฉกยาวประมาณ 4 มิลลิเมตร อัตราส่วนดอกเพศผู้: ดอกเพศเมีย ประมาณ 7: 1 ปริมาณดอกย่อย ประมาณ 70-100 ดอกต่อช่อ แต่จะติดผล 7-15 ผลเท่านั้น

ผล มีรูปร่างค่อนข้างป้อมหรือรูปกระสวย กว้าง 2-3 เซนติเมตร ยาว 2.5-3.5 เซนติเมตร มีเปลือกแข็ง มี 3 พู ผลอ่อนสีเขียว ผลสุกจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และเมื่อแก่จัดเปลือกนอกที่เป็นสีเหลืองจะเปลี่ยนไปเป็นสีดำ ผลแห้งที่ติดอยู่บนต้นจะไม่แตกออก แต่เมื่อผลร่วงลงสู่พื้นดินอาจแตกได้ผลสดหนึ่งผลมีน้ำหนักประมาณ 15 กรัม ผลแห้งน้ำหนักประมาณ 2.6 กรัม ผลเมื่อแกะผนังด้านนอกและ ผนังชั้นกลาง ออกจะพบผนังชั้นใน สานกันเป็นชั้นหุ้มเมล็ดไว้ภายใน หนึ่งผลมีจำนวนเมล็ด 2-3 เมล็ด

เมล็ด มีลักษณะรูปร่างป้อมยาว รูปกระสวย กว้างประมาณ 1 เซนติเมตร และยาวประมาณ 2 เซนติเมตร เปลือกหุ้มเมล็ดสีดำ มีเยื่อหุ้มเมล็ด บุอยู่ภายใน เป็นที่เก็บสะสมน้ำมันและสารเคอร์ซิน (Curcin) ส่วนเนื้อในและเอ็มบริโอ มีสีขาว แต่ละเมล็ดมีน้ำหนักประมาณ 0.5-1 กรัม (ชำนาญ, 2549)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การผสมพันธุ์

เป็นพืชผสมข้ามดอกหรือข้ามต้นโดยอาศัยลมหรือแมลงโดยการถ่ายละอองเกสร ซึ่งเวลาบานของดอกเป็นสิ่งสำคัญที่ควรพิจารณาในการผสมพันธุ์ โดยปกติดอกจะบานเวลาเช้าประมาณ 90% โดยดอกเพศผู้จะบานก่อนดอกเพศเมีย และดอกเพศผู้จะมีปริมาณมากกว่าดอกเพศเมีย ทำให้ได้ผลผลิตอยู่ในเกณฑ์ต่ำ นอกจากนี้สบู่ดำยังมีผลและเมล็ดขนาดเล็ก ทำให้ได้น้ำมันน้อย ดังนั้นการผสมพันธุ์เพื่อปรับปรุงพันธุ์และเพิ่มผลผลิตจึงมีการเน้นหนักในเรื่องต่อไปนี้ (ทวีศักดิ์, 2548)

1. ทำให้เปอร์เซ็นต์ดอกเพศเมียเพิ่มมากขึ้นหรือทำให้จำนวนผลมากขึ้น
2. ทำให้ผลหรือขนาดเมล็ดใหญ่ขึ้น
3. ทำให้มีการออกดอกและเมล็ดแก่เร็วขึ้น

การเก็บเกี่ยวและหีบน้ำมัน

ต้นสบู่ดำเป็นพืชที่ทยอยออกดอก จึงทำให้เก็บเกี่ยวได้ไม่พร้อมกัน โดยมีการเก็บเกี่ยวผลผลิตทุกๆ 2 สัปดาห์ ภายหลังการเก็บเกี่ยว ต้องนำผลไปตากแดดให้แห้งก่อนนำไปกะเทาะเปลือก แล้วนำเมล็ดสบู่ดำ มาบดด้วยเครื่องบดให้แตกแบบหยาบ แล้วนำไปตากแดดหรือใช้ตู้อบเพื่อให้เกิดความร้อน ขั้นสุดท้ายนำมาอัดด้วยเครื่องอัดเพื่อให้ได้น้ำมัน จากนั้นนำน้ำมันที่ได้ใส่ขวดตั้งไว้ประมาณ3 วัน เพื่อให้สารแขวนลอยตกตะกอน แล้วนำน้ำมันส่วนใสมากรอง อีกครั้งเพื่อป้องกันตะกอนไปอุดตันรูน้ำมัน ซึ่งจะทำให้เครื่องยนต์ติดยาก หลังจากนั้นจึงนำมาใส่กับเครื่องยนต์ดีเซลล์รอบต่ำโดยไม่ต้องใช้น้ำมันชนิดอื่นผสมอีก ซึ่งเป็นคุณสมบัติพิเศษของน้ำมันสบู่ดำ ราคาเมล็ดสบู่ดำที่เหมาะสม สำหรับเกษตรกรที่ลงทุนปลูกสบู่ดำในประเทศไทย ควรมีราคาไม่ควรต่ำกว่ากิโลกรัมละ 5 บาทในกรณีกล้าพันธุ์ราคา 3 บาท และได้ผลผลิตไม่ต่ำกว่าไร่ละ 800 กิโลกรัมต่อปี และมีต้นทุนการผลิตที่ 2,500 บาทต่อไร่ (ศิษฎพงษ์, 2548) เพื่อความคุ้มทุนในการปลูกสบู่ดำ ต้องมีเทคโนโลยีการผลิตที่ให้ผลผลิตสูงกว่า (800 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี) อย่างไรก็ตามควรมีการวิเคราะห์แผนธุรกิจให้ชัดเจนว่าสบู่ดำ เป็นพืชที่เหมาะสมที่จะส่งเสริมให้ปลูกในเชิงการค้าหรือไม่ หากจะส่งเสริมเพื่อพัฒนาไปสู่ระดับอุสาหกรรม จำเป็นต้องศึกษาต้นทุน การผลิตอย่างละเอียด เนื่องจากมีค่าใช้จ่ายเกี่ยวกับต้นทุนผันแปรที่เพิ่มขึ้น เช่น ค่าแรงงาน ในการเพาะปลูกการดูแลรักษาตัดแต่งกิ่งให้น้ำปุ๋ย และค่าแรงในการเก็บเกี่ยวผลผลิตเป็นต้น นอกจากความคุ้มทุนทางเศรษฐศาสตร์ดังกล่าวแล้วภัยจากสาร phorbol ester ซึ่งทำให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์ได้ในระหว่างการหีบน้ำมัน ส่วนกาก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมล็ดสบู่ดำมีสารพิษตกค้างอยู่เป็นอันตรายต่อการใช้เป็นอาหารสัตว์ และมีรายงานว่าต้นสบู่ดำเป็นแหล่งอาศัยของแมลงหวี่ขาวพาหนะของโรค cassava mosaic virus ต้องระมัดระวังในการนำเข้าสายพันธุ์สบู่ดำจากต่างประเทศเหล่านี้

การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำ

กระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำกับน้ำมันปาล์ม รวมถึงน้ำมันพืชชนิดอื่นๆ มีลักษณะที่เหมือนกัน ความแตกต่างกันของน้ำมันสบู่ดำกับน้ำมันปาล์มคือ น้ำมันปาล์มจะมีปริมาณของกรดไขมันอิ่มตัวมากกว่าน้ำมันสบู่ดำ ซึ่งทำให้น้ำมันปาล์มดิบไม่สามารถเก็บไว้ได้นานเท่ากับน้ำมันสบู่ดำ เพราะจะทำให้เกิดค่า acid value ที่สูง ซึ่งจะส่งผลต่อกระบวนการผลิตไบโอดีเซลด้วยวิธีการใช้ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่นกับเบส โดยทำให้เกิดสบู่มากขึ้นตามไปด้วย ทำให้ต้องทำปฏิกิริยากับกรดหนึ่งขั้นตอนก่อนจะนำไปทำปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชั่นกับเบส หรือวิธีการอื่นๆนอกจากนี้ไบโอดีเซลจากน้ำมันปาล์มมีค่าจุดไหลเท และจุดหมอกควันสูงเกินมาตรฐานกำหนดของกรมธุรกิจพลังงาน ขณะที่ไบโอดีเซลจากน้ำมันสบู่ดำไม่มีปัญหานี้ อย่างไรก็ตามไบโอดีเซลที่ผลิตได้จากน้ำมันทั้งสองชนิดนี้ควรมีการเติมสาร anti-oxidant ลงไปเพื่อชะลอการเสื่อมสภาพและเป็นการเพิ่มค่าความเสถียรของน้ำมัน

ความเป็นพิษ

ในทุกส่วนของสบู่ดำ เช่น ลำต้น ใบ และ ผล มีสารไฮโดรไซยานิก (hydrocyanic) ที่เป็นอันตราย เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะทำให้คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ชัก หอบ หายใจขัด และอาจตายได้ (Gandhi *et al.*, 1995) ในเมล็ดสบู่ดำมีสารพิษที่เรียกว่า curcin หรือ cureacin และสารพวก resin เจือปนอยู่ หากบริโภคแล้วจะทำให้ท้องเดินมีฤทธิ์คล้ายสลอด และถ้าบริโภคในปริมาณมากอาจทำให้เสียชีวิตได้ ในน้ำมันมีสารฟอร์บอลเอสเทอร์ (Phorbol ester) ซึ่งมีฤทธิ์ในการกระตุ้นให้เซลล์ที่มียีนผิดปกติเกิดการแบ่งตัว และอาจพัฒนาเป็นเซลล์มะเร็งได้ แต่ในปัจจุบันได้มีรายงานว่า มีสบู่ดำพันธุ์ที่ไม่มีพิษซึ่งมีปริมาณของ Phorbol esters น้อยกว่า 0.011% และควรจะได้รับการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป (ชำนาญ, 2549)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารป้องกันกำจัดเชื้อรา (fungicides)

รายงานว่าน้ำสกัดจากเปลือกผลสบู่ดำสามารถยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าทุเรียน และเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรค ในมะม่วงได้ 100% เท่ากับสารเคมี metalaxyl และ prochloraz ตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัดสบู่ดำสามารถยับยั้งการสร้าง sporangia zoospore และการงอก zoospore ของ *P. palmivora* ได้ 91.67, 95.83 และ 100% ตามลำดับ รวมทั้ง สามารถยับยั้งการงอก conidia ของ *C. gloeosporioides* ได้ 100% (รังษี, 2548)

ในปี 1990 Garcia and Lawas รายงานว่าน้ำสกัดจากใบสบู่ดำสามารถควบคุมโรคพืชของ Azolla ที่ มีสาเหตุจากเชื้อรา *Sclerotium sp*. และต่อมา Thangavelu *et. al.* (2004) มีรายงานว่าการใช้สารสกัดสบู่ดำที่ความเข้มข้น 25 และ 50% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum musae* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของกล้วยได้ 100% และ ในปี 2005 Wei และคณะ รายงานว่าสาร β 1, 3- glucanase จากเมล็ดสบู่ดำสามารถฆ่าเชื้อรา *Rhizoctonia solani* และ *Gibberelle zeae* ได้และสรุปว่าสารชนิดนี้มีศักยภาพเป็น biological fungicide ได้

การใช้เป็นอาหารสัตว์

เนื่องจากกากสบู่ดำ (presscake) มีคุณค่าทางอาหารสูงแต่ประกอบด้วยสารพิษมากมาย ได้แก่ curcin, phorbolic esters, saponin, protease inhibitors และ phytates ได้มีการนำกากสบู่ดำมาผ่านกระบวนการกำจัดสารพิษก่อนนำไปเลี้ยงสัตว์โดยการใช้ความร้อนร่วมกับการสกัดด้วยสารเคมี หรือการหมักกากน้ำมันสบู่ดำด้วยเชื้อรา Rhizopus oryzae (Gübitz *et al*., 1997)

ในปี 1997 Gübitz *et al*., 1997 ได้รายงานว่าการใช้ใบของพันธุ์สบู่ดำจากประเทศแม็กซิโกเลี้ยงไหมป่า (eri silkworm) ทำให้ไหมป่ามีชีวิตรอดเพียง 5 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น และน้ำหนักเปลือกรังไหมต่ำกว่าไหมป่าที่เลี้ยงด้วยใบละหุ่ง แต่ในประเทศอียิปต์ได้มีการใช้ใบสบู่ดำเลี้ยงไหมป่า tusser กันอย่างแพร่หลาย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประโยชน์ของสบู่ดำทางการแพทย์

มีการศึกษาโดย Preeti และคณะ (2011) มีรายงานว่าแต่ละเนื้อเยื่อของสบู่ดำสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคต่างๆได้ดังนี้

1. เนื้อเยื่อเมล็ด สามารถช่วยในการรักษา โรคข้อต่อกระดูกอักเสบ (arthritis) โรคเก๊าซ์ (gout) และโรคดีซ่าน (jaundice)

2. เนื้อเยื่อจากกิ่งอ่อน และลำต้น สามารถช่วยในการรักษาอาการปวดฟัน เหงือกอักเสบ ลักปิดลักเปิด และอาการมีหนองไหล (pyorrhea)

3. น้ำเลี้ยงภายในเนื้อเยื่อต้นไม้ สามารถช่วยในการรักษา ผิวหนังอักเสบ และแผลไฟไหม้

4. สารสกัดจากพืช สามารถช่วยในการรักษา โรคเรื้อน (leprosy) โรคซิฟิลิส (syphilis) อาการแพ้ (allergies)

5. น้ำที่แยกมาจากกิ่ง สามารถช่วยในบรรเทาอาการจากโรคเอดส์ และเนื้องอก (tumor)

จากการศึกษาสารสกัดบริสุทธิ์จากรากสบู่ดำ หรือ Curcusone C ต่อการยับยั้งการเจริญและเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิสของเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) พบว่า Curcusone C สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านมเพิ่มมากขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้นอกจากนี้พบว่า Curcusone C สามารถเหนี่ยวนำให้เพิ่มหรือลดระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์มะเร็งแบบอะพอพโทซิสได้

การใช้เป็นพลังงาน

นอกจากการใช้น้ำมันสบู่ดำแปรรูปเป็น methyl หรือ ethyl esters สำหรับผสมน้ำมันดีเซลเป็นไบโอดีเซลแล้วและส่วนอื่นๆ ของสบู่ดำสามารถใช้เป็นพลังงานได้ใน Cape Verde ใช้ส่วนลำต้นและกิ่งเป็นฟืนสำหรับให้ความร้อน Gübitz *et al*., 1997 รายงานว่าการหมักเปลือกผลสบู่ดำและกากน้ำมันสบู่ดำในสภาพไร้อากาศจะได้ biogas ซึ่ง 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นก๊าซมีเทนซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การเจริญเติบโตของดอกและการผสมเกสร

จากการศึกษาของวัลชลีย์ (2527) พบว่า ดอกจะใช้เวลาตั้งแต่เริ่มมองเห็นด้วยตาเปล่าจนกระทั่งดอกบาน 17 วัน โดยการเจริญของดอกจะเป็นไปอย่างรวดเร็วในช่วง 6 วันแรก และจะมีอัตราการเจริญลดลงในช่วงหลัง เกสรดอกเพศผู้จะแตกและปล่อยละอองเกสร (pollen shed) ในช่วง 8.00-10.00 น. ส่วนช่วงยอดเกสรเพศเมียพร้อมรับละอองเกสรจะอยู่ในช่วง 9.00-10.00 น. ซึ่งสังเกตได้จากการที่มีน้ำหวานเคลือบบริเวณยอดเกสรเพศเมีย และพบว่าในแต่ละช่อดอกจะติดผล 7-15 ผล แม้ว่าจะมีดอกย่อยในแต่ละช่อดอกมากถึง 70-120 ดอก ซึ่งคาดว่าสาเหตุน่าจะมาจากการที่มีดอกเพศเมียน้อยกว่าดอกเพศผู้มาก โดยมีอัตราส่วน 1: 7 เท่านั้น ซึ่งทำให้ในแต่ละช่อดอกมีดอกเพศเมียเพียง 10-15 ดอกเท่านั้นซึ่งตรงกับ รายงานของมหาวิทยาลัยแม่โจ้และสมาคมนิสิตเก่ามหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ในพระบรมราชูปถัมภ์ (2549) สรุปได้ว่าการที่ดอกของสบู่ดำเป็นดอกแยกเพศ และแก่ไม่พร้อมกัน จึงทำให้โอกาสในการติดผลของแต่ละช่อดอกต่ำลงด้วย

Arabidopsis thaliana

เป็นพืชที่จัดอยู่ในกลุ่ม mustard ซึ่งในธรรมชาติส่วนใหญ่จะพบในเขตที่มีอากาศหนาว พบในทวีปยุโรป เอเชีย และอเมริกาเหนือ สายพันธุ์ที่มักจะใช้ในการทดลองคือ สายพันธุ์ Columbia และ Landsberg (Meinke *et al*., 1998) จัดเป็นพืชโมเดลสำหรับการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุล ทั้งนี้เนื่องจากอะราบิดอปซิส เป็นพืชที่มีวงจรชีวิตที่สั้นเพียง 5-6 สัปดาห์ (Anderson & Roberts., 1998) อะราบิดอปซิส จัดเป็นพืชที่เป็นดอกสมบูรณ์เพศ ประกอบด้วย 4 โครงสร้างใหญ่ๆ ได้แก่ กลีบเลี้ยง กลีบดอก เกสรเพศผู้ และเพศเมีย ขนาดของดอกจะยาว 2 มิลลิเมตร เมล็ดที่โตเต็มที่จะยาว 0.5 มิลลิเมตร ผลมีลักษณะยาวเรียวอยู่ภายในฝัก ต้นอ่อนจะมีการพัฒนาไปเป็น rosette มีเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 2-10 เซนติเมตร ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม บริเวณผิวใบจะถูกปกคลุมด้วยขนขนาดเล็ก และจะมีใบตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3 หลังจากปลูกลงดิน จะมีการสร้างช่อดอก การเจริญจะพัฒนาไปจนสร้างดอกและเกิดฝัก ซึ่งจะใช้เวลาหลายสัปดาห์ หากโตเต็มที่ต้นจะสูง 15-20 เซนติเมตร (Meinke *et al*., 1998) และมีโครงสร้างเป็นดอกที่สมบูรณ์เพศ จึงเหมาะในการศึกษาได้ง่ายโดยการนำมาผสมข้ามหรือ ผสมตัวเอง และปริมาณผลผลิตเมล็ดที่ได้ใน 1 ต้น ประมาณ 1,000 เมล็ดต่อต้น (William, 2004) ก่อนหน้านี้ในปี 1907 ได้มีการศึกษาจำนวนโครโมโซมของ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อะราบิดอปซิสเท่ากับ 2n=2x=10 จีโนมของอะราบิดอปซิสได้ถูกศึกษาทั้งจีโนมแล้ว พบว่าเป็นพืชที่มีจีโนมขนาดเล็กประมาณ 108 นิวคลีโอไทด์ หรือมีประมาณ 25,498 ยีน สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ง่ายโดยการให้สารเคมีก่อการกลายลงไป

กระบวนการสร้างดอก

กลไกการสร้างดอกสามารถอธิบายได้ด้วยโมเดล ABC โดยที่ยีนกลุ่ม A ควบคุมการสร้างกลีบเลี้ยง ส่วนยีนกลุ่ม A และยีนกลุ่ม B ร่วมกันสร้างกลีบดอก ยีนกลุ่ม B และยีนกลุ่ม C ร่วมกันสร้างเกสรตัวผู้ และยีนกลุ่ม C ควบคุมการสร้างเกสรตัวเมีย ในปัจจุบันนี้นักวิทยาศาสตร์ได้ทราบแล้วว่า ยีน *APETALA (AP) 1* และ *2* เป็นยีนที่อยู่ในกลุ่ม A ส่วน *AP3* และ *PISTILLATA* (*PI*) นั้นอยู่ในกลุ่ม B และยีน *AGAMOUS (AG)* นั้นเป็นยีนที่อยู่ในกลุ่ม C นอกเหนือจากนี้แล้ว นักวิทยาศาสตร์ยังทราบว่าในการสร้างดอกที่สมบูรณ์จำเป็นต้องมียีนอีกกลุ่ม หนึ่งคือ กลุ่ม E ซึ่งประกอบไปด้วยยีน *SEPALLATA (SEP) 1 2* และ *3* ที่ควบคุมการทำงานของกลุ่ม ABC ดังนั้นการสร้างดอกในปัจจุบันถูก อธิบายโดยใช้ ABCE โมเดล (Douglas *et al*. 2007)

ถ้ายีนในแต่ละกลุ่มสูญเสียการแสดงออกจะมีผลดังนี้ (Rashid, 2009)

1. หากยีนในกลุ่ม A สูญเสียการแสดงออกพบว่า มีการสร้างเกสรเพศเมีย แทนการสร้างกลีบเลี้ยง ในวงที่ 1 และมีการสร้าง เกสรเพศผู้ แทนการสร้างกลีบดอก ในวงที่ 2
2. หากยีนในกลุ่ม B สูญเสียการแสดงออกพบว่า มีการสร้างกลีบเลี้ยง แทนการสร้างกลีบดอก ในวงที่ 2 และมีการสร้างเกสรเพศเมีย แทนการสร้างเกสรเพศผู้ ในวงที่ 3
3. หากยีนในกลุ่ม C สูญเสียการแสดงออกพบว่า มีการสร้างกลีบดอก แทนการสร้างเกสรเพศผู้ ในวงที่ 3 และเช่นเดียวกันในวงที่ 4 จะถูกแทนด้วยกลีบเลี้ยง นั่นแสดงว่าในพืชที่เป็นโฮโมไซกัส ถ้ายีน *Agamous* สูญเสียการแสดงออกพืชนี้จะไม่มีทั้งเกสรเพศผู้ และเกสรเพศเมีย

จากการศึกษาของ Ohto *et al*. (2004) พบว่ายีน *APETALA2* (*AP2*) จัดอยู่ในกลุ่มที่เป็น AP2/EREBP (ethylene responsive element binding protein) ซึ่งเป็น transcription factors ควบคุมการสร้างส่วนต่างๆ และเนื้อเยื่อเจริญ อีกทั้งยังช่วยในการพัฒนาของรังไข่ และเปลือกหุ้มเมล็ด เมื่อเกิดการกลายแบบ deletion ในยีน *AP2* ผลที่ได้คือมีการเพิ่มขนาดของเมล็ดบ่งชี้ว่ายีน *AP2* มีผลในการควบคุมโดยตรงต่อขนาดของเมล็ด นอกจากนั้นได้ทำการทดลอง Reciprocal cross พบว่ายีน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

AP2 มีลักษณะการถ่ายทอดทางแม่ไปยังการควบคุมขนาดของเมล็ด ผลที่ได้จากรับการถ่ายทอดทางแม่ของยีน *AP2* ของเมล็ดจะไปเกี่ยวข้องกับการควบคุมของทั้ง จำนวนเซลล์เอ็มบริโอ และขนาดของเซลล์ ขณะที่การศึกษาของ Jofuku *et al*. (2005) ได้มีการศึกษาเพิ่มจากยีน *AP2* ในต้นอะราบิดอปซิส พบว่ายีน *AP2* จะมีส่วนควบคุมการสร้างส่วนต่างๆ และเนื้อเยื่อเจริญ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Ohto *et al*. (2004) ยังพบอีกว่ายีน *AP2* มีบทบาทที่สำคัญในการควบคุมขนาดของเมล็ดน้ำหนักของเมล็ด และการสะสมของน้ำมันและโปรตีนในเมล็ด นอกจากนั้นยังพบว่ายีน *AP2* จะมีการแสดงออกอยู่ในทุกขั้นตอนในการสร้างดอก ดังภาพ (ภาคผนวกที่ จ2) และพบอยู่ในเนื้อเยื่อแทบทุกส่วนของพืชในต้นอะราบิดอปซิส

นอกจากนี้ยังมีการศึกษา Homolog ของยีน *AP2* โดยในปี 2009 Moose *et al*. (2009) ได้ศึกษายีน *Glossy15* (*Gl15*) มีหน้าที่ควบคุมการเปลี่ยนแปลงจาก ระยะต้นอ่อนไปสู่ปลายยอดในข้าวโพดซึ่งควบคุมการเปลี่ยนแปลงความแตกต่างของลักษณะของผิวเซลล์ของใบที่ประกอบด้วย epiticular waxes, ขนใบ และลักษณะของผนังเซลล์ และทำการโคลนยีน *GL15* โดยใช้ *defective Suppressor-Mutator (dSpm)* element สอดแทรก transposon-tag เข้าไป ยีนนี้เมื่อถูกแปลรหัสคาดว่าทำหน้าที่เป็น transcription factor ซึ่งลำดับจะมีความคล้ายคลึงกับ ยีน *AP2* ที่ควบคุมในต้นอะราบิดอปซิส ซึ่งจะควบคุมองค์ประกอบของดอก และการพัฒนาของรังไข่ จากการนำลำดับกรดอะมิโนของทั้ง *GL15* และ *AP2* มาเปรียบเทียบกัน พบว่ามีความคล้ายคลึงกันถึง 80% และพบมากกว่า 170 กรดอะมิโน ที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved region)

นอกเหนือจากนี้ Nilsson *et al.* (2007) ได้ทำการศึกษาในต้นสน พบว่ามีส่วนของยีนที่มีความคล้ายคลึงกันกับยีน *AP2* ในกลุ่ม A จึงกำหนดให้เป็น *Picea abies APETALA2 LIKE1* (*PaAP2L1*), *PaAP2L2* และ *PaAP2L3* ซึ่งการแสดงออกของยีน *PaAP2L1* และ *PaAP2L3* ของพืชจะมีในส่วนที่จะสร้างเมล็ด เมื่อทำถ่ายยีน *PaAP2L2* เข้าไปในต้นอะราบิดอปซิส พบว่าต้นมีลักษณะแคระแกร็น และมีช่วงการออกดอกที่ช้า มีการออกดอกที่ไม่แน่นอน และยังพบว่าเนื้อเยื่อเจริญที่ถูกควบคุมด้วยยีน *WUSCHEL* ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง แต่เมื่อถ่ายฝากเข้าไปใน *ap2-1* mutant สามารถสร้างกลีบดอกได้ บ่งชี้ได้ว่ายีน *AP2* ในต้นสนที่เป็น Gymnosperm สามารถทำหน้าที่ทดแทนยีนกลุ่ม A ในต้นอะราบิดอปซิสได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การถ่ายยีนเพื่อเพิ่มหรือลดการแสดงออกของยีน

เริ่มด้วยการเตรียมคอมพลีเทนเซลล์ จากเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ XL1 blue ที่มีบางส่วนของยีน *lacZ* ที่หายไป จากนั้นทำการทรานส์ฟอร์เมชั่น เพื่อถ่ายเวคเตอร์ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอเชื่อมอยู่โดยวิธี heat shock แล้วนำแบคทีเรียที่ได้ไป เกลี่ยบนอาหารแข็ง Luria Bertani Agar ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน และ IPTG รวมทั้ง X-Gal เพื่อทำการคัดเลือกโดยวิธี blue white selection โดยเลือกเฉพาะโคโลนีสีขาวซึ่งคาดว่าเป็นแบคทีเรียที่ได้รับเวกเตอร์ซึ่งมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอแทรกอยู่

ในการโคลนยีนหากไม่ต้องใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอไลเกส (DNA ligase) ในปัจุบันสามารถใช้เอนไซม์โทโปไอโซเมอเรส โดยเอนไซม์นี้จะทำหน้าที่ตัดสายดีเอ็นเอเพียงหนึ่งเส้นที่ตำแหน่งของลำดับเบสที่จำเพาะแล้วทำการเชื่อมต่อกับปลายข้างหนึ่งของโมเลกุลที่ถูกตัดนี้ด้วยพันธะโคเวเลนซ์ มีผลทำให้โมเลกุลของดีเอ็นเอที่มีลักษณะขดเป็นวง (supercoiled DNA) เกิดการคลายเกลียวรอบๆ สายที่ไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ ต่อจากนั้นเอนไซม์จะทำการเชื่อมสายที่ถูกตัดดังกล่าวก่อนหลุดจากโมเลกุลของดีเอ็นเอ ในการทดลองนี้เลือกใช้ pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kit (Invitrogen, USA) ซึ่งมีพลาสมิดที่เป็นเส้นตรงโดยมีเอนไซม์โทโปไอโซเมอเรสจับอยู่ที่ปลาย เอนไซม์นี้จะทำการเชื่อมต่อเวกเตอร์ เข้ากับดีเอ็นเอที่สนใจ (insert) ได้อย่างรวดเร็ว ในการโคลนดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR) ซึ่งมีเบสอะดีนีน (adenine) ต่ออยู่ที่ปลายอันเป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ *Taq* polymerase เอนไซม์โทโปไอโซเมอเรสที่ติดอยู่ที่ปลายของเวคเตอร์จะจับปลาย insert มาเชื่อมต่อกับปลายเวกเตอร์อย่างรวดเร็ว

การโคลนโดยใช้ระบบ Gateway® อาศัยหลักการที่ bacteriophage lambda ทำการบุกรุกเซลล์และนำดีเอ็นเอของมันเข้าไปแทรกในดีเอ็นเอของเซลล์เจ้าบ้านได้โดยวิธีการรีคอมบิเนชัน (recombination) ที่ตำแหน่งจำเพาะซึ่งเกิดระหว่างตำแหน่ง *attP* ที่อยู่บนดีเอ็นของไวรัส และตำแหน่ง *attB* ที่อยู่บนจีโนมของแบคทีเรีย ซึ่งการเกิดรีคอมบิเนชันระหว่างบริเวณ att จะถูกนำมาใช้ประโยชน์ในระบบ Gateway เพื่อทำการย้ายชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจโดยตรงระหว่าง 2 เวกเตอร์ที่มีบริเวณ att บนโมเลกุลสำหรับโคลนดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์นั้นจะต้องใช้ไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสของบริเวณที่เป็น *attB* ส่วนโมเลกุลของพาหะ (vector) ซึ่งถูกเรียกว่า entry vector นั้นต้องมีลำดับเบสของบริเวณที่เป็น *attP* ขนาบสองข้างของบริเวณที่จะทำการแทรกชิ้นดีเอ็นเอเข้าไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อเติมเอนไซม์รีคอมบิเนสจะเกิดรีคอมบิเนชันระหว่างบริเวณ *attB* และ *attP* ทำให้เกิดการแทรกโมเลกุลของดีเอ็เอเข้าไปอยู่ในโมเลกุลของพาหะ (มณีวรรณ, 2553)

การถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดยอาศัยแบคทีเรียอะโกรแบคทีเรียมทูมีเฟเซียน นิยมใช้พลาสมิดสายผสมที่ประกอบด้วย ยีนต้านทานยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย ทำให้สามารถนำไปใช้เป็นตัวคัดเลือกเซลล์พืชที่ได้รับ เนื่องจากปกติเซลล์พืชจะไม่สามารถแบ่งตัวเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มียาปฏิชีวนะ ยาปฏิชีวนะที่นิยมใช้ ได้แก่ กานามัยซิน หรือ ไฮโกรมัยซิน เป็นต้น โดยการปรับปรุงพลาสมิดเพื่อให้การตัดต่อยีนทำได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยพลาสมิดที่นิยมใช้ได้แก่ ไบนารี่เวกเตอร์ ประกอบด้วยพลาสมิดขนาดเล็ก และ Ti-plasmid โดยแยกเอาบริเวณปลายข้างซ้ายและบริเวณปลายข้างขวา ไว้ในพลาสมิดขนาดเล็กประมาณ 10 kb ระหว่างปลายข้างซ้าย และขวามียีนเครื่องหมายที่ใช้คัดเลือกในพืชและตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ ส่วนนอกมีจุดเริ่มต้นการจำลองตัวของพลาสมิดในแบคทีเรีย *E. coli* และ อะโกรแบคทีเรียมทูมีเฟเซียน และยีนเครื่องหมายที่ใช้คัดเลือกในแบคทีเรีย การตัดต่อยีนทำได้โดยตัดต่อยีนที่ต้องการเข้าสู่พลาสมิดขนาดเล็กแล้วนำไปเพิ่มจำนวนในแบคทีเรีย *E.coli* จากนั้นจึงนำพลาสมิดขนาดเล็กนั้นถ่ายเข้าสู่แบคทีเรียอะโกรแบคทีเรียมทูมีเฟเซียน ที่มี Ti-plasmid อยู่ข้างในแล้ว

การถ่ายฝากดีเอ็นเอเข้าสู่พืชด้วยวิธี Agrobacterium cocultivation เป็นวิธีการถ่ายฝากดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (Host cell) โดยอาศัยการเกิดแผลและความสามารถของแบคทีเรียอะโกรแบคทีเรียมทูมีเฟเซียน ในการถ่ายฝากดีเอ็นเอ ส่วนที่เป็น T-DNA ใน Ti-plasmid เข้าสู่นิวเคลียสและแทรกเข้าไปในจีโนมของพืช เมื่อนำเซลล์ที่มีดีเอ็นเอที่ต้องการไปเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต จะได้กลุ่มเซลล์ที่สามารถถูกชักนำโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้เจริญเติบโตมีการแบ่งเซลล์เป็นสิ่งมีชีวิตดัดแปลงพันธุกรรม และนำไปศึกษาต่อเพื่อดูการแสดงออกของยีนและลักษณะต่างๆในสิ่งมีชีวิตนั้นได้ในที่สุด

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

หมายถึง การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืช หรืออาจหมายถึง การเพาะเลี้ยงเซลล์ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หรือการเพาะเลี้ยงอวัยวะ ในอาหารสังเคราะห์สูตรต่างๆ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม และปลอดเชื้อ นักวิทยาศาสตร์พบว่าเซลล์ของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงมีความสามารถที่จะเจริญเติบโตเป็นพืชที่สมบูรณ์ได้ โดยเซลล์จะมีรูปร่างคล้ายไซโกต (zygote) และทำหน้าที่เป็นไซโกตได้ โดยมีการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แสดงออกของยีนที่เหมือนเดิม ความสามารถของเซลล์เช่นนี้เรียกว่า โททิโปเทนซี (totipotency) ด้วยคุณสมบัตินี้ ทำให้เกิดการนำเทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้ในการขยายพันธุ์พืช ในปัจจุบันมีผลผลิตพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นจำนวนมาก

ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

ในปัจจุบันมีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมาใช้ประโยชน์ได้ดังนี้

1. การขยายพันธุ์ (propagation) โดยนำชิ้นส่วนต่างๆ ของพืชมาเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ โดยหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืชแต่ละชนิด ทำให้สามารถควบคุมปริมาณ และช่วงเวลาในการขยายพันธุ์พืชได้ตามต้องการและปริมาณมากในระยะเวลาอันรวดเร็ว เช่น การขยายพันธุ์กล้วยไม้เพื่อการส่งออก

2. การผลิตพืชที่ปราศจากโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งการปราศจากเชื้อไวรัส โดยการตัดส่วนยอดที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญของพืชให้มีขนาดเล็กและชักนำเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ มีการศึกษาพบว่าเชื้อไวรัสซึ่งเคลื่อนที่ไปตามท่อน้ำ (xylem) และท่ออาหาร (phloem) ของพืชจะไม่ไปถึงส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญดังนั้นจะได้ท่อนพันธุ์ที่ปราศจากเชื้อโรคเพื่อใช้ในการขยายพันธุ์โดยไม่จำเป็นต้องสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศต่อไป

3. การผลิตสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ได้มีการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาผลิตสารต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพาะเลี้ยงจากเนื่อเยื่อสมุนไพรชนิดต่างๆ ซึ่งสร้างสารตัวยาได้มากกว่าในธรรมชาติ

4. การผลิตสายพันธุ์แท้ (inbred production) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยนำละอองเรณูหรืออับเรณูมาเลี้ยงในอาหารจนเกิดเนื้อเยื่อที่มีโครโมโซมครึ่งหนึ่งของเซลล์ปกติ เมื่อทำการเพิ่มชุดโครโมโซมให้เป็น 2n ก็จะได้สายพันธุ์แท้

5. การคัดเลือกสายพันธุ์กลาย (mutant selection) เนื่องจากการกลายทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ซึ่งการคัดเลือกทำได้โดยจัดอาหารและสภาพแวดล้อมตามต้องการ เช่น การคัดเลือกพันธุ์ข้าวที่ทนเค็ม โดยการใส่เกลือลงไปในอาหารคัดเลือก เพื่อคัดเลือกพันธุ์ข้าวที่ทนเค็ม

6. การแปรผันทางพันธุกรรม (somaclonal variation) ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้น พบว่าอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในขั้นตอนของการเพาะเลี้ยง ทำให้ได้สายพันธุ์ที่กลายซึ่งอาจเกิดจากสภาวะแวดล้อมต่างๆ ในขั้นการเพาะเลี้ยง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7. การแปลงพันธุกรรม (genetic transformation) ได้มีการใช้วิธีทางพันธุวิศวกรรม ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยการถ่ายโอนยีนที่ต้องการเข้าไปในเซลล์พืช โดยอาศัยพาหะ (vector) เช่น แบคทีเรียนำยีนเข้าสู่เซลล์พืช จากนั้นชักนำกลุ่มเซลล์ให้เกิดเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์

8. การเก็บรักษาพันธุ์พืช การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในขวดเป็นวิธีการรวบรวมพันธุ์พืชได้เป็นอย่างดี สามารถส่งไปแลกเปลี่ยนพันธุ์กับต่างประเทศได้สะดวก ช่วยลดเนื้อที่ในการปลูก และปลอดภัยจากภัยธรรมชาติ

องค์ประกอบของอาหาร

อาหารที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นเกลือแร่หลายชนิด ซึ่งอยู่ในรูปที่แตกต่างกัน แต่เกลือแร่บางชนิดพืชต้องการในปริมาณที่มาก บางชนิดพืชต้องการเพียงเล็กน้อย ถ้ามีมากเกินไปอาจจะไปรบกวนการเจริญของพืชให้ไปในทิศทางที่ไม่เหมาะสมอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประกอบด้วยสารประกอบหลายอย่าง แบ่งออกเป็น 2 พวกใหญ่ๆ

1. สารอนินทรีย์

เกลือแร่เป็นส่วนประกอบที่สำคัญที่สุดอย่างหนึ่งในอาหารเพาะเลี้ยง สัดส่วนของเกลือแร่และชนิดของเกลือแร่ที่เหมาะสมที่พืชสามารถนำไปใช้ได้เป็นสิ่งที่ต้องคำนึงถึง เพราะหากว่ามีความเข้มข้นสูงเกินไปอาจเป็นพิษต่อพืชได้ แต่หากว่ามีน้อยเกินไป การเจริญเติบโตอาจไม่สมบูรณ์ แร่ธาตุทั้งหมดจะถูกเติมในอาหารในรูปของเกลือที่พืชสามารถดูดไปใช้ได้ เกลือแร่ที่เติมในอาหารแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ เกลือแร่ที่เติมในปริมาณค่อนข้างสูง เนื่องจากพืชต้องการปริมาณมาก (สารอาหารหลัก) และเกลือแร่ที่เติมในปริมาณน้อยมาก (สารอาหารรอง)

1.1 สารอาหารหลัก

ไนโตรเจน (N) มีอิทธิพลต่ออัตราการเจริญของพืช เป็นองค์ประกอบในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์, อัลคาลอยด์, กรดนิวคลีอิก และฮอร์โมนพืชบางชนิด และกรดอะมิโน ถ้าขาดไนโตรเจนจะทำให้ใบเหลืองและต้นเตี้ยแคระ หากมีไนโตรเจนมากเกินไปจะทำให้พืชเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วแต่จะไม่ออกดอก แหล่งไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคือ สารประกอบแอมโมเนียม (NH_4^+) และ ไนเตรต (NO_3^-)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ฟอสฟอรัส (P) พบมากในเนื้อเยื่อเจริญและเนื้อเยื่อที่กำลังพัฒนาอย่างรวดเร็ว อื่นๆ แต่บทบาทที่แท้จริงยังไม่ทราบ จุดประสงค์ที่สำคัญคือ ใช้เป็นตัวกระตุ้นเอนไซม์ ถ้าหากมีฟอสฟอรัสน้อยเกินไปจะทำให้พืชเหี่ยวเฉา และผิดปกติ

โปแทสเซียม (K) จำเป็นสำหรับในการแบ่งเซลล์ สำหรับสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรต และโปรตีนสำหรับสร้างคลอโรฟิลล์ และรีดิวซ์ไนเตรต โปรแทสเซียมที่มีไม่เพียงพอทำให้พืชอ่อนแอและผิดปกติ

กำมะถัน (S) อยู่ในโมเลกุลของโปรตีนบางชนิดช่วยให้รากเจริญและใบมีสีเขียวเข้ม

แคลเซียม (Ca) อยู่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์พืชในรูปของแคลเซียมเพกติน มีบทบาทในการดูดซึมสาร ให้ความสะดวกในการเคลื่อนที่คาร์โบไฮเดรตและกรดอะมิโนในใบตลอดทั้วทั้งต้นพืชและช่วยให้รากเจริญ

แมกนีเซียม (Mg) เป็นตัวที่อยู่ตรงกลางในโมเลกุลของคลอโรฟิลล์ และยังเป็นตัวกระตุ้นเอนไซม์ หากขาดแมกนีเซียมทำให้พืชมีสีจางและเฉา

เหล็ก (Fe) อยู่ร่วมในการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ ร่วมในการเปลี่ยนพลังงานในการสังเคราะห์ด้วยแสงและการหายใจ โดยถูกรีดิวซ์จากเฟอร์ริกเป็นเฟอร์รัส พืชที่ขาดเหล็กจะเกิดสภาวะพร่องคลอโรฟิลล์

1.2 สารอาหารรอง

มีเกลือแร่หลายชนิดที่พืชต้องการเพื่อการเจริญเติบโตแต่ต้องการเพียงปริมาณน้อยมาก เรียกว่า สารอาหารรอง (minor element, trace element หรือ micro nutrient) บทบาทหน้าที่ของสารอาหารเหล่านี้ยังไม่แน่ชัด โดยที่จริงแล้วสารเหล่านี้เพิ่งจะทราบว่าจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช เมื่อความบริสุทธิ์ของน้ำและสารเคมีที่ใช้ในอาหารเพาะเลี้ยงสูงขึ้น ทำให้พบเกลือแร่เหล่านี้ ถ้ามีเกลือแร่เหล่านี้อยู่มากมีหลายชนิดที่เป็นพิษต่อพืช เกลือแร่ที่พืชต้องการปริมาณน้อยมากมีดังนี้

โบรอน (B) มีบทบาทในการเคลื่อนที่ของน้ำตาล หากขาดโบรอนจะทำให้เนื้อเยื่อภายในเสื่อม เช่นโรคใส้เน่าในหัวผักกาด ถ้ามีโบรอนมากเกินไป จะทำให้พืชตาย

โมลิบดินัม (Mo) มีส่วนร่วมในการเปลี่ยนแปลงไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียและช่วยในการตรึง ไนโตรเจนของแบคทีเรีย

แมงกานีส (Mn) หากขาดจะเป็นคลอโรซีส มีใบเหลืองและแห้งเป็นจุดๆ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สังกะสี (Zn) เกี่ยวข้องกับการสร้างคลอโรฟิลล์ และการสร้างออกซิน (IAA) โดยปริมาณที่ต้องเติมลงในอาหารต้องการเพียงเล็กน้อย เพราะเติมมากจะเป็นพิษต่อพืช

ทองแดง (Cu) หากขาดจะทำให้ต้นแคระแกร็น ใบพิการบิดและด่างเป็นจุด หรือใบอ่อนแห้งตาย ธาตุนี้จำเป็นต่อการเปลี่ยนพลังงาน

คลอรีน (Cl) จำเป็นในการกระตุ้นการสังเคราะห์ด้วยแสง การขาดทำให้ใบเหี่ยวแห้งกลายเป็นสีเหลืองหรือสีบรอนซ์และตายไป แต่ต้องการเพียงปริมาณน้อยมาก

ไอโอดีน (I) เติมในอาหารในรูปของโปแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) ธาตุนี้มักจะไม่พิจารณาเป็นธาตุจำเป็นของพืช ถึงแม้ว่าจะเป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโนบางชนิด แต่อาหารบางชนิดก็ไม่เติมไอโอดีน

2. สารอินทรีย์

เป็นสารเคมีที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน เอนไซม์ ฯลฯ สารเหล่านี้พืชสามารถสร้างขึ้นได้เอง ดังนั้นจึงไม่นิยมเติมให้กับพืช อย่างไรก็ตามพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงมักจะมีขนาดเล็กเกินไปและไม่สมบูรณ์พอที่จะสร้างสารต่างๆเหล่านี้ทั้งหมด ดังนั้น สารอินทรีย์เหล่านี้จึงจำเป็นต้องเติมในอาหารเพาะเลี้ยงด้วย เพื่อช่วยให้เกิดต้นอ่อนเพิ่มมากขึ้น

2.1 คาร์โบไฮเดรต

เป็นแหล่งพลังงานของเนื้อเยื่อเป็นสารอินทรีย์เช่น น้ำตาล แป้ง และเซลลูโลส สารประกอบเหล่านี้ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน ซึ่งเป็นธาตุอาหารพื้นฐานอยู่แล้วน้ำตาลเป็นองค์ประกอบที่สำคัญมากในอาหารทุกๆสูตร น้ำตาลจำเป็นในการเจริญเติบโตและการเจริญของเนื้อเยื่อพืช เพราะว่าการสังเคราะห์ด้วยแสงของชิ้นพืชยังไม่เพียงพอดังนั้นพืชยังต้องการแหล่งพลังงานอยู่ ซึ่งโดยปกติแล้วจะเติมน้ำตาลลงในอาหารประมาณ 1-5% ขึ้นอยู่กับชนิดและขนาดของพืช โดยปกติพืชอายุน้อยหรือเอ็มบริโอ ต้องการน้ำตาลค่อนข้างสูง

2.2 วิตามินบีรวม

ประกอบด้วยสารที่จำเป็นในการเจริญและเมแทบอลิซึมของพืช เดิมใช้สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) ต่อมาสามารถจำแนกได้ว่าประกอบด้วย ไทอะมีน กรดนิโคทินิก และ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ไพริดอกซิน ซึ่งเป็นส่วนของวิตามินบีรวม พืชโดยปกติสามารถสร้างวิตามินขึ้นมาใช้ได้เอง แต่เมื่อเรานำชิ้นพืชที่มีขนาดเล็กมาเพาะเลี้ยง ชิ้นพืชส่วนนี้อาจจะไม่ใช่ชิ้นส่วนที่สร้างวิตามิน หรืออาจจะสร้างได้ไม่เพียงพอในการเจริญเติบโต ดังนั้นจึงต้องเติมลงในอาหารเพาะเลี้ยง มีดังนี้ อิโนซิทอล ไทอะมีนกรดนิโคทินิก ไพริดอกซิน กรดแพนโทเทนิก กรดโฟลิก โคลีน และไรโบฟลาวิน

2.3 วิตามิน (ไบโอติน)

เป็นโคเอนไซม์ในเมแทบบอลิซึมของไขมัน นานๆครั้งที่จะเติมในอาหาร

3. น้ำ

เป็นส่วนประกอบที่มีอยู่จริง 95% ในอาหาร ส่วนใหญ่นิยมใช้น้ำกลั่นหรืออาจใช้น้ำกรอง แทนก็ได้ถ้าไม่ใช่งานวิจัย น้ำซึ่งใช้ในงานวิจัยนั้นควรจะต้องอยู่ในระดับ type II reagent grade น้ำในระดับ มาตรฐานนี้จะต้องปราศจาก pyrogens (สารพิษซึ่งปลดปล่อยโดยแบคทีเรีย) แก๊ส และสารอินทรีย์ มีความต้านทานไฟฟ้าต่ำกว่า 1.0 เมกกาโอห์มเซนติเมตร ความจุไฟฟ้า (electrical conductivity) ต่ำกว่า 1.0 S/cm ทั้งนี้เป็นมาตรฐานซึ่งกำหนดโดยองค์กรที่เกี่ยวข้องกับคุณภาพน้ำในประเทศสหรัฐอเมริกา เช่น National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) และ American Society for Testing and Materials (ASTM)

4. สารเร่งการเจริญเติบโตหรือฮอร์โมน

เป็นชื่อรวมที่ใช้เรียกสารทั้งที่เกิดจากธรรมชาติและสารที่สังเคราะห์ขึ้นมาที่มีอิทธิพลต่อการเจริญและการเติบโตของพืช ถ้าเป็นสารอินทรีย์ที่พบในธรรมชาติ ซึ่งพืชสร้างขึ้นมาเองจะเรียกว่า ฮอร์โมน สารเหล่านี้พืชจะสร้างขึ้นมาจากอวัยวะแห่งหนึ่ง ซึ่งเป็นคนละบริเวณกับที่ฮอร์โมนทำงาน และจะใช้ในปริมาณที่น้อยมาก แต่ในปัจจุบันฮอร์โมนจะใช้แทนสารที่สังเคราะห์ขึ้นมาในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อฮอร์โมนที่นิยมใช้กันมาก มีอยู่ 2 กลุ่ม ได้แก่ ออกซิน และไซโทไคนิน โดยออกซินช่วยให้เซลล์ยืดตัวและเกิดราก ส่วนไซโทไคนินช่วยทำให้เกิดการแบ่งเซลล์และเกิดยอด นอกจากนี้ยังมีปัจจัยจาก สภาพแวดล้อม เช่น แสงและอุณหภูมิ แต่ที่สำคัญที่สุดคืออาหารจะต้องมีอัตราส่วนและชนิดของฮอร์โมนที่เหมาะสมที่สุด การเจริญของชิ้นพืชในอาหาร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพาะเลี้ยงอาจจะเจริญขึ้นมาโดยไม่ใช้ออกซินและไซโทไคนิน หรืออาจต้องการอย่างใดอย่างหนึ่ง หรืออาจจะต้องการทั้งออกซินและไซโทไคนิน

ออกซิน (Auxin)

เป็นชื่อของกลุ่มฮอร์โมน เริ่มมีการศึกษาในศตวรรษที่ 19 Charles Darwin และ Francis ได้ศึกษาการเจริญของพืช โดยนำต้นหญ้าชนิดหนึ่งมาเพื่อให้ได้รับแสงเพียงด้านเดียว พบว่า ปลายยอดมีการเจริญในแนวโค้งเข้าหาแสง แต่เมื่อตัดปลายยอดแล้วให้แสงเพียงด้านเดียว ปลายยอดไม่โค้งเข้าหาแสง เช่นเดียวกับการกรณีที่นำวัสดุทึบแสงมาคลุมที่ปลายยอด จึงสรุปได้ว่ามีสารบางอย่างเป็นตัวรับสัญญาณแสงอยู่ที่ปลายยอด และมีผลทำให้เซลล์ที่อยู่ด้านที่ได้รับแสงเจริญเติบโตช้ากว่าด้านที่ไม่ได้รับแสง มีผลให้ปลายยอดโค้งเข้าหาแสง เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า โฟโตโทรปิซึม (phototropism) ต่อมา Boysen-Jensen (1913) และ Paal (1919) แสดงให้เห็นว่ามีการเคลื่อนย้ายสิ่งที่เรียกว่าgrowth-promoting influence ที่เป็นสารบริสุทธิ์ทางเคมี ซึ่งในสภาพมืดหรือได้รับแสงสม่ำเสมอจะเคลื่อนย้ายลงมาอย่างต่อเนื่อง มีการแยกสารนี้ได้สำเร็จครั้งแรกในปี ค.ศ. 1926 โดย Went ทำให้ทราบได้ว่ามีคุณสมบัติเป็นสารกระตุ้นการเจิญเติบโตและพัฒนา (ลิลลี่, 2549) หลังจากนั้นอีกประมาณ 50 ปี จึงพบว่าตัวรับสัญญาณนั้นคือ ออกซิน

ออกซินสามารถสังเคราะห์ขึ้นมาตามธรรมชาติ โดยมีการสร้างบริเวณเนื้อเยื่อเจริญของใบอ่อน ดอก และผลอ่อน เช่น indole-3-acetic acid (IAA) ส่วน indole-3-butyric acid (IBA) มีการนำมาสกัดได้จากเมล็ดและใบข้าวโพด (ลิลลี่, 2549) ออกซินที่สังเคราะห์ แบ่งออกเป็น 6 กลุ่มคือ

1. Indole derivative เช่น indole-3-acetic acid (IAA) และ indole-3-butyric acid (IBA)
2. Benzoic acid เช่น 2,3,6-trichlorobenzoic และ 2-methoxy-3,6-dichlorobenzoic acid
3. Naphthalene acid เช่น Alfa และ Bata-naphthaleneacetic acid
4. Chlorophenoxyaacetic acid เช่น 2,4-D, 2,4,5-T
5. Naphthoxyacetic acid เช่น Alfa และ Bata NOA
6. Picolinic acid เช่น 4-amino-3,5,6 trichloropicolinic acid

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บทบาทของออกซินต่อสรีรวิทยาของพืช

มีผลต่อการการยืดยาวของเซลล์ส่วนใหญ่มีการศึกษาใน coleoptiles และเนื้อเยื่อของราก โดยจะไปเพิ่มอัตราการขยายของเซลล์ได้ 4 ทาง คือ 1) ทำให้ osmotic potential ของเซลล์ลดลง โดยจะไปเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายในเซลล์ 2) ลดแรงเต่งรวม 3) เพิ่มค่าความสามารถในการขยายตัวของผนังเซลล์ 4) เพิ่มค่าความนำไฟฟ้าของน้ำ โดยทั้งหมดมีผลในการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ โดยไปกระตุ้นการทำงานและสังเคราะห์ของ DNA Polymerase นอกจากนั้นมีส่วนทำให้เกิดการเจริญของผลที่ไม่ได้รับการผสม ที่เรียกว่า parthenocarpy ได้หลายชนิด เช่น สตรอเบอรี่ มะเขือเทศ พริกพืชตระกลูลแตง และส้ม เป็นต้น และมีส่วนในการควบคุมการหลุดร่วงของผล แต่หากใช้ในปริมาณสูงจะยับยั้งการยืดของรากแต่จะกระตุ้นเกิดรากแขนง และกระตุ้นการยืดของลำต้น (ลิลลี่, 2549)

ไซโทไคนิน (cytokinin)

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชให้มีการเจริญเติบโตได้ดี นอกจากธาตุอาหารแล้วอาจต้องมีสารบางอย่างด้วย ดังนั้นจึงได้มีการนำสารสกัดหลายชนิดมาทดสอบ ทั้งสารสกัดจากยีสต์ น้ำมะเขือเทศ น้ำมะพร้าว ซึ่งพบว่าสารที่ใส่ออกซิน และน้ำมะพร้าว 10-20% ทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดี สามารถเจริญไปเป็นแคลลัสได้ แสดงว่าในน้ำมะพร้าวน่าจะมีสารบางอย่างอยู่ จึงทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดี F. Skoog ได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์จากต้นยาสูบ เขาได้ใส่เบสซึ่งเป็นส่วนประกอบของดีเอ็นเอ จะทำให้เซลล์เจริญดีขึ้น ดังนั้นจึงใส่ DNA ที่ได้จากสเปิร์มของปลาแฮริงลงไป พบว่ายาสูบเจริญได้ดี ต่อมาจึงพบว่า DNA ที่ใส่ไปนั้น เมื่อผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันแล้ว (autoclave) มีสาร6-furfurylaminopurine เกิดขึ้นหรือจาจเรียกสารนี้ว่า ไคนีติน (kinetin)

ไคนีติน ไม่ใช่สารธรรมชาติที่พบในพืชและไม่ได้เป็นเบสของ DNA แต่เกิดจาก DNA ที่ผ่านความร้อนแล้วเปลี่ยนรูปไปหลังจากการค้นพบไคนีติน พบว่าสารในน้ำมะพร้าวที่มีผลให้เซลล์แบ่งตัวได้ดีคือ ไซโตไคนิน เนื้อเยื่อบริเวณปลายราก เป็นบริเวณที่มีการสังเคราะห์ free cytokinins ของต้นพืชและเคลื่อนย้ายจากไซเลมของรากไปสู่ลำต้นและราก สภาพแวดล้อม เช่น การเกิดความเครียดจากน้ำยังไปมีผลทำให้ไซโตไคนินในไซเลมลดลง นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า เนื้อเยื่อเจริญบริเวณปลายราก และปลายยอดของยาสูบมีไซโตไคนินสูง ขณะที่ยังพบปริมาณไซโตไคนินสูง ขณะที่เกิดการสร้างผลและเมล็ดของพืชด้วย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บทบาทของไซโตไคนินต่อสรีรวิทยาพืช

ทำให้เซลล์พืชมีการแบ่งเซลล์ ทั้งนี้ Jablenski และ Skoog พบว่า เนื้อเยื่อสามารถแบ่งเซลล์ได้ดีในอาหารที่มีไคนีตินและออกซิน หากเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารที่มีออกซินอย่างเดียว จะทำให้เกิดการจำลองดีเอ็นเอ แต่จะไม่เกิดการแบ่งเซลล์ แต่ถ้าใส่ไซโตไคนินลงไปด้วย จะทำให้เซลล์นั้นเข้าสู่ขั้นตอนของไมโทซิสได้ ซึ่งสัดส่วนของออกซินต่อไซโตไคนินมีผลต่อการพัฒนาอวัยวะของพืชด้วย หากนำแคลลัสไปเลี้ยงในอาหารที่มีสัดส่วนของฮอร์โมนออกซินต่อไซโตไคนินสูง แคลลัสนั้นจะมีการพัฒนาของเซลล์และมีการสร้างราก แต่หากนำแคลลัสนั้นเลี้ยงในอาหารที่มีสัดส่วนต่ำ แคลลัสจะมีการพัฒนาและสร้างยอดขึ้น (ภาคภูมิ, 2550)

RNA interference หรือ RNAi

เป็นกระบวนการหนึ่งในการลดการแสดงออกของยีนซึ่งพบว่าเกิดขึ้นได้ทั้งในพืช สัตว์ และมนุษย์ โดยใช้พลาสมิดที่สามารถสร้าง double strand RNA (dsRNA) โดยอาศัยกระบวนการถอดรหัสภายในเซลล์ dsRNA จะถูกตัดโดยโปรตีน Dicer จากนั้นจะไปร่วมกับ กลุ่มโปรตีน RISC และถูกแยกเป็นสายเดี่ยว โดยสาย antisense siRNA ที่ถูกเรียกว่า guide RNA มีเบสคู่สมกับ mRNA เป้าหมายและช่วยให้ RISC complex เข้าจับและทำลาย mRNA เป้าหมายได้อย่างแม่นยำ

เวกเตอร์ที่ใช้ในสร้าง RNA silencing

ในพืชดัดแปลงพันธุกรรมในการเกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีน ซึ่งถ้านำสิ่งมีชีวิตที่มีการถ่ายยีนแบบ sense construct และอีกสิ่งมีวิตหนึ่งถ่ายยีนแบบ antisense construct มาผสมกัน พบว่าอัตราการยับยั้งการแสดงออกของยีนดีกว่าการถ่าย construct อันใดอันหนึ่งเข้าไป ซึ่งหมายถึงกระบวนการเกิด RNAi ที่อาศัยอาร์เอ็นเอสายคู่ ทำให้ mRNA เป้าหมายถูกทำลายลง ซึ่งเวกเตอร์ที่ทำให้เกิดกลไกดังกล่าว มีอยู่หลายชนิดขึ้นอยู่กับชนิดของพืช เช่นในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว จะนิยมใช้เวกเตอร์ pStargate ขณะเดียวกันในพืชใบเลี้ยงคู่ มักจะใช้เวกเตอร์ pHellsgate ซึ่งเวกเตอร์ทั้งสองจะใช้อาศัยหลักการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนที่ตำแหน่งจำเพาะ

pHellsgate vector เป็นเวกเตอร์ที่ นำไปสู่การเกิดโครงสร้าง hpRNA ที่มีการฟอร์มเป็นรูปแบบของ inverted repeat ที่เกิด self-complementary ของยีนเป้าหมายทั้งสองชิ้นกลายเป็น dsRNA

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สำหรับโครงสร้างของ pHellsagte8 มีขนาด 17,476 คู่เบส ประกอบด้วยส่วนที่สำคัญ right border (35S promotor) และ ด้านปลาย left border (Octopine Synthase (ocs) terminator) นอกจากนั้นยังมีส่วนของ *att*R1 และ *att*R2 จำนวน 2 ชุด ที่ใช้ในการแลกเปลี่ยน *att*L1 และ *att*L2 cassettes ที่เป็นชิ้นยีนที่ต้องการจะสร้าง construct โดยกระบวนการแลกเปลี่ยนของปฏิกิริยาของ Gateway® LR Clones™ II enzyme Mix (Invitrogen, USA) ระหว่าง *att*R1 และ *att*R2 ถูกขั้นด้วยยีน *ccdB* ซึ่งเป็นยีนที่ใช้เป็น negatively selectable marker นอกจากนั้นเป็นส่วนของ Intron (อินทรอน) จากยีน *Flaveria Pdk* (pyruvate orthophosphate dikinase) ยีนต้านยาปฏิชีวนะ *spec* ใช้เป็น selectable marker และยังมีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ ดังภาพ (ภาคผนวกที่ ค1) โดยขนาดของยีนเป้าหมายที่จะนำมาสร้าง hpRNA สามารถใช้ความยาวได้ตั้งแต่ 50 – 1 กิโลเบส แต่หากใช้ขนาดความยาวระหว่าง 300-600 คู่เบสจะให้ผลได้ดีที่สุด (Helliwell and Waterhouse., 2003)

การนำเทคโนโลยี RNAi มาใช้ในพืช

ส่วนใหญ่แล้วจะมุ่งเน้นไปเป็นเครื่องมือยับยั้งการแสดงออกของยีนเป้าหมายที่จำเพาะเพื่อปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะใหม่ๆ ที่สามารถถ่ายทอดไปในรุ่นหลังๆได้ การสร้าง dsRNA มีหลายวิธี เช่นวิธี hpRNA โดยการสร้างลำดับทั้ง sense และ antisense RNA ให้อยู่ภายในโปรโมเตอร์เดียวกันโดยมีอินทรอนขั้นกลาง โดยวิธีการนี้จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกได้ดีกว่า dsRNA จะให้ผล 80-100% (Mallory *et al*., 2001) ส่วนมากโครงสร้าง dsRNA จะถูกสร้างออกมาเป็น hpRNA (Smith *et al*., 2000) โดยความยาวของยีนที่สนใจจะประกอบไปด้วย sense และ antisense ยาวระหว่าง 98-853 นิวคลีโอไทด์ (Wesley *et al*., 2001)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างต้นสบู่ดำสายพันธุ์ KUBP 78-9 และตัวอย่างต้นอะราบิดอปซิส สายพันธุ์ Columbia

2. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

3. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

4. จัดทำโครงสร้างพลาสมิดเพื่อลดการแสดงออกของยีน *AP2*

วิธีการ

1. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสบู่ดำ

เติมน้ำกลั่นลงในบีกเกอร์ 1 ใน 3 จากนั้นดูดสารอาหารหลัก (ตารางผนวกที่ ช3) และสารอาหารรอง (ตารางผนวกที่ ช3) ที่เตรียมเป็นความเข้มข้นต่างๆ เติมน้ำตาลซูโครส 20-60 มิลลิกรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นำมาปรับค่าความเป็นกรดด่าง ให้อยู่ในช่วง 5.6-5.8 (Murashige and Skoog, 1962) เติมวุ้นลงไป 7.2 กรัมต่อลิตร หลอมวุ้นให้ละลายหมด จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15-20 นาที ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นำขวดอาหารที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อมาปิดฝาให้สนิทพร้อมนำไปใช้

นำเมล็ดสบู่ดำสายพันธุ์ KUBP 78-9 โดยความอนุเคราะห์มาจาก โครงการเคยูไบโอดีเซล มาล้างด้วยน้ำประปา เขย่าให้สิ่งสกปรกบนผิวเมล็ดหลุดออก นำมาแช่ด้วย 70% เอทิลแอลกอฮอล์ เขย่าทิ้งไว้นาน 10 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด ตากเมล็ดให้แห้ง นำเมล็ดมาเคาะเปลือกออกแยกเอาส่วน endosperm ที่มีต้นอ่อนอยู่ภายใน มาฟอกฆ่าเชื้อด้วย ยาเบตาดีนที่ความเข้มข้น 15% ปริมาตรต่อปริมาตร นาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อ 3 รอบ จากนั้นนำมาฟอกด้วยสารละลายที่ประกอบด้วย น้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร, คลอรอกซ์ 25 มิลลิลิตร และ Tween-20 จำนวน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

0.01% จำนวน 3 หยด ฟอกทิ้งไว้นาน 15 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อจำนวน 5 ครั้งๆละ 5 นาที นำส่วน endosperm มาวางทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำเนื้อเยื่อวางในอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่ปราศจากสารเร่งการเจริญเติบโตแล้วนำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 สัปดาห์ เมื่อ endosperm แตกออก ทำการย้ายต้นอ่อนที่ใบเลี้ยงกางออกแล้ว มาวางลงบนอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ให้เกิดเป็นต้นสบู่ดำ นำต้นสบู่ดำมาตัดแยกแต่ละเนื้อเยื่อ ได้แก่ ใบ ก้าน และลำต้น เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดเป็นอวัยวะต่างๆของสบู่ดำ โดยมาทดสอบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิด แคลลัส, ยอดหลายยอด และราก ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ทดสอบสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเกิดอวัยวะต่างๆของสบู่ดำ

สูตรอาหารที่	ชนิดของอาหาร	สารประกอบ	เพื่อทดสอบ
1	อาหารเหลว	MS + 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร	แคลลัส
	อาหารเหลว	MS + 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	แคลลัส
	อาหารเหลว	MS + 2,4-D 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	แคลลัส
2	อาหารแข็ง	MS + 2,4-D 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร	แคลลัส
	อาหารแข็ง	MS + 2,4-D 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	แคลลัส
	อาหารแข็ง	MS + 2,4-D 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	แคลลัส
3	อาหารแข็ง	MS + IBA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร	แคลลัส
	อาหารแข็ง	MS + IBA 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร	แคลลัส
4	อาหารแข็ง	MS + BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + 2,4-D 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร: (CI)	แคลลัส
5	อาหารแข็ง	MS + BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร: (CI/L)	แคลลัส
6	อาหารแข็ง	MS + BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + IBA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร: (SI)	ปลายยอด หลายยอด
7	อาหารแข็ง	MS + IBA 10 มิลลิกรัมต่อลิตร: (RI)	ราก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน

สืบค้นข้อมูลของยีนในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) โดยเลือกยีน *APETALA 2* (*AP2*) accession number (NM_119856.2) จากพืชอะราบิดอปซิส แล้วออกแบบ 3 คู่ไพรเมอร์จากส่วนที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ (ภาคผนวกที่ ก1) ตรวจสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการแยกดีเอ็นเอเป็นสายเดี่ยว (T_m) ปริมาณ G/C content ที่เหมาะสม การเกิดโครงสร้างทุติยภูมิ และการจับกันเองของคู่ไพร์เมอร์ด้วยโปรแกรม oligo calc (http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html)

ตารางที่ 2 คู่ไพรเมอร์สำหรับโคลนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนเป้าหมาย

ชื่อไพรเมอร์	ไพร์เมอร์ด้าน	ไพร์เมอร์ลำดับเบส (5' to 3')	อุณหภูมิ Annealing (องศาเซลเซียส)
AP2/D1/F	forward	CACCATGTGGGA TCTAAACGACGC	59
AP2/D1/R	reverse	TTCAACGGCTGT GCCGGCTC	
AP2/D2/F	forward	GTTACGTTTTACC GG	50
AP2/D2/R	reverse	TATCGTAAGCTCT AGCAGCT	
AP2/D3/F	forward	GATCACAACCTC GATTTGAG	56
AP2/D3/R	reverse	AGAAGGTCTCAT GAGAGGAG	

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. การแยกสกัดอาร์เอ็นเอ

3.1 อะราบิดอปซิส

สกัดแยกอาร์เอ็นเอ โดยวิธีของ Yu and Goh (2000) นำตัวอย่างใบอะราบิดอปซิสแช่แข็งมา 0.5 กรัม ใส่ลงในโกร่งที่เย็นจัด เติมไนโตรเจนเหลว แล้วบดให้ละเอียด เติม Hao buffer (ภาคผนวกที่ ช5) 3 มิลลิลิตร แล้วดูดสารละลายใส่หลอดขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน15 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ เติมสารละลายคลอโรฟอร์ม: ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 24: 1 ปริมาตรเท่ากับสารละลาย เขย่าเพื่อผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ สกัดด้วยสารละลายคลอโรฟอร์ม:ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ อัตราส่วน 24:1 ตามขั้นตอนเดิมอีก 2 ครั้ง แล้วเติม LiCl 10 โมลาร์ ปริมาตร 1/3 เท่าของสารละลาย ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรผสมโดยการกลับหลอดไปมา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน เพื่อให้อาร์เอ็นเอตกตะกอน หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ดูดสารละลายทิ้ง ล้างตะกอนด้วย LiCl 2.5 โมลาร์ 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ดูดสารละลายทิ้ง ล้างตะกอนด้วย เอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ในน้ำ DEPC 800 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ดูดสารละลายทิ้ง เปิดฝาทิ้งไว้ให้ตะกอนแห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำ DEPC 30 ไมโครลิตร

ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD260 OD260/280 และ OD260/230 ด้วยเครื่อง NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA) และตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอ ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE ย้อมด้วยสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ นำแผ่นเจลไปดูผลใต้แสงอุลตราไวโอเลตเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2 สบู่ดำ

สกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูปของ Pure Link™ Plant RNA Reagent (Invitrogen, USA) โดยการเติม PureLink™ Plant RNA Reagent ที่เย็น 0.5 มิลลิลิตร ต่อเนื้อเยื่อสบู่ดำ ที่ถูกบดในไนโตรเจนเหลว 0.1 กรัม ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นจึงนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที และนำสารละลายส่วนบนมาเติม 5M NaCl 0.1 มิลลิลิตร และคลอโรฟอร์ม 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที นำสารละลายส่วนบนมาเติมไอโซโพรพานอลแอลกฮอล์ในปริมาณที่เท่ากัน ผสมให้เข้ากันและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที อีกครั้งแล้วนำตะกอนที่ได้มาเติมแอลกอฮอล์ 75% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที นำตะกอนที่ได้มาละลายใน RNase-free water 10-30 ไมโครลิตร และนำไปเก็บที่ -80 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD260 OD260/280 และ OD260/230 ด้วยเครื่อง NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA) และตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอ ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE ย้อมด้วยสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์นำแผ่นเจลไปดูผลใต้แสงอุลตราไวโอเลตเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.3 การกำจัดดีเอ็นเอออกจากอาร์เอ็นเอ

นำสารละลายอาร์เอ็นเอ 1 ไมโครกรัม มากำจัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ DNase I (Fermentus, USA) โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย 10X Buffer with $MgCl_2$ 1 ไมโครลิตร, เอนไซม์ DNaseI 1 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้ครบ 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นเติม 50 มิลลิโมลาร์ของสารละลาย Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.4 การกำจัดเอนไซม์อาร์เอ็นเอส

นำสารละลายอาร์เอ็นเอ 1 ไมโครกรัม มาผ่านกระบวนการเพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อาร์เอ็นเอสที่ปนเปื้อนอยู่ในสารละลายอาร์เอ็นเอ ด้วยชุด RiboLock™ RNase Inhibitor บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นหยุดการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ RiboLock™ RNase Inhibitor โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

4. การทำปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันของอาร์เอ็นเอ

นำอาร์เอ็นเอที่ได้มาสร้างเป็น cDNA โดยใช้ชุดทำรีเวอร์สทรานสคริปชัน Super Script™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) ซึ่งใช้อาร์เอ็นเอ 1 ไมโครกรัม เติมไพรเมอร์ oligo $(dT)_{20}$ 50 ไมโครโมลาร์ 1.0 ไมโครลิตร เติม dNTP 10 มิลลิโมลาร์ 1 ไมโครลิตร และเติมน้ำ DEPC จนปริมาตรสุทธิเป็น 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วนำไปแช่น้ำแข็งทันทีนาน 1 นาที จากนั้นนำมาเติม cDNA Synthesis Mix ที่ประกอบด้วย 10X RT buffer 2 ไมโครลิตร, 25 มิลลิโมลาร์ ของ $MgCl_2$ 4 ไมโครลิตร, 0.1 โมลาร์ ของ DTT 1 ไมโครลิตร, RNaseOUT™ 40 ยูนิตต่อไมโครลิตร จำนวน 1 ไมโครลิตร และ SuperScript™ III RT 200 ยูนิตต่อไมโครลิตร 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 50 นาที เพื่อทำปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชัน จากนั้นนำมาหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยบ่มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นกำจัดอาร์เอ็นเอต้นแบบด้วยการเติม RNaseH 2 ยูนิตต่อไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที cDNA ที่ได้มาสามารถนำไปเก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนจะใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ด้วยเครื่อง PCR รุ่น LifePro Thermal Cycler (Bioer, China)

5. ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณของยีนเป้าหมาย

การสังเคราะห์ยีน *AP2* ด้วยไพรเมอร์ forward และ reverse ดังตารางที่ 1 ที่ได้ออกแบบไว้ 3 คู่เพื่อเพิ่มปริมาณในส่วนของยีนเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Vivantis, Canada) ซึ่งมีองค์ประกอบของปฏิกิริยาได้แก่ cDNA (ดีเอ็นเอต้นแบบ) 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรจำนวน 1 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ forward และไพรเมอร์ reverse 2

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ไมโครโมลาร์ อย่างละ 4 ไมโครลิตร dNTP 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, 10X PCR buffer 2 ไมโครลิตร, 25 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ 1 ไมโครลิตร สำหรับชิ้นยีนส่วนที่ 1 และสำหรับชิ้นส่วนที่ 2 และ 3 ใช้ 0.8 ไมโครลิตร, 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ของ *Taq* DNA Polymerase (Vivantis, Canada) 0.3 ไมโครลิตร, พลาสมิด 1 ไมโครลิตร และ น้ำกลั่น 8.7 ไมโครลิตร ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาเป็นแบบ gradient ดังนี้คือ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 1 รอบ ตามด้วย 30 รอบ ของ denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, annealing ที่อุณหภูมิ ดังนี้ ชิ้นยีนที่ 1 ที่อุณหภูมิ 59 องศาเซลเซียส 1 นาที / ชิ้นยีนที่ 2 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 1 นาที / ชิ้นยีนที่ 3 ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส 1 นาที, ต่อด้วยใช้ความร้อน 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที แล้วตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE ย้อมด้วยสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ นำแผ่นเจลไปดูผลใต้แสงอุลตราไวโอเลตเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน

6. เชื่อมต่อชิ้นยีนกับพลาสมิด pENTR

6.1 ออกแบบไพรเมอร์

เติมลำดับเบส CACC เข้าไปบริเวณปลาย 5' ของไพรเมอร์ ดังตารางที่ 2 เพื่อนำชิ้นยีนเข้ามาใน Gateway Vector® System ส่งสังเคราะห์ไพรเมอร์ (Pacific Science, Thailand)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 คู่ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณของยีนเป้าหมายสำหรับใช้กับ Gateway Vector® System

ชื่อไพรเมอร์	ไพรเมอร์ด้าน	ลำดับเบส (5' to 3')	อุณหภูมิ Annealing (องศาเซลเซียส)
AP2II/D1/pENTR/F	forward	CACCCACCATGTGGGATCTAAACGACGC	59
AP2II/D1/pENTR/R	reverse	TTCAACGGCTGTGCCGGCTC	
AP2II/D2/pENTR/F	forward	CACCGTTACGTTTTACCGG	50
AP2II/D2/pENTR/R	reverse	TATCGTAAGCTCTAGCAGCT	
AP2II/D3/pENTR/F	forward	CACCGATCACAACCTCGATTTGAG	56
AP2II/D3/pENTR/R	reverse	AGAAGGTCTCATGAGAGGAG	

6.2 เพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้องค์ประกอบของปฏิกิริยา คือ ใช้ไพรเมอร์แบบจำเพาะ (specific primer) ที่ออกแบบทั้ง forward primer และ reverse primer ที่เติมเบส CACC บริเวณปลาย 5' ดังตารางที่ 3 เข้มข้น 2 ไมโครโมล/ไมโครลิตร ปริมาตรอย่างละ 2.5 ไมโครลิตร, dNTP 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, 10X PCR buffer 2 ไมโครลิตร, 25 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ 1 ไมโครลิตร สำหรับชิ้นยีนส่วนที่ 1 และสำหรับชิ้นส่วนที่ 2 และ 3 ใช้ 0.8 ไมโครลิตร, 5 ยูนิตต่อไมโครลิตรของ *Taq* DNA Polymerase (Vivantis, Canada) 0.3 ไมโครลิตร, พลาสมิด 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 8.7 ไมโครลิตร ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาเป็นแบบ gradient ดังนี้คือ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 1 รอบ ตามด้วย 30 รอบของ denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, annealing ที่อุณหภูมิ ดังนี้ ชิ้นส่วนที่ 1 ที่อุณหภูมิ 59 องศาเซลเซียส 1 นาที/ ชิ้นส่วนที่ 2 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 1 นาที / ชิ้นส่วนที่ 3 ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1 นาที, ต่อด้วยใช้ความร้อน 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยเครื่อง PCR รุ่น LifePro Thermal Cycler (Bioer, China) นำมาตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส บนเจลอะกาโรส 1.0% ในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE ย้อมด้วยสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ นำแผ่นเจลไปดูผลใต้แสงอุลตราไวโอเลต เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ 1 Kb DNA Ladder marker (Fermantas, USA)

6.3 เชื่อมต่อเข้าไปใน Gateway Vector®

นำชิ้นยีนทั้ง 3 ชิ้น มาเชื่อมต่อเข้ากับ pENTR™ vector (Invitrogen, USA) โดยมีส่วนผสมของสารละลายที่ใช้ทำปฏิกิริยาดังนี้ พลาสมิด 3 ไมโครลิตร, Salt Solution 1 ไมโครลิตร, TOPO® vector 1 ไมโครลิตร และ Sterile Water ปรับปริมาตรให้ได้เป็น 6 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 22- 23 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้น heat shock โดยเติม One Shot® chemically competent *E. coli* cells ลงไป 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที แล้วนำมาแช่น้ำแข็งนาน 5 นาที จากนั้นเติม S.O.C medium 250 ไมโครลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาทีนาน 1 นาทีเพื่อเก็บเกี่ยวเซลล์ แล้วเกลี่ยเชื้อลงบนอาหารแข็ง LB (ภาคผนวกที่ ช1) ที่มียาปฏิชีวนะคานามัยซิน เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

6.4 การคัดเลือกโคลนที่ต้องการด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

ใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยโคโลนีแบคทีเรียไปจุ่มในหลอดพีซีอาร์ ซึ่งมีน้ำ ultra pure ปริมาตร 9.7 ไมโครลิตร นำไปต้มแล้วดูดส่วนใสมา 2 ไมโครลิตร ใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ซึ่งมีองค์ประกอบของปฏิกิริยาได้แก่ ดีเอ็นเอต้นแบบ 2 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ M13-F (5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3') และ M13-R (5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3') 5 ไมโครโมลาร์ อย่างละ 2 ไมโครลิตร dNTP 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิโมลาร์ 2 ไมโครลิตร 10X Vi buffer 2 ไมโครลิตร และ *Taq* DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) 0.3 ไมโครลิตร (Vivantis, Canada) โปรแกรมทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ คือ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 1 รอบ ตามด้วย 30 รอบ ของ denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, ต่อด้วยใช้ความร้อน 72 องศาเซลเซียส 1 นาที และ final extension

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที แล้วตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE ย้อมด้วยสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ นำแผ่นเจลไปตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ 1 Kb DNA Ladder marker (Fermantas, USA)

6.5 การสกัดพลาสมิดสายผสมจากโคลนแบคทีเรีย *E. coli*

เขี่ยโคโลนีแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีพลาสมิดสายผสมมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB (ภาคผนวกที่ ช1) ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตรในหลอดขนาด 15 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ข้ามคืนแล้วนำมาสกัดโดยใช้ชุดสกัดพลาสมิด AxyPrep Plasmid Miniprep Kit (Axygen, USA) เก็บเกี่ยวเชื้อที่เลี้ยงไว้ข้ามคืน ดูดเชื้อมา 1.5 มิลลิลิตร โดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาทีจากนั้นเติมบัฟเฟอร์ S1 ลงในหลอด 250 ไมโครลิตร นำไป Vortex ให้ตะกอนละลายหมด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที แล้วเติมบัฟเฟอร์ S2 ลงในหลอด 250 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ 4-6 ครั้ง แล้วเติมบัฟเฟอร์ S3 ลงในหลอด 350 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ 6-8 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดส่วนใสลงในหลอดโดยผ่านคอลัมน์ของชุด นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ดึงคอลัมน์ออกจากหลอดแล้วเทของเหลวทิ้ง จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ W2 ลงในหลอด 700 ไมโครลิตร โดยผ่านคอลัมน์นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 12,000 รอบต่อนาทีนาน 1 นาที ดึงคอลัมน์ออกจากหลอดแล้วเทของเหลวทิ้งนำไปปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อให้ปราศจากบัฟเฟอร์ W2 บนคอลัมน์ จากนั้นดึงคอลัมน์ย้ายลงหลอดใหม่ แล้วเติม Elute บัฟเฟอร์ลงไปบนคอลัมน์ 60-80 ไมโครลิตร วางทิ้งไว้นาน 3-5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บพลาสมิดไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส นำมาตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส บนเจลอะกาโรส 1.0% ในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE ย้อมด้วยสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ นำแผ่นเจลไปตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ1 Kb DNA Ladder marker (Fermantas, USA)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7. ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์และตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอในพลาสมิดสายผสม

ตรวจสอบผลของการเพิ่มปริมาณชิ้นยีนแต่ละชิ้นที่คาดว่าจะมีลำดับเบส CACC บริเวณปลาย 5' โดยส่งวิเคราะห์ลำดับเบส (Macrogen, Korea) จากนั้นนำมาตรวจสอบโดยมาเปรียบเทียบลำดับเบสกับฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม nucleotide blast (blastn)

8. การเชื่อมชิ้นยีนเข้าไปใน expression vector (pHellsgate8)

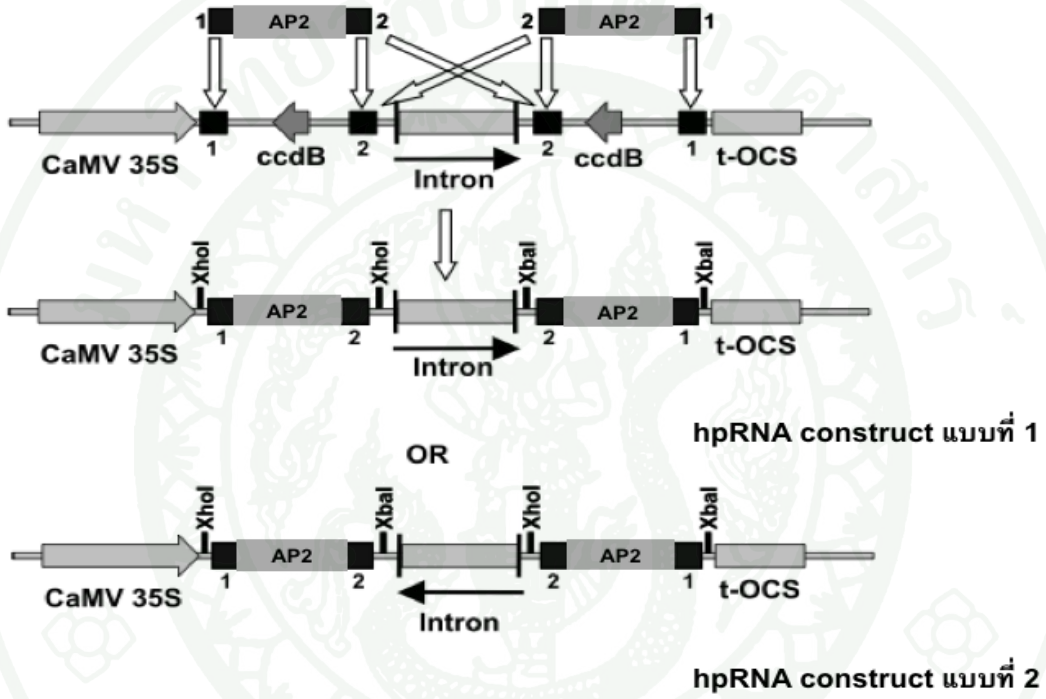
นำชิ้นยีนที่เชื่อมเข้าไปใน Gateway Vector® pENTR™ มาแลกเปลี่ยนชิ้นยีนเข้าไปใน pHellsgate8 ซึ่งเป็น Expression vector สำหรับเกิด Gene Silencing โดยใช้ Gateway® LR Clonase™ II enzyme mix (Invitrogen, USA) โดยมีส่วนผสมของสารละลายที่ใช้ทำปฏิกิริยา ดังนี้ ชิ้นยีนแต่ละชิ้นทั้ง 2 ชิ้นที่ถูกโคลนเข้าไปใน pENTR™ Directional TOPO® ประกอบด้วย pD1/1 และ pD2/6 (50-150 นาโนกรัม), เวกเตอร์ pHellsgate8, Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix 2 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำ ultra pure ให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 8 ไมโครลิตร ดังตารางที่ 3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จากนั้นเติม Proteinase K solution 2 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตรจำนวน 1 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

9. นำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านด้วยวิธี heat shock

นำเซลล์ 50 ไมโครลิตร ที่ผ่านการเตรียมคอมพีเทนเซลล์ จาก *E. coli* สายพันธุ์ DH5∝ ผสมกับดีเอ็นเอสายผสมที่ได้จากรับการแลกเปลี่ยนเข้าไปใน pHellsgate 8 จำนวน 2 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที นำมาบ่มที่มีอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ย้ายเซลล์ไปแช่น้ำแข็งทันทีนาน 2 นาที นำเซลล์ที่ผ่านการทำ heat shock เลี้ยงในอาหารเหลว LB จำนวน 600 ไมโครลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 1.30 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตกตะกอนโดยหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทอาหารส่วนบนทิ้ง ดูดอาหารเลี้ยงแบคทีเรียที่เหลืออยู่รวมทั้งเซลล์แบคทีเรีย มาเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะสเปกติโนมัยซิน เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืนเขี่ยโคโลนีแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีพลาสมิดสายผสมมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB (ภาคผนวกที่ ช)ที่มียาปฏิชีวนะสเปกติโนมัยซิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตรในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

200 รอบต่อนาที ข้ามคืนแล้วนำมาสกัดโดยใช้ชุดสกัดพลาสมิด AxyPrep Plasmid Miniprep Kit (Axygen, USA) เก็บพลาสมิดไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส นำมาตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส บนเจลอะกาโรส 1.0% ในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE ย้อมด้วยสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ นำแผ่นเจลไปตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ 1 Kb DNA laddermarker (Fermantas, USA)



ภาพที่ 1 กลไลการเกิด RNAi construct ด้วยเอนไซม์ LR Clonase™ II (Invitrogen, USA)

ที่มา: Helliwell and Waterhouse (2003)

10. การตรวจสอบโครงสร้างพลาสมิด

เก็บเกี่ยวเชื้อที่เลี้ยงไว้ข้ามคืน นำมาสกัดพลาสมิดจากแบคทีเรียด้วย Axy Prep Plasmid Miniprep Kit จากนั้นนำมาตัดด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ *XbaI* (Fermantas, Canada) และ *XhoI* (Fermantas, Canada) โดยมีส่วนผสมของสารละลายที่ใช้ทำปฏิกิริยา ดังตารางที่ 4 ดังนี้ Nuclease-Free water (Amresco, Malaysia) 16 ไมโครลิตร, 10X Buffer Tango™ 2 ไมโครลิตร, DNA (0.5-1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร และเอนไซม์ตัดจำเพาะ 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส บนเจลอะกาโรส 1.0% ในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE ย้อมด้วยสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ นำแผ่นเจลไปตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ 1 Kb DNA ladder marker (Fermantas, USA)

ตารางที่ 4 อัตราส่วนการทำปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Xho*I

*Xba*I reaction		*Xho*I reaction	
Plasmid	0.5 µl	Plasmid	0.5 µl
10X buffer Tango™	1.0 µl	10X buffer Tango™	1.0 µl
RNase free water	8.0 µl	RNase free water	8.0 µl
*Xba*I	0.5 µl	*Xho*I	0.5 µl
Total	10 µl	Total	10 µl

ตารางที่ 4A อัตราส่วนการทำปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ *Xba*I

ตารางที่ 4B อัตราส่วนการทำปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I

ตารางที่ 5 คู่ไพรเมอร์ลำดับนิวคลีโอท์จากบนเวกเตอร์ pStargate

ชื่อไพรเมอร์	ไพรเมอร์ด้าน	ลำดับเบส (5' to 3')	อุณหภูมิ Annealing (องศาเซลเซียส)
Star-F	forward	GGCGTCTCGCATA TCTCATT	55
Star-R	reverse	TTCTGCAGGTCG ACTCTAGA	

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

11. ถ่ายฝากโครงสร้างพลาสมิดเข้าไปใน *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ด้วยวิธี Freeze-thaw

ดูดสารละลายโครงสร้างพลาสมิด 2 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดคอมพลีเทนอะโครแบคทีเรียม ที่มีอยู่ 50 ไมโครลิตร นำไปแช่น้ำแข็งนาน 30 นาที จากนั้นแช่หลอดในไนโตรเจนเหลวนาน 45 วินาที แล้วนำไปบ่ม 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เติมอาหารเหลว LB 400 ไมโครลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเก็บเซลล์ที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทอาหารเหลวทิ้งพอให้เหลือประมาณ 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ในการคัดเลือก นำไปบ่ม 28 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน จากนั้นเลือกโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะไรแฟมฟิซิน และกานามัยซิน เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร นำไปบ่ม 28 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน

12. การเพาะต้นอะราบิดอปซิส

นำเมล็ดอะราบิดอปซิสใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร มาฟอกฆ่าเชื้อโดยใช้ควันที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของคลอรอกซ์และกรดไฮโดรครอริกซ์ที่เข้มข้นในอัตราส่วน 60 มิลลิลิตรต่อ 5 มิลลิลิตร โดยใส่เมล็ดอะราบิดอปซิส ในหลอดและสารที่ใช้ฟอก ใส่กล่องปิดฝาภายในตู้ที่มีการหมุนเวียนอากาศออกสู่บรรยากาศ บ่มไว้นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นนำเมล็ดมาจัดเรียงอย่างเป็นระเบียบบนจานอาหารที่มีอาหาร MS นำไปบ่มในที่มืดอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน จากนั้นจึงย้ายมาบ่มที่มีแสงอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน แล้วย้ายลงถาดเพาะเลี้ยงที่มีพีทมอส ใส่ถาดลงในกระบะที่มีน้ำ ปิดด้วยพลาสติกใส นำไปบ่มที่มีแสงอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เปิดพลาสติกทุกๆ 3 วัน เริ่มตั้งแต่ครั้งละ 1 ใน 4 ของกระบะ จนกระทั่งเปิดพลาสติกหมด จากนั้นปล่อยให้เจริญเติบโตจนกระทั่งออกฝัก เก็บเมล็ดโดยปล่อยให้ต้นอะราบิดอปซิส แห้งทั้งต้น นำถุงมาห่อทั้งต้นเพื่อเก็บเมล็ด คัดเลือกเฉพาะเมล็ดมาเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

13. ถ่ายยีนเข้าพืช

13.1 ถ่ายฝากยีนเข้าต้นอะราบิดอปซิสด้วยวิธี floral dip

เลี้ยง Starter เชื้ออะโกรแบคทีเรียมทูมีเฟเซียน สายพันธุ์ EHA 105 ที่มี RNAi construct ทั้ง 3 ชิ้น construct มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มียาปฏิชีวนะไรแฟมฟิซิน และกานามัยซิน เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 2 วัน เมื่อครบเวลาให้ดูดเชื้อมา 200 ไมโครลิตร มาเลี้ยงในอาหาร LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะไรแฟมฟิซิน และกานามัยซิน เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที นานข้ามคืน ให้ได้ค่าดูดกลืนแสงที่ OD_{600} 1.5 - 2.0 จากนั้นนำมาเก็บเกี่ยวเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาทีที่ 25 องศาเซลเซียส เทอาหารเหลวทิ้ง จากนั้นละลายตะกอนด้วยตัวทำละลาย ปริมาตร 500 มิลลิตร ที่ประกอบด้วย 5% sucrose (w/v) และ Tween-20 0.02% (v/v) จากนั้นนำอะราบิดอปซิสที่ผ่านการปลูกมา 3-4 สัปดาห์ ซึ่งอยู่ในระยะออกดอก มาจุ่มลงในสารละลายนาน 3 นาที นำถุงพลาสติกมาหุ้มเพื่อรักษาความชื้นนาน 3 วันในที่มืด จากนั้นปล่อยให้เจริญเติบโตจนกระทั่งออกฝัก เก็บเมล็ดโดยปล่อยให้ต้นอะราบิดอปซิส แห้งทั้งต้น นำถุงมาห่อทั้งต้นเพื่อเก็บเมล็ด คัดเลือกเฉพาะเมล็ดมาเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส

13.2 ถ่ายฝากยีนเข้าต้นสบู่ดำด้วยวิธี Agrobacterium cocultivation

เลี้ยงเชื้อ Starter ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะไรแฟมฟิซิน และสเปกติโนมัยซิน หรือกานามัยซิน เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ 28 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน จากนั้นดูดเชื้อมา 200 ไมโครลิตร ไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะไรแฟมฟิซิน และสเปกติโนมัยซิน หรือกานามัยซิน เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ 28 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{600} 0.5 - 0.7 จากนั้นเทเชื้อใส่หลอด 40 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที หลังจากนั้นเทอาหารเหลวทิ้ง เติมอาหารเหลว CI/L ที่มี Acetosyringone (AS) เข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร แล้วนำไปทำให้ตะกอนละลาย จากนั้นเทใส่ในขวดรูปชมพู่ ที่มีอาหารเหลวดังกล่าว ดูดอาหารที่มีเชื้ออะโกรแบคทีเรียมละลายอยู่มา 600 ไมโครลิตร มาวัดค่าดูดกลืนแสง ให้อยู่ระหว่าง OD_{600} 0.5 - 0.7 นำอาหารเหลว CI/L ที่มี AS มาเขย่าด้วยความเร็ว 200

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รอบต่อนาที นาน 30 นาที จากนั้นนำเนื้อเยื่อพืชที่ตัดแยกใบ และลำต้นแล้ว มาเลี้ยงร่วมกับอาหารเหลว CI/L + AS นำมาเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที นาน 10-15 นาที จากนั้นนำเนื้อเยื่อพืชมาซับอะโกรแบคทีเรียมส่วนเกินบนกระดาษทิชชูปลอดเชื้อ แล้วนำเนื้อเยื่อมาวางบนอาหารแข็ง CI/L ที่มี AS เข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร นำมาห่ออะลูมิเนียมฟอยล์ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน จากนั้นนำเนื้อเยื่อมาเลี้ยงในอาหารเหลว CI/L ที่มียาปฏิชีวนะ Cefotaxime เข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที นานข้ามคืน จากนั้นนำเนื้อเยื่อพืชมาซับให้แห้งบนกระดาษทิชชู แล้ววางเนื้อเยื่อบนอาหารแข็ง CI/L ที่มียาปฏิชีวนะ Cefotaxime เข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และกานามัยซิน เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร นำไปเลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียส ย้ายเนื้อเยื่อสบู่ดำเพื่อเปลี่ยนอาหารทุกๆ 3-4 สัปดาห์

14. คัดเลือกเมล็ดที่ได้รับการถ่ายยีนในต้นอะราบิดอปซิส

ฟอกฆ่าเชื้อโดยใช้ควันที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของคลอรอกซ์ และกรดไฮโดรครอริกซ์ที่เข้มข้น ในอัตราส่วน 60 มิลลิลิตรต่อ 5 มิลลิลิตร ใส่กล่องปิดฝาภายในตู้ที่มีการหมุนเวียนอากาศออกสู่บรรยากาศ บ่มไว้นาน 4 ชั่วโมง จากนั้นนำเมล็ดมาจัดเรียงอย่างเป็นระเบียบ บนจานอาหารที่มีอาหารคัดเลือก MS + ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน จากนั้นจึงย้ายมาบ่มที่มีแสงอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 14 วันแล้วย้ายเมล็ดที่รอดจากการคัดเลือกบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน ลงถาดเพาะเลี้ยงที่มีพีชมอส ใส่ถาดลงในกระบะที่มีน้ำ ปิดด้วยพลาสติกใส นำไปบ่มที่มีแสงอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เปิดพลาสติกทุกๆ 3 วันครั้งละ 1 ใน 4 ของกระบะ จนกระทั่งเปิดพลาสติกหมด จากนั้นปล่อยให้เจริญเติบโต เติมสารอาหาร (ภาคผนวกที่ ช12) ช่วยให้มีการเจริญเติบโตได้ดีขึ้น จนกระทั่งออกฝักเก็บเมล็ดโดยปล่อยให้ต้นอะราบิดอปซิส แห้งทั้งต้นหรือจนฝักเป็นสีน้ำตาล ให้นำถุงมาห่อทั้งต้น แยกเมล็ดออกมาใส่ในหลอดใหม่ 1.5 มิลลิลิตร เปิดฝาแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1-3 สัปดาห์ นำมาเก็บรักษาเมล็ดที่ 4 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

15. การตรวจสอบผลการถ่ายฝากยีน

15.1 การสกัดดีเอ็นเอของต้นอะราบิดอปซิส

เก็บใบอ่อนต้นอะราบิดอปซิส สายพันธุ์ Columbia มาบดในไนโตรเจนเหลวแล้วนำไปใส่ในสารละลายของ 2X CTAB 600 ไมโครลิตร และ 2-Mercaptoethanol 1.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมงโดยพลิกหลอดทุก 10 นาที เติม Chloroform: Isoamyl (24: 1) 600 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายใสส่วนบนมาใส่หลอดใหม่ แล้วเติมไอโซโพรพานอล 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม Washing buffer 500 ไมโครลิตร เคาะข้างหลอดเบาๆเพื่อละลายเกลือออก เทสารละลายใสทิ้งคว่ำหลอดให้แห้งแล้วเติม RNase buffer 200 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์ RNaseA 2 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นเติม Phenol: Chloroform: Isoamyl (25: 24: 1) 200 ไมโครลิตร เคาะหลอดเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติมโซเดียมอะซิเตท เข้มข้น 3 M pH 5.2 ลงไป 10 ไมโครลิตร และ Absolute Ethanol 400 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอซ้ำ แล้วนำไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที 15 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้งล้างตะกอนด้วยด้วย เอทานอล 70% ปริมาตร 500 องศาเซลเซียส นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที เทส่วนใสทิ้ง วางทิ้งไว้ให้ตะกอนแห้งโดยบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนด้วย TE buffer 50 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส นำมาตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส บนเจลอะกาโรส 1.0% ในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE ย้อมด้วยสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ นำแผ่นเจลไปตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ 1 Kb DNA ladder marker (Fermantas,USA)

15.2 การแยกสกัดอาร์เอ็นเอของต้นอะราบิดอปซิส

สกัดแยกอาร์เอ็นเอทั้งหมดจาก โดยวิธีของ Yu and Goh (2000) ดูข้อ 3.1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

15.3 นำอาร์เอ็นเอที่ได้จากข้อ 15.2 มาทำปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันของอาร์เอ็นเอ

นำอาร์เอ็นเอที่ได้มาเปลี่ยนเป็น cDNA โดยใช้ชุดทำรีเวอร์สทรานสคริปชัน SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) วิธีการทดลองข้อที่ 4 โดยใช้ mRNA ปริมาณ 300 นาโนกรัม

16. ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบผลการถ่ายยีน

16.1 นำต้นอะราบิดอปซิส ในรุ่น T_1 ที่ผ่านการถ่ายฝากยีน มาสกัดดีเอ็นเอ และทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพร์เมอร์ที่ออกแบบจากยีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซิน ลำดับเบสดูจากตารางที่ 5 ที่จำเพาะบนเวกเตอร์ pHellsgate8

ตารางที่ 6 แสดงลำดับเบสของคู่ไพร์เมอร์ที่จำเพาะบนเวกเตอร์ pHellsgate8

ชื่อไพรเมอร์	ไพร์เมอร์ด้าน	ไพร์เมอร์ลำดับเบส (5' to 3')	อุณหภูมิ Annealing (องศาเซลเซียส)
Kana_Hell (F)	forward	GACTGGGCACAA CAGACAATCG	55
Kana_Hell (R)	reverse	TATTCGGCAAGC AGGCATCG	

16.2 เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *AP2* จากการแยกอาร์เอ็นเอ ที่สกัดได้ทำปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันได้เป็น cDNA แล้วมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ เพื่อปรับความเข้มข้นเริ่มต้นให้ cDNA เริ่มต้นเท่ากันทุกตัวอย่าง โดยใช้ไพร์เมอร์ที่ออกแบบจากส่วนของยีน *Actin* ดังตารางที่ 6

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 7 คู่ไพรเมอร์ลำดับนิวคลีโอท์จากยีน *Actin* ของต้นอะราบิดอปซิส

ชื่อไพรเมอร์	ไพร์เมอร์ด้าน	ไพร์เมอร์ลำดับเบส (5' to 3')	อุณหภูมิ Annealing (องศาเซลเซียส)
AtActin2-F	forward	CTAAGCTCTCAAG ATCAAAGGCTTA	54
AtActin2-R	reverse	ACTAAAACGCAA AACGAAAGCGGTT	

16.3 เมื่อปรับความเข้มข้นให้เท่ากันทุกตัวอย่างแล้ว สามารถนำมาตรวจสอบการแสดงออกได้ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *AP2* โดยใช้สภาวะของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังตารางที่ 3 และตารางที่ 7

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 8 คู่ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณของยีนเป้าหมายจากพืชสบู่ดำ

ชื่อไพรเมอร์	ไพร์เมอร์ด้าน	ไพร์เมอร์ลำดับเบส (5' to 3')	อุณหภูมิ Annealing (องศาเซลเซียส)
AP2 domain (F)	forward	CACCTTCACCACC AAAACC	55
AP2 domain (R)	reverse	CCTTCAATGTGG GACCCTT	
AP2 nondomain (F)	forward	CACCTAAGCCTCT CCATTCCTC	55
AP2 nondomain (R)	reverse	TAACCTTCTCCGC CGTCG	
AP2 3' UTR (F)	forward	CACCGATTGGGC TTCTCTTTTAT	55
AP2 5' UTR (R)	reverse	TGCAACTGCCAA AAACTCATT	

จากนั้นนำมาตรวจสอบผลโดยเทียบสายพันธุ์ที่มี RNAi construct กับ wild type ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE ย้อมด้วยสารละลายเอทธิเดียมโบรไมด์ นำแผ่นเจลไปตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ VC 100 bp Plus DNA Ladder (Vivantis, Canada)

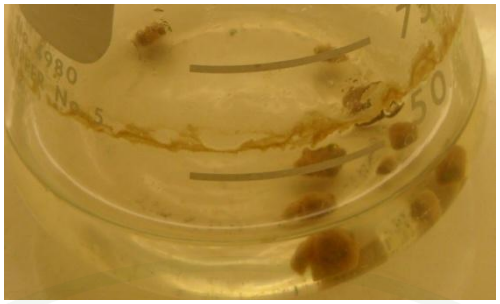
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

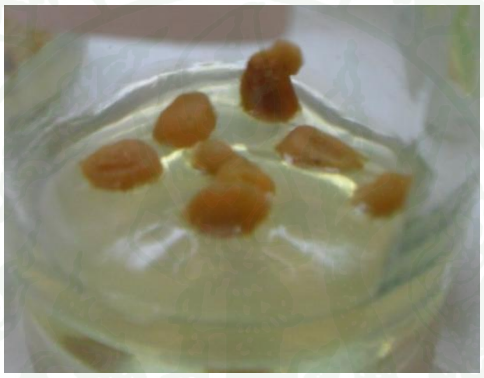
1. ผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

จากการทดสอบสูตรอาหารต่างๆ ในการชักนำใบ ก้าน และต้นให้เกิดเป็น แคลลัส พบว่า สูตรที่ 1 (MS + 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร) ในอาหารเหลว พบว่า เนื้อเยื่อทั้งใบ ก้าน และลำต้น ไม่สามารถสร้างเป็นแคลลัสได้ อีกทั้งยังทำให้เนื้อเยื่อพืชตาย ดังแสดงในภาพที่ 2โดยในภาพแสดงผลการเจริญเติบโตของ MS + 2,4-D ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนในอาหารสูตรที่ 2 ที่เป็นอาหารแข็ง ซึ่งประกอบไปด้วย MS + 2,4-D ที่ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าทุกเนื้อเยื่อเกิดเป็นแคลลัสได้ แต่แคลลัสเกาะกันหลวมๆ และมีสีเหลือง ดังภาพที่ 3 ในอาหารสูตรที่ 3 MS + IBA ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าไม่สามารถชักนำให้เป็นแคลลัสได้ โดยพบว่าเนื้อเยื่อเกิดการแห้งเหี่ยว หรือกลายเป็นสีเหลือง ดังในภาพที่ 4 ส่วนในอาหารสูตรที่ 4 (CI) ที่ประกอบด้วย MS + BAP ที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA ที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าได้เนื้อเยื่อแคลลัสที่ มีการแพ็คกันอย่างหนาแน่น แต่พบว่า เนื้อเยื่อส่วนที่เป็นใบเลี้ยง ใช้เวลาในการเหนี่ยวนำให้เกิดเป็นแคลลัสต้องใช้เวลานานกว่า 4 สัปดาห์ ขณะที่เนื้อเยื่อในส่วนเป็นก้านและลำต้นใช้เวลาประมาณ 3 สัปดาห์ จึงเจริญเป็นแคลลัสได้ ดังในภาพที่ 5 จากปัญหาของการเหนี่ยวนำเนื้อเยื่อส่วนของใบที่ใช้เวลานาน จึงได้ดัดแปลงสูตรอาหารได้เป็นสูตรอาหารที่ 5 (CI/L) ประกอบด้วย MS + BAP ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร + IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าใช้เวลาเพียง 1-2 สัปดาห์เท่านั้น ก็พบกลุ่มก้อนแคลลัสบนส่วนของใบเลี้ยงแล้ว นอกจากนั้นได้ทดลองใช้สูตรดังกล่าว ในการเหนี่ยวนำเนื้อเยื่อก้าน และลำต้น ก็พบว่าสามารถเกิดกลุ่มก้อนแคลลัสที่แพ็คตัวกันหนาแน่น และเกิดได้เร็วกว่าสูตร CI เดิม ดังแสดงในภาพที่ 6 จากนั้นเหนี่ยวนำให้เกิดเป็นยอดทวีคูณ โดยสูตรอาหารสูตรที่ 6 ซึ่งประกอบไปด้วย MS + BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + IBA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถเกิดยอดหลายยอด 4-5 ยอด ภายในเวลา 4-6 สัปดาห์ ดังแสดงในภาพที่ 7 และสำหรับการเหนี่ยวนำให้เกิดราก โดยสูตรอาหารสูตร MS + IBA 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าใช้เวลา 5-6 สัปดาห์ ดังแสดงในภาพที่ 8 แต่ในการเหนี่ยวนำให้เกิดรากทำได้ค่อนข้างยาก จึงควรจะใช้ระยะเวลาในการศึกษาสูตรเพิ่มเติม อาจจะใช้ฮอร์โมนร่วมกันระหว่างออกซินและไซโตไคนิน แต่ควรใช้ฮอร์โมนออกซินในปริมาณที่มากกว่าไซโตไคนิน เนื่องจากมีรายงานว่าออกซินในปริมาณที่มากจะไปกระตุ้นการเกิดรากแต่จะไปยับยั้งการเกิดยอด ถ้าความเข้มข้นของไซโตไคนินสูงจะกระตุ้นการเกิดยอด แต่จะไปยับยั้งการเกิดราก (นิตย์ศรี, 2551)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



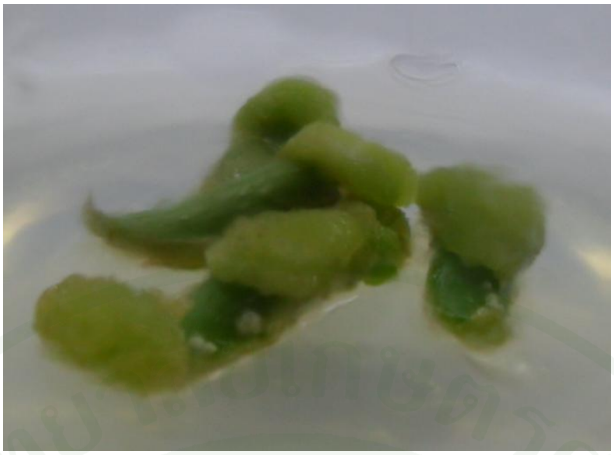
ภาพที่ 2 ผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากก้าน ในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 2 สัปดาห์



ภาพที่ 3 ผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากลำต้น ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 2 สัปดาห์

ภาพที่ 4 ผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากลำต้นและก้าน ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม 2,4-D ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 3 สัปดาห์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 5 ผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากลำต้น และก้าน ในอาหารแข็งสูตร CI: MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 2 สัปดาห์

ภาพที่ 6 ผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากใบอ่อน ในอาหารแข็งสูตร CI/L: MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร 2,4-D ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IAA ความเข้มข้น1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรนาน 2 สัปดาห์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 7 ผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากแคลลัส ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BAP ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 4-5 สัปดาห์

ภาพที่ 8 ผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากต้นสบู่ดำ ในอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม IBA ความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 5-6 สัปดาห์

จากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสม ในการเกิดแคลลัสได้ สูตรที่เหมาะสม คือ สูตรอาหารที่ 5 (CI/L) ประกอบด้วย MS + BAP ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + 2,4-D 1 มิลลิกรัมต่อลิตร +IAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสามารถเหนี่ยวนำให้ทั้ง ใบเลี้ยง ลำต้น และก้าน มีการสร้างแคลลัสได้อย่างรวดเร็วโดยใช้เวลาเพียง 1-2 สัปดาห์ ซึ่งจะรวดเร็วกว่า สูตรที่ 4 (CI) ที่ประกอบด้วย MS + BAP ที่ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ IBA ที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสูตรนี้จะใช้เวลามากกว่า 4 สัปดาห์ ในการเหนี่ยวนำให้เกิดเป็นแคลลัส จากนั้นนำแคลลัสที่ได้มา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชักนำให้เกิดเป็นปลายยอดหลายยอด ด้วยอาหารสูตรที่ 6 (SI) ซึ่งประกอบไปด้วย MS + BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร + IBAที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเกิดยอดทวีคูณ 4-5 ยอด ในระยะเวลาเวลา 4-6 สัปดาห์จากนั้นนำมาเหนี่ยวนำให้เกิดราก จะใช้อาหารสูตร MS + IBA 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าใช้เวลา5-6 สัปดาห์ แต่การชักนำให้เกิดรากนั้นค่อนข้างยาก จึงจำเป็นต้องมีระยะเวลาในการศึกษา โดยใช้ฮอร์โมนออกซิน และไซโตไคนิน ในอัตราส่วนที่เหมาะสม แต่ในการทดลองเหนี่ยวนำให้เกิดรากนั้นจำเป็นต้องมีเนื้อเยื่อสบู่ดำจำนวนมากพอที่จะมาทดสอบ เนื่องจากส่วนใหญ่แล้วถ้าสูตรอาหารไม่เหมาะสม จะทำให้พืชเกิดการชะงักการเติบโตและจะมีการทิ้งใบ และเนื้อเยื่อที่นำมาจะแห้งเหี่ยวตายไปในที่สุด

2. ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *APETALA2*

สืบค้นข้อมูลของยีนในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) โดยเลือกยีน *APETALA2* (*AP2*) accession number (NM_119856.2) จากต้นอะราบิดอปซิส ในส่วนของแปลรหัส (coding sequence, CDS) แล้วสามารถเชื่อมโยงไปยังฐานข้อมูลเฉพาะของต้นอะราบิดอปซิส คือ ฐานข้อมูล TAIR (The Arabidopsis Information Resource) จากเว็ปไซต์ http://www.arabidopsis.org/index.jsp ที่มีรายละเอียดของยีน *AP2* โดยพบว่ามีความยาว 2,486 คู่เบส ประกอบด้วย 10 เอกซอน และ 9 อินทรอน mRNA มีขนาด 1,298 คู่เบส และสามารถแปลรหัสไปเป็นโปรตีนได้ 432 กรดอะมิโน ดังภาพ (ภาคผนวกที่ ก1) ทำการออกแบบไพรเมอร์ 3 คู่ ที่จำเพาะต่อ 3 เอกซอน ที่ยาวที่สุด ได้ความยาวชิ้นที่ 1 ยาว 360 คู่เบส, ชิ้นที่ 2 ยาว 408 คู่เบส และชิ้นที่ 3 ยาว 399 คู่เบส (ภาคผนวกที่ ก1) ลำดับเบสของไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ รวมทั้งอุณหภูมิที่เหมาะสมในการแยกดีเอ็นเอเป็นสายเดี่ยวของไพรเมอร์ (T_m) ได้แสดงไว้ในตารางที่ 2

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

>gi|30690802|ref|NM_119856.2| Arabidopsis thaliana AP2 (APETALA 2); transcription factor (AP2) mRNA, complete cds

CATTAAAGTTTTTATTTTATTTTCTACCAACCAAAAGCTTTTCTCTTTGGTTTCTCTTATTTAGCTTCTA1CCTTGAGGA
GAATCATACCAGAGGATTGAAGTTTGAACCTTCAAAGATCAAAATCAAGAAACCAAAAAAAAACAAAAA1ATGTGGGAT
CTAAACGACGCACCACACCAAACACAAAGAGAAGAAGAATCTGAAGAGTTTTGTTATTCTTCACCAAGTAAACGGGTTGG
ATCTTTCTCTAATTCAAGCTCTTCAGCTGTTGTTATCGAAGATGGATCCGATGACGATGAACTTAACCGGGTCAGACCCA
ATAACCCACTTGTCACCCATCAGTTCTTCCCTGAGATGGATTCTAACGGCGGTGGTGTTGCTTCTGGCTTTCCTCGGGCT
CACTGGTTTGGTGTTAAGTTTTGTCAG2GGATCTAGCCACCGGATCGTCCGCGGGTAAAGCTACCAACGT3GCCGCTGC
CGTAGTGGAGCCGGCACAGCCGTTGAA2AAGAGTCGGCGTGGACCAAGATCAAGAAGTTCTCAGTATAGAG3TGTTACGT
TTTACCGGCGTACCGGAAGATGGGAATCTCATATTTGGGACTGTGGGAAACAAGTTTACTTAGGTGGATTTGACACTGCT
CATGCAGCAGCTCGAGCATATGATAGAGCTGCTATTAAATTCCGTGGAGTAGAAGCGGATATCAATTTCAACATCGACGA
TTATGATGATGACTTGAAACAGATGACTAATTTAACCAAGGAAGAGTTCGTACACGTACTTCGCCGACAAAGCACAGGCT
TCCCTCGAGGAAGTTCGAAGTATAGAGGTGTCACTTTGCATAAGTGTGGTCGTTGGGAAGCTCGA4TGGGTCAATTCTTA
GGCAAAAAGTATGTTTATTTGGGTTTGTTCGACACCGAGGTCGAAGCTGCTAGAGCTTACGATA4AGCTGCAATCAAATG
TAACGGCAA5GACGCCGTGACCAACTTTGATCCGAGTATTTACGATGAGGAACTCAATGCCGAGTCATCAGGGAATCCTA
CTACTCCAC5AGATCACAACCTCGATTTGAGCTTGGGAAATTCGGCTAATTCGAAGCATAAAAGTCAAGATATGCGGCTC
AGGATGAACCAACAACAACAAGATTCTCTCCACTCTAATGAAGTTCTTGGATTAGGTCAAACCGGAATGCTTAACCATAC
TCCCAATTCAAACCACCAATTTCCGGGCAGCAGCAACATTGGTAGCGGAGGCGGATTCTCACTGTTTCCGGCGGCTGAGA
ACCACCGGTTTGATGGTCGGGCCTCGACGAACCAAGTGTTGACAAATGCTGCAGCATCATCAGGATTCTCTCCTCATCAT
CACAATC6GATTTTTAATTCTACTTCTACTCCTCATCAAAATTGGCTGCAGACAAATGGCTTCCAACCTCCTCTCATGAG
ACCTTCT6GAATCTTTTATATTTTTAAGGTTTATTATTATATAAGAAAAACAAAAATGAACCTTTGAAATCCCCACATGT
TCTTGGTCATTTCATTAATCATCGGCTTATATTTTGCTTATTTTCCCCTAAATCCTCTTGTTAACTTAGGCGAACAAAAA
AAATTAATGGAAATCTTTTTCCCTCCATCGGTTACAAAAATA

ภาพที่ **9** แสดงลำดับเบสของยีน AP2 ที่มาจาก GenBank accession number: NM_119856.2

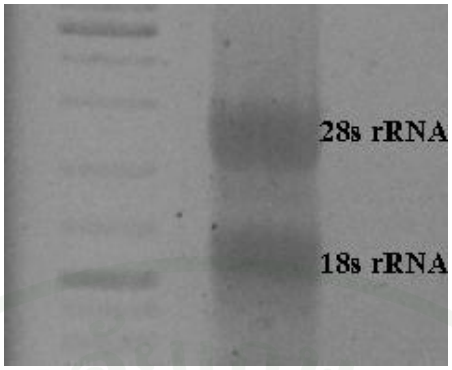
หมายเหตุ:
ไพรเมอร์ตัวอักษรหนาขีดเส้นใต้: 1 ไพรเมอร์ AP2II/D1/pENTR/F, 2 ไพรเมอร์ AP2II/D1/ pENTR/R ของยีนที่ 1 / 3 ไพรเมอร์ AP2II/D2/pENTR/F, 4 ไพรเมอร์ AP2II/D2/ pENTR/R ของยีนที่ 2 / 5 ไพรเมอร์ AP2II/D3/pENTR/F, 6 ไพรเมอร์ AP2II/D3/ pENTR/R ของยีนที่ 3

3. ผลการแยกสกัดอาร์เอ็นเอ

3.1 ผลการสกัดอาร์เอ็นเอจากต้นอะราบิดอปซิส

สกัดแยกอาร์เอ็นเอ โดยวิธีของ Yu and Goh (2000) โดยใช้ส่วนที่เป็นใบอ่อน rosette นำไปตรวจสอบปริมาณ และคุณภาพของอาร์เอ็นเอ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD260 OD260/280 ด้วยเครื่อง NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA) ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 825.9 ng/μl และตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอ ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส ดังแสดงใน ภาพที่ 10

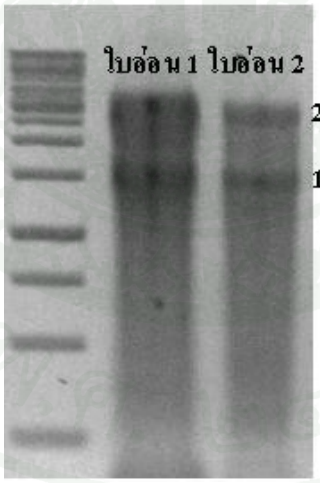
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 10 เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของอาร์เอ็นเอจากใบอ่อนของต้นอะราบิดอปซิส

3.2 ผลการสกัดอาร์เอ็นเอจากต้นสบู่ดำ

สกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป (Kit) ของ PureLink™ Plant RNA Reagent (Invitrogen, USA) จากใบอ่อนของต้นสบู่ดำ ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาสกัด นำไปตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส ดังแสดงในภาพที่ 11

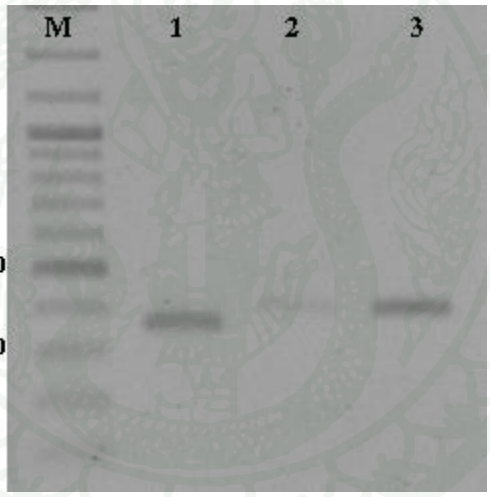


ภาพที่ 11 เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของการสกัดอาร์เอ็นเอของสบู่ดำด้วยวิธี PureLink™ Plant RNA Reagent (Invitrogen, USA)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. ผลการทำปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันของอาร์เอ็นเอ และสังเคราะห์ยีน *AP2*

นำ RNA ที่สกัดมาได้จากทั้งพืชสบู่ดำ และต้นอะราบิดอปซิส มาเจือจางให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1 พิโคกรัม -5 ไมโครกรัม เพื่อใช้ในการสร้างดีเอ็นเอสายแรก (cDNA) โดยใช้ชุดทำรีเวอร์สทรานสคริปชัน SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) ตามวิธีการทดลองข้อที่ 4 เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา นำ cDNA ที่ได้มาเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ชิ้นยีน โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนเป้าหมาย มาทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Vivantis, Canada) และนำมาตรวจสอบโดยวิธี เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ 1 Kb DNA ladder marker (Fermantas, USA) โดยชิ้นส่วนที่ 1 มีขนาด 360 คู่เบส, ชิ้นส่วนที่ 2 มีขนาด 408 คู่เบส และชิ้นส่วนที่ 3 มีขนาด 399 คู่เบส



ภาพที่ 12 เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อชิ้นยีนทั้ง 3 ชิ้นส่วน

ชิ้นส่วนที่ 1 ใช้ไพรเมอร์ AP2II/D1/pENTR/F และ AP2II/D1/ pENTR/R, ชิ้นส่วนที่ 2 ใช้ไพรเมอร์ AP2II/D2/pENTR/F และ AP2II/D2/ pENTR/R, ชิ้นส่วนที่ 3 ใช้ไพรเมอร์ AP2II/D3/pENTR/F และ AP2II/D3/ pENTR/R

หมายเหตุ:

M = DNA ladder 1 kb (Fermentus, USA)

1 = ชิ้นยีนส่วนที่ 1 ขนาด 360 คู่เบส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

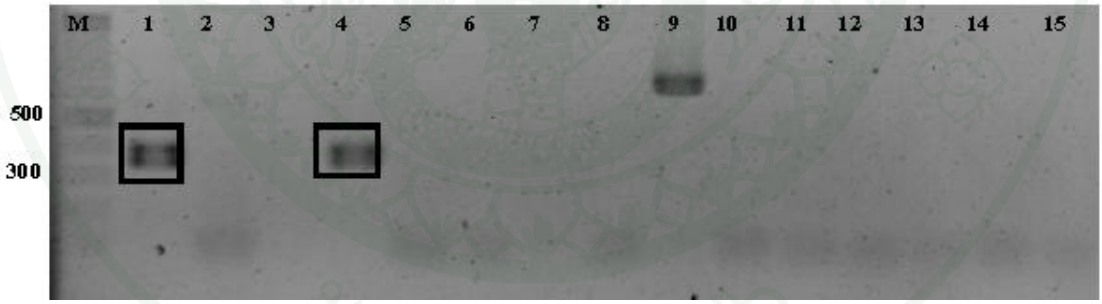
2 = ชิ้นยีนส่วนที่ 2 ขนาด 408 คู่เบส

3 = ชิ้นยีนส่วนที่ 3 ขนาด 399 คู่เบส

5. ผลการเชื่อมต่อชิ้นยีนกับพลาสมิด

เชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้เข้ากับ pENTR™ vector (Invitrogen, USA) ดูจากวิธีทดลองข้อที่ 6.3 ผลที่ได้จากการเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน พบว่ามีการเจริญเติบโตมากกว่า 200 โคโลนี ดังภาพ (ภาคผนวกที่ ข3) เลือกมาพลาสมิดละ 15 โคโลนี มาทำโคโลนีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากตารางที่ 3 และนำมาตรวจสอบโดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ 1 Kb DNA ladder marker (Fermantas, USA) ดังแสดงในภาพที่ 13-15

นำโคโลนีที่คัดเลือกมาเลี้ยงในอาหารเหลวและสกัดพลาสมิดด้วย ชุดสกัดพลาสมิด AxyPrep Plasmid Miniprep Kit (Axygen, USA) และวัดความเข้มข้นของพลาสมิดด้วยเครื่อง NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA) ดูผลดังตารางที่ 9



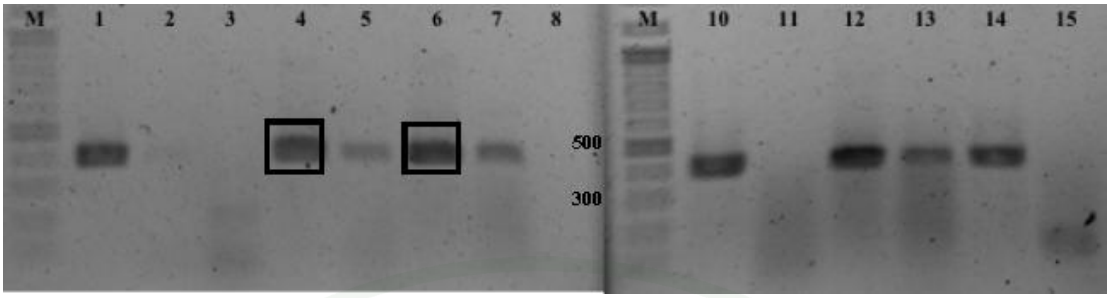
ภาพที่ 13 ผลของโคโลนีพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบการเชื่อมต่อชิ้นยีนส่วนที่ 1 กับเวกเตอร์ pENTR™

หมายเหตุ:

M = DNA ladder 1 kb (Fermentus, USA)

1 -15 = โคโลนีที่ 1-15

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

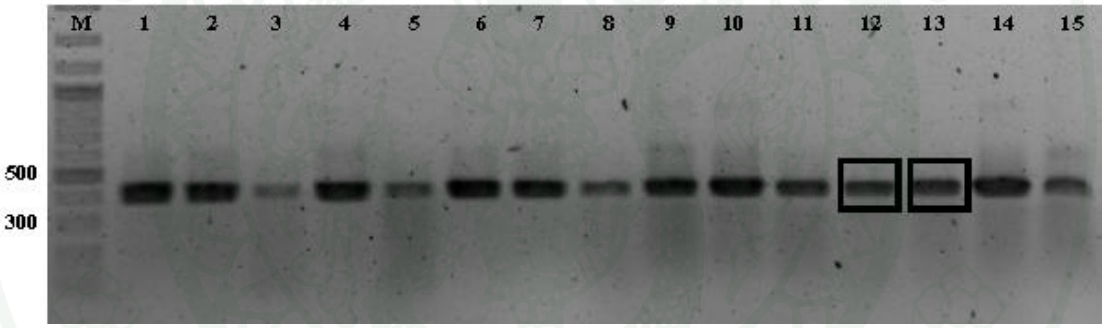


ภาพที่ 14 ผลของโคโลนีพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบการเชื่อมต่อชิ้นยีนส่วนที่ 2 กับเวกเตอร์ pENTR™

หมายเหตุ:

M = DNA ladder 1 kb (Fermentus, USA)

1 -15 = โคโลนีที่ 1-15



ภาพที่ 15 ผลของโคโลนีพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบการเชื่อมต่อชิ้นยีนส่วนที่ 3 กับเวกเตอร์ pENTR™

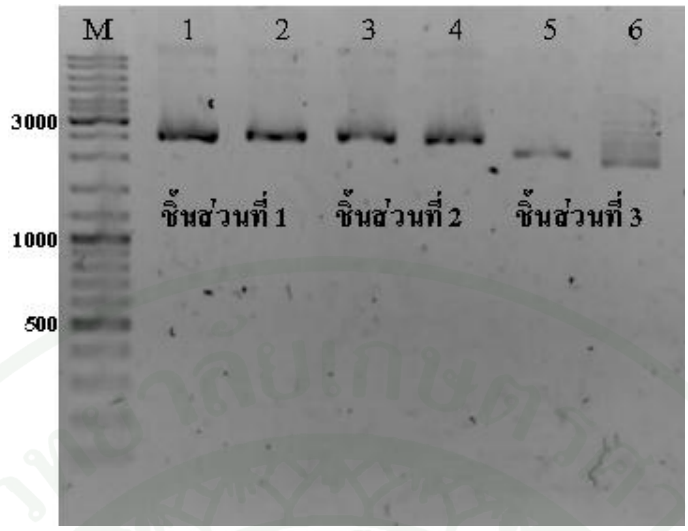
หมายเหตุ:

M = DNA ladder 1 kb (Fermentus, USA)

1 -15 = โคโลนีที่ 1-15

จากผลการคัดเลือกโคโลนีสำหรับทั้ง 3 ส่วนของยีนด้วยโคโลนีพีซีอาร์ ได้เลือกมาส่วนละ 2 โคโลนี สำหรับชิ้นส่วนที่ 1 คือ โคโลนีที่ 1 และ 4 ชิ้นส่วนที่ 2 จากโคโลนีที่ 4 และ 6 ชิ้นส่วนที่ 3 จากโคโลนีที่ 12 และ 13 เพื่อนำมาเลี้ยงและสกัดพลาสมิดเพื่อที่จะส่งหาลำดับเบส ดังภาพ (ภาคผนวกที่ ข4)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 16 เจลแสดงผลการสกัดพลาสมิดจากโคลนที่คัดเลือกมาชิ้นส่วนที่ 1 คือ โคโลนีที่ 1 และ 4 ชิ้นส่วนที่ 2 จากโคโลนีที่ 4 และ 6 ชิ้นส่วนที่ 3 จากโคโลนีที่ 12 และ 13

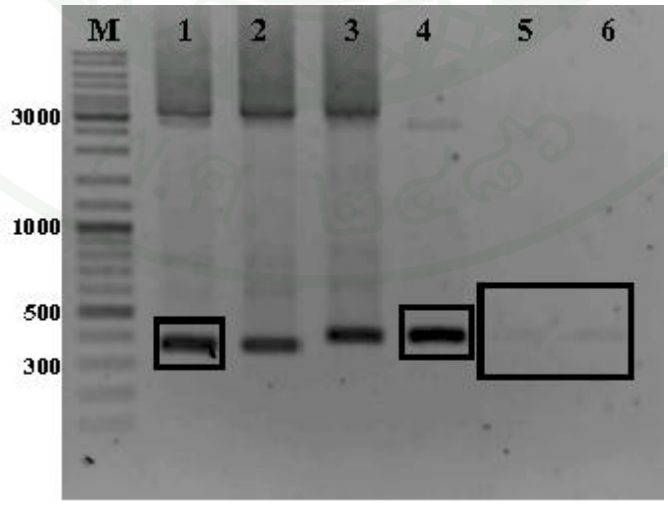
หมายเหตุ:

M = DNA ladder 1 kb (Fermentus, USA)

1-2 = โคโลนีที่ 1 และ 4 จากชิ้นยีนส่วนที่ 1

3-4 = โคโลนีที่ 4 และ 6 จากชิ้นยีนส่วนที่ 2

5-6 = โคโลนีที่ 12 และ 13 จากชิ้นยีนส่วน 3



ภาพที่ 17 เจลแสดงผลการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จากโคโลนีที่คัดเลือกมาโดยใช้ไพร์เมอร์ที่จำเพาะ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

หมายเหตุ:

M = DNA ladder 1 kb (Fermentus, USA)

1 = โคโลนีที่ 1 จากชิ้นยีนส่วนที่ 1

2 = โคโลนีที่ 4 จากชิ้นยีนส่วนที่ 1

3 = โคโลนีที่ 4 จากชิ้นยีนส่วนที่ 2

4 = โคโลนีที่ 6 จากชิ้นยีนส่วนที่ 2

5 = โคโลนีที่ 12 จากชิ้นยีนส่วนที่ 3

6 = โคโลนีที่ 13 จากชิ้นยีนส่วนที่ 3

จากภาพที่ 17 ผลจากการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ จากพลาสมิดพบว่าในยีนชิ้นที่ 1 และ 2 สามารถเพิ่มปริมาณได้ในขนาดที่ถูกต้อง แต่ยีนในชิ้นส่วนที่ 3 พบขนาดที่ถูกต้องแต่พบในปริมาณที่น้อยมากแต่เมื่อกลับไปเลือกโคโลนีอื่นแล้วทำโคโลนีพีซีอาร์ ก็พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณในชิ้นส่วนที่ 3 ได้โดยพบเป็น smear band ทุกโคลน จึงได้ทำการถ่ายฝากยีน ซ้ำอีกครั้ง ได้ทั้งหมด 27 โคโลนี แต่เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยโคโลนีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะก็ไม่พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของชิ้นยีนส่วนที่ 3 จึงพิจารณาว่าควรหยุดการทำชิ้นยีนส่วนนี้ไปก่อนเนื่องจากระยะเวลาที่จำกัด

ตารางที่ **9** ผลการวัดค่าความเข้มข้นของ pENTR™ Directional TOPO® vector: Fragment

ตัวอย่าง	OD 260/280 (นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)
pD1/1	54.9
pD1/4	53.6
pD2/4	78.2
pD2/6	80.9
pD3/12	45.1
pD3/13	40.3

หมายเหตุ: pDX/X หมายถึง พลาสมิดจากชิ้นส่วนที่ X/ โคโลนีที่ X

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. ผลการส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์และตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอในพลาสมิดสายผสม

ส่งพลาสมิดที่ได้คัดเลือกไว้ เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบส (Macrogen, Korea) จากนั้นนำมาตรวจสอบโดยมาเปรียบเทียบลำดับเบสกับฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม Nucleotide Blast (blastn) (ภาคผนวกที่ ข4, ข5 และ ข6 ตามลำดับ)

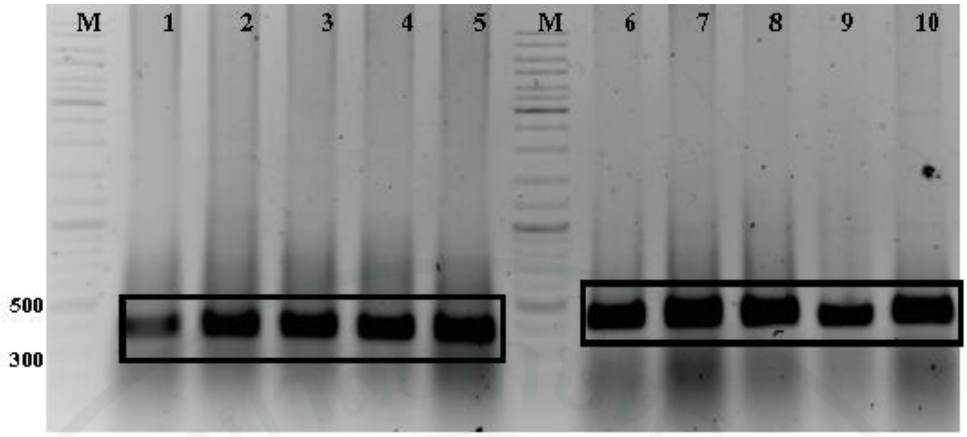
7. ผลการเชื่อมชิ้นยีนเข้าไปใน expression vector (pHellsgate8)

เมื่อได้รับการยืนยันลำดับเบสที่ถูกต้องแล้ว มาทำการย้ายชิ้นส่วนของยีน *AP2* เข้าไปใน pHellsgate8 จากนั้นนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านด้วยวิธี heat shock และสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดสกัดพลาสมิด Axy Prep Plasmid Miniprep Kit (Axygen, USA) ตามวิธีการทดลองที่ 6.5 และวัดความเข้มข้นของพลาสมิดด้วยเครื่อง NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA)

ผลของการแลกเปลี่ยนชิ้นยีนเข้าไปใน pHellsgate8 พบว่าได้ 20 โคโลนี จึงคัดเลือกโคโลนีมาชิ้นส่วนละ 5 โคโลนี แล้วนำไปตรวจสอบด้วยการทำโคโลนีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อแต่ละชิ้นส่วน และผลที่ได้พบว่ามีชิ้นส่วนยีน *AP2* ในทั้ง 10 โคโลนี ดังภาพที่ 18

จากผลการเชื่อมชิ้นยีนเข้าไปในเวกเตอร์ pHellsgate8 จึงเปลี่ยนการเรียกชื่อของโคโลนีที่ได้จากขั้นที่เชื่อมชิ้นยีนเข้าไปในเวกเตอร์ pENTR™ จากตัวอย่าง pD1/1 ไปเป็น pD1.7C.3 และ pD2/6 ไปเป็น pD2.9C.3

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 18 ผลของการตรวจสอบความสำเร็จในการเคลื่อนย้ายชิ้นส่วนยีนระหว่างเวกเตอร์ pENTR กับ pHellsgate8 ด้วยโคโลนีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ

หมายเหตุ:

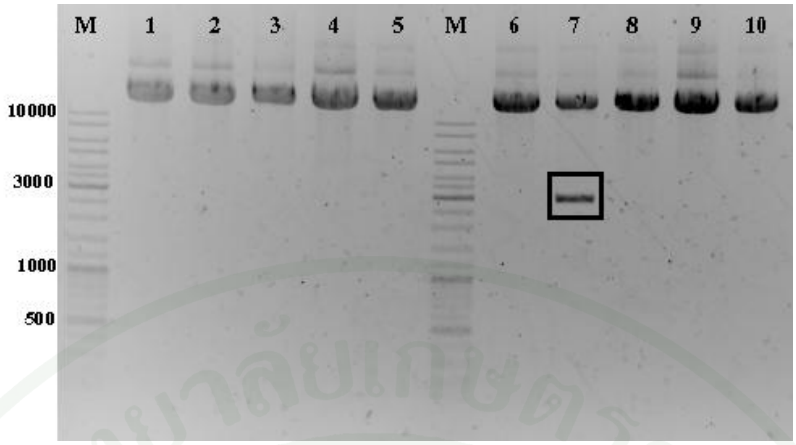
M = DNA ladder 1 kb (Fermentus, USA)

1-5 = โคโลนีที่ 1-5 จากชิ้นยีนส่วนที่ 1

6-10 = โคโลนีที่ 6-10 จากชิ้นยีนส่วนที่ 2

จากผลการสกัดพลาสมิดในภาพที่ 19 พบว่าในเลนที่ 1-5 คือ พลาสมิด pHellsgate8 จากยีนในชิ้นส่วนที่ 1 โคลนที่ 1-5, ในเลนที่ 6-10 คือ พลาสมิด pHellsgate8 จากยีนในชิ้นส่วนที่ 2 โคลนที่ 1-5 จากเลนที่ 7 พบว่ามีชิ้นส่วน ขนาดประมาณ 3000 bp ที่แตกต่างจากเลนอื่น ซึ่งปกติแล้วไม่ควรจะมีแถบดีเอ็นเอนี้เกิดขึ้นมา ดังภาพที่ 19 ทำให้ไม่เลือกโคลนนี้มาทำการทดลองต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 19 เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสแสดงผลการสกัดพลาสมิดจาก pHellsgate8 ที่มียีน *AP2*

หมายเหตุ:
M = DNA ladder 1 kb (Fermentus, USA)
1-5 = โคโลนีที่ 1-5 จากชิ้นยีนส่วนที่ 1
6-10 = โคโลนีที่ 6-10 จากชิ้นยีนส่วนที่ 2

จากผลการเชื่อมชิ้นยีนเข้าไปในเวกเตอร์ pHellsgate8 จึงเปลี่ยนการเรียกชื่อของโคโลนีที่ได้จากขั้นที่เชื่อมชิ้นยีนเข้าไปในเวกเตอร์ pENTR™ จากตัวอย่าง pD1.7C.3 ไปเป็น pF1C3 และ pD2.9C.3 ไปเป็น pF2C4

ตารางที่ **10** ผลการวัดค่าความเข้มข้นของ RNAi construct

ตัวอย่าง	OD 260/280 (นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)
pF1C3/1	541.8
pF1C3/2	391.6
pF1C3/3	340.3
pF2C4/1	278.6
pF2C4/2	477.7
pF2C4/3	346.3

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

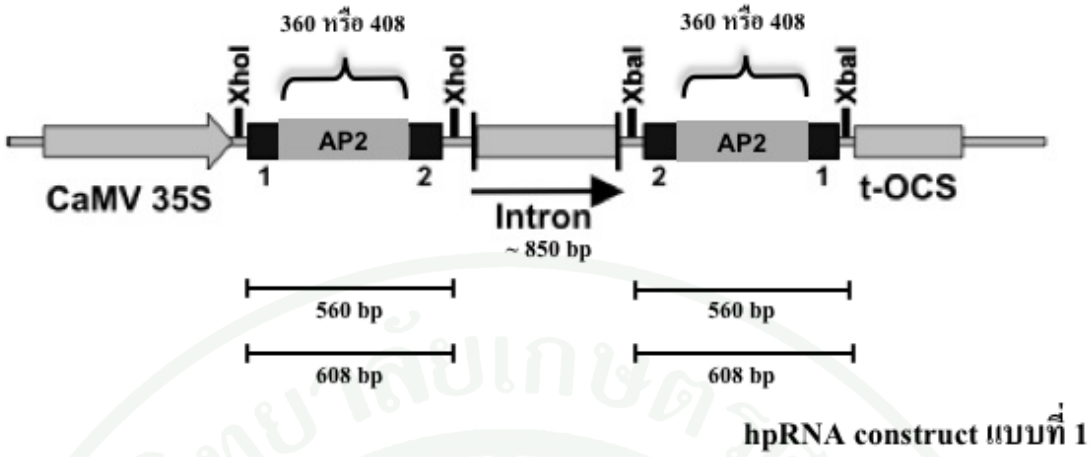
จากภาพที่ 19 ได้เลือกมาอย่างละ 1 ชิ้นส่วน สำหรับชิ้นส่วนที่ 1 เลือกเลนที่ 1 คือ pF1C3/1 และชิ้นส่วนที่ 2 pF2C4/2 จากเลนที่ 6 โดยพิจารณาจากค่าความเข้มข้น 541.8 (ng/μl) และ 477.7 (ng/μl) ตามลำดับ ดังตารางที่ 10 มาใช้เพื่อนำไปตรวจสอบทิศทางการเข้าไปในโครงสร้างของชิ้นยีนที่จะนำไปสู่การยับยั้งการแสดงออกในพืชต่อไป โดยจะตรวจสอบโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสองชนิด คือ *Xba*I และ *Xho*I ต่อไป

8. ผลการตรวจสอบชิ้น RNAi construct

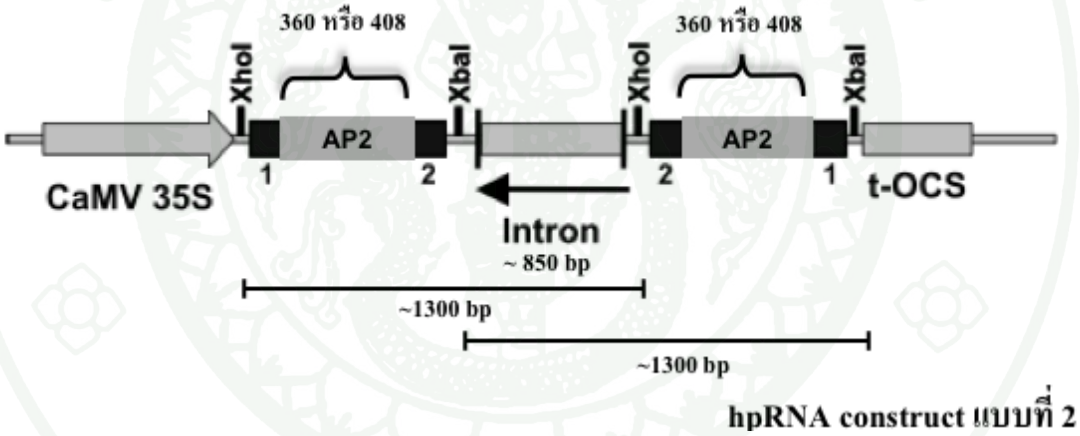
เมื่อได้ RNAi construct ที่มียีน *AP2* ที่คาดว่าจะนำไปสู่การเกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีน ต้องมีการตรวจสอบทิศทางของยีน *AP2* ในโครงสร้างนี้ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสองชนิด ได้แก่ *XbaI* และ *XhoI*

การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 2 ชนิด โดยการตัดแยกแต่ละเอนไซม์เพื่อเป็นการตรวจสอบโครงสร้างพลาสมิด และพบว่าบนโครงสร้างจะมีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะดังภาพที่ 20 และผลของการแลกเปลี่ยนสามารถเป็นไปได้ 2 รูปแบบ โดยยีนชิ้นส่วนที่ 1 มีความยาว 360 คู่เบส และเมื่อแทรกเข้าไปจะทำให้เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* แล้วได้ชิ้นส่วนที่มีความยาว 560 คู่เบส และสำหรับยีนชิ้นส่วนที่ 2 มีความยาว 408 คู่เบส และเมื่อแทรกเข้าไปจะทำให้เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* แล้วได้ชิ้นส่วนที่มีความยาว 608 คู่เบส และแบบที่ 2 ชิ้นยีนชิ้นส่วนที่ 1 มีความยาว 360 คู่เบส และเมื่อแทรกเข้าไปจะทำให้เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* แล้วได้ชิ้นส่วนที่มีความยาว 1300 คู่เบส และสำหรับยีนชิ้นส่วนที่ 2 มีความยาว 408 คู่เบส และเมื่อแทรกเข้าไปจะทำให้เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* แล้วได้ชิ้นส่วนที่มีความยาว 1300 คู่เบส ดังภาพที่ 21

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



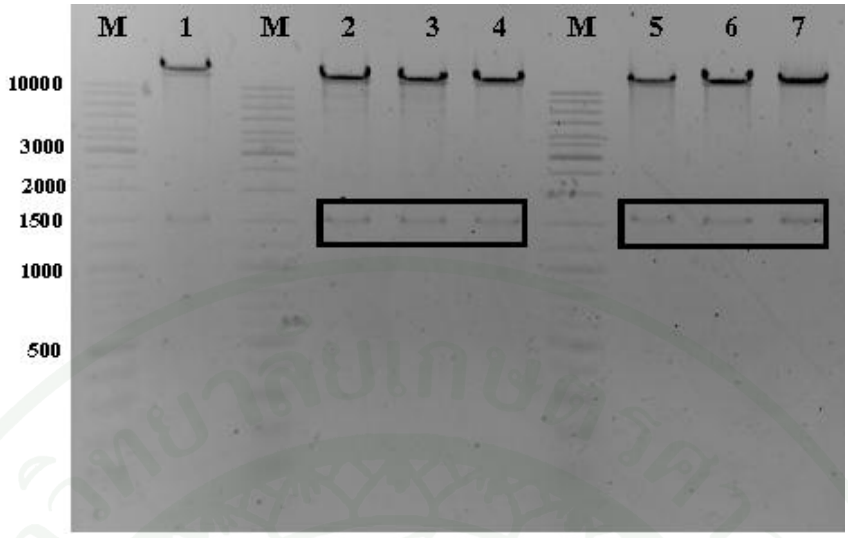
ภาพที่ 20 โครงสร้างการเกิด hpRNA แบบที่ 1 ในการแทรกของชิ้นส่วนแบบโดยตรง และตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *XhoI*



ภาพที่ 21 โครงสร้างการเกิด hpRNA แบบที่ 2 ในการแทรกของชิ้นส่วนแบบจุดตัดเกิดการคร่อมของชิ้นอินทรอน และตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *XhoI*

จากผลการตัดด้วยเอนไซม์ *Xba*I ทั้ง 2 ชิ้นส่วนของยีนคือ pF1C3 และ pF2C4 โดยเลือกโคโลนีที่ 1 ถึง 3 พบว่ามีการตัดเกิดขึ้น ดังภาพที่ 22 ซึ่งขนาดด้านบน คือ ส่วนของเวกเตอร์ pHellsgate8 มีขนาดประมาณ 15,476 คู่เบส ส่วนชิ้นด้านล่างได้ขนาดประมาณ 1,618 คู่เบส ซึ่งผลการไม่เป็นไปตามที่คาดหวัง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 22 เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ *Xba*I เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของ RNAi construct

หมายเหตุ:

M = DNA ladder 1 kb (Fermentus, USA)

1 = เวกเตอร์ pHellsgate8

2 = pF1C3/1 จากชิ้นยีนส่วนที่ 1

3 = pF1C3/2 จากชิ้นยีนส่วนที่ 1

4 = pF1C3/3 จากชิ้นยีนส่วนที่ 1

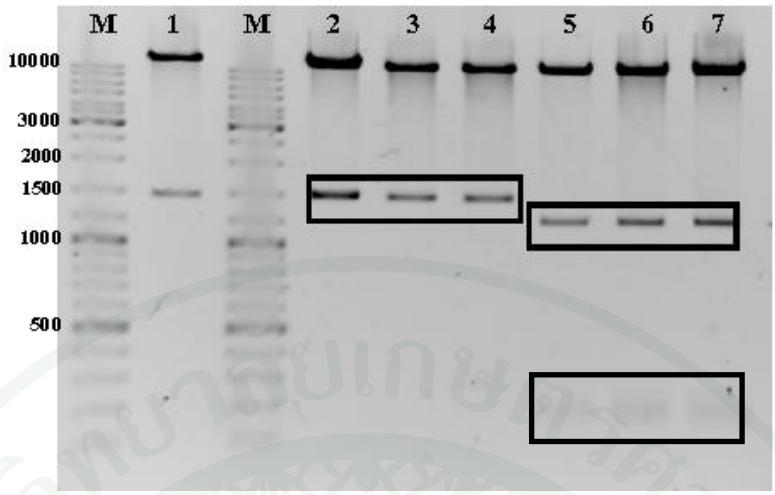
5 = pF2C4/1 จากชิ้นยีนส่วนที่ 2

6 = pF2C4/2 จากชิ้นยีนส่วนที่ 2

7 = pF2C4/3 จากชิ้นยีนส่วนที่ 2

จากผลการตัดด้วยเอนไซม์ *Xho*I ในโครงสร้าง RNAi construct คือ pF1C3 และ pF2C4 โดยเลือกโคลนที่ 1 ถึง 3 (สำหรับทั้งโครงสร้างชิ้นส่วนที่ 1 และโครงสร้างชิ้นส่วนที่ 2) พบว่าในโครงสร้าง pF1C3 เกิดการตัดมาได้ขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส ดังภาพที่ 23 ขณะที่ชิ้นส่วนของยีน pF2C4 ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 15,476 คู่เบส ซึ่งคือขนาดของเวกเตอร์ pHellsgate8 มีขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส และ 100-200 คู่เบส ดังภาพที่ 23 ซึ่งคาดว่าเป็นส่วนที่เกิดจากการตัดภายในชิ้นส่วนยีน *AP2* ซึ่งมีตำแหน่งของ *XhoI* อยู่ที่เบสตำแหน่งที่ 98 คู่เบส และ 251 คู่เบส (ภาคผนวก ค4)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 23 เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ *Xho*I เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของ RNAi construct

หมายเหตุ:

M = DNA ladder 1 kb (Fermentus, USA)

1 = เวกเตอร์ pHellsgate8

2 = pF1C3/1 pHells จากชิ้นยีนส่วนที่ 1

3 = pF1C3/2 pHells จากชิ้นยีนส่วนที่ 1

4 = pF1C3/3 pHells จากชิ้นยีนส่วนที่ 1

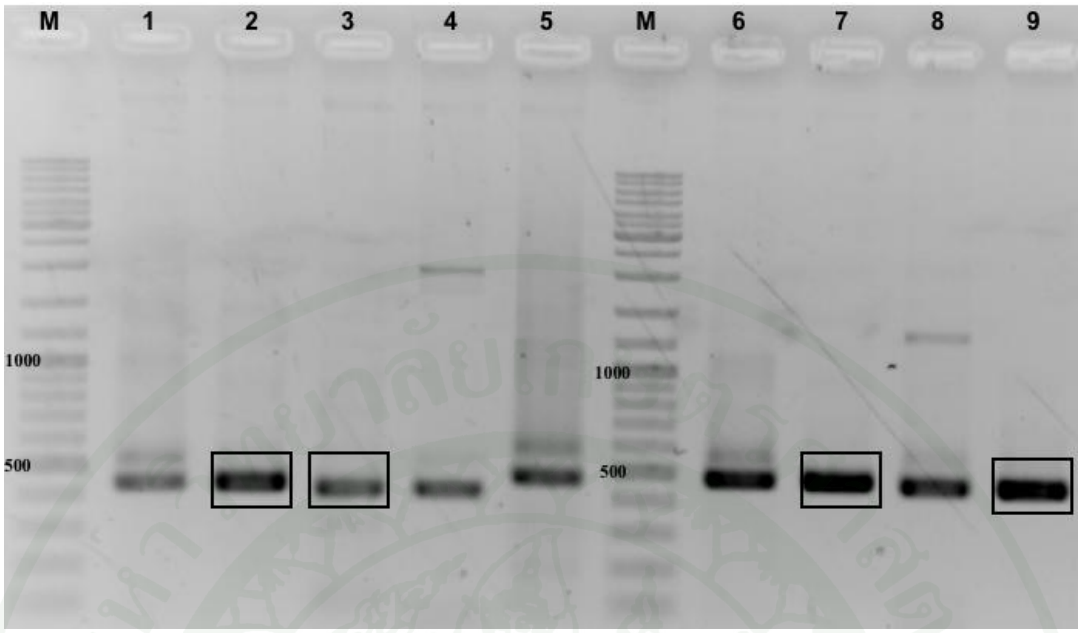
5 = pF2C4/1 pHells จากชิ้นยีนส่วนที่ 2

6 = pF2C4/2 pHells จากชิ้นยีนส่วนที่ 2

7 = pF2C4/3 pHells จากชิ้นยีนส่วนที่ 2

สรุปจากการตัดด้วยเอนไซม์ทั้งเอนไซม์ *Xho*I และ *Xba*I เพื่อตรวจสอบ พบว่าไม่ได้ขนาดที่คาดหวัง จึงต้องมีการตรวจสอบด้วยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะบนเวกเตอร์ pHellsgate8 ร่วมกับไพรเมอร์ที่จำเพาะบนยีน ดังตารางที่ 5 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์ไพรเมอร์มาจาก รศ.ดร.สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 24 เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ Star-F และ Star-R

หมายเหตุ: ได้เลือกเลนที่ 2, 3, 7 และ 9

M = DNA ladder 1 kb (Fermentus, USA)

เลนที่ 2 = pF1C3 pHells เลือกใช้ไพรเมอร์ Star-F กับ AP2II/D1/pENTR/F จากชิ้นยีนส่วนที่ 1

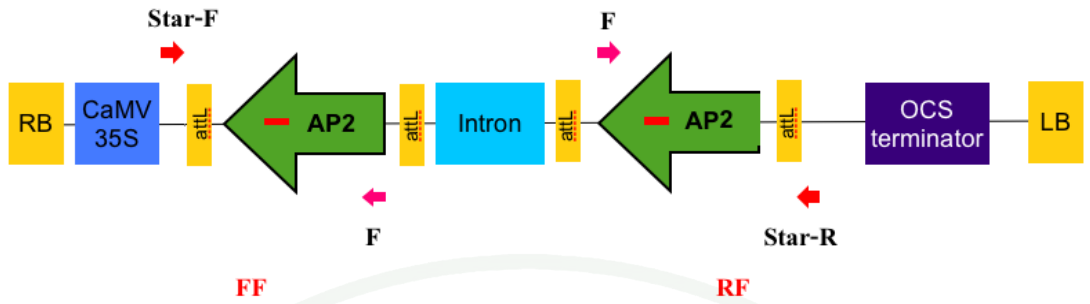
เลนที่ 3 = pF1C3 pHells เลือกใช้ไพรเมอร์ Star-R กับ AP2II/D1/pENTR/R จากชิ้นยีนส่วนที่ 1

เลนที่ 7 = pF2C4 pHells เลือกใช้ไพรเมอร์ Star-F กับ AP2II/D2/pENTR/R จากชิ้นยีนส่วนที่ 2

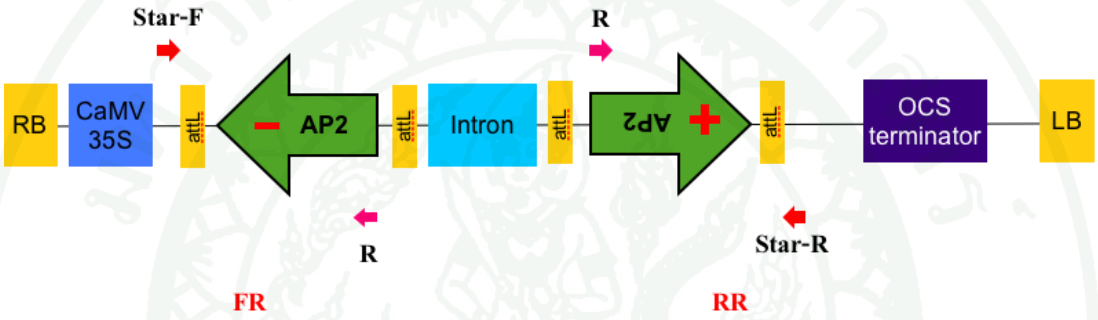
เลนที่ 9 = pF2C4 pHells เลือกใช้ไพรเมอร์ Star-R กับ AP2II/D2/pENTR/R จากชิ้นยีนส่วนที่ 2

จากผลของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบชิ้นส่วนของยีน *AP2* ทั้ง 2 ส่วน ดังภาพที่ 24 พบว่ามีชิ้นส่วนอยู่ภายในเวกเตอร์ pHellsgate8 จึงส่งผลของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ จากตัวอย่างในเลนที่ 2, 3, 7 และ 9 ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อตรวจสอบทิศทางของยีน *AP2* ที่แทรกเข้าไปในเวกเตอร์ pHellsgate8 แล้วนำผลที่ได้มาสร้างเป็นแผนภาพ ดังภาพที่ 25 และ 26

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 25 แผนภาพแสดงทิศทางของชิ้นส่วนที่ pF1C3 pHells



ภาพที่ 26 แผนภาพแสดงทิศทางของชิ้นส่วนที่ pF2C4 pHells

จากผลการสร้างแผนภาพแสดงทิศทางของชิ้นที่สอดแทรกเข้าไปในเวกเตอร์ pHellsgate8 พบว่าในชิ้นส่วนที่ pF1C3 pHells ดังภาพที่ 25 จะไม่สามารถเกิด silencing ขณะที่ pF2C4 pHells ดังภาพที่ 26 สามารถเกิด silencing โดยการเกิดโครงสร้าง hpRNA ได้ จึงเลือกทั้งสองชิ้นส่วนมาทำการถ่ายฝากเข้าไปในอะโกรแบคทีเรียม โดยชิ้นส่วนที่ pF1C3 pHells ที่ไม่สามารถเกิด silencing มาทำเป็น control

9. ผลการถ่ายฝากชิ้นโครงสร้างพลาสมิดเข้าไปใน *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105 ด้วยวิธี Freeze-thaw

นำทั้ง pF1C3/1 และ pF2C4/2 ที่ผ่านการตรวจสอบด้วยการตัดด้วยเอนไซม์แล้วมาถ่ายฝากเข้าไปในอะโกรแบคทีเรียมทูมีเฟเซียน สายพันธุ์ EHA 105 ด้วยวิธี Freeze-thaw (ภาคผนวก ค2)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นอกจากนี้ในห้องปฏิบัติการยังมี RNAi construct ที่สร้างขึ้นมาโดย นางสาวกิตติยา แสงสว่าง โดยให้ชิ้นยีนที่โคลนมาจากยีน *AP2* ของต้นสบู่ดำ ซึ่งประกอบด้วย 3 ส่วนของยีน บริเวณ domain *AP2* (ขนาด 228 คู่เบส), บริเวณ non domain *AP2* (ขนาด 158 คู่เบส) และบริเวณ 3'UTR *AP2* (ขนาด 124 คู่เบส) อยู่ในเวกเตอร์ pHellgate8 ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์เพื่อตรวจสอบโครงสร้าง RNAi construct ที่ได้ถ่ายฝากเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียมทูมีเฟเซียน สายพันธุ์ EHA 105 ด้วยวิธี Freeze-thaw พร้อมๆ กันกับชิ้นยีนทั้ง 2 ชิ้น (ภาคผนวก ค3) นำมาทำการถ่ายฝากเข้าต้นสบู่ดำ และถ่ายฝากเข้าต้นอะราบิดอปซิสพร้อมกันด้วย

จากผลการถ่ายฝากชิ้นโครงสร้างพลาสมิดเข้าไปในอะโกรแบคทีเรียมทูมีเฟเซียน สายพันธุ์ EHA 105 จึงเปลี่ยนการเรียกชื่อของโคโลนีที่ได้จากขั้นที่เชื่อมชิ้นยีนเข้าไปในเวกเตอร์ pENTR™ จากตัวอย่าง pF1C3 ไปเป็น pF1/3/1 และ pF2C4 ไปเป็น pF2/4/2 ประกอบกับมี RNAi construct จากส่วนที่ได้จาก นางสาวกิตติยา แสงสว่าง คือ pJC2/4, pJC39/44 และ pJC66/84 นำมาทำการถ่ายฝากยีนเข้าพืชด้วย

10. ผลการถ่ายยีนเข้าพืชเข้าต้นอะราบิดอปซิส ด้วยวิธี floral dip

ได้ทำการถ่ายยีนจำนวน 1 ครั้ง โดยมี RNAi construct ทั้งหมด 5 ชิ้น แบ่งโครงสร้างพลาสมิดละ 20 ต้น ได้ผลผลิตของเมล็ดอะราบิดอปซิส ในปริมาณที่มาก ดังตารางที่ 11

ตารางที่ **11** จำนวนเมล็ดที่ได้จากการถ่ายยีนในรุ่น T_1

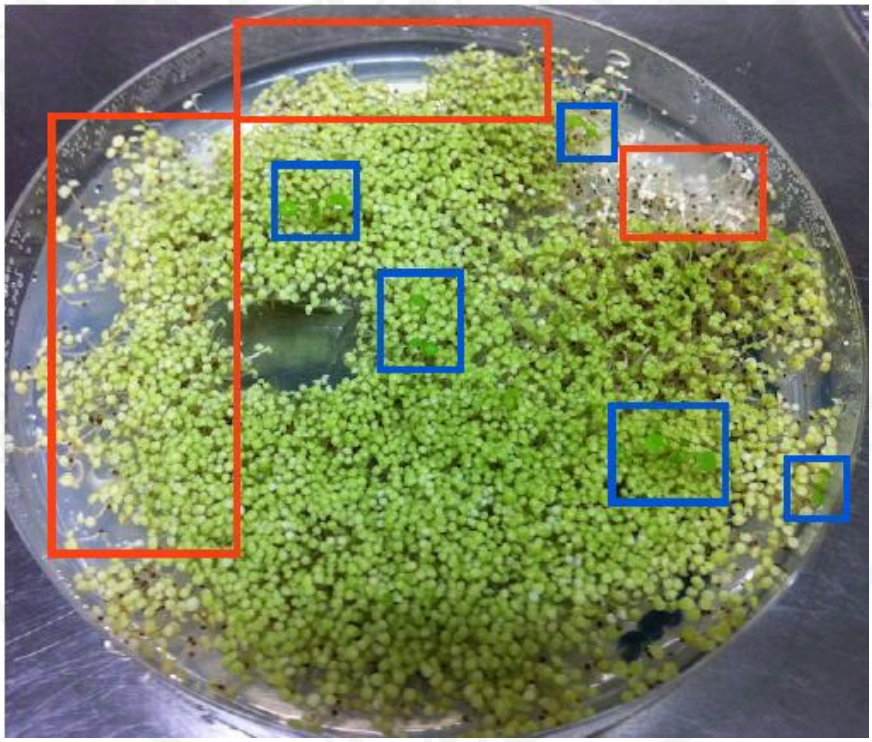
ชิ้นส่วนของยีน	**น้ำหนัก (มิลลิกรัม)**	**จำนวนเมล็ดโดยประมาณ (เมล็ด)**
pF1/3/1	79.1	32,750
pF2/4/2	114.3	47,320
pJC2/4	194.8	80,650
pJC39/44	118.3	48,490
pJC66/84	166.5	68,931

หมายเหตุ: ในน้ำหนัก 1 มิลลิกรัม จะมีเมล็ดเท่ากับ 207 เมล็ด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

11. ผลการคัดเลือกเมล็ดที่ได้รับการถ่ายยีนในต้นอะราบิดอปซิส

ในการคัดเลือกเมล็ดนี้จะใช้การฟอกด้วยคลัน โดยการนำเมล็ดในรุ่น T_0 ไปหยุดระยะพักตัว แล้วนำเมล็ดมาวางเรียงบนอาหารคัดเลือก MS + ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เพื่อคัดเลือกเมล็ดที่มี T-DNA ซึ่งขั้นตอนของการคัดเลือกเป็นสิ่งที่จำเป็น เพราะต้นที่มี T-DNA จะสามารถต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซินได้ ส่วนต้นที่ไม่ได้รับการถ่าย T-DNA จะมีการเจริญอยู่บ้าง แต่ภายหลังจะเปลี่ยนสีเขียวกลายเป็นสีขาวและตายในที่สุด ดังภาพที่ 24 จากนั้นย้ายต้นที่ผ่านการคัดเลือกด้วยยาปฏิชีวนะนาน 14 วัน ลงไปปลูกในพีทมอส และปลูกจนกระทั่งเก็บเมล็ด T_1



ภาพที่ 27 การคัดเลือกต้นอะราบิดอปซิสที่ได้รับการถ่ายชิ้น T-DNA เข้าไปในจีโนม โดยเลี้ยงบนอาหาร ½MS ที่เติมยาปฏิชีวนะกานามัยซิน

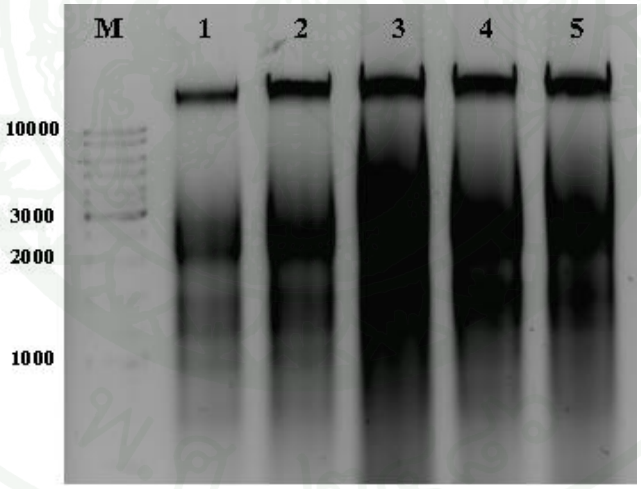
จากภาพที่ 27 ในการคัดเลือกสังเกตได้ว่ามีบางต้นที่เจริญเติบโตได้ดี มีสีเขียว และสูงกว่าต้นอื่น ภายหลังจากการคัดเลือกบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะนาน 14 วัน ในกรอบสี่เหลี่ยมสีแดง คือ ต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายฝากยีน ส่วนในกรอบสีน้ำเงิน คือ ต้นที่ได้รับการถ่ายฝากยีนทำให้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เจริญเติบโตได้ดี ในอาหารที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซินได้ จากนั้นย้ายต้นที่เจริญเติบโตลงเพาะในดิน ดังภาพที่ 28

ภาพที่ 28 ต้นอะราบิดอปซิสที่ผ่านการถ่ายยีน T-DNA ในรุ่น T_1 เมื่อมีการย้ายลงปลูกในดิน

12. ผลการตรวจสอบผลการถ่ายฝากยีนจากต้นอะราบิดอปซิส



ภาพที่ 29 เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากต้นอะราบิดอปซิส

หมายเหตุ:

M = DNA ladder 1 kb (Fermentus, USA)

1 = pJC39/44: T_1

2 = pJC66/84: T_1

3 = pF1/3/1: T_1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

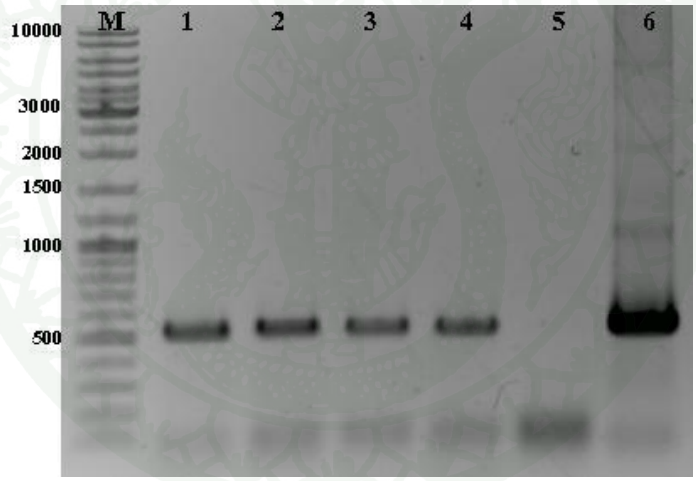
4 = pF2/4/2: T_1

5 = wild type: negative control

จากภาพที่ 29 สาเหตุที่ไม่มีตัวอย่าง pJC2/14 เนื่องจากในขั้นตอนการปลูกลงพีทมอส ตัวอย่างเกิดการตายไปในระหว่างเพาะเลี้ยง ซึ่งต่างจากตัวอย่างจากชิ้นยีนอื่นที่เจริญเติบโตได้อย่างปกติ

13. ผลการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบผลการถ่ายยีนเข้าไปในอะราบิดอปซิส

13.1 นำดีเอ็นเอที่สกัดมาจากแต่ละต้นที่เจริญเติบโตได้ มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์จากยีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซิน และทำปฏิกิริยาจากตารางที่ 5



ภาพที่ 30 เจลแสดงผลการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบการมีโครงสร้างพลาสมิดในจีโนมพืช

หมายเหตุ:

M = DNA ladder 1 kb (Fermentus, USA)

1 = pJC39/44: T_1

2 = pJC66/84: T_1

3 = pF1/3/1: T_1

4 = pF2/4/2: T_1

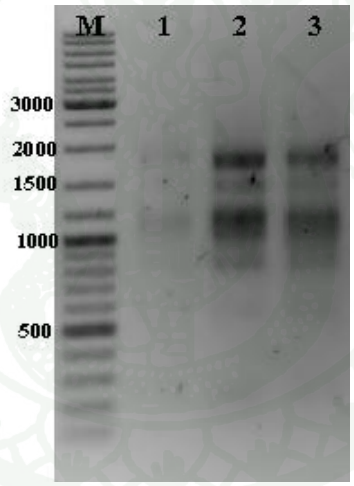
5 = wild type: negative control

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6 = pHellsgate8: positive control

จากภาพที่ 30 นำดีเอ็นเอที่สกัดมาจากตัวอย่างต้นอะราบิดอปซิส มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากยีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซิน ดังตารางที่ 5 พบว่าผลของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ทุกตัวอย่างสามารถเพิ่มปริมาณของยีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซิน ได้ขนาด 520 คู่เบส ได้อย่างถูกต้อง เมื่อเทียบกับ pHellsgate8 (positive control) ขณะที่ตัวอย่างที่เป็น wild type (negative control) ต้องไม่สามารถเพิ่มปริมาณในส่วนของยีนต้านยาปฏิชีวนะได้ ซึ่งเป็นผลที่ถูกต้องแล้ว เนื่องจากพืช wild type ไม่มียีนต้านยาปฏิชีวนะใดๆ อยู่ในจีโนมของพืช ทำให้สรุปได้ว่าประสบความสำเร็จในการถ่ายยีนเข้าไปในอะราบิดอปซิส

13.2 ผลการแยกสกัดอาร์เอ็นเอของต้นอะราบิดอปซิส



ภาพที่ 31 เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของการสกัดอาร์เอ็นเอจากต้นอะราบิดอปซิสที่ได้รับการถ่ายฝาก

หมายเหตุ:

M = DNA ladder 1 kb (Fermentus, USA)

1 = pJC2/14: T_1

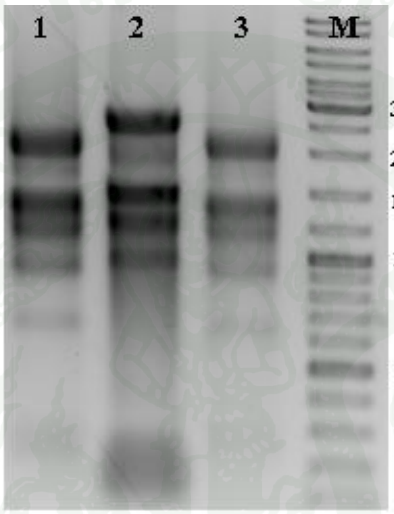
2 = pJC39/44: T_1

3 = pJC66/84: T_1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากภาพที่ 31 เป็นผลการสกัดอาร์เอ็นเอจากต้นอะราบิดอปซิส ที่มาจากตัวอย่าง pJC2/14: T_1, pJC39/44: T_1 และ pJC66/84: T_1 พบว่าตัวอย่างต้นที่มาจากตัวอย่างของ pJC2/14 มีปริมาณอาร์เอ็นเอที่น้อยเนื่องจากตัวอย่างมีปริมาณเนื้อเยื่อที่เจริญบนพีทมอสน้อยมาก

ส่วนจากผลการสกัดอาร์เอ็นเอที่มาจากตัวอย่าง pF1/3/1:T_1, pF2/4/2:T_1 และ wild type ดังแสดงในภาพที่ 32



ภาพที่ 32 เจลอิเล็กโทรโฟรีซีสของการสกัดอาร์เอ็นเอจากต้นอะราบิดอปซิสที่ได้รับการถ่ายฝาก

หมายเหตุ:

M = DNA ladder 1 kb (Fermentus, USA)

1 = ต้นอะราบิดอปซิส รุ่น T_1 ที่มี pF1/3/1: T_1

2 = ต้นอะราบิดอปซิส รุ่น T_1 ที่มี pF2/4/2: T_1

3 = wild type

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 12 ผลการวัดค่าความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่แยกสกัดมาได้จากต้นอะราบิดอปซิสรุ่น T_1

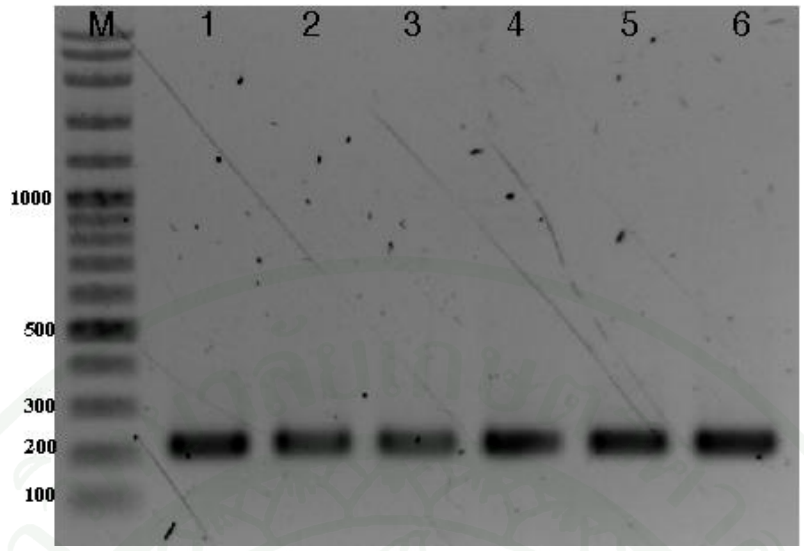
ตัวอย่าง	OD 260/280 (**นาโนกรัมต่อไมโครลิตร**)
pF1/3/1	291.4
pF2/4/2	661.3
wild type	169.7
pJC2/4	51.4
pJC39/44	362.1
pJC66/84	174.5

จากผลของการแยกสกัดอาร์เอ็นเอ พบว่าคุณภาพของอาร์เอ็นเอของแต่ละตัวอย่างมีความแตกต่างกัน เนื่องมาจากปกติแล้วปริมาณของอาร์เอ็นเอในเซลล์มีเพียง 20 พิโคกรัม และมี mRNA ประมาณ 1.5-2.5% ซึ่งมีปริมาณน้อยมากดังนั้นการที่จะเตรียม mRNA ให้มีคุณภาพที่ดีนั้นเป็นสิ่งที่ยาก แต่คุณภาพที่ได้เพียงพอที่จะนำมาใช้ในขั้นตอนต่อไป

14. ผลการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบผลการถ่ายยีน *AP2* ในต้นอะราบิดอปซิส รุ่น T_1

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากต้นดัดแปลงพันธุกรรมมาทำปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันได้เป็น cDNA และนำมาตรวจสอบผลการลดการแสดงออกของยีน *AP2* โดย RNAi construct โดยการทำปฏิกิริยา Semi-quantitative RT-PCR ที่จำนวน 25, 30 และ 35 รอบ และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะของแต่ละชิ้นส่วนยีน *AP2* โดยนำ wild type มาใช้ในการเปรียบเทียบระดับการแสดงออก ปริมาณ cDNA เริ่มต้น โดยใช้ปริมาณ cDNA ในแต่ละตัวอย่างเท่ากัน โดยทราบจากระดับการแสดงออกของยีน *Actin* ที่เท่ากันที่ 35 รอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังแสดงในภาพที่ 33

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 33 เจลแสดงการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ AtActin2-F และ AtActin2-R บนดีเอ็นเอจากต้นอะราบิดอปซิสที่รับการถ่ายฝาก

หมายเหตุ:

M = VC 100 bp Plus DNA Ladder (Vivantis, Canada)

1 = ต้นอะราบิดอปซิส รุ่น T_1 ที่มี pJC2/14: T_1

2 = ต้นอะราบิดอปซิส รุ่น T_1 ที่มี pJC39/44: T_1

3 = ต้นอะราบิดอปซิส รุ่น T_1 ที่มี pJC66/84: T_1

4 = ต้นอะราบิดอปซิส รุ่น T_1 ที่มี pF1/3/1: T_1

5 = ต้นอะราบิดอปซิส รุ่น T_1 ที่มี pF2/4/2: T_1

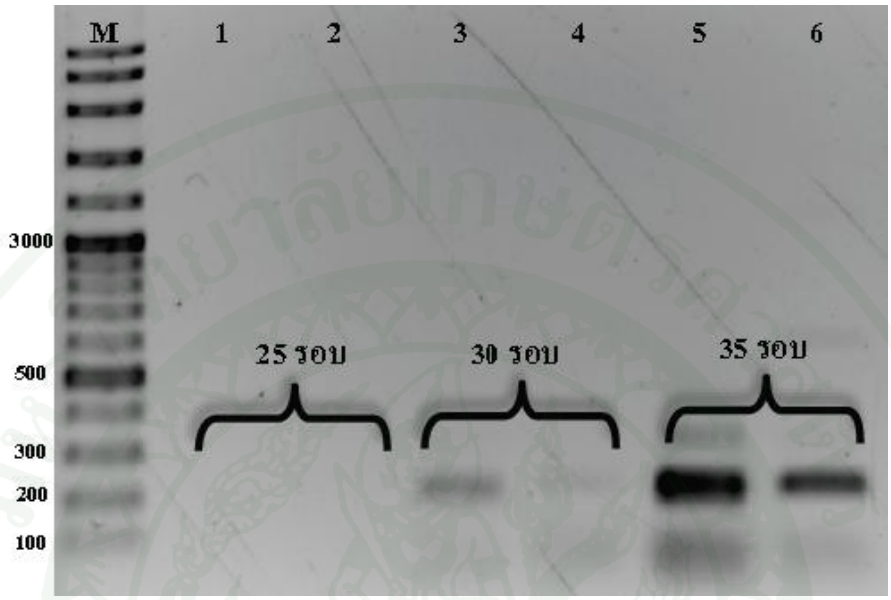
6 = wild type; negative control

ผลของการปรับความเข้มข้นของ cDNA โดยใช้ยีน *Actin* เป็นยีนเปรียบเทียบ จากภาพที่ 33 ทั้ง pJC2/14: T_1, pJC39/44: T_1, pJC66/84: T_1, pF1/3/1: T_1, pF2/4/2: T_1 และ wild type เมื่อนำมาปรับความเข้มข้น โดยดูจากผลจะพบแถบดีเอ็นเอขนาด 257 คู่เบส ในแต่ตัวอย่างที่เท่ากัน และจะใช้ปริมาณ cDNA ที่เริ่มต้นนี้ ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *AP2* ต่อไป

นำปริมาณของ cDNA เริ่มต้นที่เท่ากันในแต่ละตัวอย่างมาตรวจสอบการแสดงออก โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะของแต่ละชิ้นส่วนของยีน โดยเปรียบเทียบการแสดงออกกับต้นที่เป็น wild type

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แล้วนำมาตรวจสอบผลโดยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ VC 100 bp Plus DNA Ladder (Vivantis, Canada) ดังภาพที่ 34-36



ภาพที่ 34 เจลแสดงผลปฏิกิริยา Semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อชิ้นส่วนที่ pJC2/14

หมายเหตุ:

M = VC 100 bp Plus DNA Ladder (Vivantis, Canada)

1 = wild type ที่ 25 รอบ

2 = ต้นอะราบิดอปซิส รุ่น T_1 ที่มี pJC2/14 ที่ 25 รอบ

3 = wild type ที่ 30 รอบ

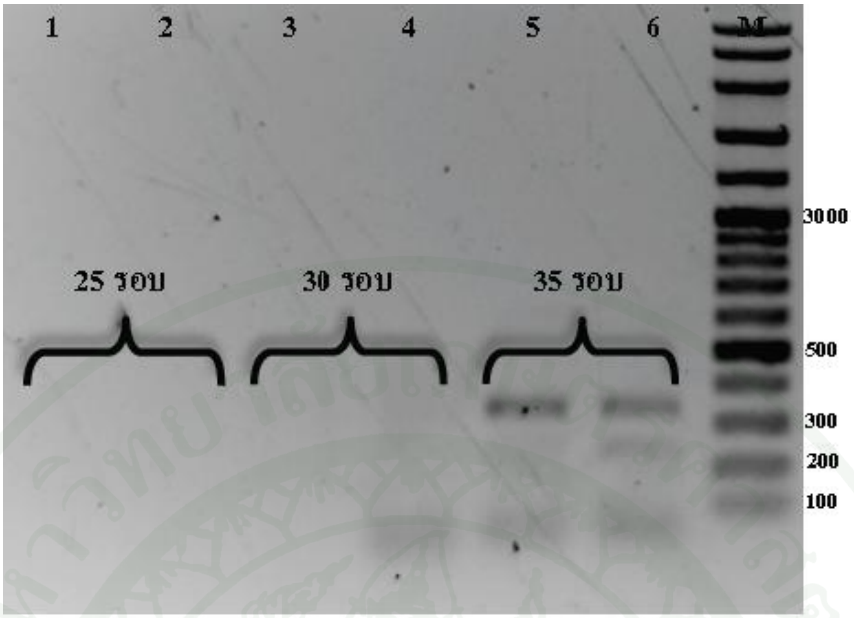
4 = ต้นอะราบิดอปซิส รุ่น T_1 ที่มี pJC2/14 ที่ 30 รอบ

5 = wild type ที่ 35 รอบ

6 = ต้นอะราบิดอปซิส รุ่น T_1 ที่มี pJC2/14 ที่ 35 รอบ

จากภาพที่ 34 จากปริมาณ cDNA ที่เท่ากัน (เทียบด้วยการแสดงออกของยีน *Actin*) เมื่อนำมาตรวจการแสดงออกด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *AP2* โดยเปรียบเทียบกับ wild type พบว่าต้นอะราบิดอปซิส รุ่น T_1 ที่มี RNAi construct ในส่วน pJC2/14 มีการแสดงออกของยีน *AP2* ที่น้อยลง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 35 เจลแสดงผลปฏิกิริยา Semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อชิ้นส่วนที่ pF1/3/1

หมายเหตุ:

M = VC 100 bp Plus DNA Ladder (Vivantis, Canada)

1 = wild type ที่ 25 รอบ

2 = ต้นอะราบิดอปซิส รุ่น T_1 ที่มี pF1/3/1 ที่ 25 รอบ

3 = wild type ที่ 30 รอบ

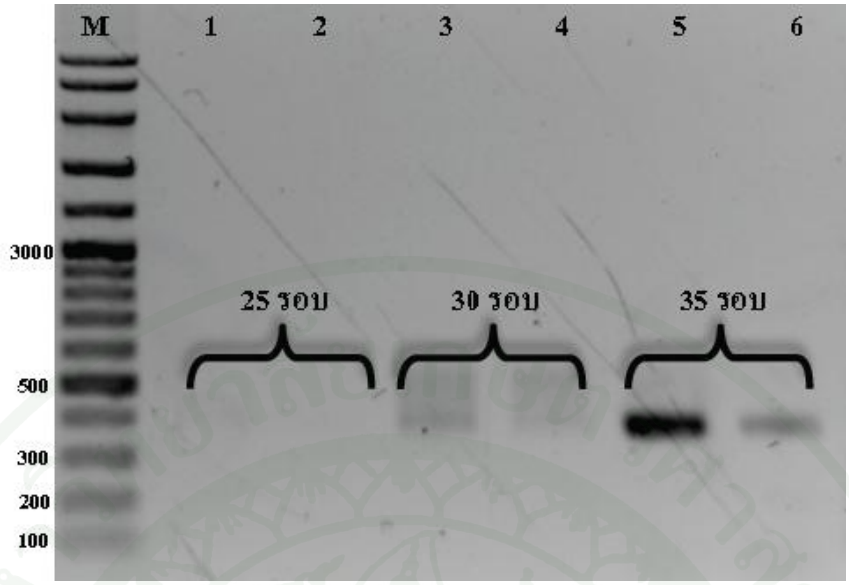
4 = ต้นอะราบิดอปซิส รุ่น T_1 ที่มี pF1/3/1 ที่ 30 รอบ

5 = wild type ที่ 35 รอบ

6 = ต้นอะราบิดอปซิส รุ่น T_1 ที่มี pF1/3/1 ที่ 35 รอบ

จากภาพที่ 35 จากปริมาณ cDNA ที่เท่ากัน (เทียบด้วยการแสดงออกของยีน *Actin*) เมื่อนำมาตรวจสอบการแสดงออก ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *AP2* โดยเปรียบเทียบกับ wild type พบว่าต้นอะราบิดอปซิส รุ่น T_1 ที่มี RNAi construct ในส่วน pF1/3/1 มีการแสดงออกของยีน *AP2* ที่เท่าเดิม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 36 เจลแสดงผลปฏิกิริยา Semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อชิ้นส่วนที่ pF2/4/2

หมายเหตุ:

M = VC 100 bp Plus DNA Ladder (Vivantis, Canada)

1 = wild type ที่ 25 รอบ

2 = ต้นอะราบิดอปซิส รุ่น T_1 ที่มี pF2/4/2 ที่ 25 รอบ

3 = wild type ที่ 30 รอบ

4 = ต้นอะราบิดอปซิส รุ่น T_1 ที่มี pF2/4/2 ที่ 30 รอบ

5 = wild type ที่ 35 รอบ

6 = ต้นอะราบิดอปซิส รุ่น T_1 ที่มี pF2/4/2 ที่ 35 รอบ

จากภาพที่ 36 จากปริมาณ cDNA (เทียบด้วยการแสดงออกของยีน *Actin*) เมื่อนำมาตรวจสอบการแสดงออก ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *AP2* โดยเปรียบเทียบกับ wild type พบว่าต้นอะราบิดอปซิส รุ่น T_1 ที่มี RNAi construct ในส่วน pF2/4/2 มีการแสดงออกของยีน *AP2* ที่ลดลง

สรุปจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *AP2* ในต้นอะราบิดอปซิส ที่มี RNAi construct สำหรับยีน *AP2* ในรุ่น T_1 พบว่ามีการลดการแสดงออกเป็นจำนวน 2 ต้นจาก 3 ต้น

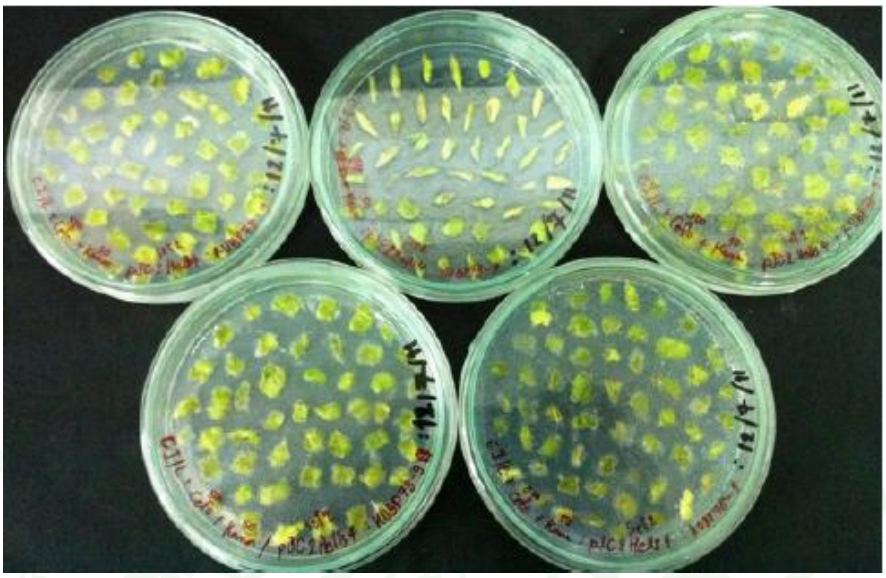
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ที่ได้ทำการทดสอบ

15. ผลการถ่ายฝากยีนเข้าต้นสบู่ดำด้วยวิธี Agrobacterium cocultivation

ชิ้นยีนที่นำมาใช้ในการถ่ายฝากเข้าสู่เนื้อเยื่อสบู่ดำด้วยวิธี Agrobacterium cocultivation ประกอบด้วย ชิ้นยีน *AP2* ที่มาจากต้นอะราบิดอปซิสจำนวน 2 ชิ้น คือ pF1/3 และ pF2/12 นอกจากนั้นยังมีส่วนของยีน *AP2* ที่มาจากสบู่ดำจำนวน 3 ส่วน คือ pJC2/14 (บริเวณ domain *AP2*), pJC39/44 (บริเวณ non domain *AP2*) และ pJC66/84 (บริเวณ 3'UTR *AP2*) ในครั้งแรกๆ พบว่ามีการเจริญของอะโกรแบคทีเรียมในขั้นของการคัดเลือก จนทำให้เนื้อเยื่อตายในที่สุด แต่ในช่วงหลังจากที่เริ่มมีเนื้อเยื่อเจริญไปเป็นแคลลัสใน 3-4 สัปดาห์ บนอาหารคัดเลือกสูตร CI/L ที่มียาปฏิชีวนะ Cefotaxime เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และกานามัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และทำการย้ายเนื้อเยื่อที่ไม่พบการปนเปื้อนของอะโกรแบคทีเรียม ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร SR (Shoot Regeneration) ที่มียาปฏิชีวนะเพื่อเป็นการกระตุ้นให้เกิดปลายยอด โดยบนอาหารนี้จะลดยาปฏิชีวนะ Cefotaxime ลงเหลือเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร แต่ยังคงมียาปฏิชีวนะกานามัยซิน จากนั้นหลังจาก 5-6 สัปดาห์ จะย้ายลงอาหารสูตร RI (Root Induction) เพื่อนำไปสู่การเหนี่ยวนำให้เกิดราก จนกระทั่งขั้นที่จะลงปลูกในแปลงทดลอง แต่จากการทดลองเกิดวิกฤตทางธรรมชาติ มีผลต้องมีการตัดไฟฟ้าที่ตึกภาควิชาพันธุศาสตร์ และทำให้ไม่สามารถทำการย้ายเนื้อเยื่อไปสู่อาหารใหม่ได้ รวมทั้งอุณหภูมิในห้องสูงขึ้น ทำให้เนื้อเยื่อไม่สามารถเจริญเติบโตในสภาวะที่เหมาะสมได้ ภายหลังพบว่าเนื้อเยื่อสบู่ดำ เกิดการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียและรา บางส่วนแคลลัสมีสีเหลืองและตายในที่สุดดังภาพที่ 37 และ 38 ด้วยระยะเวลาในการทำงานวิจัยที่จำกัด จึงจำเป็นต้องหยุดการถ่ายยีนในส่วนของสบู่ดำเพียงแค่การเหนี่ยวนำให้เกิดเนื้อเยื่อแคลลัส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 37 แสดงการถ่ายฝาก RNAi construct เข้าไปในเนื้อเยื่อใบอ่อน ลำต้น และก้านของสบู่ดำ

โดยได้ทำการถ่ายฝากทั้ง 5 ชิ้นส่วน เข้าเนื้อเยื่อสบู่ดำจำนวน 7 ครั้ง แต่ละในการถ่ายยืนจะใช้เนื้อเยื่อทั้งหมดในการถ่ายฝากประมาณ 250 ชิ้น/1ชิ้นส่วนของ RNAi construct ดังภาพที่ 37 รวมทั้งหมด 8,750 ชิ้น

ภาพที่ 38 แสดงผลเนื้อเยื่อที่ทำการถ่ายฝากเข้าต้นสบู่ดำหลังจากเกิดวิกฤตการณ์น้ำท่วมกรุงเทพมหานคร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

ได้ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากสบู่ดำ เพื่อมุ่งไปสู่การเหนี่ยวนำให้เกิด แคลลัส ปลายยอด หลายยอด และเกิดราก โดยได้สภาวะที่เหมาะสมของการเกิดแคลลัส จากสูตรอาหาร CI/L (MS ที่เติม BAP ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เติม 2,4-D ที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม IAA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร) ซึ่งเกิดกลุ่มก้อนแคลลัสที่รวดเร็วและเกิดการแพ็คตัวอย่างหนาแน่น ในระยะเวลา 1-2 สัปดาห์ ขณะที่ได้สูตรอาหารที่เหมาะสมกับการเกิดปลายยอดทวีคูณ จากสูตรอาหาร SI (MS ที่เติม BAP 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม IBA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร)โดยสามารถชักนำให้เกิดปลายยอดได้สูงสุด 4-5 ยอด ในระยะเวลา 4-6 สัปดาห์ และชักนำให้เกิดรากได้สำเร็จ จากสูตรอาหาร MS ที่เติม IBA ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่การชักนำให้เกิดกลุ่มก้อนแคลลัส ควรจะเพิ่มถ่านกัมมันเข้าไป เพื่อช่วยในการดูดซับสารพิษที่อยู่ในสบู่ดำ ที่เกิดหลังจากการตัดเนื้อเยื่อพืช

ส่วนงานทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุล ได้ศึกษายีน *AP2* จากต้นอะราบิดอปซิสที่มีรายงานว่า เมื่อลดการแสดงออกแล้ว จะทำให้ขนาดของเมล็ด ปริมาณน้ำมันภายในเมล็ด และเพิ่มขนาดของเซล์เอมบริโอ จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะนำความรู้เหล่านี้ มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ต้นสบู่ดำโดยขนาดของยีน *AP2* มีขนาดใหญ่ 1,298 bp ซึ่งการนำมาสร้าง RNAi construct เลือก AP2 Domain ในส่วนของ 3 เอกซอน ที่มีขนาดยาวที่สุด แล้วนำมาสร้างเป็น RNAi construct โดยเพิ่มปริมาณทั้ง 3 ส่วนของยีนมาได้ แล้วนำไปตรวจสอบลำดับเบส จากนั้นเลือกใช้ pHellsgate8 ซึ่งเป็นเวกเตอร์สำหรับการสร้างเป็น RNAi construct แล้วได้ถ่ายฝากโครงสร้างดีเอ็นเอ เข้าไปในอะโกรแบคทีเรียม ทูมีเฟเซียน สายพันธุ์ EHA 105 แล้วนำมาถ่ายฝากเข้าไปใน ต้นอะราบิดอปซิสด้วยวิธี floral dip จากนั้นจึงเก็บเมล็ดอะราบิดอปซิสในรุ่น T_0 มาคัดเลือกบนอาหาร MS ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน โดยจะใช้เวลาในการคัดเลือกบนอาหาร 2 สัปดาห์ เลือกต้นที่เจริญเติบโตได้ มาปลูกลงพีทมอส ตัดส่วนของใบอ่อนของต้นอะราบิดอปซิสมาสกัดดีเอ็นเอ แล้วมาทำปฏิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซิน ที่อยู่บนเวกเตอร์ pHellsgate8 ผลที่ได้พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนต้านยาปฏิชีวนะกานามัยซิน ได้ทั้ง pF1/3/1, pF2/4/2, pJC39/44, pJC66/84 แสดงว่าได้รับการถ่ายฝากตามที่คาดไว้

สกัดอาร์เอ็นเอ เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *AP2* จากตัวอย่างต้นอะราบิดอปซิส แล้วนำมาสร้าง cDNA ด้วยเอนไซม์รีเวอร์สทรานสคริปชัน แล้วมาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากยีน *Actin* เพื่อทำการปรับความเข้มข้นเริ่มต้นให้เท่ากันทุกตัวอย่าง ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *AP2* พบว่า ต้นอะราบิดอปซิส รุ่น T_1 ที่มีโครงสร้าง RNAi ในส่วน pJC2/14 และ pF2/4/2 มีการแสดงออกของยีน *AP2* ที่น้อยลง ขณะที่ pF1/3/1 มีการแสดงออกของยีน *AP2* ที่เท่าเดิม และได้ทำการถ่ายฝากเข้าต้นสบู่ดำด้วยวิธี Agrobacterium cocultivation แต่การถ่ายฝากไม่ประสบความสำเร็จ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

จรัญญา งามขำ, วารี เนื่องจำนงค์, มติ เหรียญกิจการ และ พรทิพา พิชา. 2552. การประเมินศักยภาพของสารสกัดจากรากของสบู่ดำต่อการเหนี่ยวนำให้เกิด Apoptosis ในเซลล์มะเร็งเต้านม. **วารสารโรคมะเร็ง** 29: 90-101.

ชำนาญ ฉัตรแก้ว. 2549. **สบู่ดำพืชพลังงาน**. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์ฟันนี่พับบลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ.

นาค โพธิแท่น. 2527. **รายงานความก้าวหน้าของโครงการสบู่ดำ**. กรมวิชาการเกษตร. 4 หน้า.

ธัญญารัตน์ ปัทมพงศา. 2550. **การศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตเมล็ดสบู่ดำและน้ำมันสบู่ดำเพื่อใช้ทดแทนน้ำมันดีเซลในเครื่องยนต์ทางการเกษตรของเกษตรกรในบ้านคลองปลาไหล จังหวัดชัยนาท**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นันท์นภัส เทพสำราญ โชคพิศิษฐ์ เทพสิทธา และ อารีย์ ทองภักดี. 2549. **การชักนำให้เกิดยอดทวีคูณในหลอดทดลองของสบู่ดำ**. วิทยานิพนธ์ออนไลน์ สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศิลปากร.

ระพีพันธ์ ภาสบุตร และ สุขสันต์ สุทธิผลไพบูลย์. 2525. **ผลการวิจัยค้นคว้าการใช้น้ำมันสบู่ดำเป็นพลังงานทดแทนเครื่องยนต์ดีเซลในการใช้น้ำมันสบู่ดำเดินเครื่องยนต์ดีเซล**. 5: 11-42.

รังษี เจริญสถาพร และ อมรรัชฎ์ คิดใจเดียว. 2548. **การวิจัยและพัฒนาสารสกัดจากพืชเพื่อควบคุมโรคพืช**. 2: 8-10.

ลิลลี่ กาวีต๊ะ, มาลี ณ นคร, ศรีสม สุวรรณวงศ์ และ สุริยา ตันติวิวัฒน์. 2549. **สรีรวิทยาของพืช**. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วิมลรัตน์ ศุกรินทร์, มณเฑียร โสมภีร์, H. Gocho และ นาค โพธิแท่น. 2536. **การปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิตของสบู่ดำโดยการฉายรังสีแกมม่า**. ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่นสถาบันวิจัยพืชไร่กรมวิชาการเกษตร. 124-127.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัลชลีย์ หุลานนท์. 2527. **การศึกษาลักษณะทางชีววิทยาของดอกและการติดผลของสบู่ดำ**. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิษฎพงษ์ รัตนกิจ. 2548. **ข้อมูลเบื้องต้นของผลผลิตเมล็ดสบู่ดำจากแปลงอนุรักษ์พันธุ์**. ศูนย์วิจัยพืชไร่นครราชสีมา. 4 หน้า.

สมพร ประเสริฐส่งสกุล. 2552. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชกับการปรับปรุงพันธุ์พืช**. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์โฟร์เพซ, กรุงเทพฯ.

สรศักดิ์ มณีขาว, สุชาติ คำอ่อน, คำจันทร์ เทพบรรหาร, สุจินต์ ชีวประเสริฐ และนาค โพธิแท่น. 2529. **การรวบรวมและการศึกษาพันธุ์สบู่ดำจากภาคใต้**. ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น สถาบันวิจัยพืชไร่กรมวิชาการเกษตร. หน้า 47-49.

สุรพงษ์ เจริญรัถ. 2548. **นานาสาระสบู่ดำ**. กรมวิชาการเกษตร. กสิกรปีที่ 78 ฉบับที่ 4: หน้า 24.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. **จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี**. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

นิตย์ศรี แสงเดือน. 2551. **พันธุศาสตร์ของพืช**. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

มณีวรรรณ สุขสมทิพย์. 2553. **การโคลนยีนเบื้องต้น**. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

แอนนา สายมณีรัตน์, พิทยาภรณ์ สุภรพัฒน์, สุปราณี งามประสิทธิ์, แสงแข น้าวานิช, สุขุม โชติช่วงมณีรัตน์, ฉัตรพงศ์ บาลลา และเอ็จ สโรบล. 2549. การรวบรวมพันธุ์สบู่ดำจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ของประเทศไทยเพื่อใช้เป็นเชื้อพันธุกรรม. น. 3-23. ใน **รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Aponte, C.H. 1978. **Estudio de *Jatropha curcas* L como recurso biotico**. Diploma thesis. University Veracruz. Mexico.

Anderson, M. and J.A. Roberts. 1998. **ARABIDOPSIS**. Sheffield Academic Press. UK.

Angenent, G.C., and L. Columbo. 1996. Molecular control of ovule development. **Trends in Plant Sci.** 1: 228-232.

Aukerman, M.J. and H. Sakai. 2003. Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its *APETALA2*-like target genes. **Plant Cell.** 15: 2730–2741.

Bleecker, A. 1997. **Guide to Growing *Arabidopsis thaliana* Vellanoweth Lab, CSULA**. Available Source: http://www.calstatela.edu/faculty/vllnwth/grow.html, May 27, 2009.

Bowman, J.L., D.R. Smyth and E.M. Meyerowitz. 1991. Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. **Development** 112: 1-20.

Chantharaprasong, J. and P.C. Van Welzen. 2008. **Flora of Thailand: Euphorbiaceae** National Herbarium Naderland. Available Sorce: http://www.nationaalherbarium.nl/ThaiEuph/ThJspecies/ThJatrophaT.htm, April 20, 2008.

Chen, X., 2004. A microRNA as a translational repressor of *APETALA2* in Arabidopsis flower development. **Sci.** 303, 2022–2025.

Chris, H. and P. Waterhouse. 2003. Constructs and method for high-throughput gene silencing in plants. **Elsevier Sci**. Method 30: 289-295.

Das, P., G.R. Rout. and A.B. Das. 1993. Somatic embryogenesis in callus cultures of *Mussaenda erythrophylla* cvs. **Plant Cell Tissue Organ** Cult. 35:199–201.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Ditta, G., A. Pinyopich, P. Robles, S. Pelaz and M.F. Yanofsky. 2004. The SEP4 gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristemidentity. **Current Biology** 14: 1935–1940.

Douglas, E.S., S. A. Chanderbali, S. Kim, M. Buzgo and P. Soltis. 2007. The ABC Model and its Applicability to Basal Angiosperms. **Annals of Botany.** 100: 155–163.

Duke, J.A. 1985. CRC Handbook of Medicinal Herbs. CRC Press Inc. Boca Raton, Fl.

Elbashir, S.M., J. Harborth, W. Lendeckel , A. Yalcin, K. Weber and T. Tuschl. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. **Nature.** 411: 494-498.

Garcia, R.P. and P. Lawas. 1990. Potential plant extracts for the control of Azolla fungal pathogens. Philipp. **Agric.** 73: 343-348.

Grimm, C. 2005. The Jatropha Project in Nicaragua. File://F:\JCL-Project-Nicaragua.html. 4 pages.

Gubitz, G.M., M. Mittelbach, and M. Trabi. 1997. **Biofuels and Industrial Products from *Jatropha curcas***. Developed from the Symposium Jatropha 97 Managua, Nicaragua February 23- 27, 1997.

Hebert-Soule´, D., J.R. Kikkert. and B.I. Reich. 1994. Phosphinothricin stimulates somatic embryogenesis in grape. (Vitis sp. L.). **Plant Cell Rep.** 14:380–384.

Hopkins, W.K. and N.P.A. Huner. 2004. **Introduction to Plant Physiology**. John Wiley & Sons, Inc. The University of Western Ontario. USA.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Irish, V.F. 2010. The flowering of Arabidopsis flower development. **The Plant Journal**. 61: 1014-1028.

Jan de Klerk, G. and P. Pumisutapon, 2008. Protection of in-vitro grown Arabidopsis seedlings against abiotic stresses. **Plant Cell Tiss Organ Cult.** 95: 149–154.

Jofuku, K.D., P.K. Omidyar, Z. Gee, and J.K. Oakum. 2004. Control of seed mass and seed yield by the floral homeotic gene *APETALA2.* **PNAS** 102: 3117–3122.

Koornneef, M., C.J. Hanhart. and J.H. Vanderveen. 1991. A genetic and physiological analysis of late flowering mutations in *Arabidopsis thaliana*. **Mol. Gen. Genet.** 229: 57–66.

Lauter, N., A. Champagne., S. Carlson., M. Gobble. and S.P. Moose. 2005. microRNA172 down-regulates glossy15 to promote vegetative phase change in maize. **PNAS** 102; 9412–9417.

Li, M.R., H.Q. Li. and G.J. Wu. 2006. Study on factors influencing Agrobacterium-mediated transformation of *Jatropha curcas*. **J. Mol. Cell. Bio.** 39: 83–87.

Macrae, I., K. Zhou, A. Repic, A. Brooks, W. Cande, P. Adams and J. Duodena. 2006. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. **Sci.** 311: 195-198.

Martin, K.P. 2003. Plant regeneration through direct somatic embryo- genesis on seed coat explants of cashew (*Anacardium occiden-tale* L.). **Sci. Hortic.** 98: 299–304.

Martinez-Zapater, J.M. and J. Salinas. 1998. **ARABIDOPSIS PROTOCOL** Volume 82. Humana Press, Totowa, New Jersey.

Meinke, D. W., J. M. Cherry, C. Dean, S. D. Rounsley and M. Koorneef. 1998. *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. **Sci.** 282: 662-682.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Meiru, L., L. Hongqing, J. Huawu, P. Xiaoping, and W. Guojiang. 2007. Establishment of an Agrobacteriuim-mediated cotyledon disc transformation method for *Jatropha curcas*. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.** DOI 10.1007/s11240-007-9320-6.

Moose, S. P. and P.H. Sisco. 2009. *Glossyl5,* an *APETALA2-1ike* gene from maize that regulates leaf epidermal cell identity. **GENES & DEVELOPMENT** 10: 3018-3027.

Nilsson, L., A. Carlsbecker, A. S. Larsson and T. Valhalla. 2007. *APETALA2* like genes from *Picea abies* show functional similarities to their Arabidopsis homologues. **Planta.** 225: 589–602.

Ohto, M., R. L. Fischer, R.B. Goldberg, K. Nakamura, and J.J. Harada. 2005. Control of seed mass by *APETALA2*. **PNAS.** 102: 3123–3128.

Pelaz, S., G.S. Ditta, E. Baumann, E. Wisman and M.F. Yanofsky. 2000. B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. **Nature** 405: 200–203.

Pruss, G., L. Bowman and V.B. Vance 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.

Rashid, A. 2009. **Molecular Physiology and Biotechnology of Flowering Plants**. Alpha Science International Ltd. Oxford. UK.

Sadakorn, J. 1982. Report on Collection of *Jatropha curcas* L. **(Saboo-dam) in the North of Thailand**. 5 pages.

Sen, G.L. and H.M. Blau. 2005. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA &decay known as cytoplasmic bodies. **Nat Cell Biol.** 7: 633-636.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Simon, R., M.I. Iguana. and G. Coupland. 1996. Activation of floral meristem identity genes in *Arabidopsis*. **Nature** 384: 59–62.

Shigyo, M., M. Ito. 2004. Analysis of gymnosperm two-AP2-domain- containing genes. **Dev. Genes Evol**. 214: 105–114.

Smith, A.N., P.S. Surinder, W. Ming-Bo, P.A. Stoutjesdijk, A.G. Green and P.M. Waterhouse. 2000. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. **Nature** 407: 319-320.

Theissen, G. 2001. Development of floral organ identity: stories from the MADS house. **Current Opinion in Plant Biology** 4: 75-85.

_____. and H. Saedler. 2001. Plant biology: Floral quartets. **Nature** 409: 469-471.

_____. and R. Melzer. 2007. Molecular Mechanisms Underlying Origin and Diversification of the Angiosperm Flower. Oxford Journals. **Annals of Botany** 100: 603-619.

Taiz, L. and E. Zeiger. 2006. **Plant Physiology**. Sinauer Associates, Inc. edition 4. USA.

Timir, J.B., P. Mukherjee and M.M. Datta. 2007. Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn.,an important biofuel plant. **Plant Biotechnol Rep**. 1: 135–140.

Valvekens, D., M.V. Montagu. and M.V. Lijsebettens. 1988. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. **PNAS** 85: 5536–5540.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ก

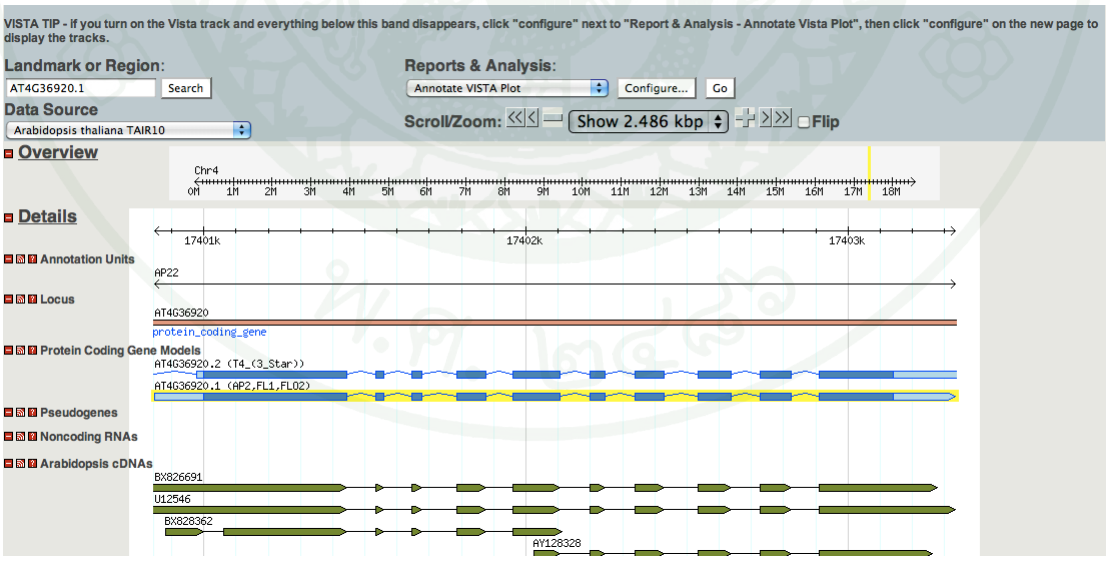
การแบ่งชิ้นยีน *AP2* เป็น 3 ส่วน และจำนวน coding region

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

>gi|30690802|ref|NM_119856.2| Arabidopsis thaliana AP2 (APETALA 2); transcription factor (AP2) mRNA, complete cds

CATTAAAGTTTTTATTTTATTTTCTACCAACCAAAAGCTTTTCTCTTTGGTTTCTCTTATTTAGCTTCTAACCTTGAGGA
GAATCATACCAGAGGATTGAAGTTTGAACCTTCAAAGATCAAAATCAAGAAACCAAAAAAAAACAAAAAAAATGTGGGAT
CTAAACGACGCACCACACCAAACACAAAGAGAAGAAGAATCTGAAGAGTTTTGTTATTCTTCACCAAGTAAACGGGTTGG
ATCTTTCTCTAATTCAAGCTCTTCAGCTGTTGTTATCGAAGATGGATCCGATGACGATGAACTTAACCGGGTCAGACCCA
ATAACCCACTTGTCACCCATCAGTTCTTCCCTGAGATGGATTCTAACGGCGGTGGTGTTGCTTCTGGCTTTCCTCGGGCT
CACTGGTTTGGTGTTAAGTTTTGTCAGTCGGATCTAGCCACCGGATCGTCCGCGGGTAAAGCTACCAACGTTGCCGCTGC
CGTAGTGGAGCCGGCACAGCCGTTGAAAAAGAGTCGGCGTGGACCAAGATCAAGAAGTTCTCAGTATAGAGGTGTTACGT
TTTACCGGCGTACCGGAAGATGGGAATCTCATATTTGGGACTGTGGGAAACAAGTTTACTTAGGTGGATTTGACACTGCT
CATGCAGCAGCTCGAGCATATGATAGAGCTGCTATTAAATTCCGTGGAGTAGAAGCGGATATCAATTTCAACATCGACGA
TTATGATGATGACTTGAAACAGATGACTAATTTAACCAAGGAAGAGTTCGTACACGTACTTCGCCGACAAAGCACAGGCT
TCCCTCGAGGAAGTTCGAAGTATAGAGGTGTCACTTTGCATAAGTGTGGTCGTTGGGAAGCTCGAATGGGTCAATTCTTA
GGCAAAAAGTATGTTTATTTGGGTTTGTTCGACACCGAGGTCGAAGCTGCTAGAGCTTACGATAAAGCTGCAATCAAATG
TAACGGCAAAGACGCCGTGACCAACTTTGATCCGAGTATTTACGATGAGGAACTCAATGCCGAGTCATCAGGGAATCCTA
CTACTCCACAAGATCACAACCTCGATTTGAGCTTGGGAAATTCGGCTAATTCGAAGCATAAAAGTCAAGATATGCGGCTC
AGGATGAACCAACAACAACAAGATTCTCTCCACTCTAATGAAGTTCTTGGATTAGGTCAAACCGGAATGCTTAACCATAC
TCCCAATTCAAACCACCAATTTCCGGGCAGCAGCAACATTGGTAGCGGAGGCGGATTCTCACTGTTTCCGGCGGCTGAGA
ACCACCGGTTTGATGGTCGGGCCTCGACGAACCAAGTGTTGACAAATGCTGCAGCATCATCAGGATTCTCTCCTCATCAT
CACAATCAGATTTTTAATTCTACTTCTACTCCTCATCAAAATTGGCTGCAGACAAATGGCTTCCAACCTCCTCTCATGAG
ACCTTCTTGAATCTTTTATATTTTTAAGGTTTATTATTATATAAGAAAAACAAAAATGAACCTTTGAAATCCCCACATGT
TCTTGGTCATTTCATTAATCATCGGCTTATATTTTGCTTATTTTCCCCTAAATCCTCTTGTTAACTTAGGCGAACAAAAA
AAATTAATGGAAATCTTTTTCCCTCCATCGGTTACAAAAATA

ภาพผนวกที่ ก1 ลำดับเบสของยีน *AP2* ในส่วนที่เป็น complete coding sequence แยกออกเป็น 3 ชิ้นส่วน โดยส่วนที่เป็นสีแดง คือ ชิ้นยีนส่วนที่ 1, ส่วนที่เป็นสีเหลือง คือ ชิ้นยีนส่วนที่ 2 และส่วนที่เป็นสีฟ้า คือ ชิ้นยีนส่วนที่ 3



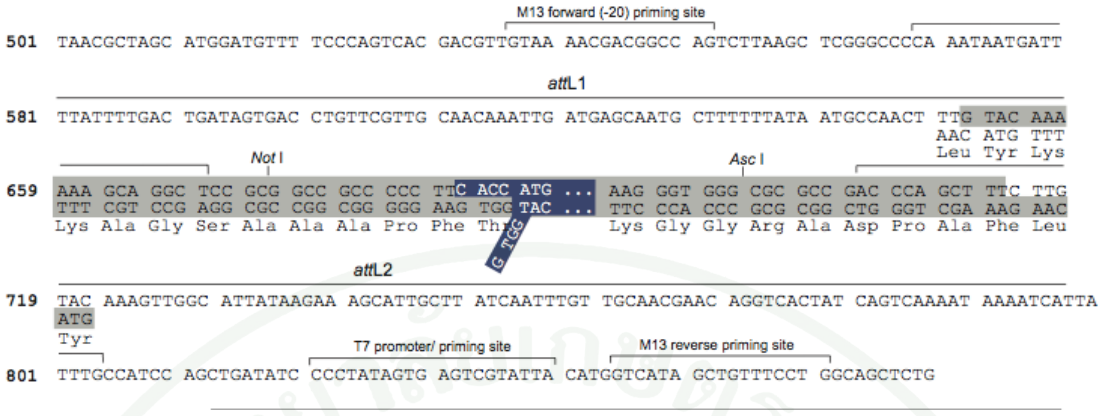
ภาพผนวกที่ ก2 ส่วนประกอบของยีน *AP2* ประกอบด้วย 10 เอกซอน 9 อินทรอน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ข

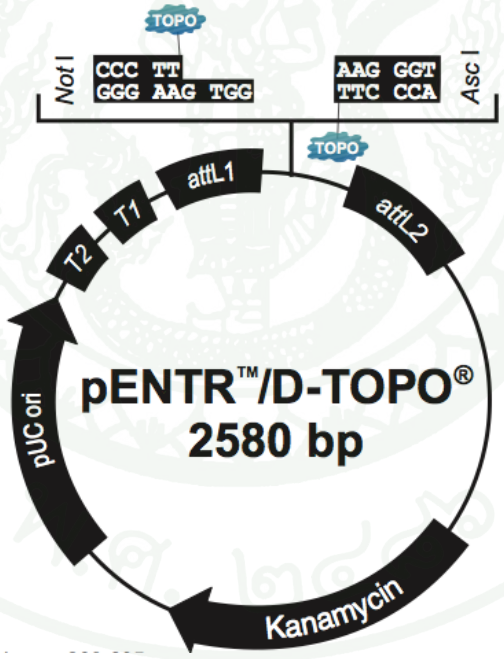
ภาพโครงสร้าง pENTR™ Directional TOPO® วิธีสร้างพลาสมิดสายผสม
และส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ ข1 ตำแหน่งของชิ้นยีนที่จะเข้าจับกับ pENTR™ Directional TOPO® vector

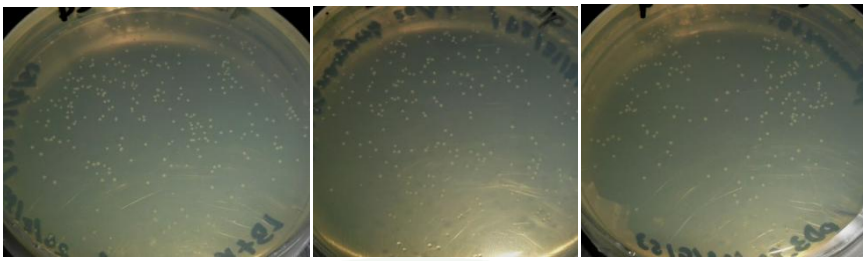
ที่มา: Invitrogen (2006)



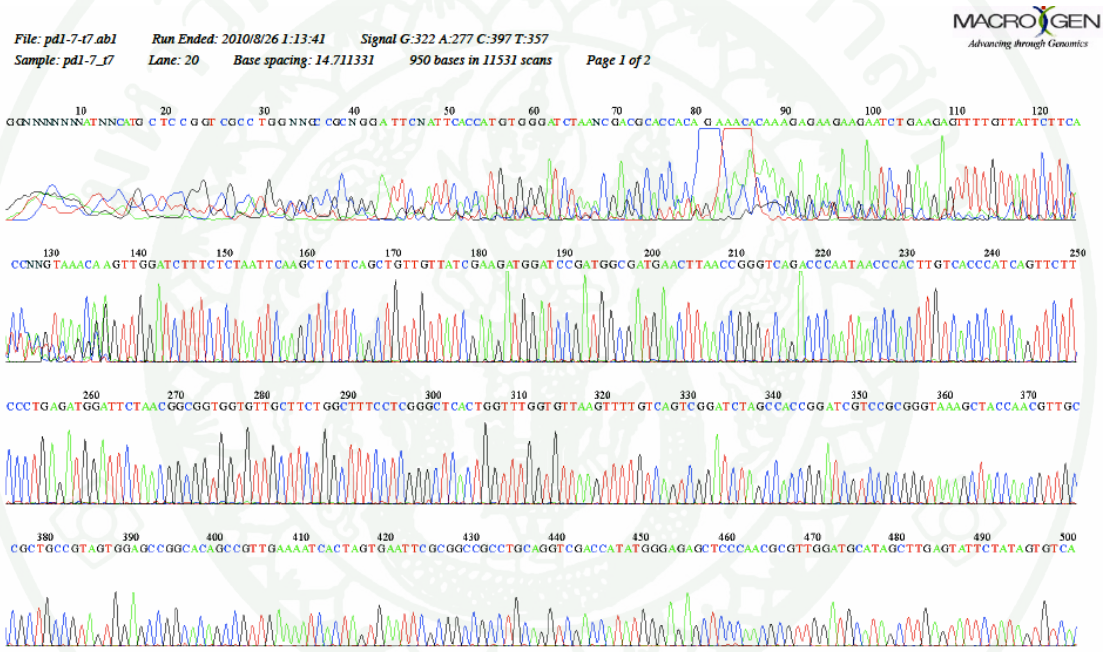
ภาพผนวกที่ ข2 โครงสร้างของ pENTR™ Directional TOPO® vector

ที่มา: Invitrogen (2006)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

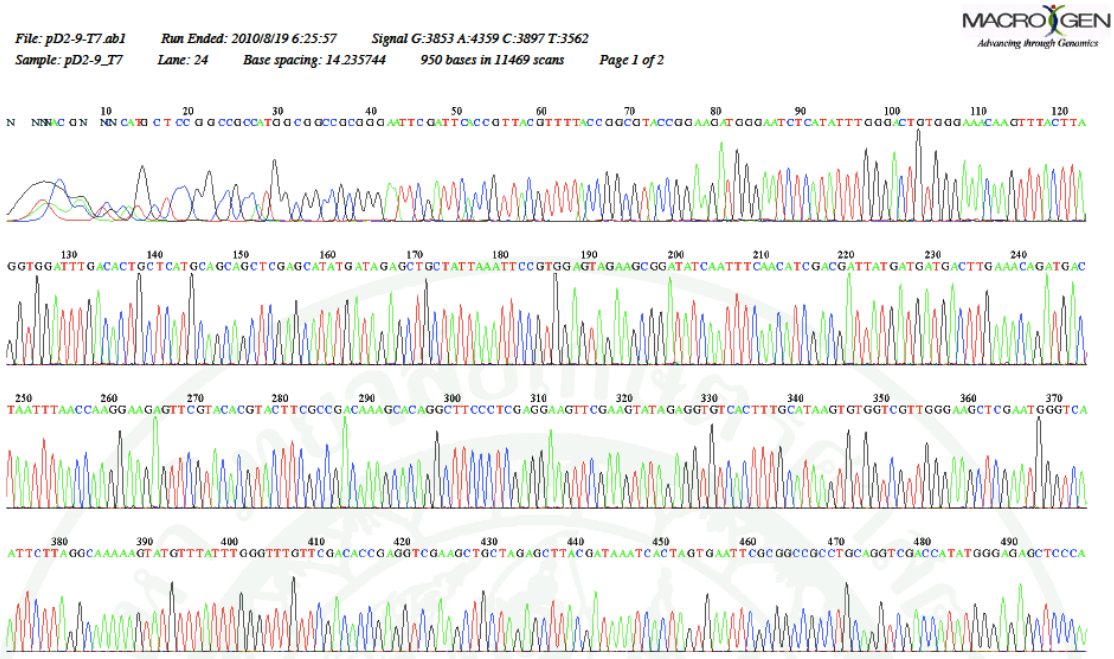


ภาพผนวกที่ ข3 แสดงโคโลนีของยีน *AP2* ทั้ง 3 ส่วนจากต้นอะราบิดอปซิสที่ผ่านการโคลนด้วย One Shot® chemically competent

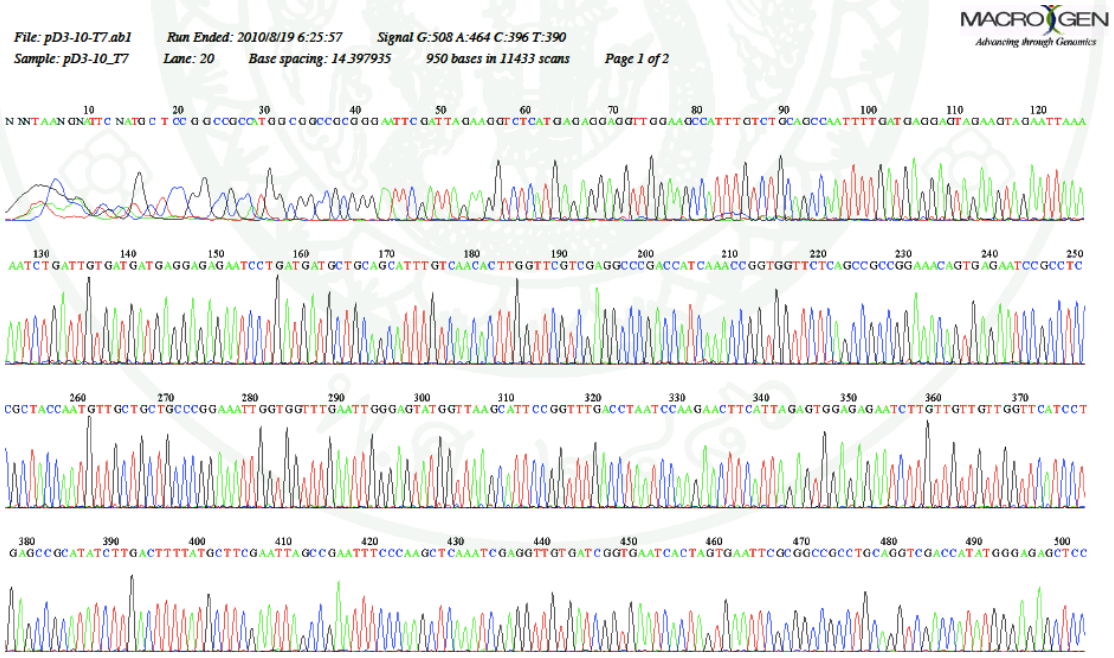


ภาพผนวกที่ ข4 ส่งหาลำดับเบสจากชิ้นยีน *AP2* ในส่วนที่ 1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

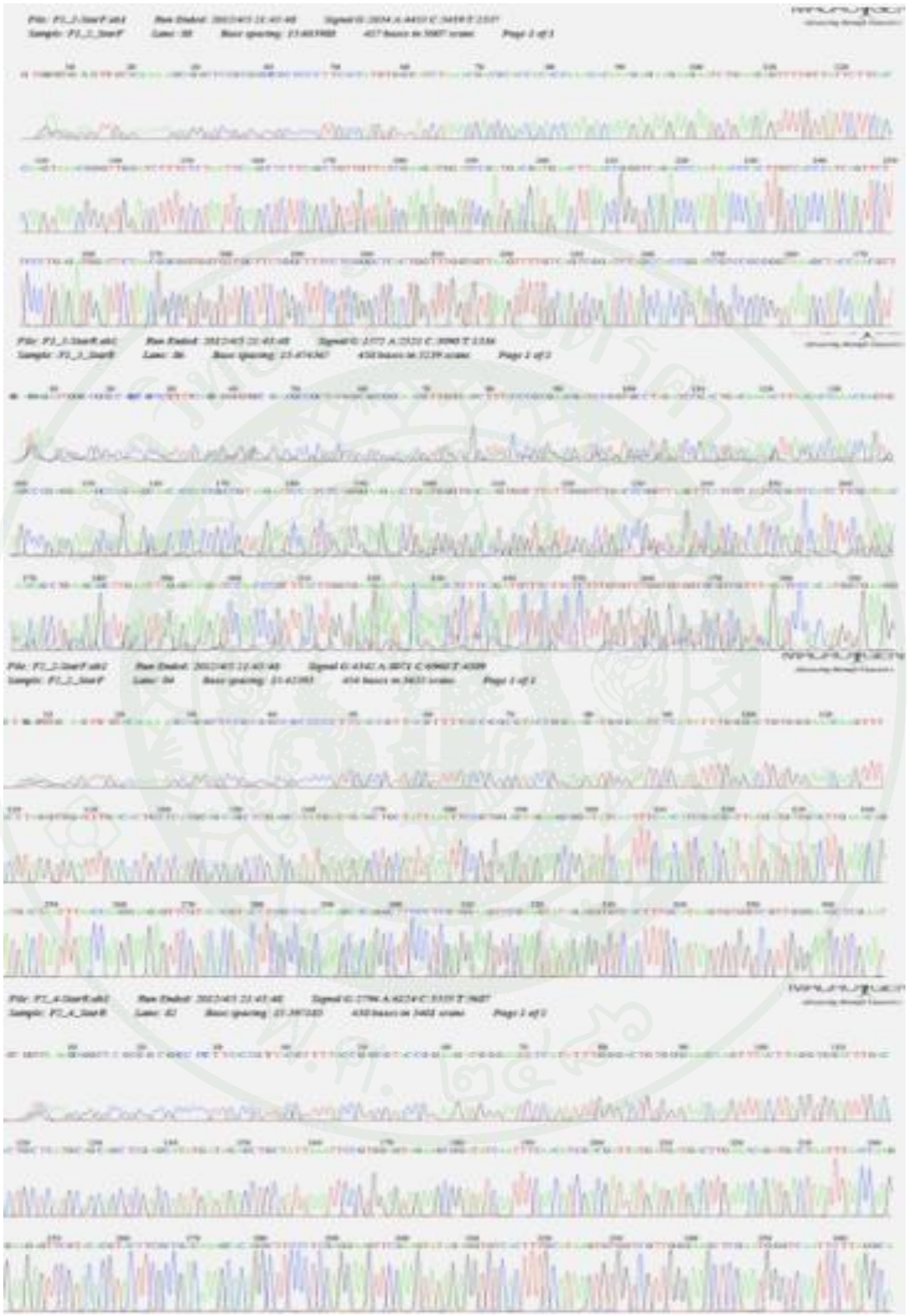


ภาพผนวกที่ ข5 ส่งหาลำดับเบสจากชิ้นยีน *AP2* ในส่วนที่ 2



ภาพผนวกที่ ข6 ส่งหาลำดับเบสจากชิ้นยีน *AP2* ในส่วนที่ 3

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



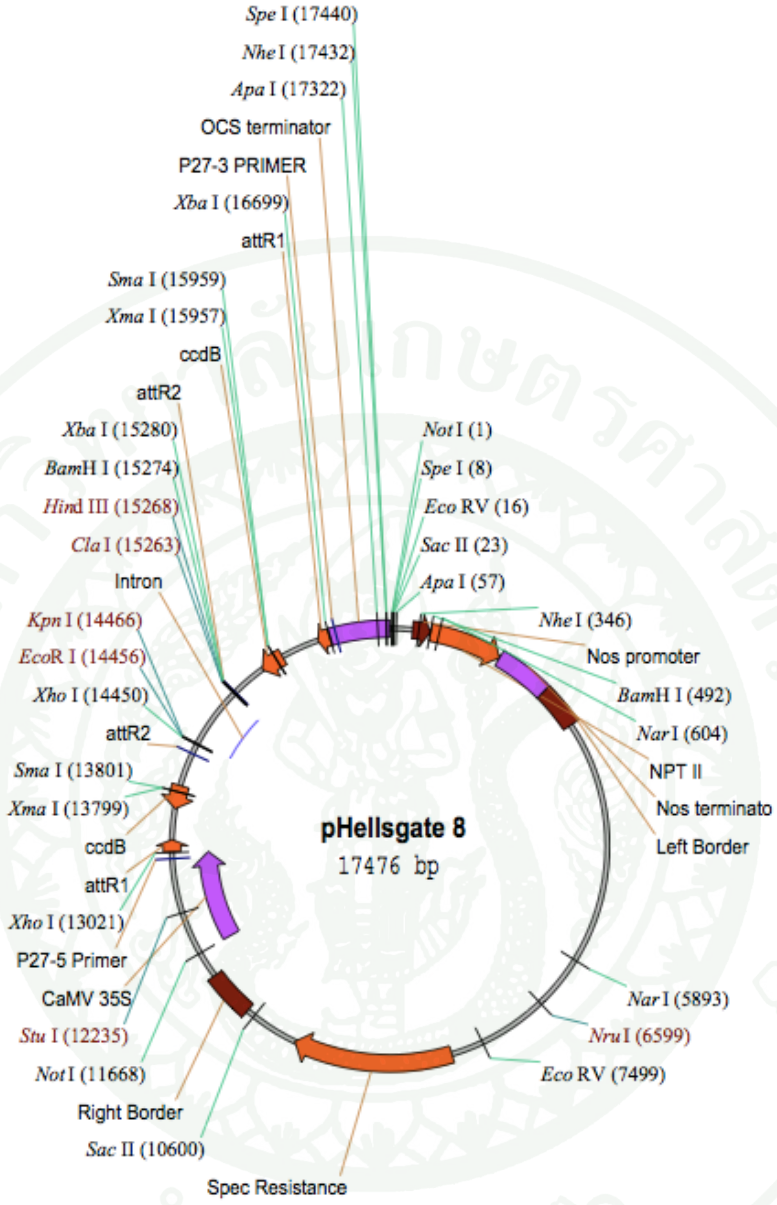
ภาพผนวกที่ ข7 ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อตรวจสอบทิศทางของยีน *AP2* ที่อยู่ใน
เวกเตอร์ pHellsgate8

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ค

ภาพโครงสร้าง pHellsgate8 และวิธีสร้างพลาสมิดสายผสม

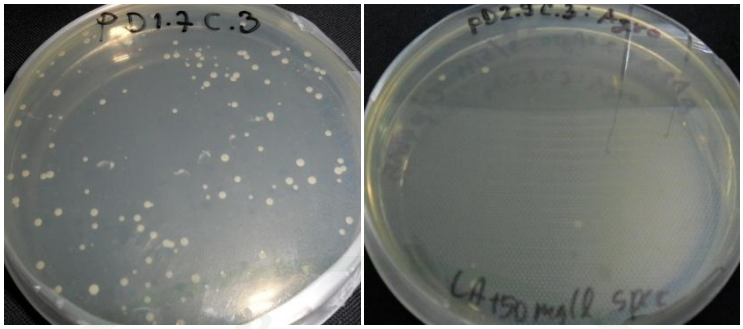
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



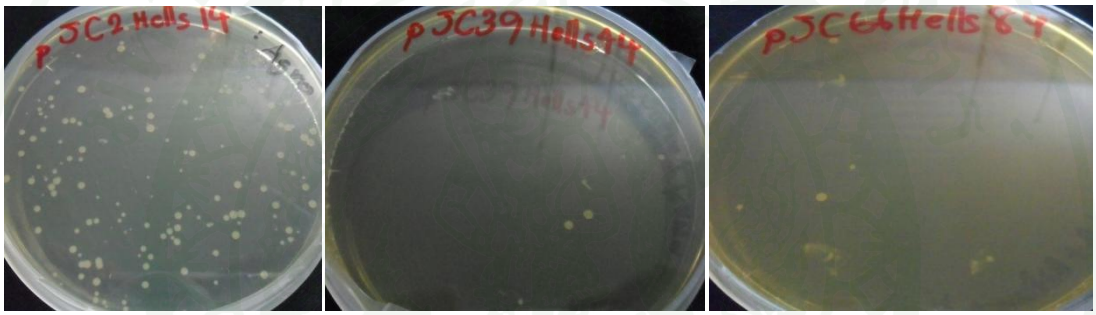
ภาพผนวกที่ ค1 โครงสร้างของเวกเตอร์ pHellsgate8

ที่มา: CSIRO/ Peter M. Waterhouse (2008)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ ค2 แสดงผลการโคลนทั้ง 2 ชิ้นยีนจากต้นอะราบิดอปซิสที่ถ่ายฝากเข้าไปในอะโกรแบคทีเรียม



ภาพผนวกที่ ค3 แสดงผลการโคลนทั้ง 3 ชิ้นยีนจากสบู่ดำที่ถ่ายฝากเข้าไปในอะโกรแบคทีเรียม

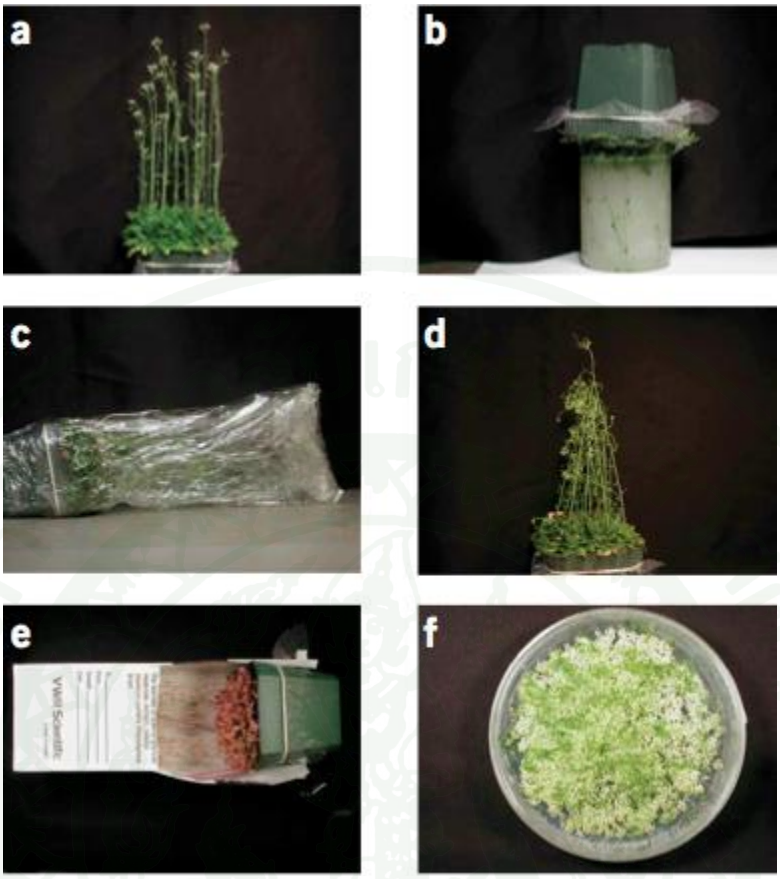
ภาพผนวกที่ ค4 การตรวจหาตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *XhoI* บนชิ้นยีนส่วนที่ 2 ด้วยโปรแกรม NEB cutter version 2.0

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ง

ขั้นตอนโดยรวมของเทคนิค Floral dip

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ ง ขั้นตอนโดยรวมของการถ่ายยีนด้วยเทคนิค Floral dip

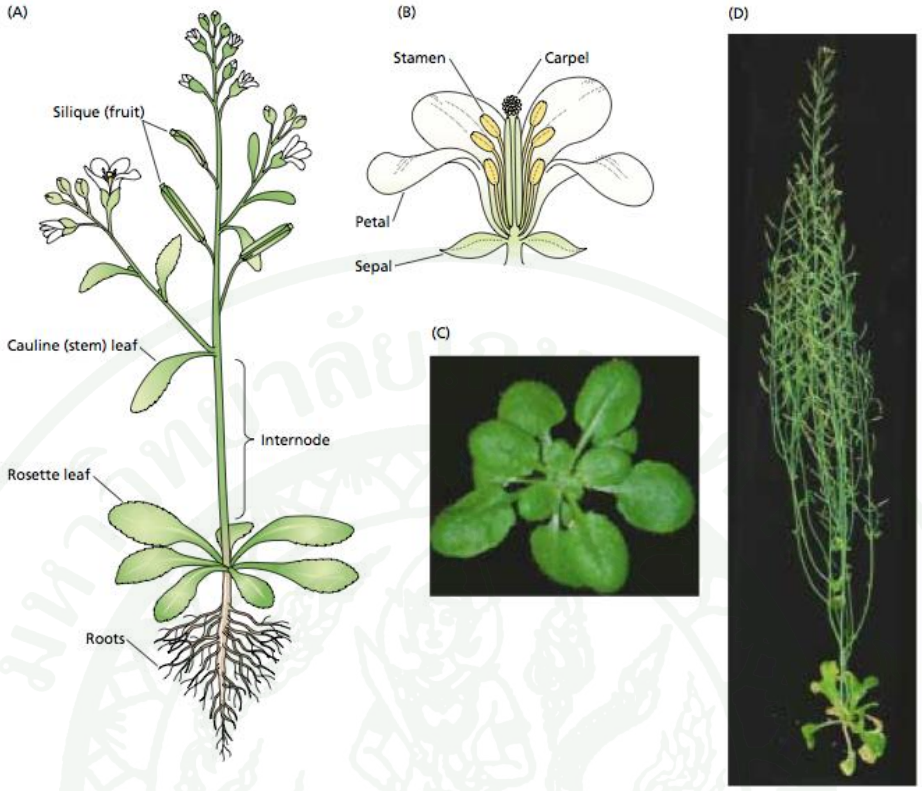
ที่มา: Xiuren Zhang (2006)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก จ

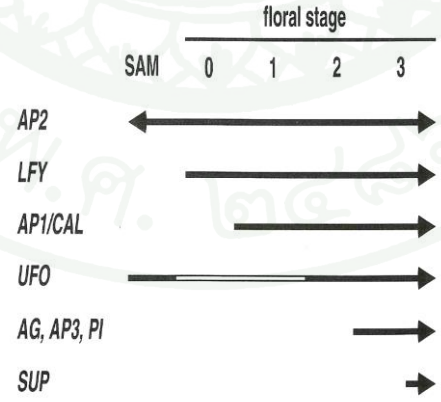
โครงสร้างของต้น และดอกจากต้นอะราบิดอปซิส และเปรียบเทียบ
ยีนที่มีผลต่อการสร้างดอก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ จ1 โครงสร้างของต้นอะราบิดอปซิส

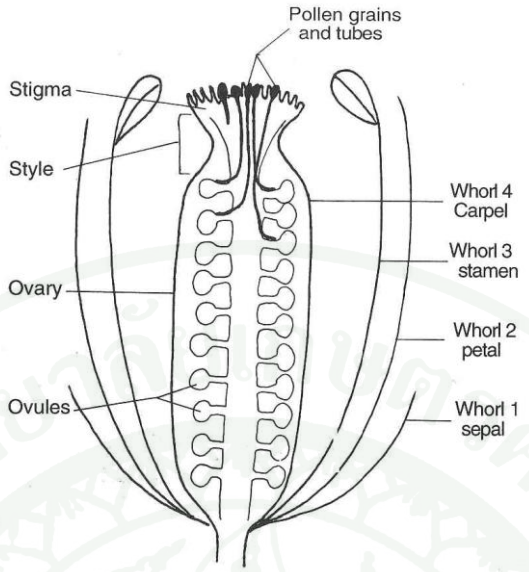
ที่มา: Taiz (2006)



ภาพผนวกที่ จ2 เปรียบเทียบความกว้างที่มีผลต่อการแสดงออกของแต่ละยีนในการสร้างดอก

ที่มา: Anderson and Roberts (1998)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ จ3 โครงสร้างและส่วนประกอบของดอกอะราบิดอปซิส

ที่มา: Anderson and Roberts (1998)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ฉ

ขั้นตอนการดูแลตลอดจนการเก็บเมล็ด ต้นอะราบิดอปซิส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ขั้นตอนการปลูก ดูแล และเก็บผลผลิตต้นอะราบิดอปซิส (Martinez-Zapater and Salinas., 1998)

ในการปลูกต้นอะราบิดอปซิส วัสดุที่ใช้ในการปลูกประกอบด้วย perlite, vermiculite และพีทมอสในการเตรียมถาด และแผนในการปลูก

1. อบฆ่าเชื้อดิน 30 นาที เพื่อฆ่าแมลงหรือสัตว์ที่อยู่ภายในดิน
2. อบให้ดินแห้งสนิท

การดูแลพืชระหว่างที่เจริญเติบโต

ภายใต้แสงที่ให้อย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส, ปริมาณน้ำที่เพียงพอ และสารอาหารเมล็ดสายพันธุ์ Columbia จะเริ่มพัฒนาตั้งแต่ช่วง 3-5 วัน หลังจากลงปลูก, จะมีการสร้างrosettes และสร้างดอกภายใน 3-4 สัปดาห์ และสามารถเก็บเกี่ยวได้ภายใน 8 สัปดาห์

แสง

ระดับแสงที่เหมาะสม คือ ประมาณ 150 ME/m^2/s. Cool white และช่วงเวลาของแสงที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตคือ การให้แสงอย่างต่อเนื่องนาน 16 ชั่วโมง

อุณหภูมิ

ต้นอะราบิดอปซิสจะเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หากต่ำกว่านี้เล็กน้อยก็สามารถทนได้ แต่หากถ้าอุณหภูมิสูงกว่านี้จะทำให้มีผลต่อการพัฒนาของ rosette สามารถทดลองอุณหภูมิได้สูงที่สุด 30 องศาเซลเซียส แต่ถ้าหากปรับอุณหภูมิให้ได้อยู่ในช่วง 23 องศาเซลเซียส ได้อยู่ในช่วงที่ดีมาก

น้ำและความชื้น

ภายหลังจากการงอกปริมาณน้ำจะเป็นสิ่งที่ต้องการ เนื่องจากน้ำมีผลทำให้เกิดสภาวะเครียด แต่ปริมาณน้ำที่มากเกินไปจะทำให้เกิดการเจริญของ algal หรือ fungal อยู่บริเวณ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผิวดิน ภายหลังจากพืชมีการสร้างใบแท้ อาจจะลดความถี่ของการให้น้ำเหลือ 1 ครั้งต่อสัปดาห์ จนกระทั่งพืชมีการสร้างดอก ความชื้นที่เหมาะสมสำหรับคุณภาพของเมล็ดจะต่ำกว่า 50% จะดีที่สุด เมื่อฝักเริ่มมีการพัฒนา

ในการเก็บเกี่ยวเมล็ด

เมล็ดจากฝักสามารถเก็บเกี่ยวได้ภายหลังจากที่ฝักเปลี่ยนเป็นสีเหลือง เนื่องจากเมล็ดจะมีระดับของการยับยั้งการงอกได้สูง โดยปกติการเก็บเกี่ยวเมล็ดจะทำหลังจากฝักเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและไม่ควรนำนิ้วไปบีบกด เพราะจะทำให้เกิดการแตกกระจายของเมล็ด ควรนำถุงมาหุ้มทั้งต้น ทิ้งไว้จน ทั้งต้นแห้ง จากนั้นใช้มือบีบเบาๆ ทั่วภายนอกถุง เพื่อให้เมล็ดแยกออกจากฝัก นำเมล็ดมาเก็บใส่ภาชนะที่แห้ง

การทำให้เมล็ดแห้ง

ความชื้นภายหลังจากเก็บเมล็ดอะราบิดอปซิส จะอยู่ประมาณ 10% แต่การเก็บรักษาควรเก็บให้ความชื้นอยู่ในช่วง 5-6% เพราะหากเก็บไว้ที่ความชื้นสูงจะทำให้เมล็ดเสื่อมคุณภาพลง โดยการทำให้ความชื้นต่ำลงโดย Air-dry เมล็ดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1-3 สัปดาห์

การเก็บรักษาเมล็ด

ภายหลังจากความชื้นภายในเมล็ดอยู่ในช่วงที่เหมาะสมแล้ว ควรนำมาเก็บในภาชนะที่แห้งและซีล เพื่อป้องกันความชื้นเพิ่มขึ้นปริมาณของเมล็ดที่เก็บได้มีประมาณ 1,250 เมล็ด เท่ากับ 25 กรัม = 50 มิลลิลิตร สำหรับการเก็บรักษาเมล็ดภายหลังจากการกำจัดความชื้น หากเก็บในระยะเวลาสั้น ควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้ถึง 5 ปี แต่หากต้องการเก็บระยะเวลานาน สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ควรให้แห้งสนิท หรือ ห่อหุ้มด้วยเจลาติน ที่เก็บในขวดแก้ว จะสามารถเก็บได้นานถึง 10 ปี หากนำเมล็ดที่เก็บรักษามาใช้ควรจะทำการ Break Dormancy ซึ่งเป็นสิ่งที่สำคัญสำหรับการนำมาปลูกเพื่อที่จะให้เมล็ดมีสภาวะที่เหมาะกับการเจริญเติบโตได้เต็มที่ และปริมาณการผลิตภายหลังจากกิจกรรมของเซลล์ถูกหยุดทำงานมานาน โดยการนำเมล็ดมาแช่น้ำแล้วเก็บไว้ในอุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส นาน 2-4 วัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ช

วิธีเตรียมสาร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. LB medium (ปริมาตร 1 ลิตร)

น้ำกลั่น	950	มิลลิลิตร
Tryptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
NaCl	10	กรัม

ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับ pH = 7.0 ถ้าเป็นอาหารแข็งเติม ผงวุ้นลงไป 15 กรัม แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)

2. การเตรียมเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้าน (competent cell)

นำเชื้ออีโคไล สายพันธุ์ DH5∝ ที่เก็บรักษาใน -80 องศาเซลเซียส มาแยกเชื้อให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยว จากนั้นเขี่ยโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหาร LB 3 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จากนั้นดูดเชื้อมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหาร LB 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาทีลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{600} 0.3 - 0.4 จากนั้นแบ่งเชื้อแยกมาใส่หลอดละ 25 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด นำไปปั่นเหวี่ยง 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทของเหลว ทิ้ง เติม $CaCl_2$ 0.1 โมลาร์ ลงไป 10 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ วางบนน้ำแข็ง 20 นาที แบ่งเซลล์ที่ได้ 100 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แช่ไนโตรเจนเหลว จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่ -80 องศาเซลเซียส

3. เตรียมเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้าน *Agrobacterium Tumefaciens* สายพันธุ์ EHA 105

นำต้นเชื้อมาแยกให้ได้เป็นโคโลนีเดี่ยว บนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะไรแฟมฟิซินเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 28 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน จากนั้นเลือกโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะไรแฟมฟิซินเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 2 วัน เมื่อครบเวลาให้ดูดเชื้อมา 100 ไมโครลิตร มาเลี้ยงในอาหาร LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 4 ชั่วโมง ให้ได้ค่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การดูดกลืนแสงที่ OD_{600} 0.4 - 0.5 จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อเก็บเกี่ยวเซลล์ เทสารละลายทิ้ง เติม NaCl ที่แช่เย็น เข้มข้น 200 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทสารละลายทิ้ง จากนั้นเติม $CaCl_2$ ที่แช่เย็นเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำมาแช่ในน้ำแข็งนาน 60 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 7,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทสารละลายทิ้ง จากนั้น เติม $CaCl_2$ ที่แช่เย็น เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1,600 ไมโครลิตร และเติม Glycerol เข้มข้น 30%W/W ปริมาตร 1,200 ไมโครลิตร แบ่งใส่หลอดๆ ละ 100 ไมโครลิตร นำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว จากนั้นเก็บรักษาไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส

5. Hao buffer (ปริมาตร 50 มิลลิลิตร)

CTAB	1	กรัม
1 M Tris-HCl pH 8.0	7.2	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA	2	มิลลิลิตร
5 M NaCl	20	มิลลิลิตร
DEPC-water	26	มิลลิลิตร

ก่อนใช้เติม PVP-90 0.5 กรัม และ 2-mercaptoethanol 1 มิลลิลิตร

6. สารละลาย 1M Tris-HCl pH 8.0

ตวง Tris base ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.1N NaCl ปริมาตร 9.2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ sterile และทำการปรับ pH ให้ได้ 8.0

7. สารละลาย 0.5 M EDTA pH 8.0

ชั่งสาร EDTA 18.164 กรัม ละลายด้วยน้ำ sterile ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และทำการปรับ pH ให้ได้ 8.0

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8. สารละลาย 5 M NaCl

ชั่งสาร NaCl 29.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นให้ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิลิตร นำสารละลายที่เตรียมได้ทำการฆ่าเชื้อโดยการ autoclave ที่ความดัน 15 psi อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

9. 10X TBE buffer (ปริมาตร 1 ลิตร)

ชั่งสาร Tris base 108 กรัม และ Boric acid 55 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วเติม sterile 40 มิลลิลิตร ของ 500 mM EDTA pH 8.0 ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น sterile

10. 0.5X buffer (ปริมาตร 1 ลิตร)

ตวง 10X TBE buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมด้วยน้ำกลั่น sterile ปริมาตร 950 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

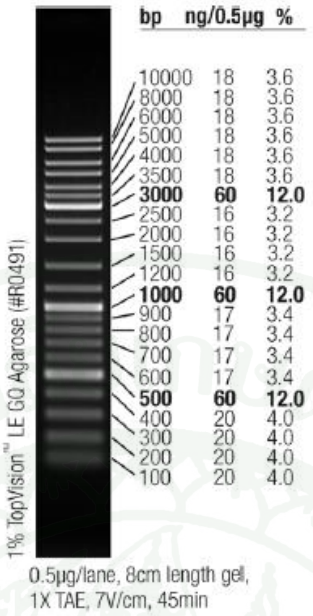
11. สารละลาย 0.1 M $CaCl_2$

ชั่งสาร $CaCl_2$ 0.56 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 30 ml จากนั้นปรับปริมาตร ให้ได้ 50 ml ด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายที่เตรียมได้ทำการฆ่าเชื้อโดยการ autoclave ที่ความดัน 15 psi, 121^{o}C นาน 15 นาที

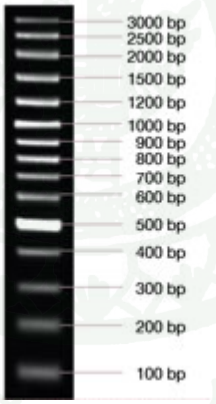
12. Ethidium bromide (10 mg/ml) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ละลาย Ethidium bromide 1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดกล่องหรือภาชนะที่หุ้มด้วยอลูมิเนียมฟรอย เก็บที่อุณหภูมิห้อง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ ช1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษา คือ Fermentas GeneRuler™ 1 Kb Ladder (Fermentus, USA)



ภาพผนวกที่ ช2 แถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้ในการศึกษา คือ VC 100 bp Plus DNA Ladder (Vivantis, Canada)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

12. สารอาหารเสริมสำหรับต้นอะราบิดอปซิส (ปริมาตร 1 ลิตร: ความเข้มข้น 10X)

KNO_3	6.32	กรัม
KH_2PO_4 pH 6.5	4.25	กรัม
$MgSO_4$	12.32	กรัม
$Ca(NO_3)_2$	5.91	กรัม

ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ปรับ pH = 6.5 เมื่อนำมาใช้จะนำไปเจือจางให้เหลือความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1X โดยนำมา 100 มิลลิลิตร ละลายลงในน้ำประปา 900 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ช3 สารเคมีในอาหารสังเคราะห์สูตร MS (Murashige and Skoog, 1962)

สารเคมี	ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)
Macroelements	
NH_4NO_3	1650.0
KNO_3	1900.0
$CaCl_2.2H_2O$	440.0
$MgSO_4.7H_2O$	370.0
KH_2PO_4	170.0
Microelements	
Na_2EDTA	37.3
$FeSO_4.7H_2O$	27.8
H_3BO_3	6.2
$MnSO_4.4H_2O$	22.3
$ZnSO_4.2H_2O$	8.6
KI	0.85
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
Organic compounds	
Myo-inositol	100.0
Glycine	2.0
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxin-HCL	0.5
Thaimine-HCL	0.5

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ -นามสกุล	นายเฉลิมพล ศรีอดุลย์พันธุ์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 22 กรกฎาคม 2527
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	ปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะเทคโนโลยีชีวภาพ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยรังสิต
ตำแหน่งหน้าที่การงาน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์