



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม)

ปริญญา

พันธุวิศวกรรม

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง

การถ่ายยีน (*E*)- β -farnesene synthase จากสะระแหน่ (*Mentha cordifolia* Opiz.)
เข้าสู่ยาสูบ (*Nicotiana tabacum*)

Genetic Transformation of (*E*)- β -farnesene Synthase from Mint (*Mentha cordifolia* Opiz.)
into Tobacco (*Nicotiana tabacum*)

นามผู้วิจัย

นางสาวกตัญญูทิศา คำช่วย

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ศรีเมธ งามโพธิ์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์อำไพพรรณ ภราดรรัตน์, วท.ค.)

ประธานสาขาวิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริวรรณ พราพงษ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การถ่ายยีน (*E*)- β -farnesene synthase จากสะระแหน่ (*Mentha cordifolia* Opiz.)
เข้าสู่ยาสูบ (*Nicotiana tabacum*)

Genetic Transformation of (*E*)- β -farnesene Synthase from Mint
(*Mentha cordifolia* Opiz.) into Tobacco (*Nicotiana tabacum*)

โดย

นางสาวกตัญญูทิศา คำช่วย

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม)

พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กัตัญญชิตา คำช่วย 2554: การถ่ายยีน (*E*)-β-farnesene synthase จากสระระแห่น (*Mentha cordifolia* Opiz.) เข้าสู่ยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม) สาขาพันธุวิศวกรรม โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์ศรีเมฆ ชาวโพรง, Ph.D. 82 หน้า

การถ่ายยีน (*E*)-β-farnesene synthase (*TSPA11*) ซึ่งควบคุมการสร้างสาร (*E*)-β-farnesene ที่สระระแห่น ผลิตขึ้นเพื่อเลียนแบบฟีโรโมนเดือนกษัยในเปลี่ยอ่อนเข้าสู่ยาสูบ ยีน *TSPA11* จาก RNA รวมทั้งสกัดจากใบของ สระระแห่น ถูกสังเคราะห์ผ่าน cDNA และผลิตคณท์พีซีอาร์ด้วยเทคนิค One Step RT-PCR จากฟอร์เวอร์ส ไพรมเมอร์ FarX1 และรีเวอร์สไพรมเมอร์ Far2B ที่ได้เพิ่มตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Bam*HI ที่ปลาย 5' ของไพรมเมอร์ทั้งคู่ จากนั้นนำผลิตคณท์พีซีอาร์เชื่อมเข้ากับโคลนนิ่งเวกเตอร์ PCR[®]/GW/TOPO[®] และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ายีน *TSPA11* มีนิวคลีโอไทด์ขนาด 1,662 คู่เบส ที่แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน ขนาด 553 หน่วย ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนที่โคลนได้มีความคล้ายคลึงกับยีน *TSPA11* ที่รายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank จึงได้สร้างไบนารีเวกเตอร์ pCAMBIA23Far โดยตัดยีน *TSPA11* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Bam*HI จากโคลนนิ่งเวกเตอร์เข้าสู่ไบนารีเวกเตอร์ pCAMBIA2311 แทนที่ *cp* ยีน ภายใต้การควบคุมของ CaMV35S promoter และ NOS terminator แล้วนำเข้า *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 เพื่อใช้ในการถ่ายยีน *TSPA11* เข้าสู่ยาสูบใบใหญ่ โดยการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนใบ ยาสูบร่วมกับเชื้อเป็นเวลา 3 วัน คัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ดัดแปลง ที่มี naphthaleneacetic acid (NAA) 0.1 mg/L, benzyladenine (BA) 1 mg/L cefotaxime 200 mg/L และ geneticin 50 mg/L พบว่าได้ยอดที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ geneticin ในระยะเวลา 8 สัปดาห์ ทั้งหมด 47 line คิดเป็น ร้อยละ 30 (46/181) และตรวจพบการสอดแทรกของยีน *TSPA11* เข้ากับจีโนมของยาสูบทั้งการตรวจสอบด้วย วิธี Polymerase Chain Reaction และวิธี Dot blot hybridization ในยาสูบที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือกทุก line รวมทั้งตรวจพบการแสดงออกของยีน *TSPA11* โดยวิธี real-time qRT-PCR ในยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนที่สุ่ม เลือกมาในระดับแตกต่างกัน ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยจะนำไปสู่การพัฒนาถ่ายยีน *TSPA11* เข้าสู่พืชที่ปลูกเพื่อ การค้าชนิดอื่น เพื่อให้พืชนั้นผลิตฟีโรโมนเดือนกษัย (*E*)-β-farnesene ขับไล่เปลี่ยอ่อนที่เป็นแมลงพาหะของ ไวรัสพืชไม่ให้เข้าใกล้ เพื่อผลในการลดการระบาดของโรคไวรัสในพืชต่อไป

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Katanyutita Damchuay 2011: Genetic Transformation of (*E*)- β -farnesene Synthase from Mint (*Mentha cordifolia* Opiz.) into Tobacco (*Nicotiana tabacum*). Master of Science (Genetic Engineering), Major Field: Genetic Engineering, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Mr. Srimek Chowpongpan, Ph.D. 82 pages.

The genetic transformation of encoded (*E*)- β -farnesene synthase (*TSPA11*) which catalyzes the synthesis of (*E*)- β -farnesene in mint that mimics the aphid alarm pheromone was transformed into tobacco plant. *TSPA11* was isolated from total RNA extracted from mint *via* cDNA using One Step RT-PCR with specific primers FarX1 and Far2B that contained the *Xba*I and *Bam*HI recognition sites, respectively. The PCR product was cloned into PCR[®] 8/GW/ TOPO[®] cloning vector followed by DNA sequencing. The cloned gene contained 1,662 bp and 553 deduced amino acids, and its nucleotide sequence was similar to *TSPA11* existed in GenBank. The inserted *TSPA11* was excised from cloning vector by *Xba*I and *Bam*HI digestion and ligated into binary vector pCAMBIA 2311 under the control of CaMV35S promoter and NOS terminator. The recombinant was named pCAMBIA23Far. The resulting construct was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* AGL-1 for transferring the *TSPA11* into tobacco. Leaf explants were cocultivated for 3 days and selected on MS medium supplement with naphthaleneacetic acid (NAA) 0.1 mg/L, benzyladenine (BA) 1 mg/L, cefotaxime 200 mg/L and geneticin 50 mg/L. Shoots regeneration appeared within eight weeks on selective media containing geneticin. Forty seven transformation lines were achieved with 30% (47/181) transformation rate. The *TSPA11* transgene integration into tobacco genome was determined by PCR and DNA dot blot hybridization. The result showed that all transgenic lines were positive for *TSPA11*. The expression level was evaluated by real-time qRT-PCR, and shown that *TSPA11* expression was variously expressed. The information from this study will be used to apply the property of *TSPA11* from mint to other important economic crops enabling the production of (*E*)- β -farnesene that repels aphids, the major insect vectors of many plant viruses minimizing the yield losses.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ดร. ศรีเมฆ ชาวโพรง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักเป็น
อย่างยิ่งที่กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้เป็นอย่างดี
ขอขอบคุณ รศ. ดร. อำไพวรรณ ภราดรวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รศ. ดร. สุพัฒน์
อรรถธรรม ประธานการสอบและอาจารย์ดร. สิทธิรักษ์ รอยตระกูล ผู้ทรงคุณวุฒิในการสอบ
ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณดร. ขนิษฐา วงศ์พัฒนารัตน์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และเครื่องมืออุปกรณ์
ในการวิเคราะห์การแสดงผลของยีน

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และ โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต
สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีที่สนับสนุน
ทุนอุดหนุนสำหรับงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ได้อบรมและให้กำลังใจผู้วิจัยมาตลอดในทุกเรื่อง
ด้วยความดีหรือประโยชน์อันใดเนื่องจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่ คุณพ่อและคุณแม่

ขอบคุณ น้องชายและน้องสาว ตลอดจนญาติพี่น้องทุกคนที่คอยห่วงใยและเป็นกำลังใจ
ตลอดมา ขอขอบคุณ สมาชิกในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุลภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือและให้คำปรึกษาในการทำงาน รวมทั้งเพื่อนทุกคน
ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจระหว่างทำการทดลองจนสำเร็จตามความมุ่งหมาย

กตัญญูทิตา คำช่วย

พฤษภาคม 2554

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	18
อุปกรณ์	18
วิธีการ	22
ผลและวิจารณ์	38
สรุป	64
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	66
ภาคผนวก	73
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	82

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างไวรัสพืชที่ถ่ายทอดโรคโดยเพลี้ยอ่อนพาหะ	6
2	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>TSPA11</i> จากสระระแห่นกับลำดับกรดอะมิโนที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้เมนู blastn	49
3	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>TSPA11</i> จากสระระแห่นกับลำดับกรดอะมิโนที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้เมนู blastp	50
4	การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>TSPA11</i> จากสระระแห่นกับลำดับกรดอะมิโนที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank โดยการเปรียบเทียบค่า distance ของสายวิวัฒนาการ	51
5	ประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่ใบยาสูบสายพันธุ์ White Burley โดยใช้เชื้อ <i>Agrobacterium</i> ที่มีพลาสมิด pCAMBIA23Far หลังการคัดเลือกบนอาหารคัดเลือก	57
ตารางผนวกที่		
1	องค์ประกอบสารละลาย ที่ 1 สูตรอาหารตัดแปลง MS	77
2	องค์ประกอบสารละลาย ที่ 2 สูตรอาหารตัดแปลง MS	78
3	องค์ประกอบสารละลาย ที่ 3 สูตรอาหารตัดแปลง MS	78
4	องค์ประกอบสารละลาย ที่ 4 สูตรอาหารตัดแปลง MS	78
5	องค์ประกอบสารละลาย ที่ 5 สูตรอาหารตัดแปลง MS	79
6	องค์ประกอบสารละลาย ที่ 6 สูตรอาหารตัดแปลง MS	79
7	สูตรอาหาร MS ดัดแปลง สำหรับ co-cultivation	80
8	สูตรอาหาร MS ดัดแปลง สำหรับชักนำให้เกิดยอดในขั้นตอนการคัดเลือกเนื้อเยื่อยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน	81

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1	5
2	10
3	39
4	41
5	42
6	43
7	44
8	45
9	46
10	46
11	51
12	52
13	53
14	54

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
15 การตรวจสอบการถ่ายโอนเวกเตอร์ pCAMBIA23Far เข้าสู่เชื้อ <i>Agrobacterium</i> สายพันธุ์ AGL-1 ด้วยวิธีพีซีอาร์	55
16 ลักษณะของชิ้นใบยาสูบหลังการคัดเลือกบนอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 2 สัปดาห์	57
17 ลักษณะต้นกล้ายาสูบ อายุ 5 สัปดาห์ที่ได้รับการถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือกหลังเพาะเลี้ยงให้เกิดรากและเพิ่มการเจริญเติบโต	58
18 การตรวจสอบการสอดแทรกของยีน <i>TSPA11</i> เข้าสู่จีโนมของยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน ด้วยวิธีพีซีอาร์	59
19 การตรวจสอบการสอดแทรกของยีน <i>TSPA11</i> เข้าสู่จีโนมของยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน โดยวิธี Dot blot hybridization ด้วยโพรบ <i>TSPA11</i> -DIG	60
20 Melting curve แสดงค่า melting temperature (T_m) ของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน (<i>E</i>)- β -farnesene synthase (<i>TSPA11</i>) และยีน <i>EPSPS</i>	62
21 การแสดงออกของยีน <i>TSPA11</i> ในยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนและยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมคือ ยีน <i>EPSPS</i> ด้วยวิธี Relative Real-time RT-PCR	63

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

BA	=	benzyladenine
bp	=	base pair
°C	=	Degree celsius
CaCl ₂	=	Calcium chloride
cDNA	=	Complementary DNA
CDP-Star	=	Disodium 4-chloro-3-(methoxyspiro {1, 2-dioxetane-3, 2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}] decan} -1-4-yl) phenyl phosphate
dH ₂ O	=	Distilled water
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	=	Deoxyribonucleotide triphosphate
DIG	=	Digoxigenin
<i>E</i> βf	=	(<i>E</i>)-β-farnesene
EBI	=	European Bioinformatics Institute
EDTA	=	Ethylenediaminetetraacetic acid
<i>E. coli</i>	=	<i>Escherichia coli</i>
HCl	=	Hydrochloric acid
mg	=	milligram
mg/L	=	milligram per litre
mg/ml	=	milligram per milliliter
ml	=	milliliter
M	=	molar
mM	=	millimolar
μM	=	micromolar
NAA	=	naphthaleneacetic acid
ng	=	nanogram
NaCl	=	Sodium chloride
NaI	=	Sodium iodide
ORF	=	Open Reading Frame

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

PCR	=	Polymerase chain reaction
pmol	=	picomole
PVP	=	Polyvinyl pyrrolidone
Rpm	=	Revolution per minute
RT-PCR	=	Reverse transcription polymerase chain reaction
SDS	=	Sodium dodecyl sulfate
SSC	=	Sodium Chloride-Sodium Citrate buffer
TAE	=	Tris-acetate-EDTA
TE	=	Tris-EDTA
Tris-HCl	=	(Tris-Hydrochloride)
UV	=	Ultraviolet

การถ่ายยีน (*E*)- β -farnesene synthase จากสะระแหน่ (*Mentha cordifolia* Opiz.)
เข้าสู่ยาสูบ (*Nicotiana tabacum*)

Genetic Transformation of (*E*)- β -farnesene Synthase from Mint
(*Mentha cordifolia* Opiz.) into Tobacco (*Nicotiana tabacum*)

คำนำ

เพลี้ยอ่อนเป็นแมลงในกลุ่มปากดูดที่อยู่ในวงศ์ Aphididae แมลงในกลุ่มนี้มีหลายชนิดด้วยกัน เช่น เพลี้ยอ่อนถั่ว (*Aphis craccivora*) เพลี้ยอ่อนยาสูบ (*Myzus persicae*) และเพลี้ยอ่อนฝ้าย (*Aphis gossypii*) เป็นต้น เพลี้ยอ่อนนับได้ว่าเป็นแมลงศัตรูพืชที่สำคัญชนิดหนึ่ง เนื่องจากมีความสามารถถ่ายทอดไวรัสพืชหลายกลุ่ม เช่น Cucumovirus, Carlavirus, Caulimovirus และ Potyvirus โดยเฉพาะไวรัสในกลุ่ม Potyvirus ซึ่งมีมากถึง 91 ชนิดที่รายงานว่ามีการถ่ายยีนเป็นแมลงพาหะ (NG และ Perry, 2004) คุณสมบัติที่ทำให้เพลี้ยอ่อนเป็นพาหะของเชื้อไวรัสที่มีศักยภาพคือรูปร่างของปากเป็นแบบปากเจาะดูด แพร่พันธุ์โดยการออกลูกเป็นตัวจึงเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็ว มีขนาดเล็กสามารถเคลื่อนย้ายโดยอาศัยลมพัดพาไปได้ง่าย อีกทั้งในระยะตัวเต็มวัยสามารถสร้างปีกได้ ทำให้เพลี้ยอ่อนบินไปดูดกินพืชอาศัยในระยะทางไกล และส่วนใหญ่เพลี้ยอ่อนชอบพืชที่มีสีอ่อนไปทางสีเหลือง ดังนั้นพืชที่เป็นโรคเกิดจากไวรัสมักมีใบสีเหลือง จึงดึงดูดให้เพลี้ยอ่อนเข้ามาดูดกิน เป็นปัจจัยส่งเสริมให้โรคระบาดได้มากยิ่งขึ้น (สุพัฒน์, 2552)

จากการศึกษาของ Beale *et al.* (2006) พบว่าเมื่อเพลี้ยอ่อนถูกโจมตีจากผู้ล่าหรือแมลงตัวห้ำ จะหลั่งฟีโรโมนเตือนภัยซึ่งประกอบด้วยสาร (*E*)- β -farnesene (EBF) เป็นผลให้เพลี้ยอ่อนตัวอื่น ๆ ในกลุ่มหยุดกินอาหารแล้วเคลื่อนย้ายไปที่อื่น นอกจากนี้สารดังกล่าวทำหน้าที่เป็น kairomone ดึงดูดความสนใจของแมลงตัวห้ำ มีรายงานว่าพบสาร EBF ใน essential oil ของพืชหลายชนิด เช่น สนมารีไทม์ แครอท มันฝรั่ง องุ่น และเปปเปอร์มินต์ (*Mentha x piperita*) เป็นต้น Crock *et al.* (1997) จึงได้ศึกษาการโคลนยีนและแสดงออกของยีน (*E*)- β -farnesene synthase ที่แปลรหัสเป็นเอนไซม์ (*E*)- β -farnesene synthase ทำหน้าที่เปลี่ยนสารตั้งต้น farnesyl diphosphate (FPP) ให้เป็นสาร EBF จาก expressed sequence tags (ESTs) ของเซลล์ต่อมน้ำมัน (oil gland) ที่แยกได้จากเปปเปอร์มินต์ (*Mentha x piperita*) พบว่ารีคอมบิแนนท์เอนไซม์

ที่ผลิตได้สามารถเปลี่ยน FPP เป็น (*E*)- β -farnesene (98%) และ (*Z*)- β -farnesene (2%) เมื่อใช้ Mg^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์

การป้องกันการคุกคามของเพ็ลลีย่อนเป็นประโยชน์โดยตรงต่อการปลูกพืช ขณะเดียวกันมีผลทางอ้อมต่อการลดการแพร่ระบาดของโรคไวรัสที่มีเพ็ลลีย่อนเป็นพาหะ จึงมีแนวคิดที่จะแยกสกัดยีนที่สร้างฟิโรโมนเตือนภัยในเพ็ลลีย่อนจากสระแทนพืชสกุลเดียวกับเปปเปอร์มิน์ และถ่ายยีนเข้าสู่ยาสูบซึ่งเป็นพืชต้นแบบที่นิยมใช้ในการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ เพื่อประโยชน์ในการศึกษาถึงศักยภาพของยีน (*E*)- β -farnesene synthase (*TSPA11*) ที่ผลิตสาร (*E*)- β -farnesene ในการจับไล่เพ็ลลีย่อน ข้อมูลที่ได้จะสามารถนำไปสู่การพัฒนาพันธุ์พืช โดยการถ่ายยีนดังกล่าวเข้าสู่พืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เพื่อผลในการควบคุมโรคไวรัสที่มีเพ็ลลีย่อนเป็นแมลงพาหะต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาวิธีการโคลนยีน (*E*)- β -farnesene synthase จากสาระแหน่
2. เพื่อถ่ายยีน (*E*)- β -farnesene synthase จากสาระแหน่ เข้าสู่ยาสูบโดยใช้เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens*
3. ศึกษาการแสดงออกของยีน (*E*)- β -farnesene synthase ในยาสูบตัดแปลงพันธุกรรม



การตรวจเอกสาร

1. เพลี้ยอ่อน

เพลี้ยอ่อนเป็นแมลงกลุ่มปากดูด อยู่ในอันดับ *Hemiptera* และวงศ์ *Aphididae* มีด้วยกันหลายชนิด เช่น เพลี้ยอ่อนถั่ว (*Aphis craccivora*) เพลี้ยอ่อนยาสูบ (*Myzus persicae*) และเพลี้ยอ่อนฝ้าย (*Aphis gossypii*) เป็นต้น เป็นแมลงขนาดเล็ก ลำตัวอ่อนนุ่ม เคลื่อนไหวช้า หัวและอกมีขนาดเล็ก ส่วนท้องโต มีรูปร่างคล้ายผลฝรั่ง และจะมีท่อเล็ก ๆ ยื่นยาวออกมา 2 ท่อ เรียกว่า cornicles (อรนุช และวีชรา, 2540)

2. อนุกรมวิธานของเพลี้ยอ่อน

อนุกรมวิธานของเพลี้ยอ่อนมีรายงานไว้ในฐานข้อมูล Integrated Taxonomic Information System (ITIS) (Bisby *et al.*, 2008) ดังต่อไปนี้คือ

Kingdom: *Animalia*

Phylum: *Arthropoda*

Class: *Insecta*

Order: *Hemiptera*

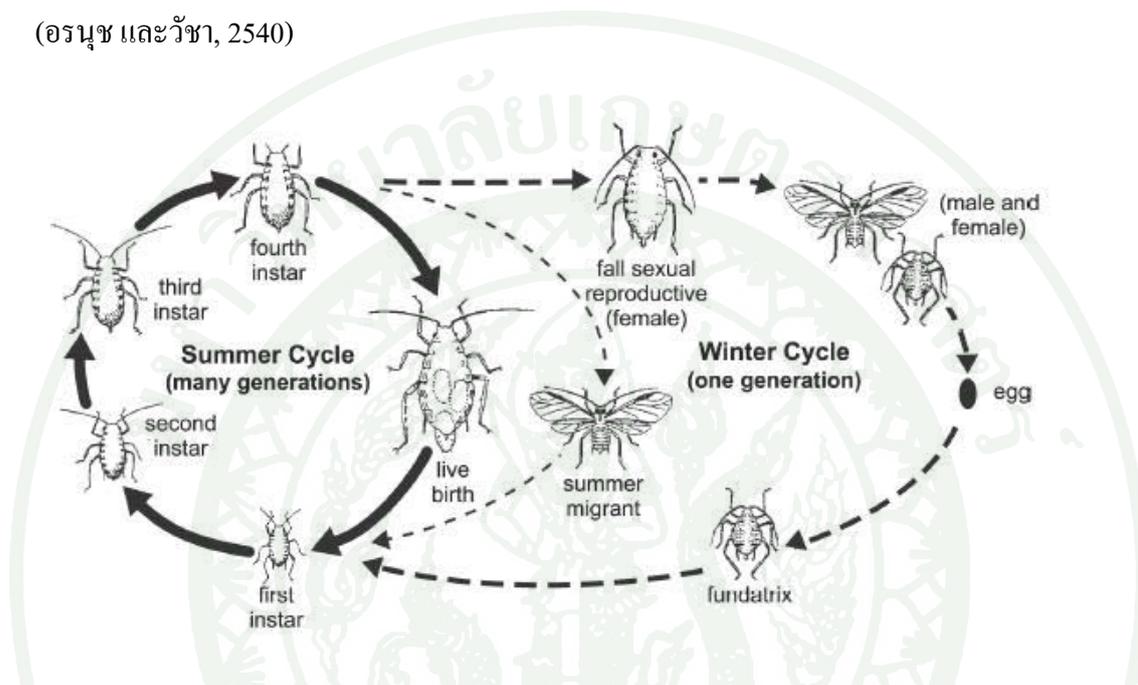
Superfamily: *Aphidoidea*

Family: *Aphididae*

3. วงจรชีวิต

เพลี้ยอ่อนมีการสืบพันธุ์ได้ 2 ระบบ ขึ้นอยู่กับลักษณะของภูมิอากาศคือ 1) alternation of generation เกิดในประเทศแถบอบอุ่น มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศในฤดูใบไม้ร่วงโดยวางไข่ไว้ตามต้นพืชและอยู่ข้ามฤดูหนาวบน primary host สลับกับการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศบน secondary host ในฤดูกาลอื่น 2) Parthenogenesis เกิดในแถบประเทศเขตร้อน ซึ่งในประเทศไทยพบมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเพียงอย่างเดียวตลอดปี (Dixon, 1973) สำหรับการขยายพันธุ์โดยการออกลูกเป็นตัวโดยไม่ต้องผสมพันธุ์ (parthenogenesis) ตัวอ่อนที่ออกมาใหม่ ๆ จะมีขนาดเล็ก

มากมองเห็นเพียงจุดสีเหลืองอ่อน ๆ ตัวเต็มวัยพบทั้งชนิดมีปีกและไม่มีปีก ชนิดที่ไม่มีปีกลอกคราบไม่เกิน 4 ครั้ง ส่วนชนิดมีปีกลอกคราบ 5 ครั้ง ก็จะเจริญเป็นตัวเต็มวัยที่สมบูรณ์ เพื่อบินไปหาอาหารแหล่งใหม่เมื่อมีพืชอาหารไม่เพียงพอ ระยะในการพัฒนาจากตัวอ่อนเป็นตัวเต็มวัยใช้เวลาประมาณ 12 วัน ตัวเต็มวัยจะเริ่มออกลูกทันที ประมาณ 1-6 ตัวต่อวัน คิดเป็นปริมาณเพลี้ยอ่อน 10-67 ตัวต่อช่วงชีวิตของเพลี้ยอ่อนตัวเต็มวัยหนึ่งตัว ตัวเต็มวัยจะมีชีวิตอยู่ได้นาน 4-9 วัน (อรนุช และวิชา, 2540)



ภาพที่ 1 วงจรชีวิตของเพลี้ยอ่อน ที่จะมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศสลับกับการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (alternation of generation) ในประเทศเขตอบอุ่น และมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Parthenogenesis) ในประเทศเขตร้อน

ที่มา: Radcliffe *et al.* (1993)

4. ฤดูกาลระบาดและลักษณะการทำลาย

เพลี้ยอ่อนมักมีการระบาดในฤดูแล้งหรือเมื่อฝนแล้งหรือฝนทิ้งช่วงนาน ๆ สามารถสร้างความเสียหายให้กับพืชปลูกได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม ความเสียหายที่เกิดขึ้นโดยตรงคือ เพลี้ยอ่อนทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยจะดูดกินน้ำเลี้ยงผ่านทาง phloem บริเวณใต้ใบอ่อน ยอดอ่อน ลำต้น ช่อดอกและฝักอ่อน ทำให้บริเวณที่ถูกทำลายหงิกงอ ถ้าเข้าทำลายบริเวณยอดมาก ๆ จะทำให้ยอดชะงักการเจริญเติบโต เหี่ยวเฉาและเหลืองตายในที่สุด ถ้าทำลายดอกจะทำให้ดอกกระแกร็นไม่ติดผล ส่วนความเสียหายทางอ้อมคือ เพลี้ยอ่อนจะผลิต honeydew ปกคลุมใบพืช ทำให้เกิดราดำ

(sooty molds) ซึ่งทำให้พืชสูญเสียพื้นที่ใบในการสังเคราะห์แสง (Van Lenteren, 1990) อีกทั้งยังเป็นพาหะนำโรคไวรัสมาสู่พืชหลายชนิด (NG and Perry, 2004) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างไวรัสพืชที่ถ่ายทอดโรคโดยเพลี้ยอ่อนพาหะ

รูปแบบการถ่ายทอดโรค	วงศ์	สกุล	จำนวนชนิดของไวรัส	ชนิดของไวรัส
Noncirculative, Nonpersistent	Bromoviridae	Alfamovirus	1	Alfalfa mosaic virus
	Bromoviridae	Cucumovirus	3	Cucumber mosaic virus
	Comoviridae	Fabavirus	4	Broad bean wilt virus-1
	Potyviridae	Potyvirus	91	Potato virus Y
	Unassigned	Carlavirus	31	Carnation latent virus
Noncirculative, Semipersistent	Caulimoviridae	Caulimovirus	9	Cauliflower mosaic virus
	Closteroviridae	Closterovirus	8	Beet yellows virus
Circulative, Nonpropagative	Luteoviridae	Enamovirus	1	Pea enation mosaic virus 1
	Luteoviridae	Luteovirus	2	Barley yellow dwarf virus
	Luteoviridae	Polerovirus	5	Potato leaf roll virus
	Luteoviridae	Umbravirus	7	Carrot mottle virus
Circulative, Propagative	Rhabdoviridae	Cytorhabdovirus	8	Lettuce necrotic yellows virus

5. การถ่ายทอดโรคของเพลี้ยอ่อน

เพลี้ยอ่อนมีความเหมาะสมต่อการเป็นพาหะของเชื้อไวรัสด้วยสาเหตุหลายประการ เช่น รูปร่างลักษณะ โครงสร้างปากของเพลี้ยอ่อนซึ่งเป็นแบบปากเจาะดูด เพื่อดูดน้ำเลี้ยงจากเซลล์หรือท่ออาหารของพืช มีการแพร่พันธุ์โดยการออกลูกเป็นตัว (parthenogenesis) จึงสามารถเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็วและมีส่วนในการแพร่กระจายไวรัสได้อย่างกว้างขวาง เป็นแมลงขนาดเล็กจึงสามารถเคลื่อนย้ายโดยอาศัยลมพัดพาไปได้โดยง่าย รวมทั้งในวงจรชีวิตของเพลี้ยอ่อนระยะตัวเต็มวัยอาจสร้างปีก (winged หรือ alate aphid) ทำให้เพลี้ยอ่อนสามารถบินไปดูดกินพืชอาศัยได้ในระยะทางไกลกว่าประเภทที่ไม่มีปีก (Apterous aphid) ซึ่งเท่ากับเป็นการเพิ่มพื้นที่การระบาดของโรคไวรัส และส่วนใหญ่เพลี้ยอ่อนชอบพืชที่มีสีอ่อนไปทางสีเหลือง ดังนั้นพืชที่เป็นโรคเกิดจาก

ไวรัสมักมีใบสีเหลือง จึงดึงดูดให้เพลี้ยอ่อนเข้ามาดูดกิน เป็นปัจจัยส่งเสริมให้โรคระบาดได้มากยิ่งขึ้น (สุพรรณ, 2552)

6. ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อไวรัสกับเพลี้ยอ่อน

6.1 ไวรัสไม่คงอยู่ในตัวแมลง (non-persistent viruses)

หลังจากที่ได้รับเชื้อไวรัส เพลี้ยอ่อนสามารถถ่ายทอดไวรัสให้กับพืชต้นใหม่ได้ทันที ไวรัสที่แมลงได้รับมาจะค่อย ๆ หดหรือเจือจางลงไปจากตัวแมลง ทั้งนี้เพราะไวรัสที่เพลี้ยอ่อนได้รับในครั้งแรกนั้น จะติดอยู่เฉพาะที่บริเวณปลายปากของแมลง ไม่มีการเคลื่อนย้ายเข้าสู่ตัวแมลง (non-circulative viruses)

6.2 ไวรัสคงอยู่ในตัวแมลงเพียงชั่วคราว (semi-persistent viruses)

การคงอยู่ของไวรัสในตัวแมลงอาจเป็นเวลาหลายชั่วโมง หรือ 2-3 วัน แต่จะไม่มีการเคลื่อนย้ายเข้าสู่ภายในตัวแมลง

6.3 ไวรัสคงอยู่ในตัวแมลง (persistent viruses)

หลังจากเพลี้ยอ่อนได้รับไวรัสจากต้นพืชที่เป็นโรค ไวรัสประเภทนี้สามารถคงอยู่ในตัวเพลี้ยอ่อนได้เป็นระยะเวลาอันยาวนานหรือตลอดชีวิตของแมลง สาเหตุเพราะไวรัสมีการเคลื่อนย้ายเข้าสู่ตัวแมลง (circulative viruses) โดยเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารของแมลง แล้วผ่านออกมาจากตัวเพลี้ยอ่อนทางน้ำลาย และเข้าสู่พืชต้นใหม่เมื่อแมลงดูดกินพืชต้นนั้น ทั้งนี้เชื้อไวรัสที่เคลื่อนย้ายเข้าสู่ตัวแมลง อาจจะไม่มีการเพิ่มปริมาณ (non-propagative) หรือเพิ่มปริมาณในตัวแมลงพาหะ (propagative) ก็ได้ (NG and Perry, 2004; Racciah and Fereres, 2009)

7. การปรับตัวร่วมกันระหว่างพืช แมลงศัตรูพืชและศัตรูของแมลงศัตรูพืช

พืชมีกลไกในการป้องกันตัวเองให้รอดพ้นจากการเข้าทำลายของแมลง โดยจะมีการปรับตัวทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และโครงสร้างบางประการ ให้เป็นอุปสรรคกับแมลงในด้านการผสมพันธุ์ การวางไข่ การกินอาหาร และการย่อยอาหาร เป็นต้น กลไกเหล่านี้ทำให้พืชรอดพ้นจากการเข้าทำลายของแมลงและยังทำให้พืชปลอดภัยจากโรคที่มีแมลงเป็นพาหะได้อีกด้วย เช่น มีรายงานว่าขี้ผึ้งและไข (wax) ในพืช เป็นตัวขัดขวางการเคลื่อนที่ การวางไข่ และการกินอาหารของแมลง ดังเช่นในข้าวสาลีพันธุ์ Vel ซึ่งมีขนบนผิวใบ จะมีความต้านทานต่อการเข้าทำลายของเพลี้ยอ่อนข้าวสาลี ได้สูงกว่าข้าวสาลีพันธุ์ Arthur ที่มีผิวใบเรียบ เนื่องจากขนบนผิวใบของข้าวสาลีพันธุ์ vel ทำให้เพลี้ยอ่อนเคลื่อนที่ได้ช้าและลำบาก ตัวเต็มวัยของแมลงจึงมักจะบินจากต้นข้าวสาลีพันธุ์ดังกล่าวไปโดยที่ไม่ลองดูดกินหรือวางไข่ ดังนั้นนอกจากพืชจะไม่ถูกคุณ้ำเลี้ยงแล้วยังปลอดภัยต่อโรคที่มีสาเหตุมาจากไวรัส yellow dwarf virus ที่มีเพลี้ยอ่อนเป็นแมลงพาหะอีกด้วย (Panda and Khush, 1995)

พืชหลายชนิดมีการผลิตสารหอมระเหย (volatile compound) เช่น สารประเภท alkaloids และ terpenoids สารเหล่านี้มีคุณสมบัติเฉพาะตัวคือ ระเหยได้ง่าย มีกลิ่นหรือรส เป็นต้น อีกทั้งสารประเภทนี้มักพบว่ามีผลต่อพฤติกรรมของแมลง มีหลายงานวิจัยรายงานว่า essential oil ที่เป็นสารกลุ่ม terpenoids ที่ผลิตจากเซลล์ trichome ในพืชหลายชนิดนั้น มีคุณสมบัติเป็นสารประเภทขับไล่หรือดึงดูดแมลง (repellent หรือ attractant) เช่น สาร citral ในตะไคร้หอม *Cymbopogon citratur* Stapf. มีฤทธิ์ไล่ยุงลาย *Aedes aegypti* L. (Oyedele *et al.*, 2002) น้ำมันหอมระเหยที่ได้จากเหง้าของว่านน้ำ (*Acorus calamus* L.) ใช้เป็นสารขับไล่ผีเสื้อกลางคืน หมัด และแมลงศัตรูเมล็ดพืชอื่นๆ (Watt *et al.*, 1962) และน้ำมันหอมระเหยจากเปปเปอร์มินมีคุณสมบัติเป็นสารรมและขับไล่แมลงต่างๆ เช่น มอดแป้ง ค้างคาวงวงข้าว และด้วงเจาะเมล็ด (Kumar, 2011) เป็นต้น

แม้ว่าสารกลุ่ม volatile compound ในพืชสามารถขับไล่แมลงศัตรูพืชได้ แต่ในธรรมชาติถ้าแมลงศัตรูพืชสามารถปรับตัวให้ทนต่อสารขับไล่ที่พืชผลิตออกมาได้นั้น ศัตรูของแมลงศัตรูพืชก็จะใช้สารดังกล่าวในการค้นหาต้นพืชและเข้าทำลายเหยื่อ เช่น เพลี้ยอ่อนกะหล่ำจะอาศัยกลิ่นของสาร sinigrin (mustard oil) นำมายังต้นกะหล่ำ ในขณะที่ parasite ของเพลี้ยอ่อนคือ แตนเบียน (*Diaeretiella rapae*) ใช้สารดังกล่าวในการค้นหาพืชและเข้าทำลายเพลี้ยอ่อน รวมถึงสาร gossypol ในต้นฝ้ายที่ช่วยให้ฝ้ายต้านทานต่อหนอนเจาะสมอฝ้ายได้ เนื่องจากสารนี้จะดึงดูด parasite

ของหนอนเจาะสมอฝ้าย (*Compoletis sonorensis*) เพื่อค้นหาและเข้าทำลายหนอนเจาะสมอฝ้าย เช่นเดียวกัน (นพพร, 2551)

8. สาร (*E*)- β -farnesene ที่พืชสร้างเพื่อขับไล่แมลงศัตรูพืช

พืชผลิตสารประกอบขึ้นมามากหลายชนิด หนึ่งในนั้นคือ สารหอมระเหย (volatile compound) ที่ไม่ได้ผลิตขึ้นมาจากดอกเท่านั้น แต่สามารถผลิตขึ้นจากส่วนอื่น ๆ ของพืชได้อีกด้วย สารหอมระเหยกลุ่มใหญ่ ๆ ที่พืชสร้างออกมาคือ สารในกลุ่มเทอร์ปีน (C_{10} monoterpenes) และเซสควิเทอร์ปีน (C_{15})

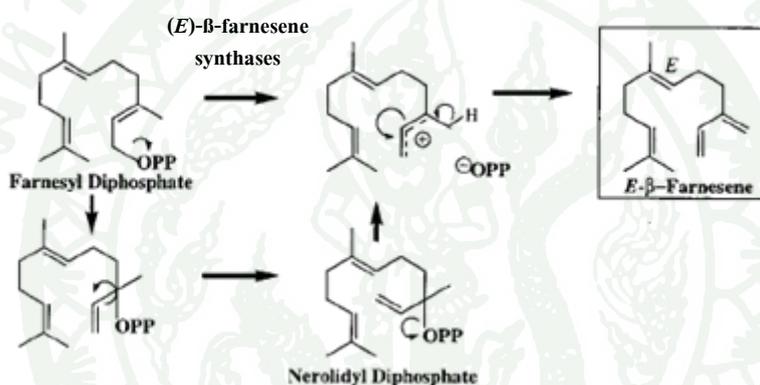
บทบาทของสารหอมระเหยในการขับไล่ศัตรูพืชนั้นมีการศึกษามากพอสมควร เช่น Wang *et al.* (2008) ศึกษาพบว่าสารหอมระเหย monoterpene ในเบญจมาศ (*Chrysanthemum morifolium*) สามารถรบกวนกระบวนการวางไข่ของผีเสื้อหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) ได้

นอกจากนี้พบว่าสารหอมระเหยที่พืชสร้างมานั้น มีผลในการขับไล่แมลงศัตรูพืชอื่นอีกคือ เพลี้ยอ่อน เนื่องจากสาร (*E*)- β -farnesene ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม sesquiterpene ที่พืชสร้างมานี้ มีบทบาทเป็นฟีโรโมนเตือนภัย (Alarm pheromone) ที่เพลี้ยอ่อนใช้ในการส่งสัญญาณให้สมาชิกในกลุ่มรับรู้ถึงอันตรายจากศัตรู ดังนั้นพืชที่สามารถสร้างสารดังกล่าวได้ก็จะมีความสามารถในการขับไล่เพลี้ยอ่อนได้ (Beale *et al.*, 2006) เช่น การศึกษาของ Gibson and Pickett (1983) พบว่ามันฝรั่งสายพันธุ์พื้นเมือง *Solanum berthaultii* Hawkes. ที่ผลิตสาร (*E*)- β -farnesene ได้ปริมาณมาก มีความสามารถในการขับไล่เพลี้ยอ่อนฟิท (green peach aphid) ได้มากกว่ามันฝรั่งที่ปลูกเพื่อการค้าซึ่งผลิตสาร (*E*)- β -farnesene ได้ปริมาณต่ำ และการศึกษาของ Mostafavi *et al.* (1996) พบว่าอัลฟิลฟาสายพันธุ์ KS94GH ซึ่งเป็นพันธุ์พื้นเมืองที่สามารถผลิตสาร (*E*)- β -farnesene ได้ปริมาณมาก จะมีความสามารถในการขับไล่เพลี้ยอ่อนถั่วและเพลี้ยอ่อนอัลฟิลฟา ได้มากกว่าสายพันธุ์อัลฟิลฟาที่ปลูกเพื่อการค้าซึ่งผลิตสาร (*E*)- β -farnesene ในปริมาณที่ต่ำกว่า

Freeman and Beattie (2008) พบว่า sesquiterpenoid เป็นสารประกอบพื้นฐานของ essential oils ที่ประกอบขึ้นด้วย isoprene (C_5H_8) จำนวน 3 หน่วย สามารถระเหยได้ง่าย เป็นสารที่มีพิษต่อแมลงและมีหน้าที่ในการป้องกันพืชจากการโจมตีของราและแบคทีเรีย สารในกลุ่ม sesquiterpenoid มีหลายแฟมิลี่ แต่ sesquiterpenes เป็นแฟมิลี่ขนาดใหญ่ พบได้ทั้งในแบคทีเรีย รา แมลง และพืช Crock *et al.* (1997) รายงานว่าสาร (*E*)- β -farnesene พบได้ใน essential oil ของพืช

ดังต่อไปนี้ Florida torreya (*Torreya taxifolia*) larch (*Larix leptolepis*) black locust (*Robinia pseudoacacia*) alfalfa (*Medicago sativa*) คาโมมายด์ (*Chamomilla recutita*) องุ่น (*Vitis vinifera*) hemp (*Cannabis sativa*) ข้าวโพด (*Zea mays*) black pepper (*Piper nigrum*) แครอท (*Daucus carota*) และเปปเปอร์มินต์ (*Mentha x piperita*) เป็นต้น

กระบวนการสังเคราะห์สาร (*E*)- β -farnesene ในพืชนั้นพบว่าอาศัยสาร farnesyl diphosphate หรือ nerolidyl diphosphate ทำหน้าที่เป็นสับสเตรท จากนั้นอาศัยการทำงานของ เอนไซม์ (*E*)- β -farnesene synthases เปลี่ยนสับสเตรทดังกล่าวให้เป็นสาร (*E*)- β -farnesene ซึ่งจะเกิดขึ้นที่ cytosol ใน endoplasmic reticulum (Belingheri *et al.*, 1988; Gleizes *et al.*, 1980)



ภาพที่ 2 แสดงกลไกการสร้างสาร (*E*)- β -farnesene ที่อาศัยการทำงานของเอนไซม์ (*E*)- β -farnesene synthases เปลี่ยนสับสเตรท farnesyl diphosphate หรือ nerolidyl diphosphate ให้เป็นสาร (*E*)- β -farnesene

ที่มา: Crock *et al.* (1997)

9. สาร (*E*)- β -farnesene ฟีโรโมนเตือนภัยของเพลี้ยอ่อน

การศึกษาในแมลงสังคมและแมลงอื่นๆ เช่น มวน (true bugs), จักจั่นเขา (treehoppers) และเพลี้ยอ่อน (aphids) พบว่าแมลงเหล่านี้มีการผลิตฟีโรโมนขึ้นมาชนิดหนึ่ง เรียกว่า “ฟีโรโมนเตือนภัย” (Alarm pheromone) เพื่อใช้เป็นสารเตือนภัยส่งสัญญาณให้กับสมาชิกในวรรังรับรู้ถึงอันตรายจากแมลงตัวห้ำหรืออันตรายอื่น ๆ ที่อาจเกิดขึ้น เมื่อเพลี้ยอ่อนถูกโจมตีจากแมลงศัตรูหรือแมลงตัวเบียน เพลี้ยอ่อนจะหลั่งน้ำคัดหลั่งที่มีลักษณะข้นเหนียว สำหรับป้องกันตัวจากอวัยวะที่เรียกว่า

siphunculi ที่อยู่บริเวณท้อง สารดังกล่าวจะไปรบกวนการกินอาหารและการวางไข่ของแมลงศัตรู ขณะเดียวกันเพ็ลี่ยอ่อนก็จะหลั่งฟีโรโมนเตือนภัยคือ สาร (*E*)- β -farnesene ที่เป็นสารประกอบในกลุ่ม sesquiterpene hydrocarbon ออกมาจากอวัยวะที่เรียกว่า cornicles ส่งสัญญาณเตือนให้เพ็ลี่ยอ่อนตัวอื่น ๆ รับรู้ถึงอันตราย แล้วจึงหยุดกินอาหารและรีบหนีไป นอกจากนี้สารดังกล่าวยังเป็น kairomone ซึ่งเป็นสารดึงดูดความสนใจและเพิ่มพฤติกรรมการหาอาหารของแมลงตัวห้ำอีกด้วย (Glinwood and Pickett, 2004; Pickett *et al.*, 1992)

10. การศึกษาในระดับจีโนมและระดับโปรตีนของเอนไซม์ (*E*)- β -farnesene synthases

สาร (*E*)- β -farnesene มีบทบาทที่น่าสนใจในการเป็นฟีโรโมนเตือนภัยของเพ็ลี่ยอ่อน และในพืชก็มีการผลิตสารดังกล่าวเพื่อประโยชน์ในการขับไล่เพ็ลี่ยอ่อนซึ่งเป็นแมลงศัตรู Crock *et al.* (1997) จึงได้ทำการศึกษาในระดับจีโนมและระดับโปรตีนของสาร (*E*)- β -farnesene ในเปปเปอร์มินต์ (*Mentha \times piperita* L. cv. Black Mitcham) โดยได้โคลนยีน (*E*)- β -farnesene synthase ที่มีหมายเลข accession คือ AF024615 จาก expressed sequence tags (ESTs) ของเซลล์ oil-gland ซึ่งมีขนาด 1,959 คู่เบส แปลรหัสได้ 550 หน่วย มีมวลโมเลกุลประมาณ 63.8 กิโลดาลตัน ทำการแสดงออกใน *Escherichia coli* พบว่าโปรตีนลูกผสมที่ได้มีความคล้ายกับเอนไซม์ sesquiterpene synthase และ epi-aristolochene synthase ของยาสูบ อีกทั้งเมื่อมี Mg^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์โปรตีนลูกผสมสามารถเปลี่ยนสับสเตรท farnesyl diphosphate เป็นสาร (*E*)- β -farnesene (85%), (*Z*)- β -farnesene (8%), d-cadinene (5%) และ sesquiterpene ตัวอื่นที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ แต่ถ้าใช้ Mn^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์จะผลิตได้สาร (*E*)- β -farnesene (98%) และ (*Z*)- β -farnesene (2%)

Prosser *et al.* (2006) ได้โคลนยีน sesquiterpene synthases ตามวิธีการของ Crock *et al.* (1997) จาก black peppermint (*Mentha \times piperita* L. cv. Black Mitcham) แล้วศึกษาถึงการทำงานของโปรตีนลูกผสมจากพลาสมิดที่มีลำดับ cDNA ที่โคลนได้ต่างกันคือ MxpSS1 และ MxpSS2 พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเป้าหมายที่อยู่บนพลาสมิด MxpSS1 แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนที่มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ (*E*)- β -farnesene synthase ถึง 96% โปรตีนลูกผสมที่ผลิตได้จากเซลล์แบคทีเรียหลังจากกำจัดเอา N-terminal thioredoxin fusion ออกสามารถเปลี่ยน farnesyl diphosphate เป็นผลิตภัณฑ์ 4 ชนิดด้วยกัน แต่ผลิตภัณฑ์หลัก 2 ชนิดแรกคือ cis-muurola-3,5-diene (45%) และ cis-muurola-4(14),5-diene (43%) ซึ่งนับได้ว่าการศึกษานี้เป็นการศึกษาถึงการทำงานของเอนไซม์ cis-muuroladiene synthase ตัวแรกที่จำแนกออกมาได้ ส่วนลำดับนิวคลีโอ

ไทด์ของยีนเป้าหมายที่อยู่บนพลาสมิด MxpSS2 แพลลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโนที่ไม่เหมือนกับลำดับ

กรดอะมิโนของเอนไซม์ (*E*)-β-farnesene synthase ที่คาดว่าจะมีความสำคัญต่อกิจกรรมของเอนไซม์ 2 เรซิดิวส์ด้วยกัน มีผลให้โปรตีนลูกผสมไม่สามารถเปลี่ยนสับสเตรท farnesyl diphosphate เป็นสาร (*E*)-β-farnesene ได้ หนึ่งในสองของตำแหน่งลำดับกรดอะมิโนที่มีการกลายพันธุ์ไปคือ ตำแหน่ง 531 (เป็น leucine ใน MxpSS2 และ serine ในเอนไซม์ (*E*)-β-farnesene synthase) ที่ตรวจสอบด้วย structural modelling พบว่าตำแหน่งดังกล่าวอยู่บริเวณ J-K loop ซึ่งเป็นตำแหน่งที่สำคัญในกิจกรรมของเอนไซม์ sesquiterpene synthases เมื่อทำ site-directed mutagenesis เปลี่ยนตำแหน่ง serine ให้ถูกต้อง พบว่าเอนไซม์ลูกผสมมีกิจกรรมของเอนไซม์ (*E*)-β-farnesene synthase ได้เป็นปกติ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเรซิดิวส์ดังกล่าวมีความสำคัญกับกิจกรรมของเอนไซม์

การศึกษาถึงระดับชีวโมเลกุลและระดับโปรตีนของเอนไซม์ (*E*)-β-farnesene synthase จากเปปเปอร์มิน ทำให้มีโอกาสที่จะนำยีน (*E*)-β-farnesene synthase ไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาสายพันธุ์พืชอื่นให้สามารถสร้างสาร (*E*)-β-farnesene ที่เป็นฟีโรโมนเตือนภัยของเพลี้ยอ่อน ซึ่งฟีโรโมนเตือนภัยที่พืชผลิตขึ้นอาจเป็นประโยชน์ต่อพืชในการขับไล่ไม่ให้เพลี้ยอ่อนเข้าทำลายพืช และอาจส่งผลให้พืชปลอดภัยจากโรคไวรัสที่มีเพลี้ยอ่อนเป็นพาหะนำโรคได้อีกด้วย การประเมินศักยภาพของยีน ทำได้โดยการสร้างพืชตัดแปลงพันธุกรรม โดยอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมคือ เทคนิคการถ่ายยีน

11. วิธีการถ่ายยีนเข้าสู่พืช

การประสบความสำเร็จในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชขึ้นอยู่กับปัจจัยที่สำคัญหลายประการ ได้แก่ เนื้อเยื่อที่นำมาใช้ในการถ่ายยีนต้องสามารถเพิ่มจำนวนหรือพัฒนาเป็นต้นใหม่ได้ดี วิธีการที่เหมาะสมในการส่งถ่ายยีน สารที่ใช้ในการคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีน พืชตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้ไม่เป็นหมัน เป็นวิธีการไม่ยุ่งยาก มีประสิทธิภาพ ไม่เสียค่าใช้จ่ายสูง และรวดเร็ว ปัจจุบันพบว่ามีวิธีการถ่ายยีนที่สอดคล้องกับความต้องการดังกล่าวหลายวิธี เช่น วิธีการถ่ายยีนโดยตรง (vectorless หรือ direct DNA transfer) ได้แก่ วิธียิงอนุภาค particle bombardment สามารถถ่ายยีนให้กับเนื้อเยื่อเป้าหมายทั้งที่เป็น protoplast และเนื้อเยื่อพืชที่เป็น intact cell ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่ไม่มีข้อจำกัดเรื่อง host range ของพืชเป้าหมายที่ใช้ แต่พบว่าการถ่ายยีนโดยวิธีดังกล่าวมีผลทำให้ได้พืชตัดแปลงพันธุกรรมที่มีรูปแบบการแทรกสอดของยีนที่ซับซ้อน และการส่งถ่ายยีนที่มีขนาดใหญ่ยังอาจได้รับความเสียหายที่เกิดขึ้นจากการแตกหักของยีนในระหว่างการส่งถ่ายยีน

(Hansen and Wright, 1999) อีกทั้งอาจเกิดการเชื่อมต่อระหว่างชั้นดีเอ็นเอที่ส่งถ่ายเข้าไปก่อนที่จะมีการแทรกสอดเข้าไปในจีโนมของพืช ทำให้เกิดการแทรกของดีเอ็นเอจำนวนหลายชิ้นในตำแหน่งเดียวกันของจีโนม (Pawlowski and Somer, 1998) ซึ่งอาจมีผลต่อการแสดงออกของยีนลดลง เนื่องจากการเกิด co-suppression (Hansen and Wright, 1999)

การถ่ายยีนโดยใช้สารเคมีชนิด polyethylene glycol ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ได้เฉพาะกับเนื้อเยื่อเป้าหมายที่เป็นโปรโตพลาสต์ และพืชที่สามารถพัฒนาจากโปรโตพลาสต์เป็นต้นได้เท่านั้น (Koop *et al.*, 1996) จากการศึกษาก่อนของ O' Neill *et al.* (1993) ได้ถ่ายยีน 16s rRNA กลายพันธุ์ที่อยู่บนพลาสมิด pIDS411 และ pTB116 เข้าสู่โปรโตพลาสต์ของ *Nicotiana tabacum* ด้วยการใส่สารเคมี polyethylene glycol พบว่าพลาสมิดเวกเตอร์จะเข้าสู่โปรโตพลาสต์และเคลื่อนที่จากตำแหน่งไซโตพลาสต์ไปยังพลาสต์แบบสุ่ม ทำให้ยีนเป้าหมายไม่สามารถสอดแทรกเข้าสู่จีโนมของคลอโรพลาสต์ได้ทุกชุด อีกทั้งเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพต่ำ และไม่สามารถใช้กับพืชชนิดอื่น ๆ ได้อย่างกว้างขวาง แต่มีข้อดีคือค่าใช้จ่ายต่ำกว่าการถ่ายยีนด้วยวิธีการใช้เครื่องยิงอนุภาค

การถ่ายยีนด้วยการฉีดดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์พืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถถ่ายยีนเข้าสู่คลอโรพลาสต์ได้ แต่วิธีการนี้จะชักนำให้เกิดความร้อนในขณะทำการถ่ายยีน ซึ่งเกิดขึ้นระหว่างโลหะกับของเหลว ความร้อนที่เกิดขึ้นสามารถทำลายพลาสมิดดีเอ็นเอที่ผ่านหลอดฉีดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 0.1 ไมโครเมตร และทำให้เซลล์ที่ได้รับดีเอ็นเอเกิดความเสียหายได้ (Daniell, 1999)

อีกวิธีที่ใช้ในการถ่ายยีนคือ การถ่ายยีนโดยใช้พาหะ (vector-mediated gene transfer) มีหลักการคือ นำยีนที่ต้องการมาเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอของพาหะ (vector) ก่อน จากนั้นพาหะก็จะส่งถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืชอีกทอดหนึ่ง ในปัจจุบันพาหะของการถ่ายยีนในพืชมีหลายชนิด แต่พาหะที่นิยมใช้ในการถ่ายยีนมากที่สุดคือ เชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคราพืช ที่มีชื่อว่า *Agrobacterium tumefaciens* การถ่ายยีนด้วยวิธีนี้เป็นที่นิยมใช้กันมาก เนื่องจากเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง และลดปัญหาเรื่องจำนวนชุดของยีนที่สอดแทรกเข้าสู่จีโนมของพืชเป้าหมาย เนื่องจากส่วนใหญ่พืชตัดแปลงพันธุกรรมที่ได้จากการถ่ายยีนโดยเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* จะมีจำนวนชุดของยีนประมาณ 1 ชุด สอดแทรกเข้าสู่จีโนมของพืชเป้าหมาย (Chen *et al.*, 2001; Hansen and Wright, 1999)

12. กระบวนการถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดย *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดินพบในปี พ.ศ. 2450 โดยนักวิทยาศาสตร์สองท่านคือ Smith E.F. และ Townsend C.O. ซึ่งสังเกตเห็นก้อนปุ่มปม (crown gall) ปรากฏอยู่บนต้นพืชใบเลี้ยงคู่ ศึกษาพบว่าสาเหตุของก้อนปุ่มปมดังกล่าวเกิดจาก *Agrobacterium* มีพลาสมิด DNA ที่ชื่อว่า tumor inducing plasmid (Ti) ซึ่งมีส่วนของ transferred DNA (T-DNA) เชื้อแบคทีเรียนี้มีคุณสมบัติในการบุกรุกเซลล์พืชที่มีบาดแผล และมีกลไกในการนำส่วน T-DNA ที่อยู่บนพลาสมิด Ti เข้าไปรวมกับโครโมโซมของพืชได้ จากนั้นโปรตีนที่แปรรหัสมาจาก T-DNA ของ *Agrobacterium* ก็จะทำให้พืชเกิดความผิดปกติของเซลล์ขึ้น พืชจึงมีลักษณะเนื้อเยื่อเป็นปุ่มปมคล้ายก้อนมะเร็ง เรียกว่า crown gall tumor จากคุณสมบัติในการนำ DNA เข้าสู่โครโมโซมพืชได้ของเชื้อ *Agrobacterium* ปัจจุบันจึงนิยมใช้เชื่อดังกล่าวเป็นสื่อในการถ่ายโอนชุดยีนที่ต้องการเข้าสู่เซลล์พืช ซึ่งขั้นตอนในการเข้าบุกรุกพืชของเชื้อ *Agrobacterium* สามารถสรุปได้เป็นขั้นตอนดังนี้ (Tzfira and Citovsky, 2000)

ขั้นตอนการจดจำและการเข้ายึดเกาะของเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* กับเซลล์พืช โดยเชื้อ *Agrobacterium* จะรับรู้ถึงการเกิดบาดแผลของพืช จากกรดอะมิโนและน้ำตาลที่ปล่อยออกมาจากเนื้อเยื่อบริเวณที่เกิดบาดแผล (Gelvin, 2000; Tzfira and Citovsky, 2002) จากนั้นเชื้อจะสร้าง cellulose filament เข้าไปยึดเกาะกับเซลล์พืช (Matthysse, 1986) โดยการทำงานของยีน *chvA*, *chvB*, *pscA* และ *att* ซึ่งเป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซมของแบคทีเรีย (Tzfira and Citovsky, 2000)

ต่อมาเชื้อ *Agrobacterium* รับสัญญาณจากพืช โดยการทำงานของโปรตีน VirA ร่วมกับโปรตีน VirG ที่รับสัญญาณจากสารที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากบาดแผลของพืช ได้แก่ สารประกอบ phenolic น้ำตาล โมเลกุลเดี่ยว เป็นต้น แล้วมีผลทำให้เกิดการ transcription ของยีน *vir* อื่น โดยสารที่ชักนำการแสดงออกของยีน *vir* ได้ดีที่สุดคือ acetosyringone (Stachel *et al.*, 1986) และยังพบว่าอุณหภูมิยังมีผลต่อการแสดงออกของยีน *vir* ที่อุณหภูมิสูงกว่า 32 °C จะยับยั้งการแสดงออกของยีน *vir* เนื่องจากไปมีผลต่อ conformation ของโปรตีน VirA (Jin *et al.*, 1993)

หลังจากยีนที่อยู่ใน *vir* operon มีการถอดรหัสและแปลรหัสเป็นโปรตีน Vir ชนิดต่าง ๆ แล้ว โปรตีน VirD1 และ VirD2 ที่ผลิตขึ้นจะทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ endonuclease ตัด Ti-plasmid ที่ตำแหน่ง LB และ RB ทำให้เกิดดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เรียกว่า T-strand โดยทางด้านปลาย 5' ของ T-strand จะมีโปรตีน VirD2 ติดอยู่ หลังจากนั้น โปรตีน VirE2 จะเข้ามาจับโดยรอบของสาย

T-strand เกิดเป็น โครงสร้าง T complex ขึ้น เพื่อเป็นการป้องกันสาย T-strand (Citovsky *et al.*, 1989) จากนั้น T-complex จะถูกส่งออกจากเซลล์ของ *Agrobacterium* ผ่านทางช่องที่เกิดขึ้นจากการรวมตัวกันของโปรตีน VirD4 และโปรตีนที่ผลิตจากยีน *virB* (Christie, 1997; Zupan *et al.*, 1998) จากนั้น T-complex จะเข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์พืช โดยการทำงานร่วมกันของโปรตีน VirD2 และ VirE2 (Tzfira and Citovsky, 2000) และ T-strand จะแทรกเข้าสู่จีโนมพืช โดยคาดว่าเกิดจากการทำงานของโปรตีน VirD2 ในการเชื่อมต่อไปปลาย 5' ของ T-strand ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวเข้ากับ genomic DNA ของพืช ตามด้วยกระบวนการสร้างสายดีเอ็นเอสายที่สองของ T-strand โดยอาศัยกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอของพืช (Tinland *et al.*, 1995)

13. การทดสอบและการคัดเลือกพืชตัดแปรพันธุกรรม

การถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดยทั่วไปนอกจากยีนเป้าหมายแล้ว ยังมียีนเครื่องหมาย (marker gene หรือ selectable gene) ซึ่งก็คือ ยีนที่ควบคุมลักษณะบางลักษณะที่ใช้ในการคัดเลือกเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ได้รับยีนที่ถ่ายฝากลงไป เพื่อตรวจสอบผลสำเร็จของการถ่ายฝากยีน ตัวอย่างยีนเครื่องหมายที่นิยมใช้ในการคัดเลือกในพืชมีด้วยกันหลายยีน เช่น ยีน *hpt* กำหนดการสร้างเอนไซม์ hygromycin phosphotransferase ทำให้ต้านทานสารปฏิชีวนะ hygromycin ต่อมาคือ ยีน *nptII* กำหนดการสร้างเอนไซม์ neomycin phosphotransferase ทำให้ต้านทานสารปฏิชีวนะ kanamycin ยีน *dhfr* กำหนดการสร้างเอนไซม์ dihydrofolate reductase ทำให้ต้านทานสาร methotrexate (สุรินทร์, 2543) และยีน *bar* (bialaphos resistance gene) ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ phosphinothricin acetyltransferase (PAT) ทำให้ต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืชในกลุ่ม phosphinothricin (PPT) ได้แก่ bialaphos และ glufosinase (Lutz *et al.*, 2001) เป็นต้น ดังนั้นเนื้อเยื่อพืชที่ประสบความสำเร็จในการถ่ายยีน นอกจากเซลล์พืชจะได้รับยีนเป้าหมายแล้ว ก็ยังได้รับยีนเครื่องหมายด้วย ทำให้เซลล์นั้นสามารถต้านทานต่อสารคัดเลือกหรือสารปฏิชีวนะที่เหมาะสมกับยีนต้านทานนั้น ๆ เซลล์ดังกล่าวจึงถูกชักนำและพัฒนาให้ได้เป็นต้นพืชตัดแปรพันธุกรรมได้ ส่วนเซลล์ที่ไม่ประสบความสำเร็จในการถ่ายยีนก็จะตายไปเนื่องจากไม่มียีนต้านทานสารคัดเลือกหรือสารปฏิชีวนะใด ๆ

ส่วนยีนรายงานผล (Reporter genes) จะทำหน้าที่ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน เพื่อยืนยันว่าโปรโมเตอร์และยีนเป้าหมายที่ถ่ายเข้าสู่เซลล์พืชนั้น มีการแสดงออกของยีนได้หรือไม่ ยีนดังกล่าวนี้ไม่มีบทบาทในการคัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายยีน (สุรินทร์, 2543) เช่น การศึกษาของ Staub and Maliga (1992) รายงานว่ายีนรายงานผล *uidA* ที่ควบคุมสร้างเอนไซม์ β -glucuronidase

(GUS) ที่ได้จากเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ K 12 สามารถตรวจกิจกรรมของเอนไซม์ β -glucuronidase กับสารตั้งต้น 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-glucuronide (X-Gluc) ได้โดยวิธี GUS histochemical assay ซึ่งเซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายยีน *uidA* จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ β -glucuronidase ที่สามารถทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น X-Gluc แสดงผลให้เห็นเป็นสารตกผลึกสีน้ำเงินเกิดขึ้นบริเวณเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีน และยีน *gfp* ที่ได้มาจาก *Aequorea victoria* ที่ควบคุมการสร้างโปรตีน green fluorescent protein (GFP) สามารถใช้เป็นยีนรายงานผลที่มองเห็นได้ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต โดยไม่ต้องทำ histochemical assay โดยเซลล์ใดที่ได้รับการถ่ายยีนเข้าหมาย เซลล์นั้นก็ยังสามารถผลิตโปรตีน GFP ได้เช่นกัน โปรตีนดังกล่าวนี้จะดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเล็ตไว้ เมื่อมองภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ดังนั้นเราจึงทราบตำแหน่งของเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ (Khan and Maliga, 1999)

14. สะระแหน่

สะระแหน่ (*Mentha cordifolia* Opiz.) มีชื่อสามัญว่า kitchen mint เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Labiatae มีชื่ออื่นๆที่เรียกแตกต่างกันออกไปตามภูมิภาคของประเทศไทย เช่น ม้ากเงาะ สะแห่น สะระแหน่สวน และหอมด่วน เป็นต้น ลักษณะโดยทั่วไปเป็นไม้ล้มลุก เลื้อยแผ่ไปตามดิน ลำต้นสี่เหลี่ยม สีเขียวแกมม่วงน้ำตาล แตกกิ่งก้านมาก ใบมีลักษณะเป็นใบเดี่ยว เรียงตัวแบบตรงข้าม รูปร่างใบเป็นวงรีค่อนข้างกว้าง กว้าง 1.5-2.5 เซนติเมตร ยาว 2-3 เซนติเมตร ผิวใบขน ขอบใบหยักแบบฟันเลื่อย มีกลิ่นเฉพาะ ดอกช่อออกเป็นกระจุกที่ซอกใบ ผลเป็นผลแห้ง ไม่แตก มีสรรพคุณทางยา ได้แก่ ขับลม แก้ปวดท้อง จุกเสียด แน่นเฟ้อ แก้ปวดหัว ทาแก้ฟกช้ำ (สมพร, 2551)

15. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของยาสูบ

ยาสูบจัดอยู่ในวงศ์ Solanaceae จีนัส *Nicotiana* มีหลายชนิด แต่ชนิดที่นิยมปลูกอย่างกว้างขวางคือ *Nicotiana tabacum* L. ที่มีจำนวนโครโมโซม $2n = 48$ เป็นพรรณไม้ล้มลุกซึ่งโดยทั่วไปมีอายุอยู่ได้เพียงปีเดียว แต่ถ้าอยู่ในสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสม คือไม่หนาวหรือร้อนแห้งแล้งเกินไป ยาสูบจะเจริญเติบโตเป็นพุ่มใหญ่ มีลักษณะเป็นพืชหลายปี

ยาสูบเป็นพืชที่ได้มีการนำมาใช้เป็นพืชต้นแบบ เพื่อศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์มาเป็นระยะเวลาอันยาวนาน เช่นมีการทดลองถ่ายยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนห่อหุ้มไวรัสใบด่างยาสูบเข้าสู่ต้นยาสูบ เพื่อสร้างพืชต้านทานไวรัส (สุรินทร์, 2543) โชคชัย (2548) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของโปรโมเตอร์

AtExp4 ที่ควบคุมการแสดงออกของยีนต่างๆ โดยการถ่ายยีนภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์
ดังกล่าวเข้าสู่ยาสูบ (*Nicotiana tabacum* cv. Ottawa) เป็นต้น



อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัสดุอุปกรณ์

- 1.1 เครื่อง LightCycler[®] 480 Real-Time PCR System (Roche, Switzerland)
- 1.2 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- 1.3 เครื่องหมุนเหวี่ยงตะกอน รุ่น Centrifuge 4515 (Eppendorf, Germany)
- 1.4 เครื่องวิเคราะห์ภาพ (Gel documentation) (Syngene, UK)
- 1.5 เครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ 37 องศาเซลเซียส (Mettler, Germany)
- 1.6 เครื่อง Micro centrifuge (Clover Laboratories, USA)
- 1.7 เครื่องไมโครเวฟ (Sharp, Japan)
- 1.8 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Ohaus, USA)
- 1.9 เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง (Ohaus, USA)
- 1.10 เครื่อง Electrophoresis (i-Myrun, Japan)
- 1.11 เครื่อง Vortex (Scientific, Thailand)
- 1.12 เครื่อง Thermocycler (Biometra, Germany)
- 1.13 เครื่อง Electroporator (Eppendorf, Germany)
- 1.14 เครื่องเขย่า (Labnet, USA)
- 1.15 ไมโครปิเปต (Labnet, USA)
- 1.16 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Sharp, Japan)
- 1.17 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (Sanyo, Japan)
- 1.18 เครื่อง Autoclave
- 1.19 ตู้ Laminar air flow
- 1.20 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ
- 1.21 เครื่อง Hybridization oven
- 1.22 หลอด Hybridization
- 1.23 Pipette tip ขนาด 1,000, 200 และ 20 ไมโครลิตร
- 1.24 microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 1.25 กระดาษ 3M

1.26 แผ่นไนลอนเมมเบรน (Roche, Switzerland)

1.27 intensifier cassette (Kodak, Japan)

1.28 เครื่อง spectrophotometer

2. ชุดน้ำยาสำเร็จรูป

2.1 RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, USA)

2.2 OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, USA)

2.3 PCR[®] 8/GW/TOPO[®] TA Cloning[®] Kit (Invitrogen, USA)

2.4 RevertAid[™] Reverse Transcriptase (Fermentas, UK)

2.4 Express SYBR[®] GreenER[™] qPCR (Invitrogen, USA)

2.5 Gel extraction kit (Qiagen, USA)

3. สารเคมี

3.1 1kb Gene ruler DNA Ladder (Fermentas, UK)

3.2 100 bp Gene ruler DNA Ladder (Fermentas, UK)

3.3 Loading dye (Fermentas, UK)

3.4 Agarose

3.5 TAE buffer

3.6 chloroform

3.7 ethidium bromide

3.8 6M NaI

3.9 wash buffer สำหรับการทำให้บริสุทธิ์ดีเอ็นเอ

3.10 Deoxyribonucleotide triphosphate; dNTPs (Fermentas, UK)

3.11 absolute ethanol

3.12 RiboLock[™] RNase Inhibitor (Fermentas, UK)

3.13 calcium chloride

3.14 อาหารแข็งและอาหารเหลว 2xYT

3.15 DMSO

3.16 สารละลาย TB

- 3.17 TE buffer
- 3.18 lysis buffer (0.2 mM NaOH, 1% SDS) สำหรับสกัดพลาสมิด
- 3.19 precipitation buffer (5 M potassium acetate, 96% acetic acid) สำหรับสกัดพลาสมิด
- 3.20 TE buffer
- 3.21 ไอโซโพรพานอล (isopropanol)
- 3.22 70% เอทานอล
- 3.23 dH₂O
- 3.24 RNase A (Fermentas, UK)
- 3.25 *Taq* DNA polymerase
- 3.26 10X *Taq* Buffer
- 3.27 เอนไซม์ตัดจำเพาะ FastDigest[®] *Eco*RI (Fermentas, UK)
- 3.28 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Bam*HI
- 3.29 binary vector 2311
- 3.30 T4 DNA Ligase
- 3.31 competent cell ของ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1
- 3.32 competent cell ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α
- 3.33 อาหารเหลว 2xYT และอาหารเหลว SOC
- 3.34 acetosyringone
- 3.35 ยาสูบสายพันธุ์ White Burley
- 3.36 อาหารสูตร MS
- 3.37 ฮอร์โมนพืช naphthaleneacetic acid (NAA)
- 3.38 ฮอร์โมนพืช benzyladenine (BA)
- 3.39 สารปฏิชีวนะ kanamycin
- 3.40 สารปฏิชีวนะ spectinomycin
- 3.41 สารปฏิชีวนะ geneticin
- 3.42 สารปฏิชีวนะ cefotaxime
- 3.43 β -mercaptoethanol
- 3.44 Homogenization buffer (0.1 M NaCl, 0.2 M sucrose, 0.01 M EDTA, 0.03 M Tris-HCl, pH 8) สำหรับสกัดดีเอ็นเอ
- 3.45 Lysis buffer (50 mM Tris-HCL, 50 mM EDTA, 2.5% SDS) สกัดดีเอ็นเอ
- 3.46 Precipitation buffer (5 M potassium acetate, 3 M 96% acetic acid) สกัดดีเอ็นเอ

- 3.47 DIG-dUTP (Roche, Switzerland)
- 3.48 denature buffer
- 3.49 hybridization Buffer
- 3.50 wash I (2 X SSC, 0.1% SDS)
- 3.51 wash II (0.5x SSC, 0.1% SDS)
- 3.52 washing buffer (maleic buffer)
- 3.53 Tween 20
- 3.54 blocking solution (Roche, Switzerland)
- 3.55 ฟิล์ม X-ray (Kodak, Japan)
- 3.56 CDP-Star® chemiluminescent reagent (Roche, Switzerland)
- 3.57 polypropylene plates (Roche, Switzerland)
- 3.58 Developer (Kodak, Japan)
- 3.59 Fixer (Kodak, Japan)

วิธีการ

1. การออกแบบไพรเมอร์

สืบค้นข้อมูลของยีน (*E*)- β -farnesene synthase จากเปปเปอร์มีน ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล Genbank ซึ่งมี 3 accession คือ AF024615, AJ786642 และ AJ786641 เปรียบเทียบลำดับ นิวคลีโอไทด์ของทั้ง 3 accession เฉพาะ Open Reading Frame (ORF) โดยใช้โปรแกรม multiple sequence alignment ClustalW2 ใน European Bioinformatics Institute (EBI) (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) เพื่อการออกแบบไพรเมอร์

2. การสกัดอาร์เอ็นเอรวม

สกัดอาร์เอ็นเอรวมจากใบของสะระแหน่ในระยะเฟสลาด โดยใช้ RNeasy Plant Mini Kit ของบริษัท Qiagen ซึ่งมีวิธีการ คือ นำใบสะระแหน่ปริมาณ 0.5 กรัม มาบดให้ละเอียดด้วย โตรเจนเหลว จากนั้นนำเนื้อเยื่อที่บดได้ปริมาณ 0.1 กรัม ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำฟอว์ RLT ปริมาตร 450 ไมโครลิตร ซึ่งมี β -mercaptoethanol ผสมอยู่ความเข้มข้น 1% เขย่าสารละลายโดยการ vortex เป็นเวลา 10 วินาที จากนั้นดูดสารละลายลงไปใน QIAshredder spin column (สีม่วง) ที่วางอยู่ในหลอดรองรับขนาด 2 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ดูดส่วนน้ำใสที่ผ่านการกรองด้วย QIAshredder spin column (ปริมาตรประมาณ 450 ไมโครลิตร) มาเติมลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม absolute ethanol 0.5 เท่าของส่วนใส (ปริมาตรประมาณ 225 ไมโครลิตร) ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยวิธีดูดขึ้นและลง แล้วดูดสารละลายดังกล่าวลงไปใน RNeasy spin column (สีชมพู) ที่วางอยู่ในหลอดรองรับขนาด 2 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสข้างล่างทิ้งไป ล้าง column ด้วยการเติมน้ำฟอว์ RW₁ ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสข้างล่างทิ้งไป ล้าง column อีกสองครั้งโดยการเติมน้ำฟอว์ RPE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสข้างล่างทิ้งไป ปั่นเหวี่ยง column ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เพื่อกำจัดน้ำฟอว์ที่เหลือค้างอยู่บน column ให้หมดไป ย้ายเฉพาะในส่วนของ column ไปวางลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชะอาร์เอ็นเอออกจาก column ด้วยการเติม RNase free water ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ที่มี RiboLock™ RNase Inhibitor ของบริษัท Fermentas ผสมอยู่ความเข้มข้น 0.04 ยูนิต์ต่อไมโครลิตร

3. การเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายโดยปฏิกิริยา RT-PCR

3.1 การเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายโดยการใช้ OneStep RT-PCR Kit (Qiagen)

เพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายโดย OneStep RT-PCR Kit ซึ่งในปฏิกิริยาประกอบไปด้วย

องค์ประกอบ		ปริมาณ
RNase free water	15	ไมโครลิตร
5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer	5	ไมโครลิตร
dNTPs(10 mM)	1	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ FarX1 (20 μ M)	0.5	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ Far2B (20 μ M)	0.5	ไมโครลิตร
QIAGEN OneStep RT-PCR enzyme Mix	1	ไมโครลิตร
RNA template (~200 นาโนกรัม)	2	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	25	ไมโครลิตร

ดูสารละลายที่กล่าวมาข้างต้นลงในหลอดพีซีอาร์ แล้วนำเข้าเครื่อง Thermal cycler ที่ตั้งโปรแกรมดังนี้ 45 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ตามมาด้วย 94 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 30 รอบ ของกระบวนการ denature ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที, กระบวนการ annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที และกระบวนการ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที จากนั้นทำกระบวนการ final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

ตรวจสอบผลด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) บน 1% อะกาโรสเจล ใน 0.5X TAE buffer เวลา 25 นาที ที่ 135 โวลต์ จากนั้นนำไปแช่สารละลาย ethidium bromide (0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 10 นาที ล้างน้ำเปล่าก่อนนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง Gel documentation (Syngene^R)

3.2 การเตรียมดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์สำหรับการเชื่อมต่อกับพลาสมิกพาหะ (vector)

นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR มาแยกขนาดด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) บน 1% อะกาโรสเจล ใน 0.5X TAE buffer เป็นเวลา 25 นาที ที่ 135 โวลต์ ตัดเจลบริเวณที่มีแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการ ชั่งน้ำหนักเจลที่ตัดได้ใส่ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทำการแยกดีเอ็นเอออกจากเจล โดยการเติม 6M NaI ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล นำ microcentrifuge tube ไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 10 นาที พลิกหลอดไปมา จนเจลหลอมละลายหมด คูดสารละลายลงใน silica column ที่รองรับด้วยหลอดขนาด 2 มิลลิลิตรครั้งละ 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสข้างล่างทิ้งไป ทำอีกครั้งหรือทำจนกว่าสารละลายจะหมด ล้าง column ด้วยการเติม wash buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสข้างล่างทิ้งไป ล้าง column อีกหนึ่งครั้งตามวิธีการข้างต้น จากนั้นนำ column ไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อกำจัด wash buffer ที่เหลืออยู่ให้หมดไป ย้าย column วางใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ บ่ม dH_2O ให้ได้อุณหภูมิประมาณ 55-65 องศาเซลเซียส จากนั้น คูด dH_2O ที่บ่มไว้ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงตรงกลางของ column บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บส่วนใสซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ไว้ที่ตู้ 20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน และตรวจสอบผลการเตรียม DNA ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) บน 1% อะกาโรสเจล ใน 0.5X TAE buffer เวลา 25 นาที ที่ 135 โวลต์ จากนั้นนำไปแช่สารละลาย ethidium bromide (0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 10 นาที ล้างน้ำเปล่าก่อนนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง Gel documentation (Syngene^R)

4. การเตรียม competent cell ของเชื้อ *E. coli*

การเตรียม competent cell ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α โดยใช้ calcium chloride เพื่อใช้ทำ transformation โดยดัดแปลงวิธีของ Inoue *et al.* (1990) มีวิธีการดังนี้คือ streak เชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α บนอาหารแข็ง 2xYT บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ นานข้ามคืน แล้วจึงนำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ที่เลี้ยงไว้ มาเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าข้ามคืนบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ต่อมานำเชื้อที่เลี้ยงไว้ข้ามคืนมาเติมลงในอาหารเหลว 2xYT ใหม่ ปริมาตร 1% ของปริมาณอาหารใหม่ (100 มิลลิลิตร) แล้วนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานประมาณ 2 ชั่วโมง ให้ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.5

จึงหยุดการเจริญเติบโตของเชื้อโดยการแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาปั่นเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทอาหารเดิมทิ้งไป จากนั้นละลายตะกอนเซลล์อย่างเบา ๆ ด้วยสารละลาย TB ที่แช่เย็นปริมาตร 32 มิลลิลิตร และแช่เย็นไว้เป็นเวลา 30 นาที แล้วปั่นเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทสารละลาย TB เดิมทิ้งไป ละลายตะกอนเซลล์อย่างเบา ๆ อีกครั้ง ด้วยสารละลาย TB แช่เย็นปริมาตร 2 มิลลิลิตร เมื่อตะกอนเซลล์ละลายหมดเติม DMSO ปริมาตร 140 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบา ๆ ในที่เย็น แล้วแบ่งเซลล์ competent ที่ได้ไว้ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตรหลอดละ 50 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ตู้ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

5. การเตรียม electrocompetent cell ของเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens*

การเตรียม electrocompetent cell ของเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 เพื่อใช้ทำ transformation โดยคัดแปลงวิธีของ Abdallah *et al.* (2004) มีวิธีการดังนี้ คือ streak เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 บนอาหารแข็ง 2xYT บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลาสามวัน จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อที่เลี้ยงไว้บนอาหารแข็งมาเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นานข้ามคืนบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส แล้วเติมเชื้อที่เลี้ยงไว้ลงในอาหารเหลว 2xYT ใหม่ ปริมาตร 10% ของปริมาตรอาหารใหม่ (อาหารใหม่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จะเติมเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร) จากนั้นนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นานประมาณ 3 ชั่วโมง ให้ค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.5 ต่อจากนั้นหยุดการเจริญเติบโตของเชื้อโดยการแช่ flask ของเชื้อไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดปั่นเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทอาหารเดิมทิ้งไป แล้วละลายตะกอนเซลล์อย่างเบา ๆ ด้วย 15% glycerol ที่แช่เย็น ปริมาตร 1/20 ของปริมาตรเชื้อที่ใช้เตรียม และแช่เย็นไว้เป็นเวลา 30 นาที ปั่นเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทสารละลายเดิมทิ้งไป จากนั้นละลายตะกอนเซลล์ให้หมดอย่างเบา ๆ ด้วย 15% glycerol แช่เย็น ปริมาตร 1/50 ของปริมาตรเชื้อที่ใช้เตรียม สุดท้ายแบ่งเซลล์ competent ที่ได้ไว้ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตรหลอดละ 50 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ตู้ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

6. การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ (vector)

ทำการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR เข้ากับดีเอ็นเอพาหะ ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ Gateway cloning vector (PCR[®] 8/GW/TOPO[®] TA Cloning[®] Kit จากบริษัท Invitrogen เป็นดีเอ็นเอพาหะ ที่ชิ้นดีเอ็นเอจะเชื่อมต่อเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ โดยการทำงานของเอนไซม์ Topoisomerase ซึ่งมีองค์ประกอบของปฏิกิริยาดังนี้คือ เวกเตอร์ปริมาณ 1 ไมโครลิตร (~5 นาโนกรัม), salt solution ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (1x), ชิ้นดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา RT-PCR (~50 นาโนกรัม) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และน้ำปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมสารละลายแต่ละตัวข้างต้นลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมสารละลายซึ่งมีปริมาตรรวมทั้งสิ้น 6 ไมโครลิตรให้เข้ากันโดยการ คูดขึ้นและลงเบาๆ แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

7. การถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli*

ถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ MachI ด้วยวิธี CaCl₂/Heat shock transformation (Sambrook and Russell, 2001) โดยเติมพลาสมิดสายผสม ปริมาตร 6 ไมโครลิตร ใน competent cell ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ MachI ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยการเคาะ หลอดเบาๆ นำไปแช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที แล้วย้ายไปไว้ในน้ำอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที จากนั้นแช่น้ำแข็งทันทีนาน 3 นาที เอาออกมาเติมอาหารเหลว SOC ปริมาตร 250 มิลลิลิตร นำหลอดไปเขย่าในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส และความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ เตาอาหารเหลวบางส่วนทิ้งไปให้เหลือไว้ ประมาณ 50 ไมโครลิตร ละลายตะกอนเซลล์กับอาหารเหลวที่เหลืออยู่ในหลอดด้วยการคืดหลอด เบาๆ จากนั้นคูดสารละลายออกมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง 2xYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ spectinomycin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

8. การสกัดพลาสมิดของดีเอ็นสายผสม (recombinant DNA)

คัดเลือกเซลล์ของเชื้อ *E. coli* ที่เจริญบนอาหารคัดเลือกแต่ละโคโลนีมาเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ spectinomycin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 2 มิลลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดโดยดัดแปลงวิธีการของ Sambrook and Russell (2001) คุกเซลล์ที่เลี้ยงไว้ในอาหารเหลวลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิตร ปั่นเก็บเซลล์ปริมาตร 1.5 มิลลิตร ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทอาหารทิ้งไป เติม TE buffer (10 mM Tris-HCl; (pH 8.0), 1 mM EDTA) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ละลายตะกอนเซลล์ด้วยการ vortex เป็นเวลาประมาณ 30 วินาที จากนั้นเติม lysis buffer (0.2 mM NaOH, 1% SDS) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดขึ้นและลง เติม precipitation buffer (5 M potassium acetate, 96% acetic acid) ปริมาตร 225 ไมโครลิตร และคลอโรฟอร์ม 200 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดขึ้นและลง แช่น้ำแข็ง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ดูดส่วนน้ำใสให้หมดใหม่ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วเติมไอโซโพรพานอลปริมาตรหนึ่งเท่าของปริมาตรส่วนใส (500 ไมโครลิตร) พลิกหลอดไปมาเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งไป ล้างตะกอนด้วยการเติม 70% เอทานอล ปริมาตร 500 ไมโครลิตร พลิกหลอดขึ้นและลง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนใสทิ้งไป ปล่อยให้ตะกอนแห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงละลายตะกอนของพลาสมิดด้วย dH₂O ที่เติม RNase A ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

ตรวจสอบผลด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) บน 1% อะกาโรสเจล ใน 0.5X TAE buffer เวลา 25 นาที ที่ 135 โวลต์ จากนั้นนำไปแช่สารละลาย ethidium bromide (0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร) เป็นเวลา 10 นาที ล้างน้ำเปล่าก่อนนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง Gel documentation (Syngene[®])

9. การตรวจสอบโคลนที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA)

9.1 การตรวจสอบโคลนที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสมด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction

ตรวจสอบยืนยันเป้าหมายที่เชื่อมอยู่บนดีเอ็นเอพาหะ โดยเทคนิค PCR ซึ่งปฏิกิริยา ปริมาตร 25 ไมโครลิตรประกอบด้วย พลาสมิด 1 ไมโครลิตร (20 นาโนกรัม) ใช้ไพรเมอร์สำหรับการสังเคราะห์ sesquiterpene synthase ฟอว์เวิร์ดไพรเมอร์ 20 μ M Far3 [5' GAGATCGAGTC GTGGAGGCT 3'] และรีเวิร์ดไพรเมอร์ 20 μ M Far2B [5' GGATCCTCAAAGACTATGGCATC AACAAAGAG 3'] เติมไพรเมอร์ละ 0.5 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายไพรเมอร์ละ 400 นาโนโมลาร์) ใช้ 10X *Taq* Buffer 2.5 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1X) ใช้ 2.5 mM dNTP 1 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์) และเติม *Taq* DNA polymerase 1 ยูนิต (1 ไมโครลิตร) ผสมให้สารละลายเข้ากันด้วยการ vortex แล้วนำหลอดพีซีอาร์ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องตกตะกอนสารตัวอย่างขนาดเล็ก (Spin down centrifuge) นาน 10 วินาที นำหลอดพีซีอาร์ใส่ในเครื่อง Thermal cycler เพื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้โปรแกรมดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 1 นาที, 60 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ เมื่อทำปฏิกิริยาสิ้นสุด นำ 5 ไมโครลิตรของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เตรียมได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) บน 1% อะกาโรสเจล ใน 0.5X TAE buffer เวลา 25 นาที ที่ 135 โวลต์ จากนั้นนำไปแช่สารละลาย ethidium bromide (0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 10 นาที ล้างน้ำเปล่าก่อนนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง Gel documentation (Syngene^R)

9.2 การตรวจสอบโคลนที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสมด้วยการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ทำการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* ซึ่งมีจุดตัดจำอยู่บนพลาสมิด pCR8/GW/TOPO ที่อยู่ห่างจากดีเอ็นเอเป้าหมายประมาณ 6 คู่เบส ซึ่งการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมีวิธีการดังต่อไปนี้คือ ควบพลาสมิดที่ต้องการตรวจสอบปริมาตร 5 ไมโครลิตร (0.1 ไมโครกรัม) ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม 10X FastDigest[®] buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1X) และเอนไซม์ FastDigest[®] *EcoRI* ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยการ vortex จากนั้นปั่นเหวี่ยงหลอดด้วยเครื่องตกตะกอนสารตัวอย่างขนาดเล็ก (Spin down centrifuge) นาน 10 วินาที บ่มหลอดไว้ที่ตู้ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

เมื่อสิ้นสุดเวลา นำ 5 ไมโครลิตรของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เตรียมได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิค อิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) บน 1% อะกาโรสเจล ใน 0.5X TAE buffer เวลา 25 นาที ที่ 135 โวลต์ จากนั้นนำไปแช่สารละลาย ethidium bromide (0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 10 นาที ล้างน้ำเปล่าก่อนนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง Gel documentation (Syngene^R)

10. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอโดยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ

นำพลาสมิดที่ตรวจสอบพบว่าให้ผลเป็นบวกจากการตรวจสอบด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเทคนิค dideoxy-chain termination (Sanger *et al.*, 1977) โดยใช้ชุดปฏิกิริยา BigDye[®] Terminator kit ของบริษัทไบโอดีไซน์ ใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ ไพรเมอร์คือ M13 forward (-20) [5' GTAAAACGACGGCCAG 3'] กับ M13 reverse [5' CAGGAA ACAGC TATGAC 3'] ที่มีตำแหน่งจดจำอยู่บนเวกเตอร์ และ Far3 [5' GAGATCGAGTCGTGG AGGCT 3'] กับ Far4 [5' CGCCTTTGGCAAGTCC CATT 3'] ซึ่งเป็น internal primer มีตำแหน่งจดจำอยู่บริเวณส่วนกลางของยีน *TSPA11* ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะนำมาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม CAP 3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>) เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *TSPA11* ให้ได้ครบสมบูรณ์ และแปลรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวเป็นกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรมของ Swiss Institute of Bioinformatics ใน ExPASy Proteomics Server เมนู Translate tool

11. การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ และการสร้าง phylogenetic tree

เปรียบเทียบความเหมือน (identity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *TSPA11* จากสระระแนงที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *TSPA11* ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้เมนู blastn และ blastp ตามลำดับ ผ่านระบบเครือข่ายอินเทอร์เน็ต <http://www.ncbi.nlm.gov>. เพื่อตรวจสอบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว และนำข้อมูลมาวิเคราะห์ต่อด้วยโปรแกรม MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007) เพื่อสร้าง phylogenetic tree

12. การ subclone ยีน (*E*)- β -farnesene synthase เข้าสู่ Binary vector pCAMBIA2311

ตัดชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1,662 คู่เบส ของยีน *TSPA11* ที่แทรกอยู่บนเวกเตอร์ PCR[®] 8/GW/ TOPO[®] ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Bam*HI รวมถึงตัด binary vector pCAMBIA2311 ด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกัน จากนั้นแยกขนาดดีเอ็นเอบน 1% อะกาโรสเจล ตัดเอาเฉพาะอะกาโรสเจลในส่วนที่มีชิ้นยีนขนาด 1,662 คู่เบส และขึ้น binary vector ขนาด 9,300 คู่เบส อยู่ อย่าตัดให้มีชิ้นดีเอ็นเอขนาดอื่นปนมาด้วยเด็ดขาด จากนั้นนำชิ้นส่วนเจลที่ตัดออกมาไปแยก สกัดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จากเจลด้วย Gel extraction kit (Qiagen) จากนั้นเชื่อมต่อยีน *TSPA11* เข้ากับ binary vector ด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase ป่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ถึง 18 ชั่วโมง และถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α โดยวิธีการ Electroporation แล้วคัดเลือกโคลนที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมบนอาหาร 2XYT ที่เติม kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดด้วยวิธีตัดแปลงของ Sambrook and Russell (2001) และคัดเลือกโคลนที่มีพลาสมิดลูกผสมที่มียีน *TSPA11* แทรกบน binary vector ที่ให้ชื่อใหม่ว่า พลาสมิด pCAMBIA23Far ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction

13. การถ่ายโอนยีนเข้าสู่เชื้อ *Agrobacterium*

สกัดพลาสมิดจาก *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ที่ตรวจสอบแล้วว่าได้รับพลาสมิด pCAMBIA23Far โดยตัดแปลงวิธี alkaline lysis ของ Sambrook and Russell (2001) จากนั้นนำพลาสมิด pCAMBIA23Far ถ่ายโอนเข้าสู่เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 ที่มีสภาพเป็น competent cell โดยวิธี electroporation ที่มีวิธีการคือ ผสมพลาสมิด pCAMBIA23Far ปริมาตร 1 ไมโครลิตร กับ competent cell ของ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (~100 นาโนกรัม) จากนั้นดูดเข้าไปใน cuvette สำหรับการทำ electroporation (electroporation cuvettes) เอาเข้าเครื่อง electroporator 2510 ของบริษัท Eppendorf ที่ตั้งค่าความต่างศักย์ไว้ที่ 2,500 โวลต์ กดปุ่ม PULSE 2 ครั้ง เมื่อเครื่องทำงานเสร็จ นำ electroporation cuvettes ออกจากเครื่องมาเติมอาหารเหลว 2xYT ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้ว ดูดออกมาใส่ในไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 ไมโครลิตร จากนั้นนำเชื้อ *Agrobacterium* ไปเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 120 rpm ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ทำการคัดเลือกโคลนบนอาหาร 2xYT ที่มี kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วสกัดพลาสมิดและวิเคราะห์โคลนที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมด้วยวิธีการพีซีอาร์ เพื่อคัดเลือกโคลนที่มีไบนารีเวกเตอร์ pCAMBIA23Far

โคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *Agrobacterium* ที่มีพลาสมิด pCAMBIA23Far ซึ่งมียีนที่แปลรหัสเป็นเอนไซม์ (*E*)-β-farnesene synthase จะนำไปใช้ในการถ่ายยีน *TSPA11* เข้าสู่ยาสูบ

14. การเตรียมเชื้อ *Agrobacterium* สำหรับการถ่ายยีน

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 ที่มีพลาสมิด pCAMBIA23Far ซึ่งมียีนที่จะถอดรหัสเป็นเอนไซม์ (*E*)-β-farnesene synthase มาเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ที่มี kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ข้ามคืนบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 120 rpm ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส จนมีค่า OD₆₀₀ ประมาณ 1.0 ถึง 1.5 แล้วนำออกมาเติม acetosyringone ให้ได้ ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครโมลาร์ นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 120 rpm ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ต่ออีก 5 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเจือจางในอาหาร MS เหลวในอัตราส่วนของปริมาตรเชื้อในอาหารเหลว : ปริมาตรอาหาร MS เหลวเท่ากับ 1 : 50 สำหรับใช้ในการถ่ายยีน

15. การถ่ายยีนโดยใช้เชื้อ *Agrobacterium*

ใช้มีดผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจุ่มลงไปในเชื้อ *Agrobacterium* ที่เจือจางไว้ กรีดลงบนใบของยาสูบสายพันธุ์ White Burley จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อายุประมาณ 1 เดือนหลังการ subculture โดยกรีดให้เป็นสี่เหลี่ยมขนาด 1×1 เซนติเมตร แล้วจึงนำชิ้นส่วนใบที่ตัดได้ จากนั้นวางลงบนจานอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) โดยเรียงชิ้นส่วนใบให้เต็มพื้นที่บนจานอาหาร ประมาณ 20 ชิ้น เก็บจานอาหารไว้ในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน (cocultivation) จากนั้นจึงย้ายชิ้นส่วนใบยาสูบที่ผ่านการ cocultivation ลงบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ที่มี naphthaleneacetic acid (NAA) 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร, benzyladenine (BA) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร, geneticin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และ cefotaxime 200 มิลลิกรัมต่อลิตร วางจานอาหารให้ได้รับแสง รอนจนกระทั่งชิ้นส่วนใบเกิดแคลลัส นำแคลลัสที่ได้ย้ายลงในอาหารคัดเลือกสูตร MS ที่ปราศจากฮอร์โมน รอนจนกระทั่งแคลลัสเจริญเป็นต้น จึงนำต้นที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือก ไปตรวจสอบการได้รับยีน (*E*)-β-farnesene synthase ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction

16. การตรวจสอบหายีน (*E*)- β -farnesene synthase ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดจากใบของยาสูบตัดแปลงพันธุกรรม มาทำการสังเคราะห์ DNA ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยจะใช้ DNA ประมาณ 20 นาโนกรัม ต่อการทำปฏิกิริยา 25 ไมโครลิตร ใช้ไพรเมอร์สำหรับการสังเคราะห์ยีน (*E*)- β -farnesene synthase ด้วยฟอร์เวอร์สไพรเมอร์ Far3 [5' GAGATCGAGTCGTGGAGGCT 3'] ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ และรีเวอร์สไพรเมอร์ [Far2B, 5' GGATCCTCAAAGACTATGGCATCAACAAA GAG3'] ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ จะได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 950 คู่เบส และสังเคราะห์ยีน *npII* ด้วยฟอร์เวอร์สไพรเมอร์ NPT1 ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ และรีเวอร์สไพรเมอร์ NPT2 ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ใช้ 10X Buffer 2.5 ไมโครลิตร ใช้ dNTPs ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เติม Taq DNA polymerase 1 หน่วยต่อการทำปฏิกิริยา 25 ไมโครลิตร นำหลอดพีซีอาร์ที่มีส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ใส่ในเครื่อง Thermal Cycler เพื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้โปรแกรมดังนี้

Thermal cycler สำหรับยีน (*E*)- β -farnesene synthase ประกอบด้วย

Denaturation	94 °C	5 min, 1 cycle	
Denaturation	94 °C	0.5 min	} 35 cycles
Annealing	60 °C	0.5 min	
Extension	72 °C	0.5 min	
Termination	72 °C	5 min, 1 cycle	

Thermal cycler สำหรับยีน *npII* ประกอบด้วย

Denaturation	94 °C	5 min, 1 cycle	
Denaturation	94 °C	0.5 min	} 35 cycles
Annealing	55 °C	0.5 min	
Extension	72 °C	0.5 min	
Termination	72 °C	5 min, 1 cycle	

หลังจากนั้นนำ 5 ไมโครลิตรของดีเอ็นเอที่เตรียมได้มาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บน 1.0% อะกาโรสเจล แล้วตรวจสอบด้วย UV-transilluminator

17. การตรวจสอบหายีน (*E*)- β -farnesene synthase ในต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยวิธี Dot blot hybridization

17.1 การสกัดดีเอ็นเอ

นำชิ้นส่วนใบของต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนและตัวอย่างที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน มาแยกสกัดดีเอ็นเอโดยตัดแปลงวิธีของ Alexander *et al.* (2007) โดยบดตัวอย่างใบด้วยไนโตรเจน-เหลว เมื่อบดตัวอย่างละเอียดแล้วตักใส่หลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Homogenization buffer (0.1 M NaCl, 0.2 M sucrose, 0.01 M EDTA, 0.03 M Tris-HCl, pH 8) ปริมาตร 300 ไมโครลิตรที่ได้เติม β -mercaptoethanol 1% และ Lysis buffer (50 mM Tris-HCL, 50 mM EDTA, 2.5% SDS) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เขย่าให้สารผสมกัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม Precipitation buffer (5 M potassium acetate, 3 M acetic acid) ปริมาตร 192 ไมโครลิตร และ chloroform 200 ไมโครลิตร เขย่าให้สารผสมกัน บ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบเป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่เติม Isopropanol ปริมาตรเท่ากับส่วนใส ผสมให้สารผสมกันเบา ๆ แล้วนำไปเซทรีฟิวซ์เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol และละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย distilled water ที่ผสมเอนไซม์ RNase A ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค 1% อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

17.2 การเติมดีเอ็นเอโพรบ

เตรียมดีเอ็นเอโพรบของยีน (*E*)- β -farnesene synthase โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่จะมีการติดฉลากโพรบด้วยสารปลดรังสี Digoxigenin (DIG) คือ DIG-dUTP โดยปฏิกิริยามีดังนี้

dH ₂ O	19	μ l
10x buffer <i>Taq</i> DNA polymerase (1x)	2.5	μ l
10x DIG-dUTP/dNTP (0.1 mM dUTP)	0.5	μ l
ไพรเมอร์ FAR3 (20 μ M)	0.5	μ l
ไพรเมอร์ FAR2B (20 μ M)	0.5	μ l
<i>Taq</i> DNA polymerase	1	μ l
พลาสมิด pCAMBIA23Far no.13 (50 ng/ μ l)	1	μ l

Thermal cycler ประกอบด้วย

Denaturation	94 °C	5 min, 1 cycle	
Denaturation	94 °C	1 min	} 35 cycles
Annealing	60 °C	1 min	
Extension	72°C	1 min	
Termination	72 °C	5 min, 1cycle	

ตรวจสอบขนาดของโพรบที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยเทคนิค 1% อะกาโรสเจลอิเล็กโตร-โฟริซิส ก่อนนำโพรบไปไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอเป้าหมาย ให้นำโพรบ 1 ไมโครลิตรไปเจือจางด้วย dH₂O ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิประมาณ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นแช่น้ำแข็งนานประมาณ 5 นาที

17.3 การตรึงดีเอ็นเอบนเมมเบรน

หยดตัวอย่างดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรนปริมาตร 5 ไมโครลิตร รอจนกระทั่งแผ่นเมมเบรนแห้งจึงหยด denature buffer บนตัวอย่างดีเอ็นเอ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร จากนั้น fix แผ่นเมมเบรนด้วยแสงยูวีเป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที

17.4 Prehybridization

นำแผ่นเมมเบรนที่ผ่านการ fix ด้วยแสงยูวี มาทำพีไฮบริไดซ์ด้วย hybridization Buffer โดยใช้อัตราส่วนบัฟเฟอร์ : เมมเบรน เท่ากับ 0.1 มิลลิตรต่อตารางเซนติเมตร (ml/cm²) ใน hybridization roller bottle จากนั้นนำเมมเบรนไปบ่มใน hybridization chamber ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

17.5 Hybridization

นำแผ่นเมมเบรนที่ผ่านการทำพีไฮบริไดซ์ด้วย hybridization Buffer มาทำไฮบริไดซ์กับโพรบซึ่งติดฉลากด้วยสารปลดครึ่งสี Digoxigenin (DIG) ที่ผสมกับ hybridization Buffer ปริมาตร 5 มิลลิตร แล้วนำแผ่นเมมเบรนไปบ่มใน hybridization chamber ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 18 ถึง 22 ชั่วโมง

17.6 Washing

ทำการกำจัด unhybridized probe ด้วยการชะล้างด้วยสารละลาย wash I (2 X SSC, 0.1% SDS) ครั้งละ 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง ที่อุณหภูมิห้อง ตามด้วยสารละลาย wash II (0.5x SSC, 0.1% SDS) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นานครั้งละ 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง และแช่ใน washing buffer (0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl และ 0.03% tween 20) ที่อุณหภูมิห้อง ครั้งละ 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง

17.7 Detection

นำเมมเบรนมาเติม 1x blocking solution (Qiagen) ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 0.5 ชั่วโมง ด้วยการเขย่าเบา ๆ จากนั้นนำเมมเบรนมาเติมสารละลายที่ประกอบด้วย 1x blocking solution : anti DIG ติดฉลากด้วยเอนไซม์ alkaline phosphatase เท่ากับ 1 : 10,000 ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง ด้วยการเขย่าเบา ๆ แล้วนำเมมเบรนออกมาใส่ในกล่องพลาสติกที่สะอาดแล้วเติมสารละลาย washing buffer (0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl และ 0.03% tween 20) ให้มากเกินพอ บ่มที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 10 นาที จำนวน 2 ครั้ง นำเมมเบรนออกมาวางในถาดพลาสติกที่สะอาดเติม CDP-Star[®] ซึ่งเป็น chemiluminescent reagent สำหรับ alkaline phosphatase detection buffer ในอัตราส่วน 1 : 500 เกลี่ยให้ทั่วเมมเบรน ปิดฉนวนถาด แล้วนำไปประกบกับฟิล์ม X-ray (Kodak) นาน 30 นาที นำฟิล์ม X-ray ไปล้างกับน้ำยา developer solution นาน 1 นาที จากนั้นล้างฟิล์มด้วยน้ำกลั่นประมาณ 1 นาที และ fixer solution นาน 5 นาที (ทำในห้องมืดตั้งแต่ขั้นตอนการประกบฟิล์ม)

18. การศึกษาการแสดงออกของยีน (*E*)- β -farnesene synthase ในยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนโดยวิธี Relative Real-time RT-PCR

แยกสกัดอาร์เอ็นเอรวมของใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนและไม่ได้รับการถ่ายยีน โดย RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) แล้วนำอาร์เอ็นเอรวมมาสังเคราะห์ First strand cDNA โดย RevertAid™ Reverse Transcriptase (Fermentas) ตามวิธีการดังนี้ คือ เติมอาร์เอ็นเอรวมปริมาณ 5 ไมโครลิตร (200 นาโนกรัม) ลงในหลอด PCR ตามด้วยไพรเมอร์ Oligo (dT)₂₄ ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ RNase free water ให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 12.5 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส ในเครื่อง Thermal cycler เป็นเวลา 10 นาที นำออกมาแช่น้ำแข็ง นาน 5 นาที จากนั้นเติม 5x reaction buffer 4.5 ไมโครลิตร ตามด้วย 10 mM dNTPs 2 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในเครื่อง Thermal cycler เป็นเวลา 10 นาที นำออกมาแช่น้ำแข็ง นาน 5 นาที แล้วจึงเติม RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase 1 ไมโครลิตร (200 ยูนิต) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที ตามมาด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ในเครื่อง Thermal cycler จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้

นำ First strand cDNA ของตัวอย่างที่ได้ มาวิเคราะห์การแสดงออกของยีน (*E*)- β -farnesene synthase โดย LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche, Switzerland) และใช้ SYBR dye เป็นตัวตรวจสอบ PCR ที่เกิดขึ้นในหลอดทดลอง ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับ ยีน (*E*)- β -farnesene synthase คือ Beta-1F [5' CAACTGGCAAGGGCATTCAATGAGGA 3'] กับ Beta-2R [5' GCTG GTGTCATTCCAGTACCGACCGAT 3'] และไพรเมอร์ EPSPS-NT-F [5' TGATGG TCTTAAGCAGCTTG GCGCA 3'] กับ EPSPS-NT-R [5' TCGCTCCATCAA CTTCAGTGTCATTTCAAC 3'] ที่จำเพาะกับยีน EPSPS ที่ใช้เป็นยีนอ้างอิง (internal control)

สำหรับสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาประกอบด้วย cDNA 1 ไมโครกรัม, Express SYBR® GreenER™ qPCR (Invitrogen, USA), 10 ไมโครโมล Forward และ Reverse primer ของยีน *TSPA11* และยีน *EPSPS* และ distilled water มีรายละเอียดดังนี้คือ

Express SYBR® GreenER™ qPCR supermix	5	μl
10 μM forward primer	0.4	μl
10 μM Reverse primer	0.4	μl
distilled water	3.2	μl
First strand cDNA (~ 10 นาโนกรัม)	1	μl
ปริมาตรรวม	10	μl

ใส่สารละลายที่เตรียมไว้ลงใน polypropylene plates จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาด้วย LightCycler® 480 Real-Time PCR System ของบริษัท Roche ที่กำหนดให้มีการทำงานดังนี้ ในช่วงแรกใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ช่วงที่สองใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 20 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที จำนวน 30 รอบ และในช่วงสุดท้ายใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาที อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และอุณหภูมิ 97 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที จำนวน 1 รอบ แล้วบันทึกผลค่า Threshold cycle หรือ CT ที่ได้เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความแตกต่างของการแสดงออกของยีน *TSP11* ในยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนเทียบกับยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

ผลและวิจารณ์

1. การออกแบบไพรเมอร์

จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน (*E*)-β-farnesene synthase (*TSPA11*) จากเปปเปอร์มินต์ (*Mentha x piperita*) ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank จำนวน 3 accession คือ AF024615 (ขนาด 1,959 คู่เบส) AJ786642 (ขนาด 1,653 คู่เบส) และ AJ786641 (ขนาด 1,656 คู่เบส) เฉพาะส่วน Open Reading Frame (ORF) โดยใช้เมนู multiple sequence alignment ClustalW2 ใน European Bioinformatics Institute (EBI) สามารถออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน (*E*)-β-farnesene synthase คือ ไพรเมอร์ FarX1 [5' ACTCTAGATGGCTACAAACGGCGTCGTAATTAG 3'] ที่มีตำแหน่งอยู่บริเวณปลาย 5' และไพรเมอร์ Far2B [5' GGATCCTCAAAAGACTATG GCATCAAC AAAGAG 3'] ที่มีตำแหน่งอยู่บริเวณปลาย 3' นำไพรเมอร์ทั้งสองไปสังเคราะห์ cDNA และเพิ่มปริมาณยีน *TSPA11* จากอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดจากใบสะระแหน่ให้ได้สมบูรณ์ ขนาดประมาณ 1,700 คู่เบส ด้วยปฏิกิริยา One step RT-PCR อีกทั้งมีการเพิ่มตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Bam*HI บริเวณปลาย 5' ของไพรเมอร์ทั้งสองตามลำดับ เพื่อประโยชน์ในการตัดต่อยีนเข้าสู่เวกเตอร์ pCAMBIA2311

เนื่องจากยีน *TSPA11* มีขนาดยาวเกินกว่าที่จะทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพียงครั้งเดียว จึงได้ออกแบบไพรเมอร์อีกหนึ่งคู่ คือไพรเมอร์ Far3 [5' GAGTCGAGTCGTGGAGGCT 3'] และไพรเมอร์ Far4 [5' CGCCTTTGGCAAGTCCCATT 3'] ที่มีตำแหน่งอยู่บริเวณกลางยีน เพื่อใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *TSPA11* ให้ได้สมบูรณ์ (ภาพที่ 3) โดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หาได้จากแต่ละไพรเมอร์ มาหาบริเวณที่เหลื่อมซ้อนกัน แล้วรวมเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *TSPA11* ที่สมบูรณ์

XbaI

FarX1 5' **ACTCTAG**ATGGCTACAAACGGCGTCGTAATTAG 3'

```

AF024615 TAGTGAAAAAATGGCTACAAACGGCGTCGTAATTAGTTGCTTAAGGGAAGTAAGGCCACC 120
AJ786642 -----ATGGCTACAAACGGCGTCGTAATTAGTTGCTTAAGGGAAGTAAGGCCACC 50
AJ786641 -----ATGGCTACAAACGGCGTCGTAATTAGTTGCTTAAGGGAAGTAAGGCCACC 50
*****
AF024615 TATGACGAAGCATGCGCCAAGCATGTGGACTGATACCTTTTCTAACTTTTCTCTTGACGA 180
AJ786642 TATGACGAAGCATGCGCCAAGCATGTGGACTGATACCTTTTCTAACTTTTCTCTTGACGA 110
AJ786641 TATGACGAAGCATGCGCCAAGCATGTGGACTGATACCTTTTCTAACTTTTCTCTTGACGA 110
*****
AF024615 TAAGGAACAACAAAAGTGTCTCAGAAACCATCGAAGCACTTAAGCAAGAAGCAAGAGGCAT 240
AJ786642 TAAGGAACAACAAAAGTGTCTCAGAAACCATCGAAGCACTTAAGCAAGAAGCAAGAGGCAT 170
AJ786641 TAAGGAACAACAAAAGCGCTCAGAAACCATCGAAGCACTTAAGCAAGAAGCAAGAGGCAT 170
*****
AF024615 GCTTATGGCTGCAACCCTCCTCTCCAACAAATGACACTAATCGACACTCTCGAGCGTTT 300
AJ786642 GCTTATGGCTGCAACCCTCCTCTCCAACAAATGACACTAATCGACACTCTCGAGCGTTT 230
AJ786641 GCTTATGGCTGCAACCCTCCTCTCCAACAAATGACACTAATCGACACTCTCGAGCGTTT 230
*****
AF024615 GGGATTGCTTTTCCATTTTGGACGGAGATCGAATACAAAATCGAACTAATCAACGC--- 357
AJ786642 GGGATTGCTTTTCCATTTTGGACGGAGATCGAATACAAAATCGAACTAATCAACGC--- 287
AJ786641 GGGATTGGCTTTCCATTTTGGACGGAGGTCGAATACAAAATCGAACAATCAACGCCGC 290
*****
AF024615 TGCAGAAGACGACGGCTTTGATTTGTTTCGCTACTGCTCTTCGTTTCCGTTTGCTCAGACA 417
AJ786642 TGCAGAAGACGACGGCTTTGATTTGTTTCGCTACTGCTCTTCGTTTCCGTTTGCTCAGACA 347
AJ786641 TGCAGAAGACGACGGCTTTGATTTGTTTCGCTACTGCTCTTCGTTTCCGTTTGCTCAGACA 350
*****
AF024615 ACATCAACGCCACGTTTCTTGTGATGTTTTTCGACAAGTTCATCGACAAAGATGGCAAGTT 477
AJ786642 ACATCAACGCCACGTTTCTTGTGATGTTTTTCGACAAGTTCATCGACAAAGATGGCAAGTT 407
AJ786641 GCATCAACGCCACGTTTCTTGCATGTTTTTCGACAAGTTCGTCGACAAAGATGGCAAGTT 410
*****
AF024615 CGAAGAATCCCTTAGCAATAATGTTGAAGGCCATTAAGCTTGATGAAGCAGCTCATGT 537
AJ786642 CGAAGAATCCCTTAGCAATAATGTTGAAGGCCATTAAGCTTGATGAAGCAGCTCATGT 467
AJ786641 TGAAGAATCCCTTAGCAATAATGTTGAAGGCCATTAAGCTTGATGAAGCAGCTCATGT 470
*****
AF024615 TGGGTTTCGCGAAGAAAGAATATTACAAGAGGCTGTAATTTTACGAGGCATCACTTGGA 597
AJ786642 TGGGTTTCGCGAAGAAAGGATATTACAAGAGGCTGTAATTTTACGAGGCATCACTTGGA 527
AJ786641 TGGGTTTCGCGAAGAAAGGATATTACAAGAGGCTGTAATTTTACGAGGCATCACTTGGA 530
*****
AF024615 AGGAGCAGAGTTAGATCAGTCTCCATTATGATTAGAGAGAAAGTGAAGCGAGCTTTGGA 657
AJ786642 AGGAGCAGAGTTAGATCAGTCTCCATTATGATTAGAGAGAAAGTGAAGCGAGCTTTGGA 587
AJ786641 AGGAGCAGAGTTAGATCAGTCTCCATTATGATTAGAGAGAAAGTGAAGCGAGCTTTGGA 590
*****
AF024615 GCACCCCTTTCATAGGGATTTCCCCATGTCTATGCACGCCTTTTCATCTCCATTTACGA 717
AJ786642 GCACCCCTTTCATAGGGATTTCCCCATGTCTATGCACGCCTTTTCATCTCCATTTACGA 647
AJ786641 GCACCCCTTTCATAGGGATTTCCCCATGTCTATGCACGCCTTTTCATCTCCATTTACGA 650
*****
AF024615 AAAGGATGACTCTAGAGATGAATTACTTCTCAAGCTATCCAAAGTCAACTTCAAATTCAT 777
AJ786642 AAAGGATGACTCTAGAGATGAATTACTTCTCAAGCTATCCAAAGTCAACTTCAAATTCAT 707
AJ786641 AAAGGATGACTCTAGAGATGAATTACTTCTCAAGCTATCCAAAGTCAACTTCAAATTCAT 710
*****
AF024615 GCAGAATTTGTATAAGGAAGAGCTCTCCCAACTCTCCAGGTGGTGGAACACATGGAATCT 837
AJ786642 GCAGAATTTGTATAAGGAAGAGCTCTCCCAACTCTCCAGGTGGTGGAACACATGGAATCT 767
AJ786641 GCAGAATTTGTATAAGAAAGAGCTCTCCCAACTCTCCAGGTGGTGGAACACATGGGATCT 770
*****
Far 3 5' GAGATCGAGTCGTGGAGGCT 3'
AF024615 GAAATCAAAATTACCATATGCAAGAGATCGAGTCGTGGAGGCTTATGTTTGGGGAGTAGG 897
AJ786642 GAAATCAAAATTACCATATGCAAGAGATCGAGTCGTGGAGGCTTATGTTTGGGGAGTAGG 827
AJ786641 GAAATCGAAATTACCATATGCAAGAGATCGAGTCGTGGAGGCTTACGTATGGGGAGTGGG 830
*****

```

ภาพที่ 3 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน (*E*)-β-farnesene synthase จากเปปเปอร์มินท์ที่มี รายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank จำนวน 3 accession คือ AF024615, *E*Bf synthase [*Mentha x piperita*]; AJ786642, *E*Bf synthase [*Mentha x piperita*] และ AJ786641, *cis*-muuroladiene synthase [*Mentha x piperita*]

```

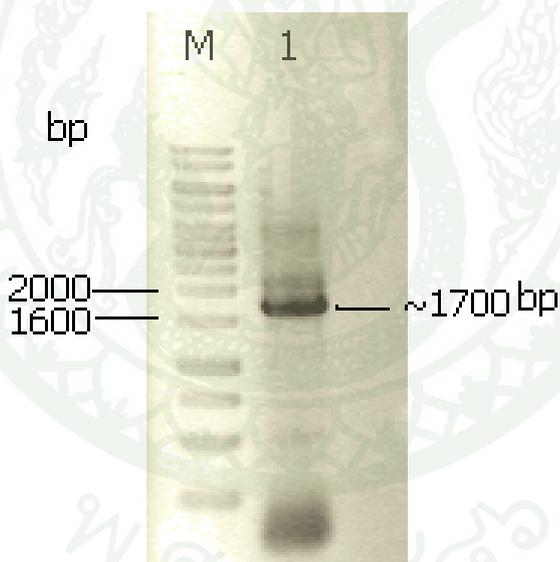
3' TTACCCTGAACGGTTTCCGC 5' Far 4
AF024615 TTACCATTACGAACCCCAATACTCATATGTTCCGAAATGGGACTTGCCAAAGGCGTACTAAT 957
AJ786642 TTACCATTACGAACCCCAATACTCATATGTTCCGAAATGGGACTTGCCAAAGGCGTACTAAT 887
AJ786641 ATACCATTACGAACCTCAGTACTCATATGTTCCGAAATGGGACTTGCCAAAGGCATACTAAT 890
*****
AF024615 TTGTGGAATCATGGACGATACATATGATAAATTATGCTTACACTCAATGAAGCTCAACTTTT 1017
AJ786642 TTGTGGAATCATGGACGATACATATGATAAATTATGCTTACACTCAATGAAGCTCAACTTTT 947
AJ786641 TATTGGAATCATGGATGATACTTATGATAAATTATGCTTACACTCAATGAAGCTCAACTTTT 950
*****
AF024615 TACTCAAGTCTTAGACAAGTGGGATAGAGATGAAGCTGAACGACTCCCAGAATACATGAA 1077
AJ786642 TACTCAAGTCTTAGACAAGTGGGATAGAGATGAAGCTGAACGACTCCCAGAATACATGAA 1007
AJ786641 TACTCAAGTCTTAGACAAGTGGGATAGAGATGAAGCTGATCGACTCCCAGAATACATGAA 1010
*****
AF024615 AATCGTTTATCGATTTATTTGAGTATATATGAAAATTATGAACGTGATGCAGCGAAACT 1137
AJ786642 AATCGTTTATCGATTTATTTGAGTATATATGAAAATTATGAACGTGATGCAGCGAAACT 1067
AJ786641 AATCGTTTATGAATTTATTTGAGTACATGTGAAAATTATGAACGTGATGCAGCGAAACT 1070
*****
AF024615 TGAAAAAGCTTTCAGCTCCTTATTTTAAGGAAACCGTGAAAACAACCTGGCAAGGGCATT 1197
AJ786642 TGAAAAAGCTTTCAGCTCCTTATTTTAAGGAAACCGTGAAAACAACCTGGCAAGGGCATT 1127
AJ786641 TGAAAAAGCTTTCAGCTCCTTATTTTAAGGAAACCGTGAAAACAACCTGGCAAGGGCATT 1130
*****
AF024615 TAATGAGGAGCAGAAGTGGGTTATGGAAGGCAGCTACCGTCATTCCAAGACTACGTAAA 1257
AJ786642 TAATGAGGAGCAGAAGTGGGTTATGGAAGGCAGCTACCGTCATTCCAAGACTACGTAAA 1187
AJ786641 TAATCAGGAGCAGAAGTGGGTTATGGAAGGCAGCTACCGTCATTCCAAGACTACGTAAA 1190
*****
AF024615 GAATTCAGAGAAAACCGCTGCATTTATACCATGTTTGTCTTCTATCATCCAGGCTTGAA 1317
AJ786642 GAATTCAGAGAAAACCGCTGCATTTATACCATGTTTGTCTTCTATCATCCAGGCTTGAA 1247
AJ786641 GAATTCAGAGAAAACCGCTGCATTTATACCATGTTTGTCTTCTATCATCCAGGCTTGAA 1250
*****
AF024615 ATCTGTTACCCAAGAAACCATTGATTGGATCAAGAGTGAACCCACGCTCGCAACATCGAC 1377
AJ786642 ATCTGTTACCCAAGAAACCATTGATTGGATCAAGAGTGAACCCACGCTCGCAACATCGAC 1307
AJ786641 ATCTGTTACCCAAGAAACCATTGATTGGATCAAGAGTGAACCCACGCTCGCAACATCAAC 1310
*****
AF024615 CGCTATGATCGGTCGGTATTGGAATGACACCAGCTCTCAGCTCCGTGAAAGCAAAGGAGG 1437
AJ786642 CGCTATGATCGGTCGGTATTGGAATGACACCAGCTCTCAGCTCCGTGAAAGCAAAGGAGG 1367
AJ786641 CGGTATGATCGGCCGATATTGGGATGACATCGGCTCTCACCTCCGCGAAAGCAAAGGAGG 1370
*****
AF024615 GGAAATGCTGACTGCGTTGGATTTCCACATGAAAGAATATGGTCTGACGAAGGAAGAGGC 1497
AJ786642 GGAAATGCTGACTGCGTTGGATTTCCACATGAAAGAATATGGAAATAACAAGGAAGAGGC 1427
AJ786641 GGAAATGCTGACTGCGTTGGATTTCCACATGAAAGAATATGGTCTGACGAAGGAAGAGGC 1430
*****
AF024615 GGCATCTAAGTTTGAAGGATTGGTTGAGGAAACATGGAAGGATATAAACAAGGAATTCAT 1557
AJ786642 GGCATCTAAGTTTGAAGGATTGGTTGAGGAAACATGGAAGGATATAAACAAGGAATTCAT 1487
AJ786641 GGCATCTAAGTTTGAAGGATTGGTTGAGGAAACATGGAAGGATATAAACAAGGAATTCAT 1490
*****
AF024615 AGCCACAATAATTATAATGTGGGTAGAGAAATTGCCATCACATTCCTCAACTACGCTCG 1617
AJ786642 AGCCACAATAATTATAATGTGGGTAGAGAAATTGCCATCACATTCCTCAACTACGCTCG 1547
AJ786641 AGCCACAATAATTATAATGTGGGTAGAGAAATTGCCATCACATTCCTCAACTACGCTCG 1550
*****
AF024615 GATATGTGAAGCCAGTTACAGCAAAACTGACGGAGACGCTTATTCAGATCCTAATGTTGC 1677
AJ786642 GATATGTGAAGCCAGTTACAGCAAAACTGACGGAGACGCTTATTTAGATCCTAATGTTGC 1607
AJ786641 GATATGTGAAGCCAGTTACAGCAAAACTGACGGAGACGCTTATTTAGATCCTAATGTTGC 1610
*****
BamHI
3' GAGAAACAACCTACGGTATCAGAAAACCTCCTAGG 5' Far2B
AF024615 CAAGGCAAATGTCGTTGCTCTCTTTGTTGATGCCATAGTCTTTTGAATTGTCATAATCAAA 1737
AJ786642 CAAGGCAAATGTCGTTGCCCTCTTTGTTGATGCCATAGTCTTTTGA----- 1653
AJ786641 CAAGGCAAATGTCGTTGCCCTCTTTGTTGATGCCATAGTCTTTTGA----- 1656
*****
AF024615 GACCCTATAATTATAATATATGTGTTTAAGAACTAATAAGCTTGCTTTATGTATAGTT 1797
AJ786642 -----
AJ786641 -----

```

ภาพที่ 3 (ต่อ)

2. การเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายโดยปฏิกิริยา One Step RT-PCR

นำอาร์เอ็นเอรวม (total RAN) ที่สกัดจากใบสะระแหน่มาใช้เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ Complementary DNA (cDNA) และเพิ่มปริมาณยีน (*E*)-β-farnesene synthase ด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ FarX1 และ Far2B โดยปฏิกิริยา One Step RT-PCR ผลิตรหัสพันธุกรรมที่ไซอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 1,700 คู่เบส (ภาพที่ 4) ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดผลิตรหัสพันธุกรรมที่ไซอาร์ที่โคลนได้เมื่อตรวจสอบบน 1 % อะกาโรสเจลเปรียบเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน และพบว่าขนาดของผลิตรหัสพันธุกรรมที่ไซอาร์ที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของยีน (*E*)-β-farnesene synthase ที่โคลนได้จากเปปเปอร์มินต์ (*Mentha × piperita*) ในการศึกษาของ Crock *et al.* (1997) รายงานว่า ยีนดังกล่าวมีขนาด 1,959 คู่เบส ที่เป็นส่วน ORF ขนาด 1,650 คู่เบส อีกทั้งสอดคล้องกับการศึกษาของ Maruyama *et al.* (2001) ที่โคลนยีน (*E*)-β-farnesene synthase จาก *Citrus junos* ได้ขนาด 1,867 คู่เบส ที่เป็นส่วน ORF ขนาด 1,680 คู่เบส

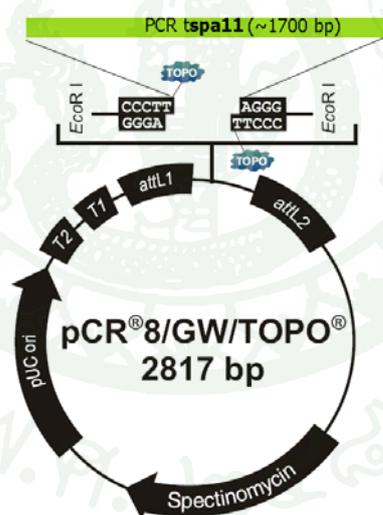


ภาพที่ 4 ผลิตรหัสพันธุกรรมที่ไซอาร์ของยีน *TSPA11* ที่เพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา One Step RT-PCR

ซึ่งมีขนาดประมาณ 1,700 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน โดยในช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb และในช่องที่ 2 คือ ผลิตรหัสพันธุกรรมที่ไซอาร์ของยีน *TSPA11* จากสะระแหน่ที่เพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา One Step RT-PCR

3. การเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์เอ็นเอเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ (vector)

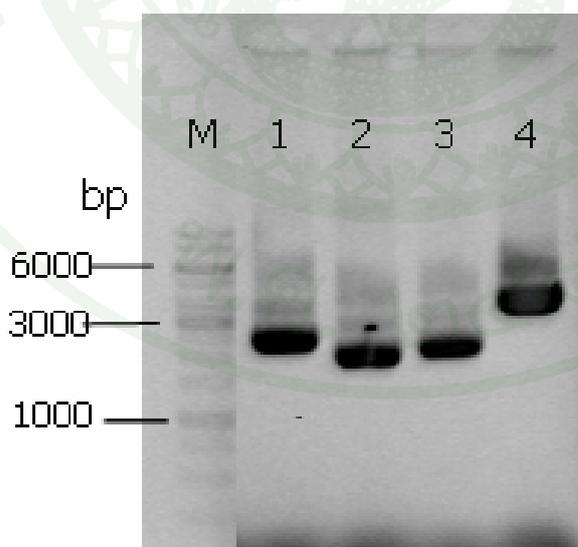
ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน (*E*)-β-farnesene synthase ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ขนาดประมาณ 1,700 คู่เบส ได้นำมาเชื่อมต่อกับ cloning vector (PCR[®]8/GW/TOPO[®]) ที่มีขนาดประมาณ 2,800 คู่เบส เวกเตอร์ดังกล่าวมีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *Eco*RI อยู่ 2 ตำแหน่ง บริเวณใกล้เคียงกับตำแหน่งของ inserting site และมียีนต้านทานสารปฏิชีวนะ spectinomycin (ภาพที่ 5) หลังจากเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์เข้ากับ cloning vector ได้ถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ MachI ด้วยวิธี CaCl_2 /Heat shock คัดเลือกโคโลนีที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือก 2xYT ที่มีสารปฏิชีวนะ spectinomycin ความเข้มข้น 100 mg/L พบมีเพียง 4 โคโลนี ที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือก สาเหตุที่มีโคโลนีปริมาณน้อยเจริญบนอาหารคัดเลือก อาจเนื่องมาจากใช้เวลาในการ ligation น้อยเพียงแค่ 5 นาที ซึ่งเป็นเวลาที่เพียงพอสำหรับการเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์เอ็นเอขนาดน้อยกว่า 1,000 คู่เบส เข้ากับเวกเตอร์ แต่อาจไม่เพียงพอสำหรับการเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์เอ็นเอของยีน *TSPA11* ที่มีขนาดใหญ่ (~ 1,700 คู่เบส) เข้ากับเวกเตอร์ ดังนั้นถ้าต้องการเพิ่มประสิทธิภาพในการเชื่อมต่อนิวคลีโอไทด์เอ็นเอขนาดใหญ่เข้ากับเวกเตอร์ควรเพิ่มเวลาในการ ligation ให้นานขึ้น



ภาพที่ 5 แผนที่ยีนบนพลาสมิด PCR[®]8/GW/TOPO[®] TA Cloning[®] พลาสมิดมีขนาด 2,817 คู่เบส โปรโมเตอร์ T7 promoter มียีนต้านทานสารปฏิชีวนะ spectinomycin ใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดชนิดนี้ และมี origin of replication เป็น pUC ยีนยีน *TSPA11* ขนาดประมาณ 1,700 คู่เบส จะแทรกอยู่ในตำแหน่ง TA overhang ที่มีเอนไซม์ Topoisomerase เชื่อมติดไว้ทำหน้าที่เชื่อมดีเอ็นเอเข้ากับเวกเตอร์ และมีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *Eco*RI อยู่ใกล้ตำแหน่งเชื่อมต่อของนิวคลีโอไทด์เอ็นเอกับเวกเตอร์

4. การสกัดพลาสมิดของดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA)

สกัดพลาสมิดโดยดัดแปลงวิธีการของ Sambrook and Russell (2001) ตรวจสอบคุณภาพและขนาดของพลาสมิดบน 1 % อะกาโรสเจล พบว่าพลาสมิดทุกตัวอย่าง ที่สกัดได้มีความสะอาด เนื่องจากไม่มีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอโครโมโซมและอาร์เอ็นเอ และมีขนาดแตกต่างกันโดยพลาสมิดจากโคโลนีที่ 4 ใน ช่อง 4 มีขนาดใหญ่กว่าพลาสมิดที่ได้จากอีก 3 โคโลนี ใน ช่อง ที่ 1 ถึง 3 (ภาพที่ 6) ขนาดของรีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่คาดไว้ประมาณ 4,500 คู่เบส ซึ่งเท่ากับขนาดของเวกเตอร์ PCR[®]/GW/TOPO[®] (~ 2,800 คู่เบส) รวมกับขนาดของชิ้นยีน *TSPA11* (~ 1,700 คู่เบส) พบว่าพลาสมิดจากโคโลนีที่ 4 เท่านั้น ที่มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของรีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่คาดคะเนไว้ โดยมีขนาดประมาณ 4,500 คู่เบส เมื่อเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน ส่วนพลาสมิดจากอีก 3 โคโลนีนั้น มีขนาดเล็กกว่าขนาดของรีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่คาดไว้ทั้งสิ้น จึงคาดว่ายังมีเพียงพลาสมิดจากโคโลนีที่ 4 เท่านั้น ที่มีชิ้น *TSPA11* แทรกอยู่ แต่อีกเหตุผลหนึ่งที่ทำให้พลาสมิดแต่ละตัวอย่างมีการเคลื่อนที่บนอะกาโรสเจลแตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากพลาสมิดที่สกัดได้จากแต่ละโคโลนีมีรูปแบบของพลาสมิดที่แตกต่างกัน ซึ่งถ้าพลาสมิดอยู่ในรูปแบบ supercoiled ก็จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าบนอะกาโรสเจล แต่ถ้าอยู่ในรูปแบบ nicked จะเคลื่อนที่ได้ช้าลงบนอะกาโรสเจล ดังนั้นการจะตรวจสอบว่าพลาสมิดมีชิ้น *TSPA11* แทรกอยู่หรือไม่ ควรตรวจสอบด้วยการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและวิธี Polymerase Chain Reaction

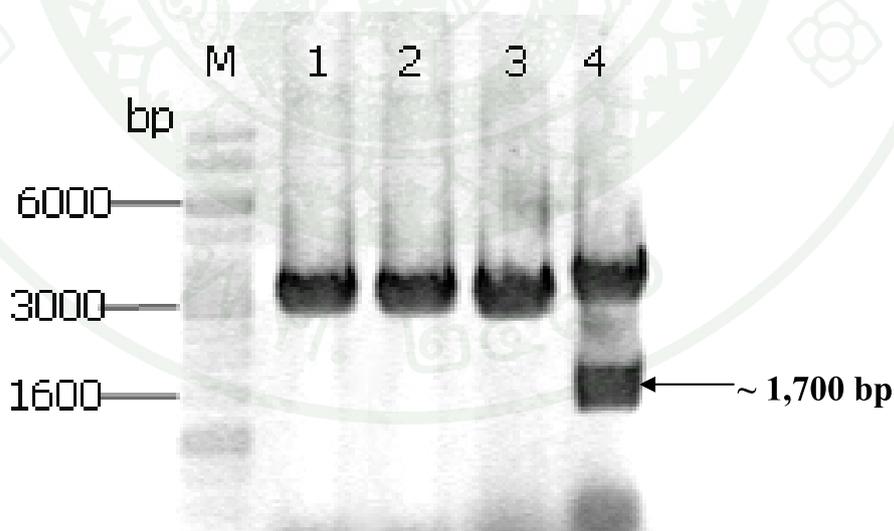


ภาพที่ 6 พลาสมิดที่สกัดได้จากโคโลนีที่ 1 ถึง 4 ที่เจริญเติบโตได้บนอาหารคัดเลือก

โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ช่องที่ 1 ถึง 4 คือ พลาสมิดที่สกัดได้จากโคโลนีที่ 1 ถึง 4 ตามลำดับ

6. การตรวจสอบโคลนที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA) ด้วยการตัดพลาสมิดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ

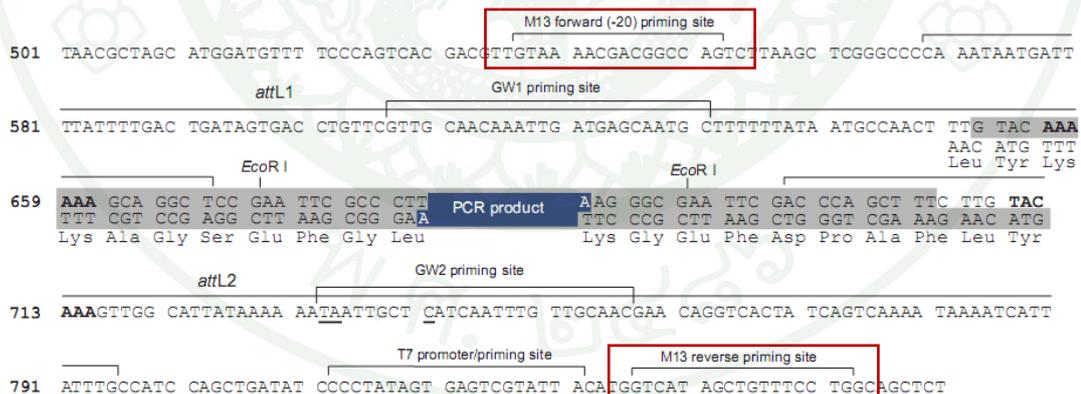
ตัดย่อยพลาสมิดจากทั้ง 4 โคลนนี้ด้วยเอนไซม์ *EcoR* I แล้วตรวจสอบคุณภาพและขนาดบน 1 % อะกาโรสเจล เพื่อตรวจสอบการแทรกของชิ้นยีน *TSPA11* บนเวกเตอร์ พบว่าพลาสมิดจาก โคลนนี้ที่ 1 ถึง 3 ใน ช่อง ที่ 1 ถึง 3 (ภาพที่ 7) พบแถบของดีเอ็นเอเพียงหนึ่งแถบขนาดประมาณ 3,000 คู่เบส ซึ่งคาดว่าเป็นแถบของเวกเตอร์ PCR[®] 8/GW/ TOPO[®] ที่เปลี่ยนจากรูปแบบ supercoiled มาอยู่ในรูปแบบ linear หลังถูกตัดด้วยเอนไซม์ *EcoR* I ส่วนใน ช่อง ที่ 4 (ภาพที่ 7) พบแถบดีเอ็นเอ สองแถบขนาดประมาณ 3,500 คู่เบส กับขนาดประมาณ 1,600 คู่เบส ซึ่งน่าจะเป็นแถบของเวกเตอร์ PCR[®] 8/GW/TOPO[®] และแถบของชิ้นยีน *TSPA11* ที่ถูกตัดออกจากเวกเตอร์ PCR[®] 8/GW/TOPO[®] ด้วยเอนไซม์ *EcoR* I บริเวณตำแหน่ง inserting site ตามลำดับ เห็นได้ว่าแถบดีเอ็นเอที่คาดว่าเป็น แถบของ เวกเตอร์ยังมีขนาดใหญ่กว่า 3,000 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดที่ใหญ่กว่าขนาดโดยประมาณของ เวกเตอร์ PCR[®] 8/GW/ TOPO[®] เป็นไปได้ว่าภายในชิ้นยีน *TSPA11* อาจมีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *EcoR* I แทรกอยู่ก็เป็นได้ เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *EcoR* I ทำให้มีการตัดเหลือมเข้าไปในส่วนของยีน *TSPA11* ด้วย เป็นสาเหตุของยีน *TSPA11* ที่มีขนาดสั้นลง (~ 1,600 คู่เบส) เมื่อเทียบกับขนาดก่อนที่ จะเชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ (~ 1,700 คู่เบส)



ภาพที่ 7 พลาสมิดที่สกัดได้จากโคลนนี้ที่ 1 ถึง 4 ที่เจริญเติบโตได้บนอาหารคัดเลือก ตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ช่องที่ 1 ถึง 4 คือ พลาสมิดจากโคลนนี้ที่ 1 ถึง 4 ที่ตัดย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ตามลำดับ

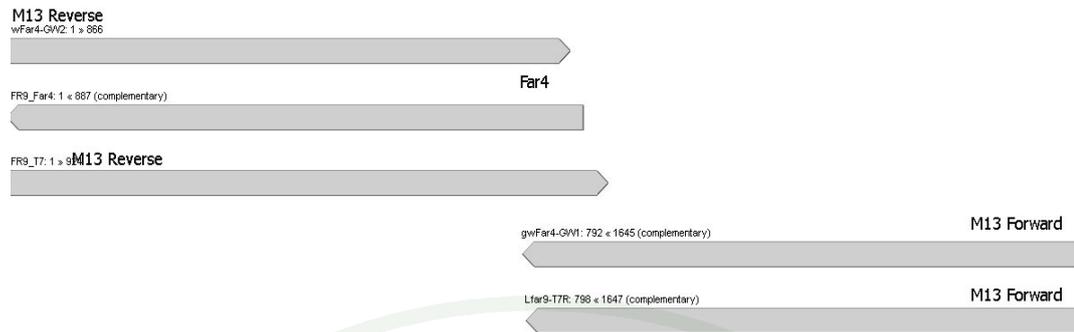
7. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอโดยเครื่องวิเคราะห์หัตถโนมิติ

พลาสมิডจากโคลนนิ่งที่ 4 ที่คาดว่ามิซึซึน *TSPA11* แทรกอยู่บนเวกเตอร์ PCR[®] 8/GW/ TOPO[®] นำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย Big dye dideoxy termination kit ของบริษัทไบโอดีไซน์ ด้วยไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งจดจำบนเวกเตอร์ คือ ไพรเมอร์ M13 forward (-20) [5' GTAAAACGA CGGCCAG 3'] และ M13 reverse [5' CAGGAAAC AGCTATGAC 3'] (ภาพที่ 8) ซึ่งการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ทั้งคู่ จะทำให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของมิซึซึนเป้าหมายทั้งด้าน 5' และ 3' ซึ่งการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในครั้งนี้ เป็นประโยชน์ในการนำเอาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาใช้ออกแบบไพรเมอร์บริเวณส่วนกลางยีน คือ ไพรเมอร์ฟอร์เวอร์ส Far3 [5' GAGATCGAGCTGTGG AGGCT 3'] และรีเวอร์ส Far4 [5' CTCCTTTGGTAAGTCCCATT 3'] เพื่อใช้หาลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนกลางยีนให้ได้ครบสมบูรณ์ จากนั้นใช้โปรแกรม CAP3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>) เพื่อตรวจสอบตำแหน่งที่เหมือนกัน (assemble) แล้วหาจุดที่เหลื่อมซ้อนกันประกอบเป็นนิวคลีโอไทด์เส้นใหม่ที่ครบสมบูรณ์ทั้งยีน (ภาพที่ 8) จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามิซึซึน *TSPA11* ที่ครบสมบูรณ์นี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสิ้น 1,662 คู่เบส ใช้โปรแกรมของ Swiss Institute of Bioinformatics ใน ExPASy Proteomics Server เมนู Translate tool (<http://expasy.org/tools/dna.html>) แปลรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นกรดอะมิโนได้ 553 หน่วย และไม่พบ stop codon ภายในยีน (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 8 ตำแหน่งของไพรเมอร์ M13 forward (-20) และ M13 reverse ซึ่งมีตำแหน่งจดจำอยู่บนเวกเตอร์ PCR[®] 8/GW/TOPO[®] ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเป้าหมายที่แทรกอยู่บนเวกเตอร์ดังกล่าว

ที่มา : Invitrogen (2006)



ภาพที่ 9 การนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *TSPA11* ที่ได้จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ มาตรวจสอบตำแหน่งที่เหมือนกัน (assemble) เพื่อหาจุดเชื่อมซ้อนโดยใช้โปรแกรม CAP3 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>) ได้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากไพรเมอร์ M13 forward กับ reverse และไพรเมอร์ Far4 เพื่อประกอบเป็นนิวคลีโอไทด์เส้นใหม่ของยีน *TSPA11* จากสระระแหน่ที่ครบสมบูรณ์

XbaI
~~~~~

|     |          |          |          |          |          |          |          |          |          |           |          |          |          |          |          |          |   |   |   |   |   |   |
|-----|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|---|---|---|---|---|---|
|     | M        | A        | T        | N        | G        | V        | V        | I        | S        | C         | L        | W        | D        | V        | R        | P        | P | M | T | K |   |   |
| 1   | TCTAGATG | GCTACAAA | CGGCGTCG | TAATTAGT | TGCCTATG | GGACGTGA | GGCCACCT | ATGACGAA | AGATCTAC | CGATGTTT  | GCCGCAGC | ATTAATCA | ACGGATAC | CCTGCACT | CCGGTGGG | TACTGCTT |   |   |   |   |   |   |
|     | H        | E        | P        | S        | M        | W        | A        | D        | T        | F         | S        | N        | F        | Y        | L        | D        | D | Q | E | Q | E |   |
| 65  | GCACGAGC | CAAGCATG | TGGGCTGA | TACTTTTT | CTAACTTT | TATCTTGA | CGATCAGG | AACAAGAA | CGTGCTCG | GTTTCGTAC | ACCCGACT | ATGAAAAA | GATTGAAA | ATAGAACT | GCTAGTCC | TTGTTCTT |   |   |   |   |   |   |
|     | K        | Y        | A        | E        | T        | I        | E        | A        | L        | K         | Q        | E        | A        | R        | G        | M        | L | M | A | A | T | T |
| 129 | AAGTACGC | AGAAACCA | TTGAAGCG | CTGAAGCA | AGAAGCAA | GAGGCATG | CTTATGGC | TGCGACCA | TTCATGCG | TCTTTGGT  | AACTTCGC | GACTTCGT | TCTTCGTT | CTCCGTAC | GAATACCG | ACGCTGGT |   |   |   |   |   |   |
|     | P        | L        | Q        | Q        | M        | I        | L        | I        | D        | T         | L        | E        | R        | L        | G        | L        | A | F | H | F | E |   |
| 193 | CGCTCTTC | CAACAAAT | GATACTAA | TCGACACT | CTCGAGCG | TTTGGGAT | TGGCTTTC | CATTTTGA | GCGGAGAG | GTTGTTTA  | CTATGATT | AGCTGTGA | GAGCTCGC | AAACCCTA | ACCGAAAG | GTAAACT  |   |   |   |   |   |   |
|     | T        | E        | I        | E        | Y        | K        | I        | E        | Q        | I         | N        | A        | A        | E        | D        | G        | V | F | G | L | F |   |
| 257 | GACGGAGA | TCGAATAC | AAAATCGA | ACAAATCA | ACGCTGCA | GAAGACGG | CGTCTTCG | GTTTGTTT | CTGCCTCT | AGCTTATG  | TTTTAGCT | TGTTTAGT | TGCGACGT | CCTCTGCC | GCAGAAGC | CAAAACAA |   |   |   |   |   |   |
|     | A        | T        | A        | L        | R        | F        | R        | L        | L        | R         | Q        | H        | Q        | R        | R        | I        | S | C | D | V | F | D |
| 321 | GCTACGGC | TCTTCGGT | TCCGTTTG | CTCAGACA | GCATCAAC | GACGCATT | TCTTGCGA | TGTTTTCG | CGATGCCG | AGAAGCCA  | AGGCAAAC | GAGTCTGT | CGTAGTTG | CTGCGTAA | AGAACGCT | ACAAAAGC |   |   |   |   |   |   |
|     | K        | F        | V        | D        | K        | D        | G        | K        | F        | E         | E        | S        | L        | S        | N        | N        | V | E | G | L | L |   |
| 385 | ACAAGTTT | GTCGACAA | AGATGGCA | AGTTTGAA | GAATCCCT | TAGCAATA | ATGTTGAA | GGCCTATT | TGTTCAAA | CAGCTGTT  | TCTACCGT | TCAAACCT | CTTAGGGA | ATCGTTAT | TACAACCT | CCGGATAA |   |   |   |   |   |   |
|     | S        | L        | Y        | E        | A        | A        | H        | V        | G        | F         | R        | D        | E        | R        | I        | L        | Q | E | A | V | N |   |
| 449 | AAGCTTGT | ACGAAGCA | GCTCATGT | TGGATTTT | GCGACGAA | AGAATATT | ACAAGAGG | CTGTGAAT | TTCGAACA | TGCTTCGT  | CGAGTACA | ACCTAAAG | CGCTGCTT | TCTTATAA | TGTTCTCC | GACACTTA |   |   |   |   |   |   |
|     | F        | T        | R        | H        | Q        | L        | I        | R        | M        | E         | A        | E        | L        | D        | Q        | S        | P | L | L | I | K | E |
| 513 | TTTACGAG | GCATCAGT | TGATACGC | ATGGAAGC | AGAGTTAG | ATCAGTCT | CCATTATT | AATTAAGC | AAATGCTC | CGTAGTCA  | ACTATGCG | TACCTTCG | TCTCAATC | TAGTCAGA | GGTAATAA | TTAATTTT |   |   |   |   |   |   |
|     | K        | V        | K        | R        | A        | L        | E        | H        | P        | L         | H        | R        | D        | F        | P        | I        | V | Y | A | R | L |   |
| 577 | AGAAAGTG | AAGCGAGC | TTTGGAGC | ACCCTCTT | CATAGGGA | TTTCCCCA | TCGTCTAT | GCACGCCT | TCTTTTAC | TTGCTTCG  | AAACCTCG | TGGGAGAA | GTATCCCT | AAAGGGGT | AGCAGATA | CGTGCGGA |   |   |   |   |   |   |

**ภาพที่ 10** ลำดับนิวคลีโอไทด์และการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนของยีน *TSPA11* โดยใช้โปรแกรมของ Swiss Institute of Bioinformatics ใน ExPASy Proteomics Server เมนู Translate tool วิเคราะห์ข้อมูล

F I S F Y E K D D S R D E L L L K L S K I  
 641 TTTCATTT CCTTTTAC GAAAAGGA TGACTCGA GAGATGAA TTACTTCT CAAACTAT CCAAAATC  
 AAAGTAAA GGAAAATG CTTTTTCT ACTGAGCT CTCTACTT AATGAAGA GTTTGATA GGTTTTAG  
 N F N F M Q N L Y K K E L S Q L S R W W N T  
 705 AACCTCAA CTTTCATGC AGAATCTG TATAAAAA AGAGCTCT CCCAACTC TCCAGGTG GTGGAACA  
 TTGAAGTT GAAGTACG TCTTAGAC ATATTTTT TCTCGAGA GGGTTGAG AGGTCCAC CACCTTGT  
 W D L N S K L P Y A R D R A V E A Y V W G  
 769 CATGGGAT CTGAATTC AAAATTAC CCTACGCA AGAGATCG AGCTGTGG AGGCTTAC GTATGGGG  
 GTACCCTA GACTTAAG TTTTAATG GGATGCGT TCTCTAGC TCGACACC TCCGAATG CATACCCC  
 V G Y H Y E P Q Y S Y V R M G L T K G V L  
 833 AGTAGGAT ACCATTAC GAACCCA ATACTCAT ATGTTCTG ATGGGACT TACCAAAG GAGTACTT  
 TCATCCTA TGGAATAG CTTGGGGT TATGAGTA TACAAGCT TACCCTGA ATGGTTTC CTCATGAA  
 I C G V M D D T Y D N Y D S T L N E A Q L F  
 897 ATTTGTGG AGTCATGG ATGATACA TATGATAA TTATGACT CAACACTT AATGAAGT TCAACTCT  
 TAAACACC TCAGTACC TACTATGT ATACTATT AATACTGA GTTGTGAA TTACTTCG AGTTGAGA  
 T Q V L D K W D R D E A E R L P E Y M K I  
 961 TTACTCAA GTCTTAGA CAAGTGGG ATAGAGAT GAAGTGA ACGACTCC CAGAATAC CAGAAAT  
 AATGAGTT CAGAATCT GTTCACCC TATCTCTA CTTGACTG TGCTGAGG GTCTTTATG TACTTTTTA  
 V Y R F I L S I Y E D Y E R D A A K L G K  
 1025 CGTTTATC GATTTATT TTGAGTAT ATATGAAG ATTATGAA CGTGTATC AGCGAAA TTGGAAAA  
 GCAAATAG CTAATAAA AACTCATA TATACTT TAATACTT GCACTACG TCGCTTTG AACCTTTT  
 S F A A P Y L R N S V K Q L A R A F N E E L  
 1089 AGCTTTGC AGCTCCTT ATTTAAGG AATTCCTG GAAACAAC TGGCAAGG GCATTCAA TGAGGAGC  
 TCGAAACG TCGAGGAA TAAATTC TTAAGGCA CTTTGTGG ACCGTTCG CGTAAGTT ACTCCTCG  
 K W V M E R Q L P S F Q D Y V E N S E K T  
 1153 TGAAGTGG GTTATGGA AAGGCAGC TACCGTCA TTCCAAGA CTACGTAG AGAATTC A GAGAAAAC  
 ACTTCACC CAATACCT TTCCGTCG ATGGCAGT AAGGTTCT GATGCATC TCTTAAGT CTCTTTTG  
 S C V Y T M F A S I I P G L K S V T H E T  
 1217 TAGCTGCG TTTATACC ATGTTTGC TTCTATCA TCCCAGGC TTGAAATC TGTTACCC ATGAAACC  
 ATCGACGC AAAATATGG TACAAACG AAGATAGT AGGGTCCG AACTTTAG ACAATGGG TACTTTGG  
 I D W M K S E P T L A T S T A M I G R Y W N  
 1281 ATTGATTG GATGAAGA GTGAACCC ACGCTCGC AACATCGA CTGCTATG ATCGGTGC GTACTGGA  
 TAATAAC CTACTTCT CACTTGGG TGCGAGCG TTGTAGCT GACGATAC TAGCCAGC CATGACCT  
 D T S S Q L R E S K G G E M L T A L D F H  
 1345 ATGACACC AGCTCTCA GCTCCGTG AAAGCAA GGAGGGGA AATGCTGA CTGCGTTG GATTCCA  
 TACTGTGG TCGAGAGT CGAGGCAC TTTCGTTT CCTCCCCT TTACGACT GACGCAAC CTAAAGGT  
 M K E Y G L T K E E A V S K F E G L V E E  
 1409 CATGAAGG AATATGGT TTGACGAA GGAAGAGG CGGTATCT AAGTTTGA GGGATTGG TTGAGGAA  
 GTACTTCC TTATACCA AACTGCTT CCTTCTCC GCCATAGA TTCAAACCT CCCTAACC AACTCCTT  
 T W K D I N K E F I A T T N Y N V G R E T A  
 1473 ACATGGAA GGATATAA ACAAGGAA TTCATAGC CACAATA ACTATAAT GTGGGTAG AGAAACTG  
 TGTACCTT CCTATATT TGTTCTT AAGTATCG GTGTTGAT TGATATTA CACCCATC TCTTTGAC  
 I T F L N Y A R I C E A S Y S K T D G D A  
 1537 CCATCACA TTCTCAA CTATGCTC GGATATGT GAAGCCAG TTACAGCA AAACCTGAC GGAGACGC  
 GGTAGTGT AAGGAGTT GATACGAG CCTATACA CTTCCGTC AATGTCGT TTTGACTG CCTCTGCG  
 Y T D P N V A K A N V I A L F V D A I V F  
 1601 TTATACAG ATCCTAAT GTTGCCAA GGCAAATG TCATTGCT CTCTTTGT TGATGCCA TAGTCTTT  
 AATATGTC TAGGATTA CAACGGTT CCGTTTAC AGTAACGA GAGAAACA ACTACGGT ATCAGAAA  
 BamHI  
 ~~~~~  
 *
 1665 TGAGGATC C
 ACTCCTAG G

ภาพที่ 10 (ต่อ)

8. การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ และการสร้าง phylogenetic tree

เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *TSPA11* จากสระระแห่ (Beta Far Thai) และยีนที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) โดยใช้เมนู blastn พบว่ายีน (*E*)-β-farnesene synthase จากสระระแห่และเปปเปอร์มินส์ปีชีส์อื่นมีความแตกต่างกันไม่มากนัก ซึ่งมีความเหมือน (Identity) อยู่ในช่วง 97-92% โดยมีความเหมือนกับยีน (*E*)-β-farnesene synthase ใน *Mentha arvensis* มากที่สุดเท่ากับ 97% และมีความเหมือนกับยีนอื่นคือ ยีน gamma-cadinene synthase จาก *Ocimum basilicum* (โหระพา) น้อยที่สุดเท่ากับ 72% (ตารางที่ 2)

เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากยีน (*E*)-β-farnesene synthase จากสระระแห่ที่โคลนได้กับฐานข้อมูลยีนในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้เมนู blastp พบว่าลำดับกรดอะมิโนจากสระระแห่ (Beta Far Thai) มีค่าความเหมือน (Identity) กับลำดับกรดอะมิโนจากยีน (*E*)-β-farnesene synthase ในพืชสกุล *Mentha* สปีชีส์อื่นๆ 91-98 % มีค่า E-value เท่ากับ 0 โดยมีความเหมือนกับยีน (*E*)-β-farnesene synthase ใน *Mentha arvensis* มากที่สุด เท่ากับ 97% รองลงมาใน *Mentha x piperita* และ *Mentha asiatica* เท่ากับ 91 % อีกทั้งยังมีความเหมือนกับยีนอื่นคือ ยีน cis-muuroadiene synthase จาก *Mentha x piperita* เท่ากับ 89% และยีน gamma-cadinene synthase จาก *Ocimum basilicum* (โหระพา) เท่ากับ 61% (ตารางที่ 3) การเปรียบเทียบลำดับ กรดอะมิโน โดยสร้างสายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) พบว่ายีน (*E*)-β-farnesene synthase จากสระระแห่ และเปปเปอร์มินส์ปีชีส์อื่นที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูลมีความแตกต่างกันไม่มากนักแต่ยังอยู่คนละกลุ่มกัน (ภาพที่ 11) โดยมีความเหมือนกับยีน Eβf synthase ใน *Mentha arvensis* (ADC92564.1) มากที่สุด แต่มีความเหมือนกับยีน germacrene A synthase ในองุ่นน้อยที่สุด (ADR66821) ซึ่งเป็น out group (ตารางที่ 4)

การที่ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสมาจากยีน (*E*)-β-farnesene synthase จากสระระแห่กับเปปเปอร์มินส์ที่รายงานโดย Crock *et al.* (1997) และ Prosser *et al.* (2006) มีความแตกต่างกันเล็กน้อย เนื่องจากสระระแห่และเปปเปอร์มินส์เป็นพืชที่อยู่ในสกุลเดียวกัน คือสกุล *Mentha* แต่อยู่ในสปีชีส์ต่างกัน โดยสระระแห่จัดอยู่ในสปีชีส์ *cordifolia* ส่วนเปปเปอร์มินส์จัดอยู่ในสปีชีส์ *piperita* และพบ conserve domain ที่สำคัญคือ DDxxD motif ในลำดับกรดอะมิโนของยีน (*E*)-β-farnesene synthase จากสระระแห่ อยู่ที่ตำแหน่ง 303-307 (ภาพที่ 12) ซึ่ง domain ดังกล่าว มี conserved สูง ในโปรตีนกลุ่ม sesquiterpene synthase ที่มีความสำคัญ คือ เป็นตำแหน่งที่โปรตีนจับกับโคแฟกเตอร์ ได้แก่ Mn^{2+} และ Mg^{2+} เป็นต้น จึงคาดว่ายีนที่โคลนได้จากสระระแห่

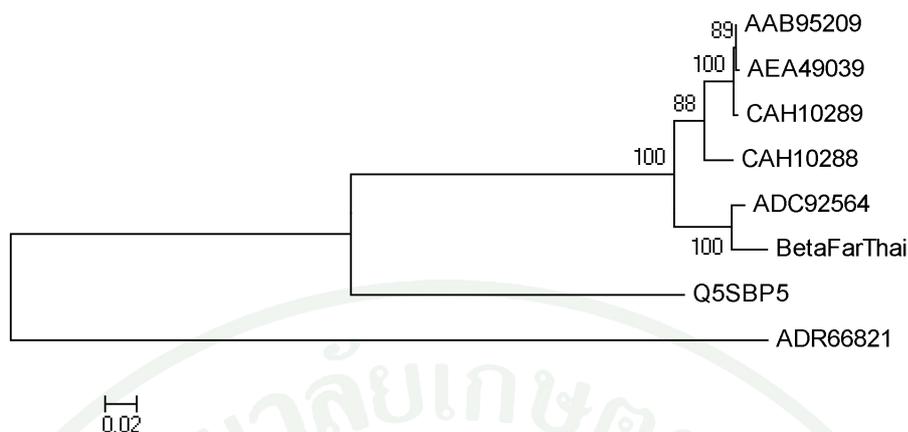
น่าจะสามารรถแปลรหัสเป็นโปรตีนที่ทำงานได้ และไม่พบ targeting sequence ภายในลำดับกรดอะมิโนทาง N-terminal แสดงว่ายีนที่โคลนได้จากสระแทนเป็นยีนที่แปลรหัสเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม sesquiterpene synthase เนื่องจากเอนไซม์ในกลุ่มนี้ เมื่อมีการแปลรหัสเป็นโปรตีนบริเวณไซโตพลาสซึมก็จะทำงานที่บริเวณเดียวกันนี้เลย ไม่เหมือนกับเอนไซม์ในกลุ่ม monoterpene synthase และ diterpene synthase ที่จำเป็นต้องมี targeting sequence ในการส่งโปรตีนที่แปลรหัสบริเวณไซโตพลาสซึมไปทำงานยังบริเวณ plastid ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษายีน (*E*)- β -farnesene synthase ในเปปเปอร์มินของ Crock *et al.* (1997) และ Prosser *et al.* (2006) และการศึกษายีนดังกล่าวในส้ม (*Citrus junos*) ของ Maruyama *et al.* (2001) ที่รายงานว่าพบ DDxxD motif แต่ไม่พบ targeting sequence ในลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากยีน (*E*)- β -farnesene synthase ที่โคลนได้

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *TSPA11* จากสระแทนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้เมนู blastn

Accession	Description	Identity	E-value
FJ999995.1	<i>Mentha arvensis</i> E β f synthase, complete cds	97%	0.0
AF024615.1	<i>Mentha x piperita</i> E β f synthase (Tspa11), complete cds (Crock <i>et al.</i> , 1997)	94%	0.0
HQ337896.1	<i>Mentha asiatica</i> E β f synthase 1 mRNA, complete cds	93%	0.0
HQ337897.1	<i>Mentha asiatica</i> E β f synthase 2 mRNA, complete cds	93%	0.0
AJ786642.1	<i>Mentha x piperita</i> E β f synthase (Tspa11 gene) (Prosser <i>et al.</i> , 2005)	93%	0.0
AJ786641.1	<i>Mentha x piperita</i> cis-muroladiene synthase (ORF1)	92%	0.0
AY693645.1	<i>Ocimum basilicum</i> gamma-cadinene synthase, complete cds (Iijima <i>et al.</i> , 2004)	72%	0.0

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน *TSPA11* จากสระระแหน่งกับลำดับกรดอะมิโนที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้เมนู blastp

Accession	Description	Identity	E value
ADC92564.1	<i>E</i> Bf synthase [<i>Mentha arvensis</i>] (Unpublished)	97%	0.0
AAB95209.1	<i>E</i> Bf synthase [<i>Mentha x piperita</i>] (Crock <i>et al.</i> , 1997)		
AEA49038.1	<i>E</i> Bf synthase 1 [<i>Mentha asiatica</i>] (Unpublished)	91%	0.0
AEA49040.1	<i>E</i> Bf synthase 1 [<i>Mentha asiatica</i>] (Unpublished)		
CAH10289.1	<i>E</i> Bf synthase [<i>Mentha x piperita</i>] (Prosser <i>et al.</i> , 2005)	91%	0.0
AEA49039.1	<i>E</i> Bf synthase 2 [<i>Mentha asiatica</i>] (Unpublished)		
AEA49041.1	<i>E</i> Bf synthase 2 [<i>Mentha asiatica</i>] (Unpublished)	91%	0.0
CAH10288.1	<i>cis</i> -muuroladiene synthase [<i>Mentha x piperita</i>] (Prosser <i>et al.</i> , 2005)	89%	0.0
Q5SBP5.1	RecName: Full=Gamma-cadinene synthase		
AAV63787.1	gamma-cadinene synthase [<i>Ocimum basilicum</i>]	61%	3e-175
AAA19216.1	5-epi-aristolochene synthase [<i>Nicotiana tabacum</i>]	40%	3e-98
AAK15641.1	sesquiterpene cyclase [<i>Capsicum annuum</i>]	39%	3e-92
ADR74192.1	(E)-beta-caryophyllene synthase [<i>Vitis vinifera</i>]	38%	3e-90
AAF74977.1	(+)-delta-cadinene synthase [<i>Gossypium hirsutum</i>]	38%	3e-92
ACX70155.1	terpene synthase 1 [<i>Citrus sinensis</i>]	37%	7e-88
ADR66821.1	germacrene A synthase [<i>Vitis vinifera</i>]	38%	1e-90
AAG41892.1	sesquiterpene synthase 2 [<i>Solanum habrochaites</i>]	35%	8e-89



ภาพที่ 11 สายวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ของยีน (*E*)-β-farnesene synthase จากสระระแห่น, เปปเปอร์มินและยีนอื่นที่นำมาจากฐานข้อมูล GenBank โดย ADC92564.1, Eβf synthase [*Mentha arvensis*]; AAB95209.1, Eβf synthase [*Mentha x piperita*]; CAH10289.1, Eβf synthase [*Mentha x piperita*]; AEA49039.1, Eβf synthase 2 [*Mentha asiatica*]; CAH10288.1, cis-muroladiene synthase [*Mentha x piperita*]; Q5SBP5.1, Gamma-cadinene synthase (โหระพา); ADR66821.1, germacrene A synthase [*Vitis vinifera*] และ BetaFarThai (สระระแห่น)

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบความเหมือนลำดับกรดอะมิโนของยีน *TSPA11* จากสระระแห่นกับลำดับกรดอะมิโนที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank โดยการเปรียบเทียบค่า distance ของสายวิวัฒนาการ

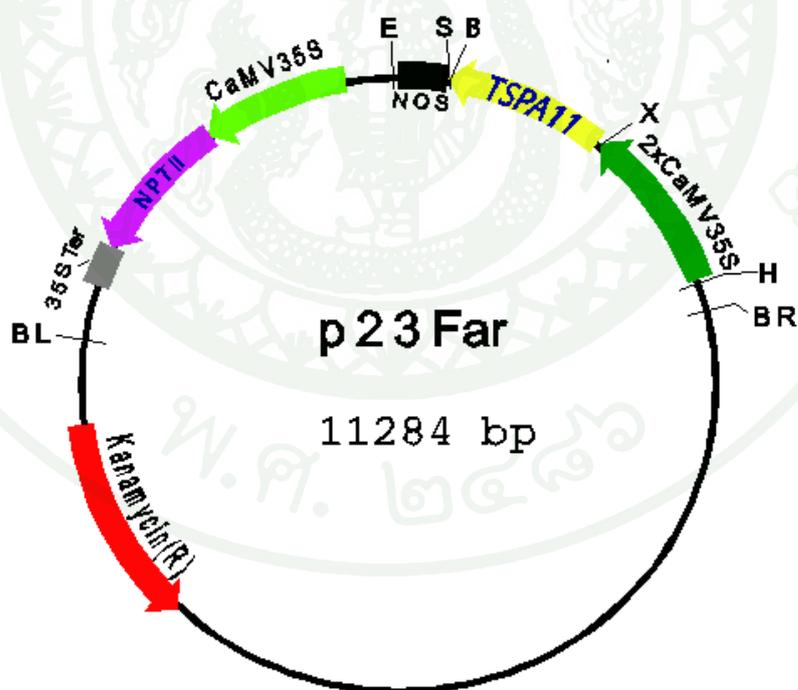
Accession	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]
[1]ADC92564								
[2]AAB95209	0.080							
[3]CAH10289	0.082	0.004						
[4]AEA49039	0.082	0.002	0.006					
[5]CAH10288	0.095	0.038	0.038	0.040				
[6]ADR66821	0.942	0.947	0.947	0.947	0.937			
[7]Q5SBP5.1	0.464	0.461	0.461	0.464	0.431	0.909		
[8]BetaFarThai	0.031	0.093	0.095	0.095	0.109	0.957	0.485	

	1		70
AF374462(1)	MKDMSIPLLAAVSSSTETVTRPPIADFHPTLWGNHFLKSLADVETIDAATQEQHAALKQEVRRMTTTANK		
EBF thai (1)	-----MATNGVVISCLWVVRPPMTKHEPMSWADTFSNFYLDQEQEKY-SETIEALKQEARGLMAAT-T		
AJ786641(1)	-----MATNGVVISCLREVRPPMTKHAPSMWTDTFSNFSLDDKEQQKR-SETIEALKQEARGLMAAT-T		
AJ786642(1)	-----MATNGVVISCLREVRPPMTKHAPSMWTDTFSNFSLDDKEQQKC-SETIEALKQEARGLMAAT-T		
AF024615(1)	-----MATNGVVISCLREVRPPMTKHAPSMWTDTFSNFSLDDKEQQKC-SETIEALKQEARGLMAAT-T		
	71		140
AF374462(71)	LAQKLMIDAVQRLGVAYHFEKETEDELGKVS--HLDSDDLVVS LRFRLFROQGVKISCDVDFDKFKDD		
EBF thai (64)	PLQOMILIDTLERLGLAFHFETEVYKIQIN-AAEDGVFGLFATALRFRLLRQHRRISCDVDFDKFVVK		
AJ786641(64)	PLQOMTILIDTLERLGLAFHFETEVYKIQINAAEDDGFDFATALRFRLLRQHRRVSCDVDFDKFVVK		
AJ786642(64)	PLQOMTILIDTLERLGLSFHFETEVYKIELIN-AAEDDGFDFATALRFRLLRQHRRVSCDVDFDKFIDK		
AF024615(64)	PLQOMTILIDTLERLGLSFHFETEVYKIELIN-AAEDDGFDFATALRFRLLRQHRRVSCDVDFDKFIDK		
	141		210
AF374462(139)	EGKFEESLINDIRGMLSLYEAAAYLIRGEDILDEAIVFTTTHLKSVISISDHSNNSNLAHQIRHSLQIIP		
EBF thai (133)	DGKFEESLNNVEGLLSLYEAAHVGFREERILQEAVNFRHQLIRME--AELDQSPLLIKKVKRALEHP		
AJ786641(134)	DGKFEESLNNVEGLLSLYEAAHVGFREERILQEAVNFRHHLEG----AELDQSPLLIREKVKRALEHP		
AJ786642(133)	DGKFEESLNNVEGLLSLYEAAHVGFREERILQEAVNFRHHLEG----AELDQSPLLIREKVKRALEHP		
AF024615(133)	DGKFEESLNNVEGLLSLYEAAHVGFREERILQEAVNFRHHLEG----AELDQSPLLIREKVKRALEHP		
	211		280
AF374462(209)	LRAAARLEARYFLDIYSRDDLHDETLKFAKLDENIQAARQKEASIMTRWWNDLGFPRKVPYARDRIIT		
EBF thai (201)	LHRDFPIVYARLFISFYEKDDSRDELLKLSKINFNFMQNYKKELSQLSRWWNTWDLNLSKLPYARDRAV		
AJ786641(200)	LHRDFPIVYARLFISYIEKDDSRDELLKLSKVNFKFMQNYKELSQLSRWWNTWDLNLSKLPYARDRVV		
AJ786642(199)	LHRDFPIVYARLFISYIEKDDSRDELLKLSKVNFKFMQNYKELSQLSRWWNTWDLNLSKLPYARDRVV		
AF024615(199)	LHRDFPIVYARLFISYIEKDDSRDELLKLSKVNFKFMQNYKELSQLSRWWNTWDLNLSKLPYARDRVV		
	281		350
		↓ DDxxD motif	
AF374462(279)	ETVFWMLLGVSYEPNLAEGRIFAKSVVCMITITDDTFDAY-CTFEELTLFTEAVTQWDIGLITLPEYMK		
EBF thai (271)	EAYVWG-VGYHYEPQYSYVRMGLTKGVLCGVMDDTYDNYDSTLNEAQLFTQVLDKWDRDEAERLPEYMK		
AJ786641(270)	EAYVWG-VGYHYEPQYSYVRMGLAKGLIIGIMDDTYDNY-ATLNEAQLFTQVLDKWDRDEADRPEYMK		
AJ786642(269)	EAYVWG-VGYHYEPQYSYVRMGLAKGVLCGIMDDTYDNY-ATLNEAQLFTQVLDKWDRDEAERLPEYMK		
AF024615(269)	EAYVWG-VGYHYEPQYSYVRMGLAKGVLCGIMDDTYDNY-ATLNEAQLFTQVLDKWDRDEAERLPEYMK		
	351		420
AF374462(348)	FIVYALLDIYREAEELAKEGRSYGIPIYAKQMQEILIIILVFTFAKWLKYGYPVTEDEYKVSVALRSIGIRIT		
EBF thai (340)	IIVRFILSIYEDYERDAAKLGKSPAAPYLSNSVKQLARAFNEELKQWVMERQLPSFQDYVKNSEKTSCTIYT		
AJ786641(338)	IIVRFILSTCENYERDAAKLGKSPAAPYFKETVKQLARAFNEEQKWVMERQLPSFQDYVKNSEKTSCTIYT		
AJ786642(337)	IIVRFILSIYENYERDAAKLGKSPAAPYFKETVKQLARAFNEEQKWVMERQLPSFQDYVKNSEKTSCTIYT		
AF024615(337)	IIVRFILSIYENYERDAAKLGKSPAAPYFKETVKQLARAFNEEQKWVMERQLPSFQDYVKNSEKTSCTIYT		
	421		490
AF374462(418)	LAVSFDLQDFIATKDNFCILKNAKSLKATETIGRLMDIAGYKFEQRCHNPSAVECVKNQHGVSSE		
EBF thai (410)	MFAS--IIPGLKSVTHTETIDWKSEPTLATSTAMIGRYWNTSSQLRESKGGEMLTALDFHMKEYGLTKE		
AJ786641(408)	MFAS--IIPGLKSVTQETIDWKSEPTLATSTGMIGRYWDDIGSHLRESKGGEMLTALDFHMKEYGLTKE		
AJ786642(407)	MFAS--IIPGLKSVTQETIDWKSEPTLATSTAMIGRYWNTSSQLRESKGGEMLTALDFHMKEYGLTKE		
AF024615(407)	MFAS--IIPGLKSVTQETIDWKSEPTLATSTAMIGRYWNTSSQLRESKGGEMLTALDFHMKEYGLTKE		
	491		560
AF374462(488)	EAVKELLEVANSSWKDINEELNPT--TVPLPLQRLLYFARSGHFYDDGH-DRVTHSLVMKROVALLL		
EBF thai (478)	EAVSKFEGLVEETWKDINKEFIATTNYNVGREIAITFLNYARICEASYSKTDGDGAYLDPNVAKANVVALF		
AJ786641(476)	EAAASKFEGLVEETWKDINKEFIATTNYNVGREIAITFLNYARICEASYSKTDGDGAYLDPNVAKANVVALF		
AJ786642(475)	EAAASKFEGLVEETWKDINKEFIATTNYNVGREIAITFLNYARICEASYSKTDGDGAYLDPNVAKANVVALF		
AF024615(475)	EAAASKFEGLVEETWKDINKEFIATTNYNVGREIAITFLNYARICEASYSKTDGDGAYLDPNVAKANVVALF		
	561		
AF374462(555)	TEPVAI---		
EBF thai (548)	VDAIVF-GS		
AJ786641(546)	VDAIVF---		
AJ786642(545)	VDAIVF---		
AF024615(545)	VDAIVF---		

ภาพที่ 12 DDxxD motif ซึ่งเป็น conserve domain ของลำดับกรดอะมิโนของยีน (*E*)-β-farnesene synthase จากสาระแน (EBF thai) เปปเปอร์มินที่รายงานโดย Crock *et al.* (1997), AF024615 และ Prosser *et al.* (2006), AJ786642 กับ AJ786641 และส้ม (*Citrus junos*) ที่รายงานโดย Maruyama *et al.* (2001), AF374462

9. การ subclone ยีน (*E*)- β -farnesene synthase เข้าสู่ binary Vector pCAMBIA2311

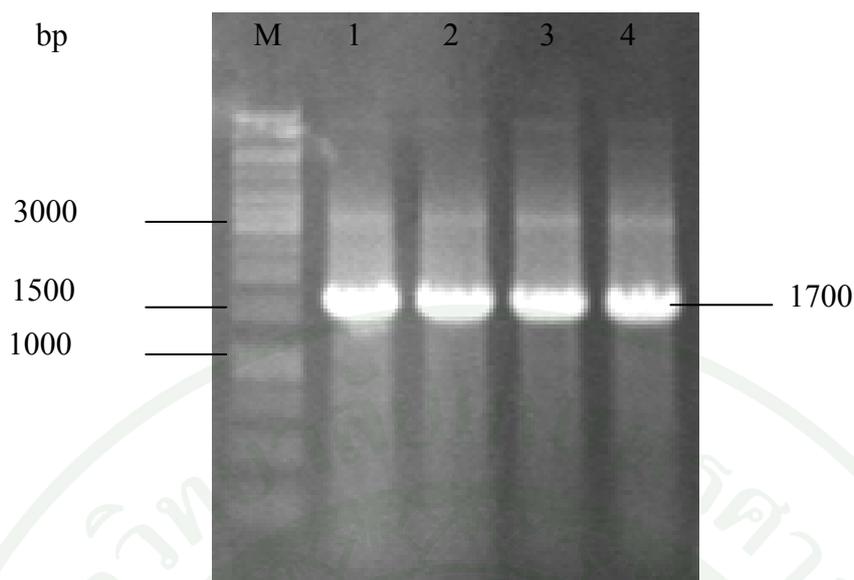
สับโคลนยีน (*E*)- β -farnesene synthase จากสระระแหงที่ตัดยอยดวยเอนไซมตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Bam*HI จากโคลนนิ่งเวคเตอร์ เชื่อมต่อเข้าสู่ไบนารีเวคเตอร์ pCAMBIA2311 โดยแทนที่ *cp* ยีน ให้อยู่ภายใต้การควบคุมของ 2x*CaMV*35S promoter และ NOS terminator และมียีน *nptII* ใช้เป็นยีนคัดเลือก ไบนารีเวคเตอร์มีขนาด ประมาณ 11.2 kb (ภาพที่ 13) ให้ชื่อว่า pCAMBIA23Far เนื่องจากไบนารีเวคเตอร์นี้มีขนาดใหญ่ การถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียจึงทำได้ยาก ดังนั้นจึงเลือกที่จะนำเวคเตอร์ดังกล่าวเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α โดยวิธี electroporation แล้วคัดเลือกแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดถูกผสมบนอาหาร 2xYT ที่มี Kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และตรวจสอบผลโดยเทคนิคพีซีอาร์ (ภาพที่ 14) พบว่าพลาสมิดที่สกัดได้จากโคโลนีที่เติบโตได้บนอาหารคัดเลือกที่สุ่มมาทั้งหมดสี่โคโลนี พบชิ้นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 1,700 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดเดียวกับขนาดของยีน *TSP11* จากไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *TSP11* ซึ่งจะเห็นได้ว่าการถ่ายโอนพลาสมิดขนาดใหญ่เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านโดยวิธี electroporation นั้นมีประสิทธิภาพ



ภาพที่ 13 แผนที่ยีนของพลาสมิด pCAMBIA23Far ที่อยู่ภายใต้การควบคุมของ

2x*CaMV*35S promoter และ NOS terminator และมียีน *nptII* ใช้เป็นยีนคัดเลือก

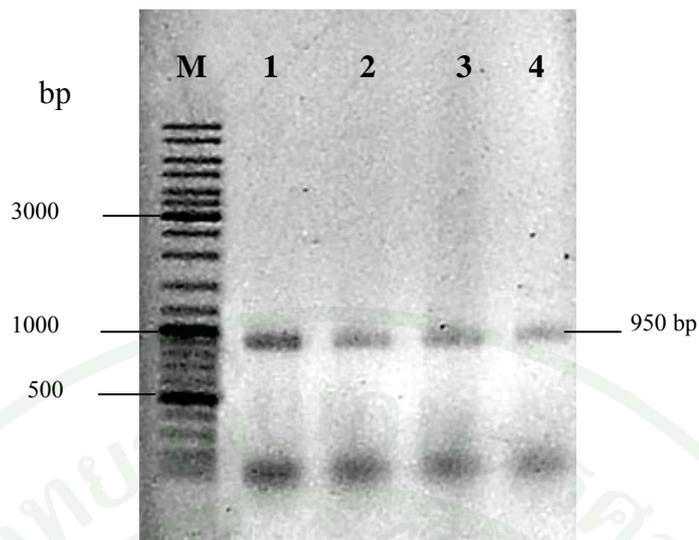
ไบนารีเวคเตอร์มีขนาดประมาณ 11.2 kb



ภาพที่ 14 การตรวจสอบการถ่ายโอนเวกเตอร์ pCAMBIA23Far เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ช่องที่ 1 ถึง 4 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยไพรเมอร์ Far1X และ Far2B ของพลาสมิดที่สกัดจากโคโลนีที่ 1 ถึงโคโลนีที่ 4 ตามลำดับ

10. การถ่ายโอนยีนเข้าสู่เชื้อ *Agrobacterium*

ถ่ายโอนเวกเตอร์ pCAMBIA23Far เข้าสู่เชื้อ *Agrobacterium* สายพันธุ์ AGL-1 โดยวิธี electroporation เนื่องจากวิธีการดังกล่าวเหมาะสมในการถ่ายโอนพลาสมิดขนาดใหญ่เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน อีกทั้งกรณีของการถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่ *Agrobacterium* นั้นจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องใช้วิธีการนี้เนื่องจากผนังเซลล์ของ *Agrobacterium* มีความหนาและเป็นเมือก การถ่ายโอนพลาสมิดด้วย calcium chloride จะทำให้ได้ประสิทธิภาพต่ำ เมื่อทำการวิเคราะห์โคลนด้วยวิธีการพีซีอาร์ (ภาพที่ 15) โดยเลือกใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *TSPA11* บริเวณส่วนกลางยีน (internal primer) คือ ไพรเมอร์ Far3 และ Far2B ที่ให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 950 คู่เบส เนื่องจากสามารถลดเวลาในขั้น annealing ให้เหลือเพียง 30 วินาที ในแต่ละรอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ทำให้ตรวจสอบผลได้เร็วกว่าการใช้ไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งบริเวณปลาย 5' และ 3' ที่ให้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 1,700 คู่เบส ที่ใช้เวลาในขั้น annealing รอบละ 1 นาที เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง ซึ่งผลการตรวจสอบพบว่าโคโลนีที่สุ่มเลือกมาทั้งหมดสี่โคลนนั้น ตรวจสอบขึ้นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 950 คู่เบส เห็นได้ว่าการถ่ายโอนพลาสมิดขนาดใหญ่เข้าสู่เชื้อ *Agrobacterium* โดยวิธี electroporation นั้นมีประสิทธิภาพ ซึ่งรีคอมมิแนนท์ *Agrobacterium* นี้จะนำไปใช้ประโยชน์ในการถ่ายโอนยีน *TSPA11* เข้าสู่ยาสูบ



ภาพที่ 15 การตรวจสอบการถ่ายโอนเวกเตอร์ pCAMBIA23Far เข้าสู่เชื้อ *Agrobacterium* สายพันธุ์ AGL-1 ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ช่องที่ 1 ถึง 4 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากไพรเมอร์ Far3 และ Far2B ของพลาสมิดโคโลนี่ที่ 1 ถึง 4 ตามลำดับ

11. การถ่ายยีน (*E*)- β -farnesene synthase เข้าสู่ยาสูบโดยใช้เชื้อ *Agrobacterium* ที่มีพลาสมิด pCAMBIA23Far

การถ่ายยีน (*E*)- β -farnesene synthase ซึ่งเป็นยีนที่จะถอดรหัสเป็นเอนไซม์ (*E*)- β -farnesene synthase ที่อยู่บนพลาสมิด pCAMBIA23Far โดย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 เข้าสู่ใบยาสูบใบใหญ่ พบว่าชิ้นส่วนใบยาสูบทั้งที่ได้รับการถ่ายยีนและไม่ได้รับการถ่ายยีนยังคงมีสีเขียวสดหลังการ cocultivation บนอาหาร MS เป็นเวลา 3 วัน แต่หลังจากคัดเลือกบนอาหาร MSHGC (MS ที่มีฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร สารปฏิชีวนะ geneticin 50 มิลลิกรัมต่อลิตรและ cefotaxime 200 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าเนื้อเยื่อใบยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลซีดและไม่มีแคลลัสเกิดขึ้นเลย (ภาพที่ 16 ก)) ส่วนบริเวณรอยตัดและบริเวณที่เกิดบาดแผลจากปากกิบของเนื้อเยื่อใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน พบมีแคลลัสซึ่งมีลักษณะเป็นก้อนอัดแน่นสีเขียวเกิดขึ้น (ภาพที่ 16 ข)) โดยอัตราการเกิดแคลลัสของชิ้นเนื้อเยื่อคิดเป็นร้อยละ 77.9 และประสิทธิภาพการถ่ายยีนในใบยาสูบหลังการคัดเลือกบนอาหารคัดเลือกโดยใช้สารปฏิชีวนะ geneticin เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบมีต้นยาสูบที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะจำนวน 47 line คิดเป็นร้อยละ 30

สอดคล้องกับการศึกษาของ Svab *et al.* (1990) และ Newell *et al.* (2003) ที่รายงานว่าการใช้สารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโตไคนิน (BA) ร่วมกับสารกลุ่มออกซิน (NAA) มีผลต่อการพัฒนาของเนื้อเยื่อพืชคือ สารไซโตไคนินกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์และการเจริญเติบโตของกลุ่มเซลล์พัฒนาขึ้นเป็นลำต้น ขณะที่สารออกซินกระตุ้นให้เกิดการขยายขนาดและการยึดตัวของเซลล์ ดังนั้นการใช้สาร BA ร่วมกับ NAA ทำให้กลุ่มเซลล์พัฒนากลายเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ และระดับของสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมในการชักนำเนื้อเยื่อใบยาสูบให้เจริญเป็นยอดที่สมบูรณ์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ สนิธิธร (2549) ที่ชักนำให้ชิ้นส่วนใบยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนเจริญเป็นยอดบนอาหารสังเคราะห์สูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

คัดเลือกเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีนออกจากเนื้อเยื่อพืชที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน โดยยีนคัดเลือก neomycin phosphor transferase (*nptII*) เนื่องจากเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนเท่านั้นที่จะมีการแสดงออกของยีน *nptII* ให้ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ geneticin ที่ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ โดยกระบวนการทำงานของไรโบโซมขนาด 80s (Goodwin *et al.*, 2004) ดังนั้นเนื้อเยื่อพืชที่ได้รับการถ่ายยีนจะสามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกได้เนื่องจากมียีนต้านทานสารปฏิชีวนะ geneticin ในขณะที่เนื้อเยื่อพืชที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนไม่สามารถเจริญบนอาหารคัดเลือกได้ เนื่องจากไม่ได้รับยีนต้านทานสารปฏิชีวนะ geneticin เมื่อเนื้อเยื่อถูกยับยั้งการสร้างโปรตีนก็จะมีลักษณะสีขาวซีดและตายในที่สุด ในการทดลองครั้งนี้พบว่าระดับสารปฏิชีวนะ geneticin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถคัดเลือกเนื้อเยื่อยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนได้ทั้งหมด อีกทั้งพบว่าการคัดเลือกด้วย geneticin 50 มิลลิกรัมต่อลิตรใช้เวลาสั้นกว่าการคัดเลือกด้วย kanamycin 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ดังเช่นการทดลองของ Dobhal *et al.* (2010) ที่ต้องใช้เวลาในการคัดเลือกว่าถึง 3 สัปดาห์

ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพการถ่ายยีนในใบยาสูบพันธุ์ White Burley โดยใช้เชื้อ *Agrobacterium* ที่มีพลาสมิด pCAMBIA23Far หลังการคัดเลือกบนอาหารคัดเลือก

Experiment	No. of explants co-cultivated	No. of explants producing callus (2 weeks)	Total no. of geneticin resistant shoot (8 weeks)
Control	20	0	0
1	81	60	21
2	100	81	26
Total	181	141	47
Frequency (%)		77.9	30



(ก)



(ข)

ภาพที่ 16 ชี้นใบยาสูบหลังการคัดเลือกบนอาหารคัดเลือก (MS ที่มีฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 1 mg/L NAA ความเข้มข้น 0.1 mg/L สารปฏิชีวนะ geneticin 50 mg/L และ cefotaxime 200 mg/L) พบมีแคลลัสซึ่งมีลักษณะเป็นก้อนอัดแน่นสีเขียวเกิดขึ้น เป็นเวลา 2 สัปดาห์
 (ก) ชี้นใบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนไม่สามารถเจริญเป็นแคลลัสได้บนอาหารคัดเลือก
 (ข) ชี้นใบที่ได้รับการถ่ายยีนสามารถเจริญเป็นแคลลัสได้บนอาหารคัดเลือก
 (ในวงกลมสีน้ำเงินแสดงแคลลัสของยาสูบ)



(ก)

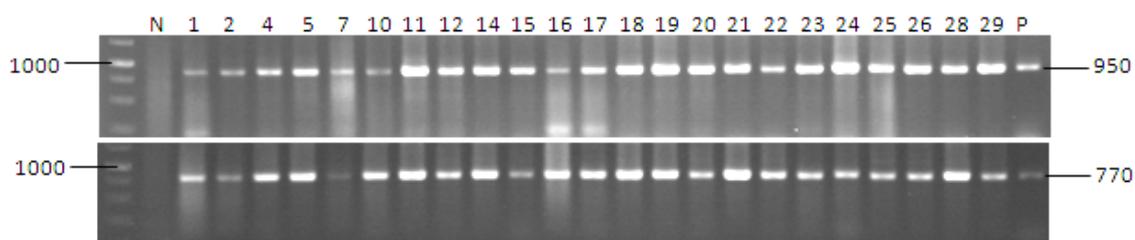
(ข)

(ค)

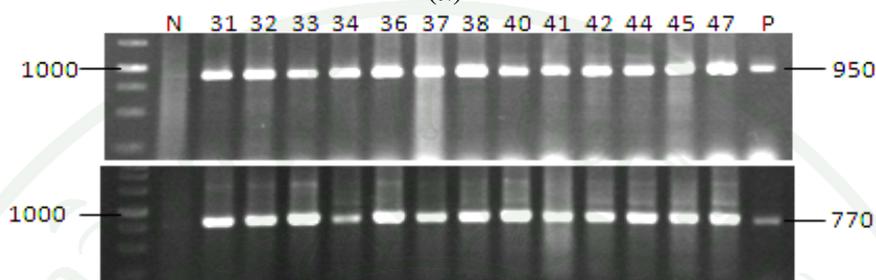
ภาพที่ 17 ลักษณะต้นกล้ายาสูบตัดแปลงพันธุกรรมอายุ 5 สัปดาห์ ที่ได้รับการถ่ายยีนบนอาหารคัดเลือก หลังเพาะเลี้ยงให้เกิดรากและเพิ่มการเจริญเติบโต (ก) ต้นกล้ายาสูบ Line 19 (ข) ต้นกล้ายาสูบ line 20 และ (ค) ต้นกล้ายาสูบ line 21

12. การตรวจสอบหายีน (*E*)- β -farnesene synthase ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

ทดสอบการแสดงออกของยีนแบบ stable transformation ซึ่งเป็นการเชื่อมยีนเป้าหมายเข้ากับจีโนมของพืชโดยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่ายาสูบรุ่น R_0 ทุก line ที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ geneticin ตรวจพบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีนเป้าหมายคือยีน *TSPA11* ที่มีขนาดประมาณ 950 คู่เบส และยีนคัดเลือก คือ ยีน *nptII* ขนาดประมาณ 770 คู่เบส จากการใช้ไพรเมอร์ Far3 และ Far2B และไพรเมอร์ NPT1 และ NPT2 ตามลำดับ (ภาพที่ 18 (ก) และ(ข), ช่อง 1 ถึง 47) ตามลำดับ แต่ไม่พบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *TSPA11* และยีน *nptII* ในยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ภาพที่ 18 (ก) และ(ข), ช่อง N) ทำให้คาดว่ายาสูบที่ชักนำให้เจริญเป็นต้นและมีความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะน่าจะได้รับยีน *TSPA11* สอดแทรกเข้าไปในจีโนมจริง



(ก)

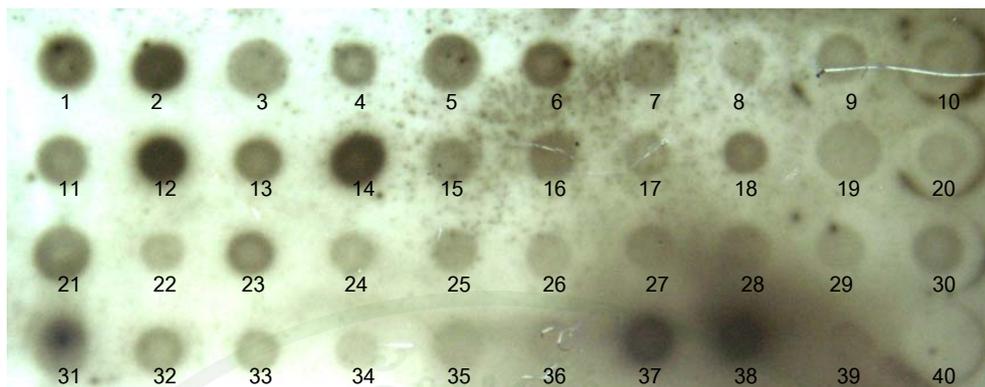


(ข)

ภาพที่ 18 การตรวจสอบการสอดแทรกของยีน *TSP11* เข้าสู่จีโนมของยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ช่อง N คือ ยาสูบไม่ได้ถ่ายยีน ช่องที่ 1 ถึง 47 คือ ตัวอย่างยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนเบอร์ 1 ถึง 47 ตามลำดับ และช่อง P คือ พลาสมิด pCAMBIA23Far (ก) ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *TSP11* ขนาดประมาณ 950 คู่เบส และยีน *nptII* ขนาดประมาณ 770 คู่เบส ของตัวอย่างยาสูบดัดแปลงพันธุกรรม ในตัวอย่างที่ 1 ถึง 29 (ข) ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *TSP11* ขนาดประมาณ 950 คู่เบส และยีน *nptII* ขนาดประมาณ 770 คู่เบส ของตัวอย่างยาสูบดัดแปลงพันธุกรรม ในตัวอย่างที่ 31 ถึง 47

13. การตรวจสอบหายีน (*E*)- β -farnesene synthase ในต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยเทคนิค Dot blot hybridization

ใช้เทคนิค Dot blot hybridization ตรวจยืนยันผลการมียีน *TSP11* ในดีเอ็นเอตัวอย่างจากยาสูบที่สามารถชักนำให้เจริญเป็นต้นที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ geneticin พบว่ายาสูบที่ถ่ายยีนทุก line สามารถตรวจสอบพบสัญญาณการ hybridization ระหว่างยีนเป้าหมาย (*TSP11*) และดีเอ็นเอโพรบที่ติดฉลากด้วยสารปลดครึ่งสี Digoxigenin (DIG) บนแผ่นฟิล์มได้ (ภาพที่ 19) ดังนั้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนจำนวน 36 line น่าจะได้รับยีน *TSP11* เข้าไปเชื่อมอยู่ในจีโนมจริงเนื่องจากให้ผลที่สอดคล้องกันในการตรวจสอบหายีน *TSP11* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์และวิธี Dot blot hybridization



ภาพที่ 19 การตรวจสอบการสอดแทรกของยีน *TSPA11* เข้าสู่จีโนมของยาสูบที่
ได้รับการถ่ายยีน โดยวิธีการ Dot blot hybridization ด้วยโพรบ *TSPA11*-DIG
โดยจุด ที่ 1 ถึง 36 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของยาสูบตัดแปลงพันธุกรรมตัวอย่างที่
1 ถึง 36, จุดที่ 37 ถึง 39 คือ positive control (pCAMBIA23Far) และจุดที่ 40 คือ
negative control (ตัวอย่างดีเอ็นเอของยาสูบที่ไม่ได้ถ่ายยีน)

14. การศึกษาการแสดงออกของยีน (*E*)- β -farnesene synthase ในยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนโดยวิธี Relative Real-time RT-PCR

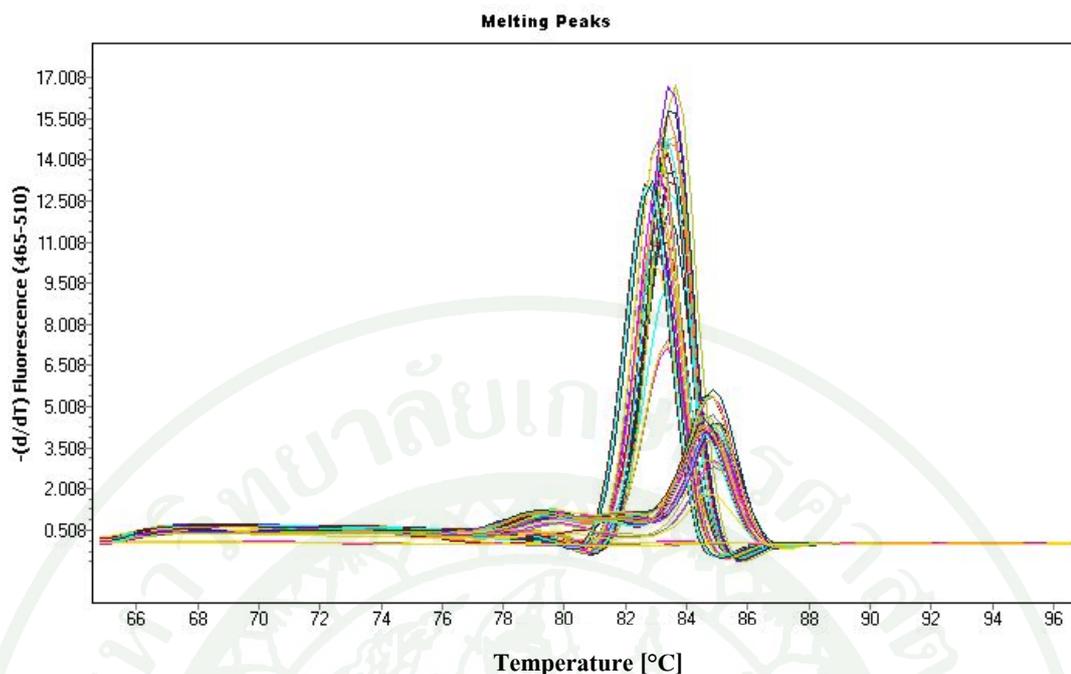
การวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีน (*E*)- β -farnesene synthase โดยวิธี Relative Real-time RT-PCR ด้วย LightCycler[®] 480 Real-Time PCR System (Roche, Switzerland) และใช้ SYBR dye เป็นตัวตรวจสอบการแสดงออกของยีน และใช้ยีน *EPSPS* เป็นยีนอ้างอิง (internal control) นั้น จำเป็นจะต้องทราบถึงความจำเพาะเจาะจงของผลการศึกษาที่ได้ โดยจะพิจารณาถึงความจำเพาะเจาะจงของ primer ที่จำเพาะกับยีนเป้าหมาย (*TSPA11*) และยีนอ้างอิง (*EPSPS*) ซึ่งพิจารณาได้จาก Melting curve ที่จะแสดงค่าอุณหภูมิที่จุดหลอมเหลว (T_m) ที่ควรจะมีจุดสูงสุดเพียง 1 จุดเท่านั้น เนื่องจากการเพิ่มของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นต้องไม่มีการเพิ่มของดีเอ็นเอในส่วนอื่น (Non specific product) หรือเป็นดีเอ็นเอที่เกิดจาก primer dimmers เมื่อพิจารณา Melting curve ของไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *TSPA11* และยีน *EPSPS* พบว่าค่า T_m ของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *TSPA11* มีค่าเท่ากับ 83 องศาเซลเซียส และค่า T_m ของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *EPSPS* มีค่า T_m เท่ากับ 85 องศาเซลเซียส รวมถึงไม่มีส่วนของ primer dimmers และการปนเปื้อนของดีเอ็นเออื่นเกิดขึ้น เนื่องจากการเกิดจุดสูงสุดของกราฟเพียงตำแหน่งเดียว (ภาพที่ 20) แสดงว่าไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาการแสดงออกของยีน (*E*)- β -farnesene synthase มีความจำเพาะเจาะจงกับยีน (*E*)- β -farnesene synthase เท่านั้น

เมื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีน (*E*)-β-farnesene synthase ในยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน โดยการนำค่า Ct ที่ได้จากยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนที่สุ่มเลือกมาทดลอง มาทำการ calibrate กับค่า Ct ของยีน *EPSPS* ที่ได้จากยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ผลจะแสดงออกมาในรูปแบบ Relative expression level ซึ่งแสดงให้เห็นจากสูตรคำนวณดังนี้ คือ

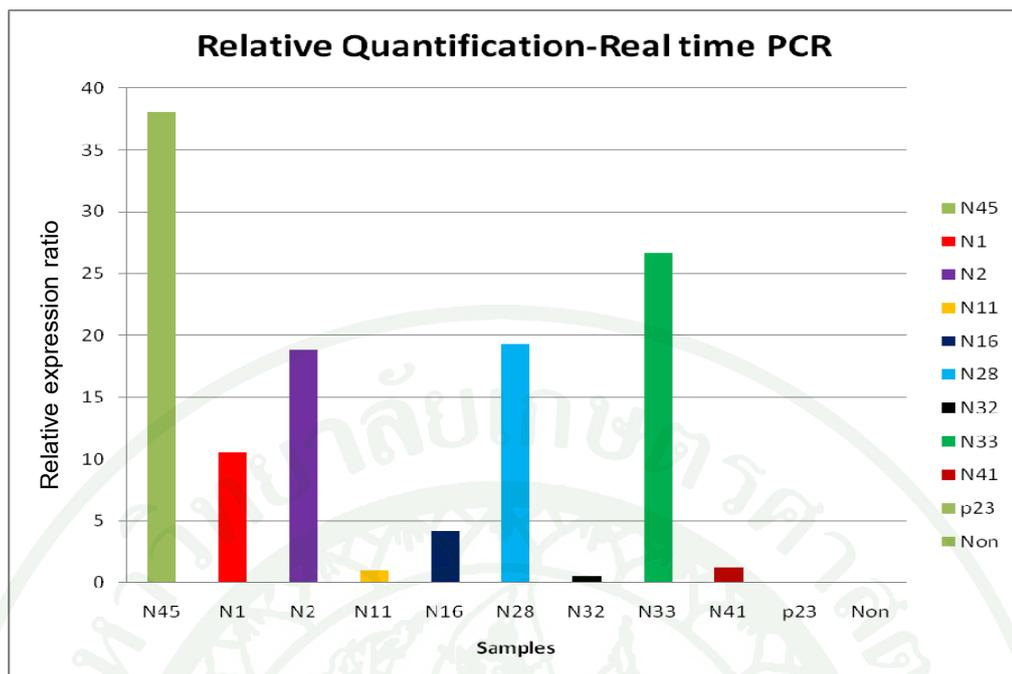
$$\text{Relative Quantification} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{transgenic}) - \Delta C_t (\text{non transformed})$$

ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *TSP11* ในตัวอย่างยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนที่สุ่มมาทดลองทั้งสิ้นจำนวน 9 line พบว่ายาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนทุก line มีการแสดงออกของยีน *TSP11* ในระดับต่าง ๆ กัน โดยใน line ที่ 45 พบมีการแสดงออกของยีน *TSP11* สูงสุด รองลงมาคือ line 33, 28, 2, 1, 16, 41, 11 ตามลำดับ และ line ที่ 32 มีการแสดงออกของยีน *TSP11* ต่ำที่สุด และสามารถแบ่งระดับการแสดงออกของยีนได้เป็นสามระดับด้วยกัน คือ กลุ่มที่มีการแสดงออกยีนในระดับสูง ได้แก่ line 45 และ line 33 กลุ่มที่มีการแสดงออกของยีนในระดับปานกลาง ได้แก่ line 1, line 2 และ line 28 และกลุ่มที่มีการแสดงออกของยีนในระดับต่ำ ได้แก่ line 11, line 16, line 32 และ line 41 ทั้งนี้ไม่พบการแสดงออกของยีน *TSP11* ในยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ภาพที่ 21)



ภาพที่ 20 Melting curve แสดงค่า melting temperature (T_m) ของไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน (*E*)- β -farnesene synthase (*TSPA11*) และยีน *EPSPS* ในยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนและยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน โดยใช้เทคนิค Relative Real-time PCR ซึ่ง peak ของยีน *TSPA11* มีค่า Fluorescence สูง และมีค่า T_m เท่ากับ 83 องศาเซลเซียส ส่วน peak ของยีน *EPSPS* มีค่า Fluorescence ต่ำ และมีค่า T_m เท่ากับ 85 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 21 การแสดงออกของยีน *TSPA11* ในยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนและยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม คือยีน *EPSPS* ด้วยเทคนิค Relative Real-time PCR โดย N45 (line 45), N1 (line 1), N2 (line 2), N11 (line 11), N16 (line 16), N28 (line28), N32 (line 32), N33 (line33), N41 (line 41), p23 (pCAMBIA23Far) และ Non (ยาสูบไม่ได้ถ่ายยีน)

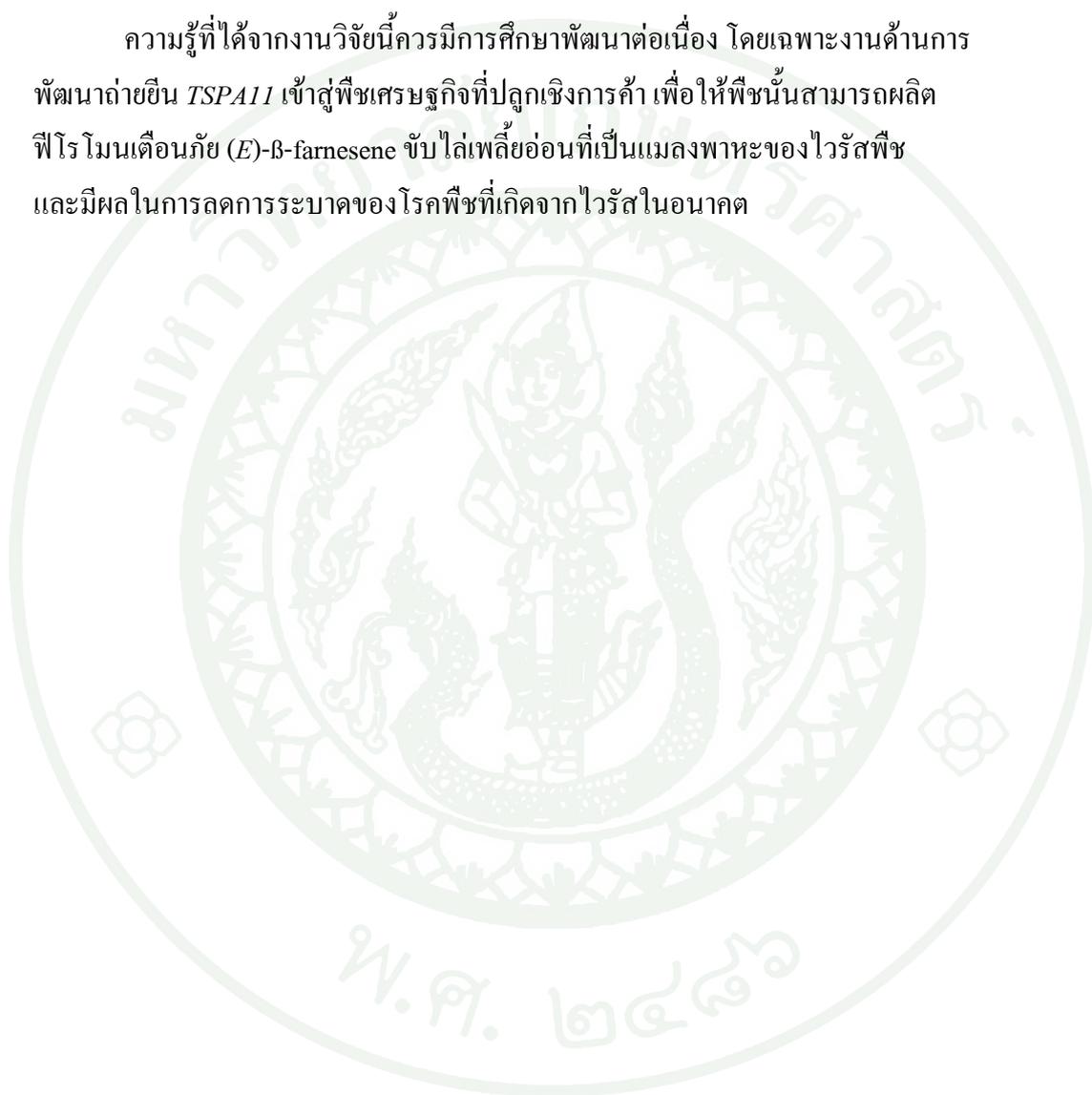
สรุป

ในงานวิจัยนี้สามารถโคลนยีน (*E*)- β -farnesene synthase (*TSPA11*) จากสระระแหงนเป็ นผลสำเร็จ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ครบสมบูรณ์ในส่วนของ Open Reading Frame (ORF) ซึ่งมีขนาด 1662 คู่เบส แปลรหัสได้กรดอะมิโนขนาด 553 หน่วย โดยรวมรหัสหยุดด้วย ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่โคลนได้มีบางตำแหน่งแตกต่างกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน (*E*)- β -farnesene synthase ที่พบในฐานข้อมูล GenBank แต่กัอยู่ใ นอัตร่าส่วนที่ค่อนข้างต่ำ และไม่พบ stop codon ภายในยีน แสดงให้เห็นว่ายีนที่ได้มานี้ครบสมบูรณ์ เนื่องจากมีการออกแบบไพรเมอร์เพื่อการโคลนยีนที่เหมาะสม โดยใช้ข้อมูลยีน (*E*)- β -farnesene synthase จากเปปเปอร์มีน เป็นพีชที่อยู่ในสกุลเดียวกันกับสระระแหงนคือ สกุล *Mentha* ที่สืบค้นได้จากฐานข้อมูล GenBank จำนวน 3 accessions เพื่อออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ โดยฟอร์เวิร์ดและรีเวิร์สไพรเมอร์จะมีการเติม linker เข้าไปด้ว ยคือตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *Xba*I และ *Bam*HI เข้าไปทางด้านปลาย 5' และ 3' ของยีนตามลำดับ อีกทั้งไม่พบตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *Xba*I และ *Bam*HI ภายในยีน เป็นประโยชน์ในการ subclone โดยสามารถบังคับทิศทางของยีนในการเชื่อมเข้าสู่ binary vector ได้ binary vector ที่ได้จะนำไปใช้ถ่ายยีน *TSPA11* เข้าสู่ต้นยาสูบโดยอาศัยเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นตัวส่งถ่ายยีน ส่วนการสกัด RNA รวมจากใบสระระแหงนนั้ ใช้ชุดสกัดเนื่องจากทำการสกัดด้วอย่างปริมาณไม่มาก ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายที่จ้ต้องซื้อสารเคมีที่มีราคาแพง เช่นเดียวกับชุดปฏิบัติการ One Step RT-PCR และได้เลือกใช้ PCR[®] 8/GW/TOPO cloning vector เนื่องจากเป็นเวคเตอร์ที่มีประสิทธิภาพดีในการเชื่อมต่อกับยีนเป้าหมาย เพราะมีการป้องกันการเชื่อมต่อกันเองของ vector

สามารถถ่ายโอนไบนารีเวคเตอร์ pCAMBIA23Far เข้าสู่เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 เป็นผลสำเร็จ นำไปใช้เป็นตัวส่งถ่ายยีน *TSPA11* เข้าสู่ยาสูบใบใหญ่ โดยการเลี้ยงชิ้นส่วนใบยาสูบร่วมกับเชื้อ *Agrobacterium* เป็นเวลา 3 วัน ทำการคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ด้รับการถ่ายยีนและชักนำเนื้อเยื่อดังกล่าวให้เจริญเป็นแคลลัสและขอดบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ที่มี naphthaleneacetic acid (NAA) 0.1 mg/L, benzyladenine (BA) 1 mg/L, geneticin 50 mg/L และ cefotaxime 200 mg/L พบว่าด้ยอดที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ geneticin ในระยะเวลา 8 สัปดาห์ทั้งหมด 47 line คิดประสิทธิภาพในการถ่ายยีนด้ร้อยละ 30 ซึ่งยาสูบที่ด้รับการถ่ายยีนจำนวน 36 line ตรวจพบว่ามียีน *TSPA11* สอดแทรกในจีโนมทั้งการตรวจสอบด้ววิธี Polymerase Chain Reaction ซึ่งพบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *TSPA11* และยีนคัดเลือก *nptII* ที่มีขนาดประมาณ 950 คู่เบส และ 770 คู่เบส ตามลำดับ และการตรวจสอบด้ววิธี Dot blot hybridization ที่พบสัญญาณการ hybridization ระหว่างยีนเป้าหมาย (*TSPA11*) และดีเอ็นเอโพรบบนแผ่นฟิล์ม

รวมทั้งตรวจพบการแสดงออกของยีน *TSPA11* ในแต่ละตัวอย่างของยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนที่สุ่มเลือกมาในระดับแตกต่างกัน โดยพบว่ายีน *TSPA11* มีการแสดงออกของยีนมากที่สุดในยาสูบ line 45 และมีการแสดงออกของยีนน้อยที่สุดใน line 32 รวมถึงไม่พบการแสดงออกของยีนดังกล่าวในยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน จากการตรวจสอบด้วยวิธี real time RT-PCR

ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้ควรมีการศึกษาพัฒนาต่อเนื่อง โดยเฉพาะงานด้านการพัฒนาถ่ายยีน *TSPA11* เข้าสู่พืชเศรษฐกิจที่ปลูกเชิงการค้า เพื่อให้พืชนั้นสามารถผลิตฟีโรโมนเตือนภัย (*E*)- β -farnesene ขับไล่เพลี้ยอ่อนที่เป็นแมลงพาหะของไวรัสพืช และมีผลในการลดการระบาดของโรคพืชที่เกิดจากไวรัสในอนาคต



เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา. 2548. การแสดงออกของยีนที่ถ่ายเข้าสู่ยาสูบ (*Nicotiana tabacum* cv. **Ottawa**) เมื่อใช้โปรโมเตอร์ **AtExp4**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- นพพร คล้ายพงษ์พันธุ์. 2551. การปรับปรุงพันธุ์พืชต้านทานแมลง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สมพร ภูதியานันต์. 2551. สมุนไพรไล่ตัว เล่มที่ 13 ว่าด้วยสมุนไพรแต่งสี กลิ่น รส. คณะเภสัชกรรม คณะเภสัชกรรม มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เอราวัณการพิมพ์, เชียงใหม่.
- สุพัฒน์ อรรถธรรม. 2552. โรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัส. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.
- สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล. 2543. พันธุ์วิศวกรรมเบื้องต้น. พิมพ์ครั้งที่ 1. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สินีธร สมสืบ. 2549. การถ่ายยีนเข้าสู่คลอโรพลาสต์ในยาสูบ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- อรนุช กองกาญจนะ และ วัชรรา ชูณหวงศ์. 2540. แมลงศัตรูข้าวโพดและการป้องกันกำจัด. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์ชุมนุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด, กรุงเทพฯ.
- Abdallah, M., A. H. Fahmy, K. S. Abdalla and W. S. Maaty. 2004. Transformation of a high Molecular weight (HMW) glutenin subunit Dy10 gene into maize. **Arab J. Biotech.** 7 (2): 165-172.
- Alexander, P. J., G. Rajanikanth, C.D. Bacon and C. D. Bailey. 2007. Recovery of plant DNA using a reciprocating saw and silica-based columns. **Molec. Ecolo. Notes.** 7: 5-9

- Beale, M. H., M. A. Birkett, T. J. Bruce, K. Chamberlain, L. M. Field, A. K. Huttly, J. L. Martin, R. Parker, A. L. Phillips, J. A. Pickett, I. M. Prosser, P. R. Shewry, L. E. Smart, L. J. Wadhams, C. M. Woodcock and Y. Zhang. 2006. Aphid alarm pheromone produced by transgenic plants affects aphid and parasitoid behaviour. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 103: 10509–10513.
- Belingheri, L., G. Pauly, M. Gleizes and A. Marpeau. 1988. Isolation by an aqueous 2-polymer phase system and identification of endomembranes from *Citrofortunella mitis* fruits for sesquiterpene hydrocarbon synthesis. **J. Plant Physiol.** 132: 80–85.
- Bisby, F.A., Y. R. Roskov, T. M. Orrell, D. Nicolson, L. E. Paglinawan, N. Bailly, P. M. Kirk, T. Bourgoïn and J. van Hertum. 2008. **Species 2000 & ITIS Catalogue of Life: 2008 Annual Checklist Taxonomic Classification.** CD-ROM. Reading, U.K.
- Chen, G., C. M. Ye, J. C. Huang, M. Yu and B. J. Li. 2001. Cloning of the *Papaya ringspot Virus* (PRSV) replicase gene and generation of PRSV-resistant papayas through the introduction of the PRSV replicase gene. **Plant Cell Rep.** 20: 272-277.
- Christie, P. J. 1997. *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. **J. Bacteriol.** 179: 3085-3094.
- Citovsky, V., M. L. Wong and P. Zambryski. 1989. Cooperative interaction of *Agrobacterium* VirE2 protein with single stranded DNA: implication for the T-DNA transfer process. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 86: 1193-1197.
- Crock J., M. Wildung and R. Croteau. 1997. Isolation and bacterial expression of a sesquiterpene synthase cDNA clone from peppermint (*Mentha x piperita* L.) that produces the aphid alarm pheromone (E)- β -farnesene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 94: 12833–12838

- Daniell, H. 1999. New tools for chloroplast genetic engineering. **Nature Biotechnol.** 17: 855-856.
- Dixon, A. F. G. 1987. Parthenogenetic reproduction and the rate of increase in aphids, pp. 269-287. *In* A. K. Minks and P. Harrewijn, eds. **Natural Enemies and Control**. Elsevier.
- Dobhal, S., P. Dinesh, K. Anil and S. Agrawal. 2010. Studies on plant regeneration and transformation efficiency of *Agrobacterium* mediated transformation using neomycin phosphotransferase II (*nptII*) and glucuronidase (*GUS*) as a reporter gene. **Afr. J. Biotechnol.** 9: 6853-6859.
- Freeman, B. C. and G. A. Beattie. 2008. An Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores. **The Plant Health Instructor**. DOI: 10.1094/PHI-I-2008-0226-01.
- Gelvin, S.B. 2000. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 51: 223-256.
- Gibson, R. W. and J. A. Pickett. 1983. Wild potatoes repels aphids by release of aphids alarm pheromone. **Nature** 302: 608-609.
- Gleizes, M., J.P. Carde, G. Pauly and C. Bernarddagan. 1980. In vivo formation of sesquiterpene hydrocarbons in the endoplasmicreticulum of pine. **Plant Sci. Lett.** 20: 79-90.
- Glinwood, R. T. and J. A. Pickett. 2004. **Aphids as Crop Pests**. CABI, Wallingford.
- Goodwin, J. L., G. M. Pastori, M. R. Davey and H. D. Jones. 2005. Selectable Markers: Antibiotic and Herbicide Resistance, pp. 191-202. *In* L. Peña, eds. **Transgenic plants : methods and protocols**. New Jersey, USA.
- Inoue, H., H. Nojima., and H. Okayama. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene.** 96: 23-28.

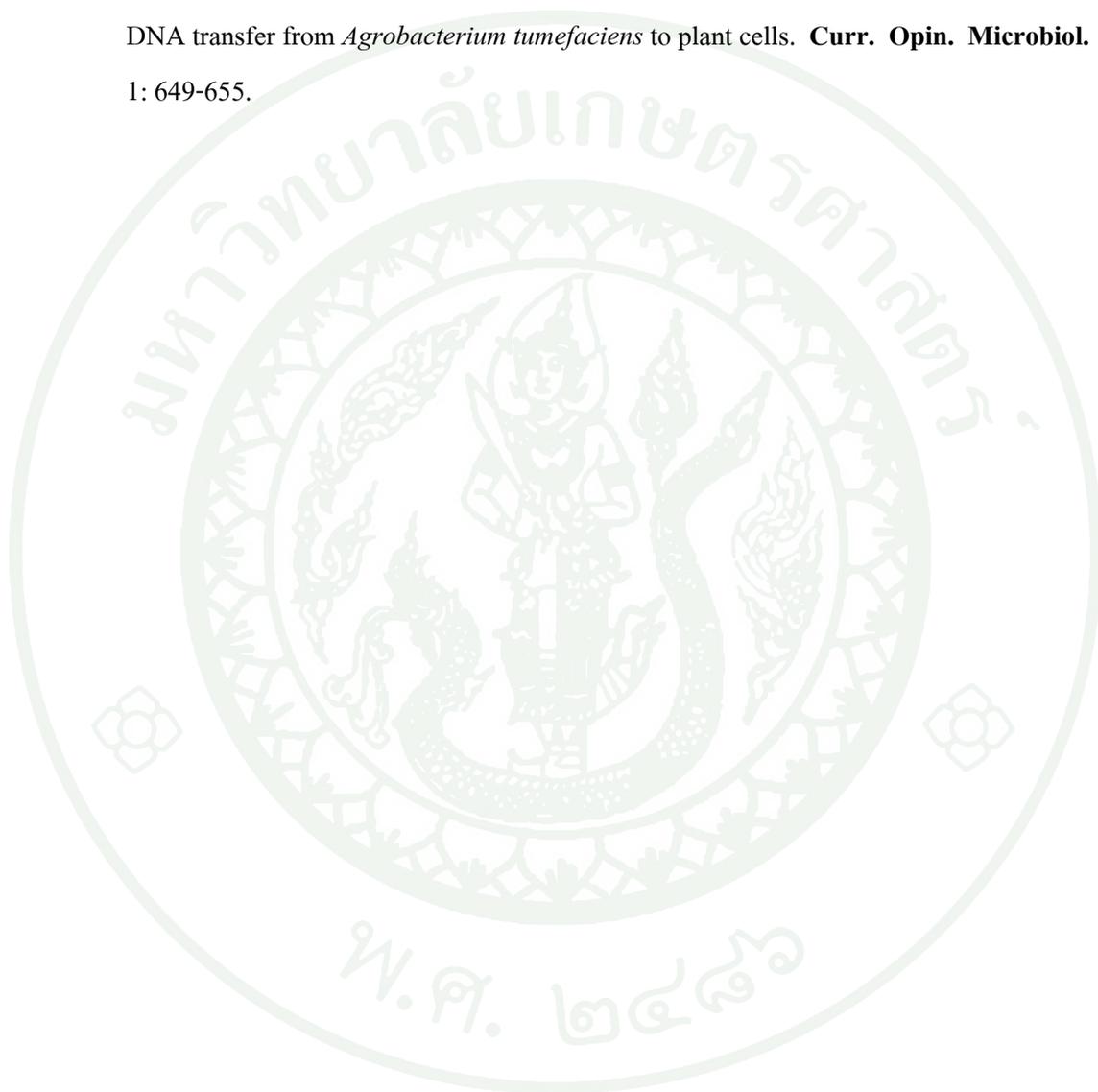
- Invitrogen Corporation. 2006. pCR[®]8/GW/TOPO[®] TA Cloning[®] Kit. Invitrogen Corporation, USA. (Unpublished manuscript)
- Jin, S., Y. N. Song, W. Y. Deng, M. P. Gordon and E. W. Nester. 1993. The regulatory VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens* does not function at elevated temperatures. **J. Bacteriol.** 175: 6830-6835.
- Khan, M. S. and P. Maliga. 1999. Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants. **Nature Biotechnol.** 17: 910-915.
- Koop, H. U., K. Steinmüller, H. Wagner, C. Rössler, C. Eibl and L. Sacher. 1996. Integration of foreign sequences into the tobacco plastome via polyethylene glycol-mediated protoplast transformation. **Planta.** 199: 193-201.
- Kumar, P., S. Mishra, A. Malik and S. Satya. 2011. Insecticidal properties of *Mentha* species: A review. **Industrial Crops and prods.** DOI:10.1016/j.indcrop.2011.02.019
- Maruyama, T., M. Ito and G. Honda. 2001. Molecular Cloning, Functional Expression and Characterization of (*E*)- β -Farnesene Synthase from *Citrus junos*. **Biol. Pharm. Bull.** 24 (10): 1171-1175.
- Matthysse, A. G. 1986. Initial interaction of *Agrobacterium tumefaciens* with plant host cells. **Crit. Rev. Microbiol.** 13: 281-307.
- Mostafavi, R., J. A. Henning, J. Gardea-Torresday and I. M. Ray. 1996. Variation in aphid alarm pheromone content among glandular and eglandular-haired *Medicago* accessions. **J. of Chemical Ecol.** 22 (9): 1629-1638.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant.** 15(3): 473-497.

- Newell, C. A., I. B. Machin, J. M. Hibberd and J. C. Gray. 2003. Expression of green fluorescent protein from bacterial and plastid promoters in tobacco chloroplasts. **Transgenic Res.** 12: 631-634.
- NG, J. C. K. and K. L. Perry. 2004. Transmission of plant viruses by aphid vectors. **Plant Pathol.** 5: 505–511.
- Oyedeld, A. O., A. A. Gbolade, M. B. Sosan, F. B. Adewoyin, O. L. Soyelu and O. O. Orafidiya. 2002. Formulation of an effective mosquito-repellent topical product from lemongrass oil. **Phytomedicine.** 9 (3): 259-262.
- Panda, N. and G. S. Khush. 1995. **Host plant resistance to insects.** CAB International in association with the International Rice Research Institute, UK.
- Pickett, J. A., L. J. Wadhams, C. M. Woodcock and J. Hardie. 1992. The chemical ecology of aphids. **Ann. Rev. Entomol.** 37: 67–90.
- Prosser, I. M., R. J. Adams, M. H. Beale, N. D. Hawkins, A. L. Phillips, J. A. Pickett and L. M. Field. 2006. Cloning and functional characterisation of a cis-muroladiene synthase from black peppermint (*Mentha x piperita*) and direct evidence for a chemotype unable to synthesise farnesene. **Phytochemistry** 67: 1564–1571.
- Racah, B. and A. Fereres. 2009. Plant Virus Transmission by Insects. **Encyclopedia of Life Sci.** DOI: 10.1002/9780470015902.A0021525.a0000760.pub2
- Radcliffe, E. B., D. W. Ragsdale and K. L. Flanders. 1993. Management of aphids and leafhoppers, pp. 117-136. *In* R. C. Rowe, eds. **Potato health management.** APS Press, New York.
- Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** 3th ed. Vol 1–3.

- Sanger F., S. Nicklen and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 12(74): 5463-5467.
- Stachel, S. E, E. W. Nester and P. C. Zambryski. 1986. A plant cell factor induces *Agrobacterium tumefaciens vir* gene expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 83: 379-383.
- Staub, J. M. and P. Maliga. 1992. Long regions of homologous DNA are incorporated into the tobacco plastid genome by transformation. **Plant Cell.** 4: 39-45.
- Svab, Z., P. Hajdukiewicz and P. Maliga. 1990. Stable transformation of plastid in higher plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 87: 8527-8530.
- Tamura K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol. Biology and Evolut.** 24: 1596-1599.
- Tinland, B., F. Schoumacher, V. Gloeckler, A.M. Bravo-Angel and B. Hohn. 1995. The *Agrobacterium tumefaciens* virulence D2 protein is responsible for species precise integration of T-DNA into the plant genome. **EMBO J.** 14: 3585-3595.
- Tzfira, T. and V. Citovsky. 2000. From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*-plant cell interaction. **Mol. Plant Pathol.** 1: 201-212.
- Van Lenteren, J. C. 1990. Biological control in a tritrophic system approach, pp. 3-21. *In* D. C. Peters, J. A. Webster and C. S. Chlouber, eds. **Aphid-Plant Interaction: Population to Molecules.** Oklahoma State University, USA.
- Wang, H., W. F. Guo, P. J. Zhang, Z. Y. Wu and S. S. Liu. 2008. Experience-induced habituation and preference towards non-host plant odors in ovipositing females of a moth. **J. Chem. Ecol.** 34: 330-338.

Watt, J. M. and M. G. Breyer- Brandwijk. 1962. **The Medicinal and Poisonous Plants of Southern and Eastern Africa.** 2nd ed. E. & S. Livingstone, Ltd., Edinburgh and London.

Zupan, J., D. Ward and P. C. Zambryski. 1998. Assembly of the VirB transport complex for DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. **Curr. Opin. Microbiol.** 1: 649-655.





ภาคผนวก

ภาคผนวก

1. สารละลาย และบัฟเฟอร์

1.1 สารละลาย 0.5 M EDTA (pH 8.0)

ชั่ง EDTA 61 กรัม ละลายในน้ำกลั่นเล็กน้อยปรับ pH เท่ากับ 8.0 แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ปริมาตร 80 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน นาน 15 นาที ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว²

1.2 สารละลาย 1 M Tris HCl (pH 8.0)

ชั่ง Tris base 12.11 กรัม ละลายในน้ำกลั่นเล็กน้อย ปรับ pH เท่ากับ 8.0 แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน นาน 15 นาที ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว²

1.3 สารละลาย 50X TAE Stock Solution

ชั่ง Tris Base 242 กรัม ละลายในน้ำกลั่นเล็กน้อย จากนั้นตวง Glacial Acetic Acid ปริมาตร 57.1 มิลลิลิตร และ 0.5 M EDTA ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน นาน 15 นาที ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว²

1.4 สารละลาย 20% SDS

ชั่ง SDS 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่นเล็กน้อย และเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน นาน 15 นาที ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว²

1.5 สารละลาย 20x SSC

ชั่ง NaCl 187.66 กรัม และ Sodium citrate 44.12 กรัม ละลายในน้ำกลั่นเล็กน้อยปรับ pH เท่ากับ 7.0 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน นาน 15 นาที ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว²

1.6 บัฟเฟอร์ TE (TE buffer), pH 8.0

ตวง 1 M Tris (pH 8.0) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และ 0.5 M EDTA (pH 8.0) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน นาน 15 นาที ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว²

1.7 บัฟเฟอร์ Maleic (Maleic buffer)

ชั่ง Maleic acid 11.60 กรัม และ NaCl 8.77 กรัม ละลายในน้ำกลั่นเล็กน้อย แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน นาน 15 นาที ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว²

1.8 บัฟเฟอร์ Detection (Detection buffer)

ชั่ง Tris-HCl 7.88 กรัม และ NaCl 2.92 กรัม ละลายในน้ำกลั่นเล็กน้อย แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน นาน 15 นาที ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว²

1.9 บัฟเฟอร์ Hybridization (Hybridization buffer)

ตวง 20xSSC ปริมาตร 25 มิลลิลิตร, 10% N-lauroylsarcosine ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ 20% SDS ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และชั่ง Blocking reagent 1 กรัม ผสมสารที่กล่าวมาข้างต้นในภาชนะที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันมาแล้ว จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

1.10 บัฟเฟอร์ 1% Blocking buffer

ชั่ง Blocking reagent 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

1.11 บัฟเฟอร์ Denature (Denature buffer)

ผสม 20x SSC ปริมาตร 6.25 ไมโครลิตร กับ 6 N NaOH ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1 มิลลิลิตร

หมายเหตุ สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม Hybridization buffer, 1% Blocking solution และ Denature buffer ต้องผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อมาก่อน รวมทั้งภาชนะที่ใช้เตรียม

2. สารปฏิชีวนะและอื่น ๆ

2.1 สารปฏิชีวนะกานามัยซิน (kanamycin) เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายกานามัยซิน 0.5 กรัม (500 มิลลิกรัม) ในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2 สารปฏิชีวนะซีฟอทาคซิม (Cefotaxime) เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายซีฟอทาคซิม 1 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งใส่หลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.3 สารปฏิชีวนะสเปคตินอมัยซิน (spectinomycin) 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายสเปคตินอมัยซิน 1 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งใส่หลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.4 สารอะซิโตไซริงโกน (Acetosyringone) 200 mM

ชั่งอะซิโตไซริงโกน 0.39 กรัม ค่อย ๆ ละลายใน Absolute ethanol จากนั้นเติมน้ำกลั่น ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วลงไปให้ครบปริมาตร 10 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.5 1% อะกาโรสเจล ในบัฟเฟอร์ TAE

ชั่ง Agarose 1 กรัม ผสมลงใน 0.5xTAE ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟจน Agaroses ละลายจนหมด

2.6 อาหารเหลวและอาหารแข็งสูตร 2xYT

สำหรับอาหารเหลว ชั่ง Yeast extract 10 กรัม, Thryptone 16 กรัม และ NaCl 15 กรัม ละลายกับน้ำกลั่นเล็กน้อย แล้วจึงเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1 ลิตร ถ้าจะเตรียมอาหารแข็งเตรียม เช่นเดียวกับอาหารเหลว แต่เติม Agar 5 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่ง ความดัน นาน 15 นาที ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว²

3. องค์ประกอบสูตรอาหารตัดแปลง MS (Murashige and Skoog, 1972)

ตารางผนวกที่ 1 องค์ประกอบสารละลายที่ 1 สูตรอาหารตัดแปลง MS

องค์ประกอบ	ความเข้มข้นสุดท้าย (mg/L)	100X (500 ml)
NH ₄ NO ₃	1650	82.5 g
KNO ₃	1900	95.0 g

ตารางผนวกที่ 2 องค์ประกอบสารละลายที่ 2 สูตรอาหารดัดแปลง MS

องค์ประกอบ	ความเข้มข้นสุดท้าย (mg/L)	100X (500 ml)
H ₃ BO ₃	6.2	0.31000 g
KH ₂ PO ₄	170	08.5000 g
KI	0.83	0.04150 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	2.5	00.1250 g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.00125 g

ตารางผนวกที่ 3 องค์ประกอบสารละลายที่ 3 สูตรอาหารดัดแปลง MS

องค์ประกอบ	ความเข้มข้นสุดท้าย (mg/L)	100X (500 ml)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	22.0 g

ตารางผนวกที่ 4 องค์ประกอบสารละลายที่ 4 สูตรอาหารดัดแปลง MS

องค์ประกอบ	ความเข้มข้นสุดท้าย (mg/L)	100X (500 ml)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	18.50 g
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	1.115 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	00.43 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.001 g

ตารางผนวกที่ 5 องค์ประกอบสารละลายที่ 5 สูตรอาหารดัดแปลง MS

องค์ประกอบ	ความเข้มข้นสุดท้าย (mg/L)	100X (500 ml)
Na ₂ .EDTA	37.35	1.87 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	27.85	1.39 g

ตารางผนวกที่ 6 องค์ประกอบสารละลายที่ 6 สูตรอาหารดัดแปลง MS

องค์ประกอบ	ความเข้มข้นสุดท้าย (mg/L)	100X (500 ml)
Thiamine.HCl	0.4	0.04 g
Nicotinic acid	0.5	0.05 g
Pyridoxine.HCl	0.5	0.05 g
Glycine	2.0	0.20 g
<i>myo</i> -Inositol	100	10.0 g

4. อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่ใบยาสูบ

ตารางผนวกที่ 7 สูตรอาหาร MS ดัดแปลง สำหรับ co-cultivation

องค์ประกอบ	1 ลิตร	0.5 ลิตร
MS สารละลายที่ 1	20 ml	10 ml
MS สารละลายที่ 2	5 ml	2.5 ml
MS สารละลายที่ 3	5 ml	2.5 ml
MS สารละลายที่ 4	5 ml	2.5 ml
MS สารละลายที่ 5	5 ml	2.5 ml
MS สารละลายที่ 6	1 ml	0.5 ml
Sucrose	30 g	15 g
Agar	8 g	4 g
Acetosyringone (AS ; 200 mM)	0.5 ml (final 100 mM)	0.25 ml (final 100 mM)

ละลายสารทั้งหมดยกเว้น Agar ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร จากนั้นปรับค่า pH ให้เท่ากับ 5.8 ด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1 นอร์มอล แล้วเติม Agar และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที จากนั้นทิ้งไว้จนอุณหภูมิประมาณ 55 องศาเซลเซียส ให้เติมสารละลาย Acetosyringone

ตารางผนวกที่ 8 สูตรอาหาร MS ดัดแปลง สำหรับชักนำให้เกิดยอดในขั้นตอนการคัดเลือกเนื้อเยื่อ
ยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน

องค์ประกอบ	1 ลิตร	0.5 ลิตร
MS สารละลายที่ 1	20 ml	10 ml
MS สารละลายที่ 2	5 ml	2.5 ml
MS สารละลายที่ 3	5 ml	2.5 ml
MS สารละลายที่ 4	5 ml	2.5 ml
MS สารละลายที่ 5	5 ml	2.5 ml
MS สารละลายที่ 6	1 ml	0.5 ml
Sucrose	30 g	15 g
naphthaleneacetic acid (NAA)	Final 0.1 mg/L	Final 0.1 mg/L
benzyladenine (BA)	Final 1.0 mg/L	Final 1.0 mg/L
Agar	8 g	4 g
geneticin	Final 150 mg/L	Final 150 mg/L
cefotaxime	Final 200 mg/L	Final 200 mg/L
pH	5.8	5.8

ละลายสารทั้งหมดยกเว้น Agar ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร จากนั้นปรับค่า pH ให้เท่ากับ 5.8 ด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1 นอร์มอล แล้วเติม Agar แบ่งใส่ flask และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ส่วนสารปฏิชีวนะจะเติมหลังจากทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลง ประมาณ 55 องศาเซลเซียส

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวกตัญญูชิตา คำช่วย Miss Katanyutita Damchuay
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 12 เดือน เมษายน พ.ศ. 2528
สถานที่เกิด	จังหวัดพัทลุง
ประวัติการศึกษา	- พ.ศ. 2551 – ปัจจุบัน กำลังศึกษาระดับปริญญาโท สาขาพันธุวิศวกรรม โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ - พ.ศ. 2547 – 2550 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ (วท.บ (ชีววิทยา) เกียรตินิยมอันดับสอง) - ระดับปริญญาตรี ได้รับทุนจากโครงการพัฒนากำลังคน ด้านวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย) - ระดับบัณฑิตศึกษาได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากโครงการทุนวิจัย มหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี - มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หมายเลขทุน MRG-WII525S031
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	
ผลงานทางวิชาการ	- นำเสนอผลงานทางวิชาการแบบบรรยายไทย เรื่อง การโคลนยีน เซสควิเทอร์พีน ซินเทส (<i>TSPA11</i>) จากสระระแหน่งที่สร้างฟีโรโมนเดือน กัยในเพลี้ยอ่อน เบต้า-ฟาร์เนสซิน ในการประชุมทางวิชาการพืชสวน แห่งชาติ ครั้งที่ 8 พ.ศ. 2552 - นำเสนอผลงานทางวิชาการแบบโปสเตอร์ เรื่อง Transformation of Sesquiterpene Synthase (<i>TSPA11</i>) from Peppermint (<i>Mentha cordifolia</i>) Produces Aphid Alarm Pheromone β -farnesene into <i>Nicotiana tabacum</i> ในการประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติ ISSAAS International Congress 2009 - นำเสนอผลงานทางวิชาการแบบบรรยายไทย เรื่อง การถ่ายยีน เซสควิเทอร์พีน ซินเทส (<i>TSPA11</i>) จากสระระแหน่งที่สร้างฟีโรโมน- เดือนกัยในเพลี้ยอ่อน (ทรานส์)-เบต้า-ฟาร์เนสซิน เข้าสู่ยาสูบ ในการ ประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 49 พ.ศ. 2554