



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

ปริญญา

พันธุศาสตร์

สาขา

พันธุศาสตร์

ภาควิชา

เรื่อง การถ่ายยีนเพื่อให้เกิด RNA interference ของยีนที่ใช้สังเคราะห์สารเคอร์คูมินอยด์
ในขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.)

Transformation for RNA Interference of the Curcuminoid Biosynthetic Genes in
Turmeric (*Curcuma longa* L.)

นางผู้วิจัย นางสาวทิวาพรรณ บุญมา

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์สุรินทร์ ปิยะ โชคณากุล, Dr.Agr.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์สมพิศ สามิภักดิ์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์สมศักดิ์ อภิสิทธิ์วานิช, Dr.Agr.Sci.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การถ่ายยีนเพื่อให้เกิด RNA interference ของยีนที่ใช้สังเคราะห์สารเคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชัน
(*Curcuma longa* L.)

Transformation for RNA Interference of the Curcuminoid Biosynthetic Genes in Turmeric
(*Curcuma longa* L.)

โดย

นางสาวทิวาพรรณ บุญมา

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)
พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทิพาพรรณ บุญมา 2555: การถ่ายยีนเพื่อให้เกิด RNA interference ของยีนที่ใช้สังเคราะห์สารเคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์) สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพันธุศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, Dr.Agr. 72 หน้า

ขมิ้นชันเป็นพืชสมุนไพรที่นำมาใช้เป็นอาหาร รวมทั้งยารักษาโรคต่างๆ เนื่องจากสารเคอร์คูมินอยด์ที่อยู่ในส่วนเหง้าของขมิ้นชัน มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสร้างสารเคอร์คูมินอยด์เป็นยีนในกลุ่ม type III polyketide synthase ที่สำคัญ ได้แก่ ยีน *diketide Co-A synthase (DCS)* และ *curcumin synthase (CURS)* ในงานวิจัยนี้ได้ถ่ายยีน *DCS* และ *CURS1* เพื่อชักนำให้เกิด RNA interference โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขมิ้นชันบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มจำนวนยอดและรากได้ ต่อมาทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน *DCS* และ *CURS1* ขนาด 196 และ 229 คู่เบส ตามลำดับ และแทรกชิ้นส่วนยีนเข้าสู่พลาสมิดโดยอาศัยกระบวนการ Gateway® recombination จากนั้นถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ยอดอ่อนขมิ้นชันโดยอาศัย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 พบยอดที่สามารถเจริญบนอาหารคัดเลือกที่เติมยาปฏิชีวนะไฮโครมัยซิน ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 3 และ 4 ต้น (คิดเป็น 0.6 และ 0.8 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ ตรวจสอบการมีอยู่ของยีนโดยใช้ไพรเมอร์ของยีน *hygromycin phosphotransferase (hpt)* พบต้นที่มีแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 1 และ 4 ต้นตามลำดับ จากนั้นตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ พบการแสดงออกของยีนทั้งในส่วนโคนต้นและใบ โดยต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *DCS* และ *CURS1* ที่ตรวจพบยีนเครื่องหมายมีความเข้มของแถบดีเอ็นเอและปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันพีซีอาร์น้อยกว่าต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน จำนวน 1 และ 2 ต้น ตามลำดับ แสดงว่าบริเวณที่ออกแบบยีน *DCS* และ *CURS1* ที่ใช้ในครั้งนี้เป็นบริเวณที่มีความสำคัญ สามารถลดการแสดงออกของยีนได้สำเร็จ

Tiwapan Boonma 2012: Transformation for RNA Interference of the Curcuminoid Biosynthetic Genes in Turmeric (*Curcuma longa* L.). Master of Science (Genetics), Major Field: Genetics, Department of Genetics. Thesis Advisor: Associate Professor Surin Peyachoknagul, Dr.Agr. 72 pages.

Turmeric (*Curcuma longa* L.) is a beneficial herb used in food additives and traditional medicines because of the antioxidant activity of curcuminoid substances in the rhizome. Curcuminoids are synthesized by two type III polyketide synthase genes, namely *diketide Co-A synthase* (*DCS*) and *curcumin synthase* (*CURS*) genes. In this study *DCS* and *CURS1* genes were transformed into turmeric to induce RNA interference. *In vitro* propagation of shoot on MS medium supplemented with 2 mg/l BA induced shoots and roots after 6 weeks. DNA fragments of 196 bp of *DCS* and 229 bp of *CURS1* were amplified from genomic DNA of turmeric and constructed into RNAi expression vector using Gateway[®] recombination system. *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 was used to transform turmeric shoot. 3 (0.6%) and 4 (0.8%) putative *DCS* and *CURS1* transformed plants were obtained. One of the *DCS* and all of the *CURS1* transformed plants showed the presence of *hpt* marker gene by PCR. The expression of the target genes were also reduced in one *DCS* transformed plant with positive *hpt* gene and two *CURS1* transformed plants. The result indicated that the region of *DCS* and *CURS1* genes in this construct were successfully used for downregulation of these genes expression.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก ที่กรุณาช่วยเหลือในงานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ทุกขั้นตอน ตั้งแต่การวางแผน
งานวิจัย ให้คำปรึกษา แนะนำ ช่วยเหลือในการแก้ปัญหาในงานวิจัย และช่วยตรวจแก้ไขข้อบกพร่อง
ในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบพระคุณ ดร. สมพิศ สามิภักดิ์ สำหรับ
คำปรึกษาในส่วนการเรียบเรียง และแก้ไขวิทยานิพนธ์นี้จนสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วย
ศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร กิรตินิจกาล ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างขมิ้นชันพันธุ์แดงสยามสำหรับ
ใช้ในการทดลอง และ รองศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ อภิสิทธิ์วานิช ที่ให้ความอนุเคราะห์ชุด
ทดลองและพลาสติกสำหรับทำงานวิจัยในขั้นตอน Gateway[®] recombination system รวมถึง
ศาสตราจารย์ ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ ประธานการสอบ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธีระชัย
ธนานันต์ ผู้ทรงคุณวุฒิ ที่กรุณาให้คำแนะนำ และช่วยเหลือในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มี
ความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ คณาจารย์ภาควิชาพันธุศาสตร์ทุกท่าน ที่กรุณาถ่ายทอดวิชาความรู้
ให้คำปรึกษา ช่วยเหลือ และให้กำลังใจเป็นอย่างดีเสมอมา

งานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่ง
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ขอขอบคุณสมาชิกห้องปฏิบัติการ 4612 และนิสิตภาควิชาพันธุศาสตร์ ที่ให้ความ
ช่วยเหลือ คำแนะนำในการวิจัย และให้กำลังใจเป็นอย่างดี

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ พ่อแม่ ที่ดูแลสั่งสอนอบรมเลี้ยงดูเป็นอย่างดี และคอย
สนับสนุนในทุกด้าน และทุกๆ คนในครอบครัว ที่คอยเป็นกำลังใจให้เสมอมา

ทิวาพรรณ บุญมา

เมษายน 2555

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	16
อุปกรณ์	16
วิธีการ	16
ผลและวิจารณ์	28
สรุปและข้อเสนอแนะ	54
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	55
ภาคผนวก	64
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	72

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากผลิตผลจากการทำปฏิกิริยา รีเวอร์สทรานสคริปชันพีซีอาร์แบบกึ่งตรวจวัดปริมาณของยีน <i>DCS</i> จำนวน 30 รอบ	51
2 ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากผลิตผลจากการทำปฏิกิริยา รีเวอร์สทรานสคริปชันพีซีอาร์แบบกึ่งตรวจวัดปริมาณของยีน <i>CURSI</i> จำนวน 27 รอบ	52

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ขอดอ่อนที่งอกจากตาเหง้าขมิ้นชัน และขอดขมิ้นชันที่ฟอกฆ่าเชื้อและเลี้ยงบนอาหาร สูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร	28
2 ขอดขมิ้นชันที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และให้แสง 8 และ 16 ชั่วโมงต่อวัน	29
3 ขอดขมิ้นชันที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 และ 60 กรัมต่อลิตร เลี้ยงในที่ให้แสง 8 และ 16 ชั่วโมงต่อวัน	30
4 ขอดขมิ้นชันที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 60 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์	32
5 แสดงการใช้อะกาโรสเจลอเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ จากการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสจากดีเอ็นเอของขมิ้นชัน	33
6 แสดงลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน <i>DCS</i> และ <i>CURS1</i> ของขมิ้นชัน	34
7 แผนที่พลาสมิด pENTR TM 1A vector	34
8 แสดงการใช้อะกาโรสเจลอเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ จากการตัดพลาสมิด pENTR TM 1A vector ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>	35
9 แสดงการใช้อะกาโรสเจลอเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ จากการตัดชิ้นดีเอ็นเอออกจากพลาสมิด pGEM [®] -T easy vector ด้วยเอนไซม์ตัด จำเพาะ <i>EcoRI</i>	36
10 แสดงบริเวณ multiple cloning site และบริเวณที่ออกแบบไพรเมอร์ reverse บน พลาสมิด pENTR TM 1A vector	37
11 แสดงการใช้อะกาโรสเจลอเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อตรวจสอบโคลนที่ได้จากการถ่าย ยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ reverse กับไพรเมอร์ของยีน คือ <i>DCS-F</i> และ <i>CURS1-F</i>	37
12 ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน <i>DCS</i> และ <i>CURS1</i> ที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pENTR TM 1A vector	38

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
13	แผนที่พลาสมิด pSTARGATE vector 39
14	แสดงการใส่อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อตรวจสอบโคลนที่ได้ด้วยปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ของยีน คือ DCS-F, DCSi-R, CURS1-F และ CURS1i-R 40
15	แสดงการใส่อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อตรวจสอบโคลนที่ได้ด้วยปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ของยีน คือ DCS-F, DCSi-R, Star-F และ Star-R 40
16	แสดงการใส่อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อตรวจสอบโคลนที่ได้ด้วยปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ของยีน คือ CURS1-F, CURS1i-R, Star-F และ Star-R 41
17	ยอดขมิ้นชันเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมซีโฟแทกซึมความเข้มข้นต่างๆ 42
18	ยอดขมิ้นชันเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมไฮโครมัยซินความเข้มข้นต่างๆ 43
19	แสดงการใส่อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อตรวจสอบคั่นที่ได้รับการถ่ายยีน DCS ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ของยีนเครื่องหมาย 45
20	แสดงการใส่อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อตรวจสอบคั่นที่ได้รับการถ่ายยีน CURS1 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ของยีนเครื่องหมาย 46
21	แสดงการใส่อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของ ยีนของคั่นที่ได้รับการถ่ายยีน DCS ด้วยปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันพีซีอาร์ (RT-PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ของยีน 47
22	แสดงการใส่อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของ ยีนของคั่นที่ได้รับการถ่ายยีน CURS1 ด้วยปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันพีซีอาร์ (RT-PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ของยีน 48
23	แสดงการใส่อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของ ยีนของคั่นที่ได้รับการถ่ายยีน DCS ด้วยการทำให้ปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชัน พีซีอาร์แบบกึ่งตรวจวัดปริมาณ (semi-quantitative RT-PCR) 49

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
24	แสดงการใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิสเพื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนของต้นที่ได้รับการถ่ายยีน <i>CURSI</i> ด้วยการทำปฏิกิริยาริเวอร์สทรานสคริปชันพีซีอาร์แบบกึ่งตรวจวัดปริมาณ (semi-quantitative RT-PCR)	50
ภาพผนวกที่		
1	บริเวณที่ออกแบปไฟรเมอร์ของยีน <i>DCS</i> และ <i>CURSI</i> จากฐานข้อมูล	65
2	แสดงการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน <i>DCS</i> ขนาด 196 คู่เบส กับฐานข้อมูล	66
3	แสดงการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน <i>CURSI</i> ขนาด 229 คู่เบส กับฐานข้อมูล	67
4	แผนที่พลาสมิด pGEM [®] -T Easy vector	68

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

bp	=	base pair
CaCl ₂	=	calcium chloride
<i>ccdB</i>	=	colorado criminal defense Bar
cDNA	=	complementary deoxyribonucleic acid
CHS	=	chalcone synthase
CTAB	=	cetyl trimethyl ammonium bromide
DEPC	=	diethyl pyrocarbonate
DMSO	=	dimethyl sulfoxide
DNA	=	deoxyribonucleic acid
dNTP	=	deoxynucleotide-5'-triphosphate
<i>E. coli</i>	=	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	=	ethylenediamine tetraacetic acid
IPTG	=	isopropyl-β-D-thiogalactoside
LB	=	Luria-Bertani broth
MgCl ₂	=	magnesium chloride
NaCl	=	sodium chloride
OD	=	optical density
PCR	=	polymerase chain reaction
PKS	=	polyketide synthase
PVP	=	polyvinylpyrrolidone
RNA	=	ribonucleic acid
RNase	=	ribonuclease
rRNA	=	ribosomal ribonucleic acid
RT-PCR	=	reverse transcription-polymerase chain reaction
<i>Taq</i>	=	<i>Thermus aquaticus</i>
TE buffer	=	Tris-EDTA buffer
Tris	=	2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
X-gal	=	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside

การถ่ายยีนเพื่อให้เกิด RNA interference ของยีนที่ใช้สังเคราะห์สารเคอร์คูมินอยด์ ในขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.)

Transformation for RNA Interference of the Curcuminoid Biosynthetic Genes in Turmeric (*Curcuma longa* L.)

คำนำ

ขมิ้นชันเป็นพืชที่คนไทยคุ้นเคยและรู้จักมาแต่โบราณ นำมาใช้แต่งสี แต่งกลิ่น และรสของอาหาร เช่น แกงเหลือง แกงไตปลา ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร เป็นแหล่งสีธรรมชาติที่ให้ความปลอดภัยมากกว่าสีสังเคราะห์ ตลอดจนเป็นสมุนไพรรักษาโรคต่างๆ เนื่องจากมีคุณสมบัติประโยชน์ต่อร่างกาย โดยพบงานวิจัยขมิ้นชันอย่างมากมาย จากงานวิจัยทางการแพทย์ พบว่ามีประโยชน์ต่อระบบทางเดินอาหาร โดยช่วยลดอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ ช่วยย่อยอาหาร บำรุงตับ ลดการเจ็บป่วยจากโรคลำไส้เรื้อรัง มีประโยชน์ต่อระบบหัวใจ หลอดเลือดหัวใจและสมอง ลดการตายของกล้ามเนื้อหัวใจ และป้องกันเซลล์สมองตายจากการขาดเลือด อีกทั้งยังสามารถช่วยยับยั้งเซลล์มะเร็งหลายชนิด ได้แก่ มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ มะเร็งต่อมลูกหมาก มะเร็งต่อมน้ำเหลือง มะเร็งเม็ดเลือดขาว มะเร็งปอด มะเร็งตับ มะเร็งเต้านม มะเร็งรังไข่ และมะเร็งปากมดลูกอีกด้วย นอกจากนี้ยังช่วยบำรุงสมอง รวมถึงอาจช่วยเรื่องอัลไซเมอร์ และฆ่าเชื้อมาลาเรียได้ จึงมีการนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพ สารสำคัญที่ทำให้ขมิ้นชันมีฤทธิ์ในการรักษาโรคต่างๆ นั้นสะสมอยู่ในส่วนเหง้า ซึ่งเป็นลำต้นใต้ดินของขมิ้นชัน โดยเป็นสารสำคัญประเภทเคอร์คูมินอยด์ที่มีสีเหลือง มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี เคอร์คูมินอยด์ประกอบด้วยสาร 3 ชนิด ได้แก่ เคอร์คูมิน (curcumin) ดีเมทอกซีเคอร์คูมิน (demethoxycurcumin) และบิสดีเมทอกซีเคอร์คูมิน (bisdemethoxycurcumin) และสารสำคัญอีกประเภทที่อยู่ในเหง้าขมิ้นชัน คือ น้ำมันหอมระเหย ซึ่งมีสีเหลืองอ่อน ซึ่งประกอบด้วยเทอร์พีนและซิงจิเบอริน นอกจากนี้ ยังมีสารกลุ่มเซสควิเทอร์ปีน และโมโนเทอร์ปีนอื่นๆ อีกหลายชนิด จึงมีความพยายามที่จะปรับปรุงพันธุ์ขมิ้นชัน เพื่อเพิ่มปริมาณสารเคอร์คูมินอยด์ที่มีอยู่ภายในเหง้าของขมิ้นชัน ทำให้สามารถผลิตสารเคอร์คูมินอยด์ได้มากขึ้น และนำมาใช้ผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้

ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างสารเคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชันเป็นยีนในกลุ่ม type III polyketide synthase ที่สำคัญ 2 ชนิด คือ *diketide-CoA synthase (DCS)* สังเคราะห์ diketide-CoA

ester จาก feruloyl-CoA และ malonyl-CoA และ *curcumin synthase (CURS)* ทำหน้าที่เปลี่ยน diketide-CoA ester เป็นสารเคอร์คูมินอยด์ งานวิจัยครั้งนี้ต้องการศึกษาหน้าที่ของยีนโดยใช้เทคนิค RNA interference โดยสร้างพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของยีนหันในทิศทางตรงกันข้าม (inverted repeat) เมื่อถ่ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์และเกิดการถอดรหัสจะทำให้เกิด hairpin RNA ซึ่งจะไปยับยั้งการแสดงออกของยีนนั้น ทำให้ไม่เกิดกระบวนการสร้างสารเคอร์คูมินอยด์ในเหง้าของขมิ้นชัน



วัตถุประสงค์

1. หาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อเพิ่มปริมาณยอดขมิ้นชัน
2. ถ่ายยีนเข้าสู่ต้นขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) โดยอาศัยเชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens*
3. ศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *DCS* และ *CURSI* ภายหลังจากการถ่ายยีนโดยใช้เทคนิค RNA interference

การตรวจเอกสาร

1. ขมิ้นชัน

ขมิ้นชัน เป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Curcuma longa* L. ชื่อสามัญ คือ turmeric หรือ curcuma ทั่วไปเรียกว่า ขมิ้น (ทั่วไป) ขมิ้นแกง ขมิ้นหยอก ขมิ้นหัว ขมิ้นชัน (ภาคกลาง ภาคใต้) ขี้มัน หมิ่น (ภาคใต้) ตายอ (กะเหรี่ยง-กำแพงเพชร) สะขอ (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน) (เต็ม, 2544)

1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ขมิ้นชันมีลักษณะเป็นพืชล้มลุกอายุหลายปี ลำต้นใต้ดินเป็นเหง้า มีทั้งเหง้าหลักที่เจริญชูตั้ง รูปไข่ หรือรูปไข่แกมรี บางครั้งเรียกเหง้าหลักว่า หัว ด้านข้างของเหง้าหลักแตกแขนงในแนวระนาบ แต่ละแขนงมักแตกย่อยต่อไปได้อีก 1-2 ครั้ง เหง้าแขนงรูปคล้ายทรงกระบอก หรือคล้ายนิ้วมือ ตรงหรือโค้งเล็กน้อย บางครั้งเรียกเหง้าแขนงว่า แง่ เนื้อเหง้าสีส้ม และ มีกลิ่นเฉพาะ ลำต้นเหนือดินเป็นลำต้นเทียมที่มีกาบใบเรียงซ้อนอัดแน่น สูงได้ถึง 1 เมตร หรือมากกว่า มีใบ 6-10 ใบต่อต้น ใบเดี่ยว ออกสลับถี่ กาบใบยาว 40-60 เซนติเมตร แผ่นใบรูปรีหรือรีแกมขอบขนาน กว้าง 10-20 เซนติเมตร ยาว 30-70 เซนติเมตร โคนใบสอบแคบหรือมน ปลายใบแหลมมาก ช่อดอกรูปทรงกระบอก กว้าง 5-9 เซนติเมตร ยาว 10-20 เซนติเมตร มีใบประดับจำนวนมาก รูปรีแกมขอบขนาน เรียงเวียนถี่รอบแกนช่อดอก ใบประดับที่อยู่บริเวณโคนช่อดอกมีสีเขียวอ่อนหรือสีขาวแกมเขียว ยาว 5-6 เซนติเมตร กว้าง 2-3 เซนติเมตร ขอบโคนใบประดับประกบติดกับใบประดับที่อยู่ใกล้เคียงและติดกับแกนช่อดอกเกิดเป็นซอกคล้ายกระเปาะ ใบประดับที่อยู่บริเวณปลายช่อดอก มีสีขาวแกมเขียวอ่อน ปลายใบประดับมีแถบสีเขียวอ่อนหรือแถบสีชมพูอ่อน โคนใบประดับไม่ประกบติดกันเป็นกระเปาะ ดอกออกในซอกกระเปาะใบประดับ 3-5 ดอกต่อซอก และทยอยบาน ดอกยาวประมาณ 5 เซนติเมตร กลีบเลี้ยงสีขาวใส ติดกันเป็นหลอดสั้น ปลายหยักไม่เท่ากัน กลีบดอกสีขาว โคนติดกันเป็นหลอดยาว ปลายผายและแยกเป็น 3 กลีบ เกสรตัวผู้ที่เป็นหมันแผ่เป็นกลีบขนาดใหญ่ 3 กลีบ กลีบกลางรูปไข่กลับ สีเหลืองอ่อนและมีแถบสีเหลืองเข้มบริเวณกลางกลีบ สองกลีบข้างรูปรีแกมขอบขนานสีเหลืองอ่อน เกสรตัวผู้ที่สมบูรณ์มีก้านสั้น อับเรณูเล็กเรียวยาวและมีงอย โอบรอบก้านชูยอดเกสรตัวเมีย รังไข่ 3 ห้อง ผลกลมหรือรี แต่มักไม่ติดผล (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2544)

1.2 แหล่งกระจายพันธุ์

ขมิ้นชัน มีถิ่นกำเนิดในประเทศแถบเอเชียใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ไม่ปรากฏหลักฐานที่ชัดเจนเกี่ยวกับแหล่งธรรมชาติในสภาพพืชป่า มีข้อสันนิษฐานว่า ขมิ้นชันเป็นพืชปลูกที่เกิดจากกระบวนการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติและมิโครโมโซม 3 ชุด ซึ่งเป็นหมัน มีการสืบทอดพันธุ์กันต่อมา โดยวิธีการคัดเลือกพันธุ์ และปลูกขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ปัจจุบันมีเขตการกระจายพันธุ์ปลูกทั่วไปในภูมิภาคที่มีอากาศร้อนหรือร้อนชื้นทั่วโลก แหล่งที่ปลูกขมิ้นชันเป็นการค้าขนาดใหญ่ของโลก คือ อินเดีย มีแหล่งอื่นบ้างแถบเอเชียตะวันออก และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ซึ่งเป็นทั้งผู้ผลิตและผู้บริโภค (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2544)

1.3 การขยายพันธุ์

ส่วนที่ใช้ขยายพันธุ์ คือ ลำต้นใต้ดินหรือเหง้า โดยการปลูกอาจใช้ท่อนพันธุ์ที่เป็นหัวแม่ หรือแง่อายุปลูกที่พร้อมเก็บเกี่ยวตามฤดูกาลประมาณ 7-9 เดือน เมื่อครบอายุเก็บเกี่ยวตัดส่วนแง่อายุขยายตลาด หัวแม่พันธุ์เก็บไว้เป็นต้นพันธุ์ปลูกในฤดูกาลต่อไป

1.4 สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม

พื้นที่ ขมิ้นชันเติบโตได้ดีในดินเกือบทุกชนิดที่มีอินทรีย์วัตถุอุดมสมบูรณ์ ร่วนซุย มีความชื้น และมีการระบายน้ำดี ไม่ทนทานต่อสภาพน้ำท่วมขัง เติบโตได้ดีในดินที่มีความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 5-7 ในสภาพดินที่มีความเป็นด่างจัด ดินเหนียวหรือดินลูกรังจะไม่เหมาะต่อการเติบโตหรือพัฒนาการของเหง้า ขมิ้นชันสามารถปลูกได้ทั้งที่ราบหรือที่ลาดเอียง ตั้งแต่พื้นที่ระดับต่ำไปจนถึงพื้นที่ระดับสูง 1,200 เมตรเหนือระดับน้ำทะเลปานกลาง มักปลูกกันมากในที่ระดับความสูง 450-900 เมตร เหนือระดับน้ำทะเลปานกลาง

อากาศ ขมิ้นชันขึ้นได้ดีในสภาพอากาศร้อนไปจนถึงอบอุ่นที่มีความชื้นและปริมาณน้ำพอเพียง

น้ำ โดยทั่วไปปลูกได้ดีในพื้นที่เขตนํ้าฝน โดยเฉพาะบริเวณที่มีปริมาณนํ้าฝน 1,000-2,000 มิลลิเมตรต่อปี หรือที่มีปริมาณนํ้าฝน 1,200-1,400 มิลลิเมตร ในเวลา 100-120 วัน ฉะนั้นถ้าปลูกในที่ที่มีปริมาณฝนน้อย ต้องใช้ระบบการให้นํ้าหรือการชลประทานเข้ามาช่วย

แสงสว่าง ขมื่นชั้นเคิบโตเต็มที่โล่งแจ้ง หรือมีแสงรำไร การปลูกในสภาพร่ม ผลผลิตจะลดลง ปลูกได้ทั้งแบบพืชเดี่ยว หรือปลูกแซมพืชไร่-พืชสวนอื่นๆ ถ้าปลูกแซมในสวนไม้ยืนต้น ต้องหลีกเลี่ยงที่ร่มจัดและบริเวณโคนไม้ใหญ่ เพราะจะทำให้การพัฒนาเหง้าไม่ดี

อุณหภูมิ โดยทั่วไปหน่องอกในช่วงอุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส และพัฒนาเหง้าในช่วงอุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิช่วงพักตัว 18-20 องศาเซลเซียส (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2544)

1.5 การปลูกขมื่นชั้นในประเทศไทย

การปลูกขมื่นชั้นในประเทศไทย เริ่มปลูกในช่วงต้นฤดูฝน ประมาณปลายเดือนเมษายน ถึงต้นเดือนพฤษภาคมของทุกปี และเก็บเกี่ยวหัวขมื่นในช่วงฤดูหนาวหรือประมาณปลายเดือนธันวาคม ถึงมกราคม ซึ่งช่วงนี้หัวขมื่นชั้นจะแห้งสนิท (มนตรี, 2553) ลำต้นเหนือดินเปลี่ยนสภาพเป็นสีเหลืองแห้งหรือน้ำตาลและเหี่ยวโทรม (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2544)

2. การขยายพันธุ์โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เป็นวิธีการเพาะเลี้ยงส่วนต่างๆ ของพืชในอาหารสังเคราะห์ ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ ชิ้นส่วนพืชไม่ว่าจะเป็นส่วนใดก็ตาม สามารถเจริญเติบโตขึ้นได้ในอาหารสังเคราะห์เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม (คิวพงศ์, 2546) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถขยายพันธุ์พืชได้ปริมาณมากในระยะเวลาอันรวดเร็ว และได้พืชที่ปลอดโรค นอกจากนั้นสามารถนำมาผลิตพืชที่มีความต้านทาน ความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และปรับปรุงพันธุ์พืชให้ได้พันธุ์ที่ต้องการ (รังสฤษฎี, 2541) รวมทั้งนำมาใช้ในกรณีที่ต้องการเพิ่มจำนวนต้นอ่อนของพืชที่ผ่านการคัดแปลงพันธุกรรมให้ได้ปริมาณมากขึ้น เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีคุณลักษณะที่ต้องการ นอกจากนั้นต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยังมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกับต้นพืชต้นแบบที่นำมาใช้ ดังนั้นพืชที่มีการผลิตสารทุติยภูมิที่สำคัญ สามารถได้สายพันธุ์ที่มีปริมาณสารทุติยภูมิคงที่ (วรารณ, 2551)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในกลุ่มขมื่นชั้นได้มีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย วัชรินทร์ (2548) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขมื่นดำ ขมื่นทอง และขมื่นขาว นำส่วนหน่อจากเหง้ามาฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วินาที และฟอกด้วย

สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (ไฮเตอร์) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15-30 นาที และฟอกซ้ำอีกครั้งด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (ไฮเตอร์) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง และตัดส่วนตาเลียงบนอาหารสูตร MS ได้ต้นปลอดเชื้อ 70-100 เปอร์เซ็นต์

ชนิดและความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนยอดของขมิ้นชัน พบว่าขมิ้นชันที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม kinetin 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ BA 6 มิลลิกรัมต่อลิตร และอาหารสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับ kinetin 4 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือ BA 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้จำนวนยอด ความสูงยอด และจำนวนรากมากที่สุด (ช่อแก้ว, 2548) ในการใช้ฮอร์โมนชนิดเดียว พบว่ามีรายงานการใช้ฮอร์โมน BA มากที่สุด เช่นงานวิจัยของวัชรินทร์ (2548) ที่เลี้ยงตาขมิ้นปลอดเชื้อบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 เดือน สามารถเพิ่มจำนวนยอดขมิ้นได้ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Naz *et al.* (2009) พบว่าสามารถชักนำยอดในอาหารสูตรเดียวกันนี้ได้ 60-70 เปอร์เซ็นต์ โดยความเข้มข้นของ BA ที่มากขึ้นสามารถเพิ่มจำนวนยอดเพิ่มขึ้น แต่จะลดความยาวยอดลง ดังนั้น Rahman *et al.* (2004) ได้เลี้ยงชิ้นส่วนตาขมิ้นบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อเพิ่มจำนวนยอด นอกจากนั้นยังสามารถเลี้ยงตาขมิ้นชันในอาหารเหลวเพื่อชักนำยอด โดยพบว่าสามารถเพิ่มจำนวนยอดได้มากกว่าเลี้ยงบนอาหารแข็งอีกด้วย (Salvi *et al.*, 2002) นอกจากฮอร์โมน BA แล้ว thidiazuron (TDZ) สามารถนำมาใช้ในการเพิ่มจำนวนยอดขมิ้นชันได้เช่นกัน โดยใช้ TDZ ความเข้มข้น 18.17 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และย้ายลงเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าสามารถชักนำยอดได้ 18.22 ± 0.62 ยอด (Prathanturug *et al.*, 2003)

ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ยังมีการศึกษาการชักนำให้เกิดเหง้าในขมิ้นชัน ปัจจัยที่มีผลในการชักนำเหง้า ได้แก่ สารควบคุมการเจริญเติบโต ปริมาณของน้ำตาล และปริมาณแสงที่ได้รับต่อวัน มีการทดลองเลี้ยงขมิ้นชันบนอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตหลายตัว ตัวอย่างงานวิจัยของ Hashemy *et al.* (2009) เลี้ยงขมิ้นบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และเลี้ยงโดยให้แสงในช่วงวันสั้น (ได้รับแสง 10 ชั่วโมงต่อวัน) สามารถชักนำให้เกิดเหง้าได้ และพบว่าความเข้มแสงมีผลในการชักนำเหง้า โดยความเข้มแสงน้อยสามารถชักนำเหง้าได้ดี นอกจากนั้นการเติมสาร BA ความเข้มข้น 12.0 ไมโครโมลาร์ ร่วมกับ NAA ความเข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์ เติมน้ำตาล 9 เปอร์เซ็นต์ และเลี้ยงในที่มืดสามารถชักนำเหง้าได้เช่นกัน (Islam *et al.*, 2004) โดยปริมาณแสงที่ได้รับต่อวันมีผลในการชักนำเหง้า การเลี้ยงขมิ้นในที่ให้แสงน้อยจะสามารถชักนำเหง้าได้ อนุพันธ์ และ วีระชน (2005) นำชิ้น

ส่วนยอดมาเลี้ยงบนอาหารสูตรที่เติมน้ำตาลซูโครส 90 กรัมต่อลิตร และเลี้ยงภายใต้แสง 8 ชั่วโมงต่อวัน สามารถชักนำให้เกิดเหง้าในหลอดทดลองได้สูงสุด 85 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนั้น การชักนำเหง้ายังทำได้โดยเลี้ยงในอาหารเหลว เนื่องจากพืชสามารถดูดซึมธาตุอาหารและน้ำตาลมาใช้ในกระบวนการสะสมเกิดเป็นเหง้าได้ดีกว่า (บุญยืน, 2544) Nayak and Naik (2006) เลี้ยงยอดในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 13.3 มิลลิโมลาร์ น้ำตาลซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์ และให้แสง 4 ชั่วโมงต่อวัน สามารถชักนำเหง้าได้ใน 30 วัน และพบว่าปริมาณน้ำตาลมีผลในการชักนำเหง้ามากที่สุด ตามด้วยปริมาณแสงและความเข้มข้นของ BA โดยความเข้มข้นของ BA ที่สูงขึ้นมีผลยับยั้งการชักนำให้เกิดเหง้า (Shirgurkar *et al.*, 2001) Adelberg and Cousins (2007) จึงเลี้ยงยอดเพื่อชักนำให้เกิดเหง้าในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์แต่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และมีการทดลองเติมสาร methyl jasmonate (MeJa) เพื่อเร่งการสร้างสาร secondary metabolite พบว่ามีผลยับยั้ง ทำให้ชีวมวลของใบ ราก และเหง้าลดลง (Cousins and Adelberg, 2008)

3. องค์ประกอบทางเคมี (chemical constituents)

เหง้าขมิ้นชันประกอบด้วยน้ำมันหอมระเหย (volatile oil) มีสีเหลืองอ่อน ปริมาณไม่น้อยกว่า 6 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักทั้งหมด มีสารสำคัญหลัก คือ เทอร์เมอโรน (turmerone) และ ซิงจิเบอรีน (zingiberene) นอกจากนี้ยังมีสารกลุ่มเซสควิเทอร์ปีน (sesquiterpene) และ โมโนเทอร์ปีน (monoterpene) อื่นๆ อีกหลายชนิด และสารสำคัญที่มีสีเหลือง เป็นสารประเภทเคอร์คูมินอยด์ (curcuminoid) มีปริมาณไม่น้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักทั้งหมด (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2544) เนื้อของเหง้าขมิ้นชันเป็นส่วนที่นำมาใช้เป็นยาบำบัดอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ แน่น จุกเสียด อาหารไม่ย่อย บิด ท้องเสีย ท้องเดิน ปวดท้องเพราะแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้ และออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา ได้ดี และลดอาการอักเสบได้ นอกจากนี้ยังพบว่าในเหง้าขมิ้นชันมีสารบางตัวที่มีฤทธิ์ขับน้ำดี ป้องกันตับอักเสบ (ภาณุพรรณ, 2544; ธารธรรมแก้ว, ม.ป.ป.) นอกจากนี้ ยังมีการค้นพบสรรพคุณใหม่ๆ ของขมิ้นอีกมากมาย เช่น การป้องกันการแข็งตัวของเลือด การชะลอความแก่ การเป็นสารต้านมะเร็งและเนื้องอกต่างๆ และยังมีสรรพคุณในการต้านไวรัส โดยเฉพาะเชื้อไวรัส HIV อันเป็นสาเหตุของโรคเอดส์ ขมิ้นจึงเป็นพืชอีกชนิดหนึ่งที่เป็นความหวังในการรักษาโรคเอดส์ (มนตรี, 2553)

สารเคอร์คูมินอยด์ประกอบด้วยสารสำคัญ 3 ชนิด ได้แก่ เคอร์คูมิน (curcumin) ดีเมทอกซีเคอร์คูมิน (demethoxycurcumin) และบิสดีเมทอกซีเคอร์คูมิน (bisdemethoxycurcumin) (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2544) จากการวัดปริมาณสารเคอร์คูมินอยด์ที่สะสมอยู่ในขมิ้นชันพบปริมาณสารเคอร์คูมินมากที่สุด คือประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งของขมิ้น สารอีกสองชนิดมีปริมาณที่ใกล้เคียงกัน คือ ดีเมทอกซีเคอร์คูมิน 0.7 เปอร์เซ็นต์ และบิสดีเมทอกซีเคอร์คูมิน 0.6 เปอร์เซ็นต์ (Hiserodt *et al.*, 1996) Kita *et al.* (2008) พบว่า กระบวนการสร้างสารเคอร์คูมินอยด์ต้องใช้สาร cinnamoyl-CoA 2 ตัว และ malonyl-CoA 1 ตัว เป็นสารตั้งต้นเพื่อสร้าง skeleton หลังจากนั้นจึงเกิดกระบวนการสร้างหมู่ไฮดรอกซิลและหมู่เมทิลขึ้นบน aromatic ring ภายหลัง สำหรับยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างสารเคอร์คูมินอยด์เป็นยีนในกลุ่ม type III polyketide synthase ที่สำคัญ 2 ชนิด คือ *diketide-CoA synthase (DCS)* สังเคราะห์ diketide-CoA ester จาก feruloyl-CoA และ malonyl-CoA โดยพบว่าเอนไซม์ DCS ชอบใช้ feruloyl-CoA เป็นสารตั้งต้นมากกว่า *p-coumaroyl-CoA* ทำให้พบปริมาณสารเคอร์คูมินมากกว่าสารอีกสองชนิดดังกล่าว (Katsuyama *et al.*, 2009a) และ *curcumin synthase (CURS)* ซึ่งขณะนี้พบทั้งหมด 3 ยีน คือ *CURS1*, *CURS2* และ *CURS3* โดยพบว่า *CURS2* และ *CURS3* เป็น isozyme กับ *CURS1* ทำหน้าที่เปลี่ยน diketide-CoA ester เป็นสารเคอร์คูมินอยด์ (Katsuyama *et al.*, 2009b)

นอกจากสารตั้งต้นที่มีผลต่อปริมาณสารเคอร์คูมินอยด์แต่ละชนิดที่สะสมอยู่ในเหง้าแล้ว ยังเกี่ยวเนื่องกับระดับการแสดงออกของยีน *DCS* และ *CURS* ทั้ง 3 ชนิดที่พบว่ามีการแสดงออกของ ยีนในเหง้ามากกว่าในส่วนของใบ ทำให้พบสารเคอร์คูมินอยด์สะสมอยู่ในเหง้ามากกว่าส่วนอื่นๆ (Katsuyama *et al.*, 2009b)

5. การโคลนยีนด้วยวิธี Gateway® recombination system

ในการโคลนยีนขึ้นพื้นฐานต้องอาศัยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อตัดโมเลกุลของดีเอ็นเอและใช้เอนไซม์ไลเกสเพื่อเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้าด้วยกัน แต่ในปัจจุบันยังมีวิธีการอื่นๆ ที่ใช้สำหรับการโคลนยีนที่มีประสิทธิภาพรวดเร็วและไม่ยุ่งยาก ได้แก่ การใช้ปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ตำแหน่งจำเพาะ (site-specific recombination) โดยพบการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนลักษณะเช่นนี้ในกรณีฟาจแลมปีดานูกรุกเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย ดีเอ็นเอของฟาจเข้าไปแทรกในจีโนมของเซลล์เจ้าบ้านโดยใช้วิธีการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนที่ตำแหน่งจำเพาะ ซึ่งเกิดขึ้นระหว่างตำแหน่ง

attachment site (*att*) 2 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่ง *attB* (attachment bacteria) ที่อยู่บนจีโนมของเซลล์เจ้าบ้านมีขนาด 25 คู่เบส สัญลักษณ์ที่ใช้แทนตำแหน่ง ได้แก่ BOB' กับตำแหน่ง *attP* (attachment phage) ที่อยู่บนดีเอ็นเอของฟาจมีขนาด 250 คู่เบส สัญลักษณ์ที่ใช้แทนตำแหน่ง ได้แก่ POP' โดยมีบริเวณ O ที่มีลำดับเบสเหมือนกันเป็นบริเวณอนุรักษ์ ส่วนบริเวณ B และ B' กับบริเวณ P และ P' เป็นลำดับเบสที่ขนาบทั้งสองข้างของบริเวณอนุรักษ์ การแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนเกิดขึ้นได้ต้องอาศัยโปรตีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องเข้ามาจับ ได้แก่ เอนไซม์ integrase (Int) และโปรตีน IHF (integration host factor) โดยบนตำแหน่ง *attP* จะมีบริเวณจับของเอนไซม์ Int ซึ่งทำงานร่วมกับโปรตีน IHF ได้เป็นอินโทโซม (intosome) ไปจับที่ตำแหน่ง *attB* เกิดไซแนปซิส เชื่อมระหว่างดีเอ็นเอต่างโมเลกุล ดีเอ็นเอของฟาจแทรกเข้าไปในจีโนมของแบคทีเรีย ได้เป็นสองส่วนคือ *attL* สัญลักษณ์ที่ใช้แทนตำแหน่ง ได้แก่ BOP' และ *attR* สัญลักษณ์ที่ใช้แทนตำแหน่ง ได้แก่ POB' (Dale and Park, 2003; อรินทิพย์, ม.ป.ป.)

นอกจากการแทรกเข้าไปในจีโนมของแบคทีเรียแล้วยังสามารถเกิดการตัดดีเอ็นเอออกจากบริเวณดังกล่าวได้ โดยอาศัยโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตัด (excision) กลับเป็นดีเอ็นเอฟาจที่มีตำแหน่ง *attP* และจีโนมแบคทีเรียที่มีตำแหน่ง *attB* ได้เหมือนเดิม

ตำแหน่ง *attB* และ *attP* มีลำดับเบสที่เหมือนกันเพียง 15 คู่เบส ที่บริเวณ O คือ GCTTT(TTTATAC)TAA และการเกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนจะเกิดเฉพาะบริเวณลำดับเบส 7 คู่เบสที่อยู่ในวงเล็บเท่านั้น (Dale and Park, 2003; Snyder and Champness, 2003)

การนำระบบ Gateway® recombination มาใช้ประโยชน์ในการโคลนยีน จะต้องมีตำแหน่ง *att* สำหรับการย้ายชิ้นส่วนจากบริเวณหนึ่งไปอีกบริเวณหนึ่ง จึงต้องเตรียมชิ้นดีเอ็นเอสำหรับโคลนยีนที่มีตำแหน่งจำเพาะ *att* โดยอาจออกแบบไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสของตำแหน่งที่เป็น *attB* ไว้ทั้งสองข้างของชิ้นดีเอ็นเอ แล้วเพิ่มปริมาณจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ส่วนพลาสมิดที่เรียกว่า entry vector จะมีลำดับเบสที่มีตำแหน่งจำเพาะ *attP* ขนาบทั้งสองข้างของบริเวณที่ต้องการแทรกชิ้นดีเอ็นเอเข้าไป เมื่อเติมเอนไซม์รีคอมบินเนส ทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนระหว่างตำแหน่ง *attB* และ *attP* ทำให้ชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแทรกเข้าไปอยู่ในพลาสมิด entry vector หรืออาจเตรียมพลาสมิดได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและเชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับ entry vector เพื่อให้มีตำแหน่ง *att* สำหรับใช้ในการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนได้ต่อไป (มณีวรรณ, 2553)

นอกจากนั้นยังสามารถทำให้มีการเคลื่อนย้ายชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการไปยังบริเวณอื่นที่มีตำแหน่ง *att* อยู่ การย้ายชิ้นส่วนดีเอ็นเอจาก entry vector ไปยัง expression vector โดยอาศัยปฏิกิริยา LR clonase reaction ชิ้นส่วนดีเอ็นเอจะเข้าไปแทนที่บริเวณยีน *ccdB* ซึ่งเป็นยีนที่ทำให้เกิดการตายในเซลล์แบคทีเรียโดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไจเรส ที่เกี่ยวข้องกับการจำลองโมเลกุลของดีเอ็นเอ (Bernard and Couturier, 1992) ดังนั้นเซลล์เจ้าบ้านที่ได้รับพลาสมิดและเกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วน จะสามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (มณีวรรณ, 2553)

เทคโนโลยีระบบ Gateway® พัฒนาขึ้นโดยกลุ่มนักวิจัยจากบริษัท Life Technologies และผลิตเพื่อจำหน่ายทางการค้าโดยบริษัท Invitrogen ออกแบบผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ประโยชน์ในงานวิจัยทั้งในด้านดีเอ็นเอ จีโนมิกส์ และโปรตีน รวมทั้งการศึกษาการแสดงออกของยีน โดยการยับยั้งการแสดงออก (gene silencing) ด้วยเทคนิค RNA interference (RNAi) อาศัยบริเวณตำแหน่ง *att* ในการแทรกชิ้นส่วนดีเอ็นเอในเวกเตอร์ RNAi ที่ต้องการ ทำให้สามารถตรวจสอบทิศทางของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์ได้ถูกต้อง (Earley *et al.*, 2006; Karimi *et al.*, 2007)

ปัจจุบันการนำระบบ Gateway® มาประยุกต์ใช้ในการเตรียมพลาสมิดสำหรับเทคนิค RNA interference ทำได้ง่ายและรวดเร็ว องค์กร CSIRO ของประเทศออสเตรเลียได้พัฒนาพลาสมิด hairpin RNAi เพื่อศึกษาหน้าที่ของยีนและพัฒนาพืชให้ได้ลักษณะที่ต้องการ การแทรกชิ้นส่วนยีนที่เราต้องการเข้าสู่พลาสมิด hairpin RNAi สามารถอาศัยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะหรืออาศัยระบบ Gateway® โดยพลาสมิดที่อาศัยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ได้แก่ pHANNIBAL และ pKANNIBAL ใช้ในงานพืชใบเลี้ยงคู่ โดย pHANNIBAL จะมีส่วนของยีนต้านทานยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน และ pKANNIBAL จะมียีนต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซิน นำชิ้นส่วนยีนที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส อาศัยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ตรงกับเอนไซม์ตัดจำเพาะบริเวณข้างๆ ของอินทรอนในพลาสมิด เมื่อตัดและเชื่อมต่อ จะได้พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนยีนแทรกอยู่หั่นในทิศตรงข้ามตามต้องการ นอกจากนั้นยังมีพลาสมิด pSTARLING สำหรับใช้ในงานพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เนื่องจากส่วนของโปรโมเตอร์ที่ใช้เป็น ubiquitin promoter ของข้าวโพด ที่สามารถแสดงออกได้ดีในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว

สำหรับพลาสมิด hairpin RNAi ที่อาศัยระบบ Gateway® ได้แก่ พลาสมิด pHELLSGATE สำหรับใช้ในงานพืชใบเลี้ยงคู่ และ pSTARGATE ซึ่งดัดแปลงจาก pHELLSGATE เพื่อใช้สำหรับพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เนื่องจากโปรโมเตอร์ที่ใช้เป็น ubiquitin promoter และมียีนต้านทานยาปฏิชีวนะ

ไฮโครมัยซิน นอกจากนั้นยังมีการเปลี่ยนบริเวณโปรโมเตอร์ เพื่อให้จำเพาะกับพืชที่ศึกษา ได้แก่ pWATERGATE ที่เปลี่ยนบริเวณโปรโมเตอร์ 35S ของ pHELLSGATE เป็นโปรโมเตอร์ของยีน RbcS จากต้นอะราบิดอปซิส เพื่อลดการถูกยับยั้งการถอดรหัสเนื่องจากการใช้โปรโมเตอร์ที่ไม่เหมาะสมในพืชนั้นๆ สำหรับ pHELLSGATE ในการโคลนยีนโดยระบบ Gateway® จะต้องมีบริเวณจำเพาะสำหรับเกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วน ได้แก่ บริเวณ *attR1* และ *attR2* โดยอยู่ขนานข้างยีน *ccdB* ทั้งสองยีนที่หันในทิศตรงข้าม และมีส่วนของอินทรอนคั่นตรงกลางทั้งสองยีน ชิ้นส่วนยีนที่ต้องการสามารถเตรียมโดยโคลนชิ้นยีนในพลาสมิด pENTRY โดยชิ้นส่วนยีนที่อยู่ในพลาสมิด pENTRY จะมีส่วน *attL1* และ *attL2* ขนานอยู่ทั้งสองข้างของยีน เมื่อเกิดกระบวนการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนด้วยปฏิกิริยา LR clonase ทำให้ชิ้นส่วนยีนถูกย้ายไปอยู่ในพลาสมิด pHELLSGATE แทนที่ยีน *ccdB* ทั้งสองยีน โดยจะหันในทิศทางที่ตรงข้ามกัน

6. เทคนิค RNA interference

RNAi เป็นเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาหน้าที่ของยีน และใช้ในการควบคุมการแสดงออกของลักษณะที่ต้องการ โดยอาศัย double-stranded RNA (dsRNA) กระตุ้นให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีนเป้าหมาย กลไกการเกิด RNAi พบทั้งในพืชและสัตว์ ใช้ป้องกันการโจมตีของไวรัส และควบคุมการแสดงออกของยีน (Doran and Helliwell, 2009) โดย dsRNA ถูกจดจำด้วยเอนไซม์ในกลุ่ม RNaseIII endonuclease เรียกว่า dicer โดยเอนไซม์ dicer มีบริเวณที่เร่งปฏิกิริยา 2 โดเมน และเป็นเอนไซม์ที่มี 2 หน่วยย่อย แต่ละหน่วยย่อยจะมีบริเวณที่เร่งปฏิกิริยาหนึ่งโดเมนไม่ทำงาน dsRNA จะถูกตัดด้วยโดเมนที่ยังทำงานได้เป็นชิ้นขนาดเล็ก 21-25 นิวคลีโอไทด์ เรียกว่า short interfering RNA (siRNA) ซึ่งจะรวมกับโปรตีน RNA-induced silencing complex (RISC) เกิดเป็นสารเชิงซ้อน ต่อมา helicase ใน RISC complex จะคลายเกลียวคู่ของ siRNA เกิดเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวจับกับ mRNA ที่มีลำดับเบสคู่สมกัน และเกิดการย่อยสายอาร์เอ็นเอนั้น ทำให้ไม่สามารถเกิดการแสดงออกของยีนนั้นได้ การควบคุมการแสดงออกของยีนในขั้นนี้เรียกว่า post-transcriptional gene silencing (PTGS) (Borgio, 2009; Klug *et al.*, 2007; Mansoor *et al.*, 2006)

การยับยั้งกระบวนการถอดรหัสสามารถใช้เทคนิค anti-sense หรือ co-suppression ทำให้เกิด dsRNA และเกิดกระบวนการ RNAi แต่พบว่าการใช้ hairpin RNA มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีนได้ดีที่สุด โดยแขนของ hairpin RNA มีความยาวได้ตั้งแต่ 98-853 คู่เบส และการนำอินทรอนมาใช้เป็นส่วน loop (ihpRNA) สามารถยับยั้งการแสดงออกได้ถึง 90-100 เปอร์เซ็นต์ (Wesley *et al.*, 2001)

สำหรับการนำเทคนิค RNA interference มาใช้ในการศึกษาหน้าที่ของยีนนั้น Miki and Shimamoto (2004) ได้ทดลองใช้เทคนิค RNAi เพื่อศึกษาหน้าที่ของยีนในข้าว พบว่าสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนในระดับ mRNA ได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ต่อมา Xu *et al.* (2008) ศึกษาการทำงานของ *OsHXX10* ซึ่งเป็นยีนในกลุ่ม hexokinase ที่มีการแสดงออกในเรณูของข้าว พบว่ามีความสำคัญต่อกระบวนการปล่อยละอองเรณู เมื่อยับยั้งการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RNAi ทำให้ผนังของเรณูบาง ไม่สามารถแตกออกเพื่อปล่อยละอองเรณูได้ การงอกของละอองเรณูและการติดเมล็ดน้อยลง จากนั้นมีการศึกษายีน squalene epoxidase 2 ชนิด คือ *PgSQE1* และ *PgSQE2* ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์ phytosterol และ ginsenoside ในโสม (*Panax ginseng*) พบว่ายีนทั้งสองชนิด มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกัน 83 เปอร์เซ็นต์ เมื่อยับยั้งการแสดงออกของ *PgSQE1* พบว่า *PgSQE2* สามารถทำงานได้บางส่วน และพบว่า *PgSQE1* มีความสำคัญในการสังเคราะห์ ginsenoside จึงสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการพัฒนาเพื่อผลิตสาร ginsenoside ที่สำคัญในอนาคตได้ (Han *et al.*, 2010)

เทคนิค RNAi ยังสามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ ดังเช่นกระบวนการเกิดสีดอกไม้ Nishihara *et al.* (2005) พบว่ายีน *chalcone isomerase* มีความสำคัญกับกระบวนการสังเคราะห์สารฟลาโวนอยด์ในกลีบดอกของยาสูบ เมื่อถูกยับยั้งการแสดงออก ทำให้ไม่สร้างสีดอก หรือการยับยั้งยีน *chalcone synthase (CHS)* ซึ่งเป็นยีนที่สำคัญในกระบวนการสร้างแอนโทไซยานิน และฟลาโวนอยด์ใน *Torenia hybrida* พบว่าทำให้ดอกเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีขาวจนถึงซีด (Fukusaki *et al.*, 2004) และในปี 2007 มีงานวิจัยเกี่ยวกับการปรับปรุงพันธุ์ดอกกุหลาบเพื่อผลิตดอกกุหลาบสีน้ำเงิน โดยใช้เทคนิค RNAi ลดการแสดงออกของยีน *DFR (dihydroflavonol 4-reductase)* ในดอกกุหลาบ และถ่ายยีน *DFR* ของดอกไอริสเข้าไปทำหน้าที่แทน พบว่ามีสาร delphinidin ซึ่งเป็นสารสีน้ำเงินสะสมอยู่ในกลีบของดอกกุหลาบ (Katsumoto *et al.*, 2007)

นอกจากการปรับปรุงพันธุ์ไม้ดอก ยังมีงานวิจัยที่นำเทคนิค RNAi มาใช้ปรับปรุงพันธุ์พืชเศรษฐกิจเพื่อเพิ่มคุณภาพทางการค้า เช่นการยับยั้งการแสดงออกของยีน *CaMXMT1* ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สารคาเฟอีนในต้นกาแฟ (*Coffea canephora*) พบว่าปริมาณการสะสมคาเฟอีนลดลง เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC (Ashihara *et al.*, 2006) การเพิ่มคุณค่าทางอาหารในเมล็ดคาโนล่า (*Brassica napus*) โดยยับยั้งการแสดงออกของยีน *DE-ETIOLATED1 (DET1)* ที่ควบคุมการตอบสนองต่อแสงของพืช และมีผลต่อกระบวนการสร้างสารแคโรทีนอยด์และสารฟลาโวนอยด์ พบว่าในเมล็ดมีการสะสมสารแคโรทีนอยด์มากขึ้น และลดปริมาณ sinapate ester ทำให้มีคุณค่าทางอาหารมากขึ้น (Wei *et al.*, 2009)

ในการปรับปรุงพันธุ์พืชเศรษฐกิจให้ต้านทานต่อโรคสามารถใช้เทคนิค RNAi ได้โดย Fahim *et al.* (2010) ถ่ายพลาสมิด hpRNA ที่มีส่วนของยีน nuclear inclusion protein 'a' (*Nia*) ของไวรัส wheat streak mosaic virus (WSMV) ที่ก่อให้เกิดโรคในข้าวสาลี ทำให้สามารถต้านทานไวรัสได้ นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้เทคนิคในการยับยั้งการสะสมของ patatin ที่มีอยู่มากในหัวมันฝรั่ง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ และใช้หัวมันฝรั่งเป็นต้นแบบในการทดลองผลิตวัคซีนของมนุษย์ โดยช่วยลดขั้นตอนการสกัดโปรตีน ลดการปนเปื้อนจาก patatin เพื่อผลิตวัคซีนที่บริสุทธิ์ได้ (Kim *et al.*, 2008)

7. การถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย

การถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย สามารถถ่ายเข้าสู่เนื้อเยื่อพืชได้หลายชนิด เช่น ใบ ใบเลี้ยง ชิ้นส่วนของลำต้น เซลล์แขวนลอย แคลลัส ต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเมล็ด เป็นต้น ซึ่งข้อดีของการถ่ายยีนแบบนี้คือทำได้ง่าย อุปกรณ์ที่ใช้มีน้อยและไม่ซับซ้อน และต้นพืชดัดแปลงพันธุ์ที่ได้มีจำนวนชุดของยีนที่ถ่ายน้อย (Hansen and Wright, 1999) การถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรียได้ผลดีในพืชใบเลี้ยงคู่ แต่ก็สามารถดัดแปลงเพื่อให้การถ่ายยีนมีประสิทธิภาพสูงขึ้นในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวได้ โดยการกระตุ้นด้วยสารฟีนอลิก เช่น acetosyringone (Curtis, 2010)

การถ่ายยีนเข้าสู่มันและพืชในสกุลขมิ้น (*Curcuma* spp.) มีรายงานทั้งการถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย และการใช้เครื่องยิงอนุภาค (particle bombardment) ได้แก่ การถ่ายยีนเข้าสู่ปทุมมา (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.) โดยผ่านแคลลัสที่ชักนำขึ้นจากเนื้อเยื่อส่วนโคนต้น โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 (pCAMBIA 1305.1) พบว่าเมื่อทำการบ่มแคลลัสร่วมกับอะโกรแบคทีเรีย เป็นเวลา 30 นาที สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน *gus* โดยวิธีการ GUS assay (กัลยา, 2550) และการถ่ายยีนเข้าสู่ส่วนของยอดของปทุมมา (*Curcuma alismatifolia* Gagnep.) โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีเวกเตอร์ pCAMBIA 2301 พบว่ามีการแสดงออกของยีน *gus* เกิดขึ้นที่ใบและรากของปทุมมา (กัญจนา และ สุเม, 2551) และพบการถ่ายยีนเข้าสู่ยอดปทุมมาโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGLO ที่มีเวกเตอร์ pBI121 หรือ pBI121-*Ca-ACS1* เป็นเวลา 30 นาที ตรวจสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนด้วยปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลิเมอร์ส histochemical GUS assay และ southern blotting พบว่าสามารถผลิตต้นปทุมมาที่ได้รับการถ่ายยีนภายในเวลา 3 เดือน และประสิทธิภาพในการถ่ายยีน มากกว่า 14 เปอร์เซ็นต์ (Mahadthanapuk *et al.*, 2006)

ในส่วนของขมิ้น (*Curcuma longa* L.) มีการถ่ายยีนโดยใช้วิธีการยิงอนุภาค โดยนำแคลลัสที่ได้จากส่วนยอดของต้นขมิ้นมาทำการยิงอนุภาคทองที่เคลือบด้วยพลาสมิด pAHC25 ที่มียีน *bar* และ *gusA* ควบคุมการแสดงออกของยีนด้วย ubiquitin promoter และคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยอาหารที่เติม glufosinate ซึ่งเป็นสารกำจัดวัชพืช พบว่ามีแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีน 50 เปอร์เซ็นต์ ที่สามารถเจริญบนอาหารที่มี glufosinate หลังจากนั้นนำแคลลัสที่ได้ไปชักนำให้เกิดยอด และเพิ่มปริมาณยอดจนได้เป็นต้น นำมาทดสอบด้วยปฏิกิริยาลูซิโพลีเมอเรส และ histochemical GUS assay เพื่อตรวจสอบต้นที่ได้รับการถ่ายยีน พบว่าต้นขมิ้นสามารถต้านทานต่อสารกำจัดวัชพืช glufosinate ได้ (Shirgurkar *et al.*, 2006)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) พันธุ์แดงสยาม ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร กิรตินิจกาล ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
2. เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105

วิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขมิ้นชัน

1.1 ฟอกฆ่าเชื้อ และเพิ่มจำนวนยอดขมิ้นชัน

เลือกยอดอ่อนที่งอกจากตาเหง้าขมิ้นชัน ขนาด 0.5-1.0 เซนติเมตร ตัดให้ติดส่วนโคนของตาเหง้าขมิ้นชันมาเล็กน้อย ลอกใบแก่และผิวเหง้าสีน้ำตาลออก ทำความสะอาดด้วยน้ำสบู่ จากนั้นนำมาฟอกในสารละลายเบตาดีน เป็นเวลา 30 นาที และแช่ในสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 วินาที แล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (ไฮเตอร์) ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมสารลดแรงตึงผิว (tween 20) จำนวน 2-3 หยด เขย่านาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นลอกส่วนใบด้านนอกออกจนเหลือตายอดขนาดประมาณ 0.5 เซนติเมตร นำส่วนตายอดที่ปลอดเชื้อเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติม BA (N⁶-benzyladenine) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และวุ้น 7.2 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดค่า 5.6-5.8 เพาะเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เพื่อเพิ่มจำนวนยอด และเตรียมสำหรับการถ่ายยีน

1.2 ชักนำให้เกิดเหง้าในขมิ้นชัน

ทดสอบหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดเหง้าโดยนำยอดขมิ้นชันที่ได้จากการเพิ่มจำนวนยอด เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 และ 60 กรัมต่อลิตร เลี้ยงในที่ให้แสง 8 และ 16 ชั่วโมงต่อวันตามงานวิจัยของ Hashemy *et al.* (2009) และทดลองเลี้ยงยอดขมิ้นชันในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 60 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่าง 5.7 เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 1,500 ลักซ์ อุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 สัปดาห์

2. การจัดทำพลาสติกเพื่อถ่ายยีนเข้าสู่ขมิ้นชัน

2.1 เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน DCS และ CURS1

2.1.1 สกัดดีเอ็นเอขมิ้นชัน

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของขมิ้นชัน ตามวิธีของ Agrawal *et al.* (1992) โดยนำไปอ่อนขมิ้นชันประมาณ 0.5-1.0 กรัม ใส่ลงในโกร่ง เติมน้ำไตรเจนเหลวและบดให้ละเอียด แล้วนำผงใบบดไป extraction buffer [(2% CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide), 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) pH 8.0, 100 mM Tris-HCl pH 8.0)] 0.7 มิลลิลิตร และ 2-mercaptoethanol 1.5 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที โดยกลับหลอดไปมา 2-3 ครั้งทุก 10 นาที จากนั้นเติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (chloroform : isoamyl alcohol = 24:1) 0.7 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติมน้ำไอโซโพรพานอล 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนด้วย washing buffer (10 mM sodium acetate pH 5.2, 70% ethanol) 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที คว่ำหลอดให้ตะกอนแห้ง ละลายตะกอนด้วย RNase buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 15 mM NaCl) 200 ไมโครลิตร เติมนิวคลีเอส RNase A (10 mg/ml) 4 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน สกัดแยกนิวคลีเอส RNase A และโปรตีนที่เหลืออยู่ออกไปด้วยฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (phenol : chloroform : isoamyl

alcohol = 25:24:1) 200 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยกลับหลอดไปมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แยกสารละลายส่วนบนมาเติม คลอโรฟอร์ม : ไอโซอมีลแอลกอฮอล์ (24:1) 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 x g เป็นเวลา 5 นาที คูดสารละลายใสส่วนบนเติมโซเดียมอะซิเตท ความเข้มข้น 3 โมลาร์ (pH 5.2) 20 ไมโครลิตร และเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ (absolute ethanol) 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ละลายด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้ต่อไป

2.1.2 ออกแบบไพรเมอร์สำหรับยีน *DCS* และ *CURS1*

ออกแบบไพรเมอร์ทั้งหมด 2 คู่ คือ DCS-F และ DCSi-R เพื่อสังเคราะห์ชิ้นส่วน ดีเอ็นเอของยีน *DCS* ขนาด 196 คู่เบส และไพรเมอร์ CURS1-F และ CURSi-R เพื่อสังเคราะห์ชิ้นส่วน ดีเอ็นเอของยีน *CURS1* ขนาด 229 คู่เบส จากฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) โดยเลือกออกแบบจากส่วนแปลรหัส (coding sequences) ของยีน *DCS* (accession number : AB495006) และ *CURS1* (accession number: AB495007) และตรวจสอบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Fast PCR และ Oligo Calc: oligonucleotide properties calculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) โดยลำดับเบสของไพรเมอร์แต่ละชนิด มีดังนี้

DCS-F 5'-CAACAGCACGCCCCAGTCGA-3'

DCSi-R 5'-CCGAGCGATCCTGGACCAGG-3'

CURS1-F 5'-TCAGCTCATCCATCACGAAGTACAC-3'

CURSi-R 5'-ATCATCGCCGACAACCTCGG-3'

2.1.3 เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณส่วนของยีนทั้งสองชนิดด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยองค์ประกอบในปฏิกิริยา ได้แก่ ดีเอ็นเอขมึ้นชั้น ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร 2 ไมโครลิตร, forward primer และ reverse primer ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ อย่างละ 1 ไมโครลิตร, dNTP ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ 0.75 ไมโครลิตร, 10X PCR buffer 1.5 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ 0.75 ไมโครลิตร, *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร (Invitrogen, USA) 0.1 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่น 7.9 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้ปริมาตรรวม 15 ไมโครลิตร

ทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยเริ่มบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นดำเนินปฏิกิริยาทั้งหมด 40 รอบ โดยแต่ละรอบประกอบด้วยขั้นตอนบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที, 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที สุดท้ายบ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ ตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator

2.2 เชื่อมต่อชิ้นส่วนยีนเข้ากับเวกเตอร์เพิ่มจำนวน และถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli*

2.2.1 เชื่อมต่อชิ้นส่วนยีนเข้ากับเวกเตอร์เพิ่มจำนวน

เชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเข้ากับเวกเตอร์ pGEM®-T easy vector (Promega) โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยา ได้แก่ 2X Rapid Ligation Buffer 5 ไมโครลิตร, pGEM®-T easy vector 1 ไมโครลิตร, สารละลายดีเอ็นเอ 3 ไมโครลิตร และ T4 DNA ligase 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

2.2.2 ถ่ายเวกเตอร์เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli*

ถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α โดยนำคอมพิเทนท์เซลล์แช่แข็ง ปริมาตร 50 ไมโครลิตรมาละลายในน้ำแข็ง เติมสารละลายดีเอ็นเอที่ต่อเข้ากับพลาสมิด ปริมาตร 5 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้น heat shock โดยแช่ในอ่างน้ำควบคุม

อุณหภูมิที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที แล้วแช่น้ำแข็งทันที เป็นเวลา 2 นาที เติมน้ำอาหารเหลว LB 500 ไมโครลิตร นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 250 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง เตรียมอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เกลี่ยด้วย IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside) ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ 40 ไมโครลิตร และ X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 40 ไมโครลิตร จากนั้นดูดเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร เกลี่ยลงบนอาหารแข็ง LB ที่เตรียมไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

2.3 คัดเลือกโคลนที่ต้องการด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

ใช้ไม้อิมพันเซียโคลนแบคทีเรียสีขาวจุ่มในหลอด 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งมีน้ำกลั่นปริมาณ 40 ไมโครลิตรเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยองค์ประกอบปฏิกิริยา ได้แก่ ดีเอ็นเอต้นแบบ 2.75 ไมโครลิตร, M13 forward primer และ M13 reverse primer ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ อย่างละ 0.75 ไมโครลิตร, dNTP ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ 1.5 ไมโครลิตร, 10X PCR buffer 1.5 ไมโครลิตร, MgCl₂ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ 0.6 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase ความเข้มข้น 5 หน่วยต่อไมโครลิตร (Invitrogen, USA) 0.08 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่น 7.07 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้ปริมาตรรวม 15 ไมโครลิตร

ทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยเริ่มบ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นดำเนินปฏิกิริยาทั้งหมด 30 รอบ โดยแต่ละรอบประกอบด้วยขั้นตอนบ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที สุดท้ายบ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ ตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator

2.4 สกัดพลาสมิดสายผสม และหาลำดับเบส

เลี้ยงโคลนแบคทีเรียที่มีพลาสมิดสายผสมที่ต้องการในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นสกัดพลาสมิดด้วยชุด NucleoSpin® Plasmid นำเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลวปั่นตกตะกอนเซลล์แบคทีเรีย ที่ความเร็ว

11,000 x g เป็นเวลา 30 วินาที เทอาหารทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วย A1 buffer 250 ไมโครลิตร เติม A2 buffer 250 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการกลับลอดไปมา และเติม A3 buffer 300 ไมโครลิตร ผสมโดยการกลับลอดไปมา ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 x g เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนลงใน NucleoSpin[®] plasmid column ที่อยู่บน collection tube ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 x g เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายที่ตกมาใน collection tube ทิ้ง เติม A4 buffer 600 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 x g เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายที่ออกมาทิ้ง นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 11,000 x g นาน 2 นาที เทสารละลายที่ออกมาทิ้ง ย้าย column ลงในหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม AE buffer 50 ไมโครลิตร วางไว้ในอุณหภูมิห้อง 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 x g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator และนำสารละลายพลาสมิดที่สกัดได้ ส่งเพื่อหาลำดับเบสต่อไป

2.5 ย้ายชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้าสู่พลาสมิดสำหรับถ่ายยีน โดยอาศัย Gateway[®] recombination system

2.5.1 จัดเตรียมพลาสมิด pENTR vector ที่มีชิ้นส่วนยีน

2.5.1.1 นำพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ และพลาสมิด pENTR[™] 1A vector (Invitrogen, USA) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยา ได้แก่ พลาสมิด 2 ไมโครลิตร, 10X NEBuffer 3 1 ไมโครลิตร, *EcoRI* ความเข้มข้น 10 หน่วยต่อไมโครลิตร (BioLabs) 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 6 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.5.1.2 ดึงหมู่ฟอสเฟตที่ปลาย 5' ของพลาสมิด pENTR[™] 1A vector ออกด้วย alkaline phosphatase เพื่อลดการเชื่อมต่อกันเองของพลาสมิด โดยเติมเอนไซม์ alkaline phosphatase ความเข้มข้น 10 หน่วยต่อไมโครลิตร (BioLabs) 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.5.1.3 ตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator

2.5.1.4 ตัดแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการออกจากเจลอะกาโรส โดยตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *DCS* และ *CURS1* ขนาดประมาณ 200 และ 250 คู่เบสตามลำดับ สำหรับพลาสมิด pENTR™ 1A vector เลือกตัดชิ้นพลาสมิดที่มีขนาดประมาณ 2.5 กิโลเบส

2.5.1.5 สกัดแยกชิ้นดีเอ็นเอออกจากเจลอะกาโรสด้วยชุด FAVORGEN® gel purification โดยนำชิ้นเจลใส่ในหลอด (ชิ้นเจลที่ได้มีน้ำหนักมากกว่า 300 มิลลิกรัม) แล้วเติม FADF buffer 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที เมื่อชิ้นเจลหลอมจนหมด ดูดสารละลายใส่ลงใน FADF column ที่อยู่บน collection tube ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 x g เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายที่ออกมาทิ้ง เติม wash buffer 700 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 x g เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายที่ออกมาทิ้ง นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 11,000 x g เป็นเวลา 3 นาที เทสารละลายที่ออกมาทิ้ง ย้าย column ลงในหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชะดีเอ็นเอออกจาก column โดยเติม elution buffer 20-40 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 11,000 x g เป็นเวลา 2 นาที ตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator

2.5.1.6 เชื่อมต่อพลาสมิด pENTR™ 1A vector เข้ากับชิ้นส่วนยีน โดยอาศัยเอนไซม์ T4 DNA ligase โดยองค์ประกอบปฏิกิริยา ได้แก่ ชิ้นส่วนยีน 3 ไมโครลิตร, พลาสมิด pENTR™ 1A vector 1 ไมโครลิตร, 10X T4 DNA ligation buffer 1 ไมโครลิตร, T4 DNA ligase ความเข้มข้น 40 ยูนิตต่อไมโครลิตร (BioLabs) 0.5 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 4.5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

2.5.1.7 ถ่ายพลาสมิดเข้าสู่เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α (ดูข้อที่ 2.2.2) แต่เลือกใช้อาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อคัดเลือกโคลนที่มีพลาสมิด pENTR vector ที่มียีนต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซิน นำโคลนแบคทีเรียที่ขึ้นบนอาหารมาตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาถูกโซไฟลิเมอเรส (ดูข้อที่ 2.3) โดยใช้ไพรเมอร์ของยีน และ pENTR reverse primer (5'-GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC-3') จากนั้นสกัดพลาสมิดสายผสมจากโคลนแบคทีเรียที่ต้องการ (ดูข้อที่ 2.4) ส่งเพื่อหาลำดับเบสต่อไป

2.5.2 แลกเปลี่ยนชิ้นส่วนยีนกับพลาสมิด pSTARGATE RNAi Gateway vector โดยอาศัย site-specific recombination

เตรียมปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนยีนโดยอาศัยปฏิกิริยา LR clonase องค์ประกอบในปฏิกิริยา ได้แก่ พลาสมิด pENTR™ 1A vector ที่มีชิ้นส่วนยีน 1 ไมโครลิตร, พลาสมิด pSTARGATE vector 1 ไมโครลิตร, LR clonase II (Invitrogen, USA) 2 ไมโครลิตร และ น้ำกลั่น 6 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นเติมเอนไซม์ proteinase K บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายที่ได้ถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α (ดูข้อที่ 2.2.2) แต่เลือกใช้อาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะสเปคโตรไมซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คัดเลือกโคลนที่ต้องการด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (ดูข้อที่ 2.3) โดยใช้ไพรเมอร์ของยีน *DCS* และ *CURS1* และตรวจสอบทิศของยีนที่แทรกอยู่ในพลาสมิดด้วยปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับเบสที่อยู่บนพลาสมิด ได้แก่ไพรเมอร์ Star-F (5'-GGCGTCTCGCATATCTCATT-3') และ Star-R (5'-TTCTGCAGGTCGACTCTAGA-3') ร่วมกับไพรเมอร์ของยีน *DCS* และ *CURS1* ทั้ง forward และ reverse โดยตรวจสอบที่ลู่ไพรเมอร์ จากนั้นสกัดพลาสมิด (ดูข้อที่ 2.4) และเตรียมพลาสมิดสำหรับการถ่ายยีน

3. การถ่ายยีนเข้าสู่ยอดขมิ้นชันโดยอาศัยเชื้ออะโกรแบคทีเรีย

3.1 เตรียมเชื้ออะโกรแบคทีเรียสำหรับการถ่ายยีน

ถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เชื้อแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 โดยดูดสารละลายพลาสมิดลงในหลอดที่มีเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่เตรียมพร้อมสำหรับการรับ พลาสมิดเข้าสู่เซลล์ ทิ้งไว้ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจุ่มหลอดลงในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 30 วินาที นำมาละลายน้ำแข็งในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วเติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB ที่เติมยาปฏิชีวนะ สเปคโตรไมซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และไธมามิซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไป เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ตรวจสอบโคลนที่ต้องการด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิ เมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน

3.2 ถ่ายยีนเข้าสู่ยอดขมิ้นชัน

เลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่ตรวจสอบยีนแล้วในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เติมยาปฏิชีวนะสเปคโตรไมซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และไรแฟมพิซิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นย้ายลงสู่อาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพื่อเลี้ยงต่ออีก 1 วัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เจือจางสารละลายอะโกรแบคทีเรียด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 50 มิลลิลิตร ให้มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5-0.6 จากนั้นเติมสาร acetosyringone (1 mM) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มสารละลายอะโกรแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำยอดอ่อนขมิ้นชันจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ตัดส่วนใบออกให้มีขนาด 0.5-1.0 เซนติเมตร มาเลี้ยงร่วมกับสารละลายอะโกรแบคทีเรีย เป็นเวลา 30 นาที ในอ่างน้ำที่มีคลื่นเสียง sonicate จากนั้นนำยอดขมิ้นชันมาชุบให้แห้งด้วยกระดาษที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เลี้ยงยอดขมิ้นชันที่ได้รับการถ่ายยีนในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในที่มืด เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นฆ่าเชื้ออะโกรแบคทีเรียส่วนเกินออกโดยล้างยอดขมิ้นชันในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่เติมซีโฟแทกซิม 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ข้ามคืน แล้วจึงย้ายยอดขมิ้นชันเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีโฟแทกซิม 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และไฮโกรมัยซิน 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 6-8 สัปดาห์ โดยเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ จากนั้นย้ายลงเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อเพิ่มจำนวนยอด

4. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *DCS* และ *CURS1*

4.1 ตรวจสอบการได้รับการถ่ายยีนโดยเพิ่มปริมาณยีนเครื่องหมายด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เอส

สกัดดีเอ็นเอจากต้นขมิ้นชันที่รอดชีวิตจากการคัดเลือกบนอาหารสูตร MS ที่เติมยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธีของ Agrawal *et al.* (1992) (คู่มือที่ 2.1.1) จากนั้นตรวจสอบการมีอยู่ของยีนเครื่องหมาย *hygromycin phosphotransferase (hpt)* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เอส โดยออกแบบคู่ไพรเมอร์ดังนี้

HPT-F	5'-ATGTCCTGCGGGTAAATAGC-3'
HPT-R	5'-GCCTCCAGAAGAAGATGTTG-3'

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณส่วนของยีนด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่โพลิเมอร์สโดยเริ่มบ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดำเนินปฏิกิริยาทั้งหมด 30 รอบ โดยแต่ละรอบประกอบด้วยขั้นตอนบ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที, 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที สุดท้ายบ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ ตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator

4.2 ตรวจสอบการแสดงออกโดยวิเคราะห์ปริมาณอาร์เอ็นเอของยีน *DCS* และ *CURS1*

4.2.1 สกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างขมิ้นชัน

นำส่วนของใบและโคนต้นขมิ้นชันที่ได้รับการถ่ายยีน สกัดอาร์เอ็นเอตามวิธีของ Yu and Goh (2000) โดยนำตัวอย่างปริมาณ 0.5 กรัม บดให้ละเอียดในโกร่ง ใส่น้ำในหลอด 1.5 มิลลิลิตรที่มี extraction buffer 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ เติมน้ำคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (chloroform : isoamyl alcohol = 24:1) ปริมาตรเท่ากับสารละลาย ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ สกัดด้วยสารละลายคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 24:1 ตามขั้นตอนเดิมอีก 2 ครั้ง จากนั้นเติม LiCl ความเข้มข้น 10 โมลาร์ ปริมาตร 1/3 เท่าของสารละลาย ผสมโดยการกลับหลอดไปมา บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เพื่อให้อาร์เอ็นเอตกตะกอน หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทสารละลายทิ้ง ล้างตะกอนด้วย LiCl ความเข้มข้น 2.5 โมลาร์ 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ในน้ำ DEPC 800 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนแห้งในอากาศ จากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำ DEPC 30 ไมโครลิตร เก็บตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD₂₆₀, OD_{260/280} และ OD_{260/230} และตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสใน

เจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator

4.2.2 ทำปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันพีซีอาร์ของอาร์เอ็นเอ

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 4.2.1 มาทำปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันพีซีอาร์ (RT-PCR) ของอาร์เอ็นเอ โดยใช้ชุด One-Step RT-PCR (Life Technologies) โดยชุดปฏิกิริยา ประกอบด้วย อาร์เอ็นเอ (ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) 2 ไมโครลิตร, 2X Reaction Mix 10 ไมโครลิตร, forward primer และ reverse primer ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ อย่างละ 1 ไมโครลิตร, RT/PLATINUM *taq* Mix 1 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่น 5 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร

ทำปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันและปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรส โดยเริ่มบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นดำเนินปฏิกิริยาทั้งหมด 40 รอบ โดยแต่ละรอบประกอบด้วยขั้นตอนบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที, 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที สุดท้ายบ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดสมบูรณ์ ตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator

4.2.3 ทำปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันพีซีอาร์แบบกึ่งตรวจวัดปริมาณ (semi-quantitative RT-PCR)

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ มาทำปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชัน และปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรส เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน 18S rRNA ขนาด 101 คู่เบส เพื่อใช้เป็นยีนอ้างอิงในการปรับให้ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอต้นแบบของทุกๆ ตัวอย่างมีค่าเท่ากัน โดยออกแบบคู่ไพรเมอร์ดังนี้

18S rRNA-F	5'-CCTTCCTCTAAATGATAAGGTTCAATGG-3'
18S rRNA-R	5'-GATTGAATGGTCCGGTGAAGTGTT-3'

ทำปฏิกิริยาริเวอร์สทรานสคริปชันพีซีอาร์ของอาร์เอ็นเอดังข้อที่ 4.2.2 โดยใช้
ไพรเมอร์ของยีน *DCS* และ *CURSI* และทำปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรส จำนวน 15, 20, 25, 30 และ
40 รอบ ตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอธิเดียมโบร
ไมด์ และตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator



ผลและวิจารณ์

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขมิ้นชัน

1.1 ฟอกฆ่าเชื้อ และเพิ่มจำนวนยอดขมิ้นชัน

นำยอดอ่อนจากเหง้าของขมิ้นชันมาล้างด้วยน้ำสะอาด ฟอกฆ่าเชื้อด้วยเบตาดีน เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นจุ่มในเอธิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 วินาที และฟอกในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (ไฮเตอร์) ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ นาน 10 นาที เลี้ยงชิ้นส่วนยอดบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ สามารถเพิ่มจำนวนยอดและรากได้ โดยมีจำนวนยอด 2-5 ยอด จำนวนราก 1-2 ราก (ภาพที่ 1)



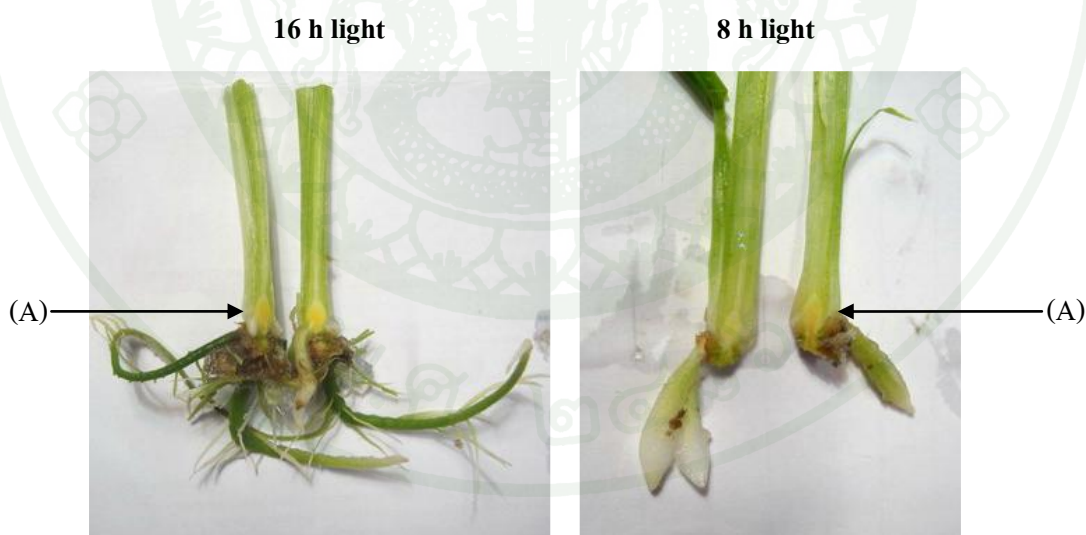
ภาพที่ 1 ยอดอ่อนที่งอกจากตาเหง้าขมิ้นชัน และยอดขมิ้นชันที่ฟอกฆ่าเชื้อและเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์

การเจริญพัฒนาของเนื้อเยื่อพืชไปเป็นยอดนั้นต้องอาศัยสารควบคุมการเจริญเติบโตกลุ่มออกซินและไซโตไคนินในอัตราส่วนที่เหมาะสม พบว่างานวิจัยเกี่ยวกับการขยายพันธุ์ขมิ้นชันด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนใหญ่มีการเติมสารกลุ่มไซโตไคนินเพียงอย่างเดียวโดยไม่เติมออกซินก็สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนยอดได้ดี เนื่องจากเนื้อเยื่อขมิ้นชันสามารถสร้างสารออกซินได้เองในปริมาณที่เพียงพอจึงไม่ต้องการออกซินเพิ่มจากอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ก็สามารถชักนำให้เกิดยอดได้ โดยสารไซโตไคนินที่นำมาใช้ส่วนใหญ่เป็นสารสังเคราะห์ ได้แก่ BA (6-benzylaminopurine), kinetin และ TDZ (thidiazuron) สารควบคุมการเจริญเติบโตที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนยอดขมิ้นชันมากที่สุด คือ TDZ ซึ่งเป็นสารกลุ่มไซโตไคนินที่มีประสิทธิภาพสูง มีฤทธิ์แรงจึงใช้ความเข้มข้นในระดับต่ำ ก็สามารถเพิ่มจำนวนยอดได้ปริมาณมาก (Prathantharug

et al., 2003) เนื่องจาก TDZ เป็นสารที่มีราคาค่อนข้างสูง จึงนิยมใช้ BA ในการชักนำยอดมากที่สุด โดยความเข้มข้นของ BA ที่มากขึ้น สามารถเพิ่มจำนวนยอดเพิ่มขึ้น แต่จะลดความยาวยอดลง พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวนยอดขมิ้นชัน ได้แก่ ความเข้มข้น 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อลิตร (วัชรินทร์, 2548; Naz *et al.*, 2009; Rahman *et al.*, 2004)

1.2 ชักนำให้เกิดเหง้าในขมิ้นชัน

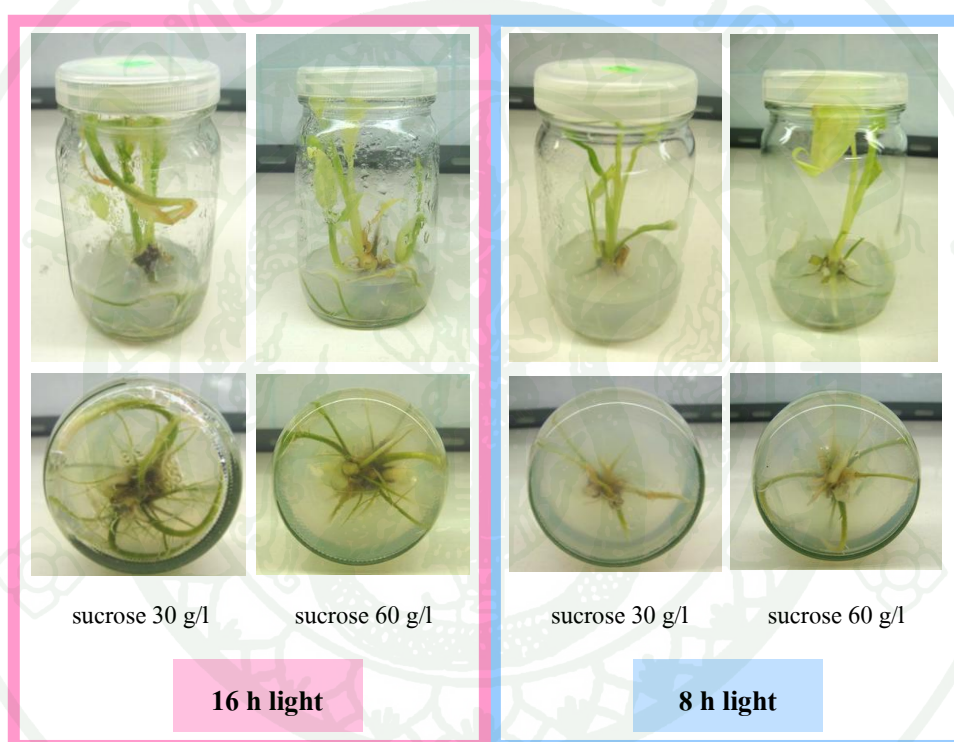
ทดสอบสูตรอาหารที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดเหง้าในขมิ้นชัน โดยทดลองใช้สูตรอาหารตามงานวิจัยของ Hashemy *et al.* (2009) โดยเลี้ยงยอดขมิ้นชันบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 และ 60 กรัมต่อลิตร เลี้ยงในที่ให้แสง 8 และ 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่าในทุกสูตรอาหารมีการแตกยอดใหม่ 1-2 ยอด มีความยาวยอดเพิ่มขึ้น ส่วนโคนของยอดมีลักษณะอวบ พบการสะสมสารเคอร์คูมินอยด์ที่มีสีเหลืองบริเวณโคนยอด และพบว่ามีรากเกิดขึ้นจำนวนมาก โดยรากที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นสีขาวและเขียว มีขนาดใหญ่ อวบ มีขนรากจำนวนมาก แต่ไม่พบการสะสมสารสีเหลืองเกิดขึ้น (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ยอดขมิ้นชันที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และให้แสง 8 และ 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (A) บริเวณโคนต้นที่มีการสะสมของสารเคอร์คูมินอยด์

ยอดขมิ้นชันที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 และ 60 กรัมต่อลิตร พบว่ายอดที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 กรัมต่อลิตรมีการเจริญเติบโตมากกว่ายอดที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมน้ำตาลซูโครสปริมาณ 60 กรัมต่อลิตร

สำหรับยอดขมิ้นชันที่เลี้ยงในที่ให้แสง 8 และ 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่ายอดขมิ้นชันที่เลี้ยงในที่ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวันมีจำนวนยอดและความยาวยอด จำนวนรากและความยาวรากมากกว่า แต่ไม่พบการสร้างเหง้าเกิดขึ้น (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ยอดขมิ้นชันที่เลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เติมน้ำตาลซูโครส 30 และ 60 กรัมต่อลิตร เลี้ยงในที่ให้แสง 8 และ 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

น้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนให้แก่พืช โดยพืชจะดูดซึมน้ำตาลไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ และถูกเก็บสะสมอยู่ในเนื้อเยื่อที่เป็นบริเวณสะสมอาหารของพืชหลายชนิด นอกจากนั้นน้ำตาลยังมีผลต่อค่า osmotic potential ภายในเซลล์พืช ดังนั้นยอดที่เลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำตาลที่สูง น้ำตาลจะถูกสะสมอยู่ในเนื้อเยื่อสูง ทำให้ค่า osmotic

potential ภายในเซลล์ลดลง กระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ของพืชทำงานได้ลดลง ทำให้การเจริญเติบโตของพืชลดลงด้วย (Fuentes *et al.*, 2005; Jo *et al.*, 2009) ความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสที่มากขึ้นทำให้น้ำหนักสดของพืชลดลง แต่น้ำหนักแห้งจะเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากการสะสมของโปรตีน proline และคาร์โบไฮเดรตภายในเซลล์มากเนื่องจาก osmotic stress (Javed and Ikram, 2008) มีงานวิจัยเกี่ยวข้องกับการทดสอบหาความเข้มข้นน้ำตาลที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดเหง้าในขมิ้นชันมากมาย โดยความเข้มข้นน้ำตาลที่เหมาะสมในการเกิดเหง้ามีตั้งแต่ความเข้มข้นปกติ คือ 30 กรัมต่อลิตร จนถึงความเข้มข้น 90 กรัมต่อลิตร การทดลองนี้ได้ใช้ความเข้มข้นน้ำตาล 30 และ 60 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นที่ใช้อาจยังไม่เหมาะสมที่พืชจะนำไปสะสมจนเกิดเป็นเหง้าได้ จากงานวิจัยของ Hashemy *et al.* (2009) พบว่าสามารถชักนำให้เกิดเหง้าได้ในอาหารสูตร MS ที่เติม NAA ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับ kinetin ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร เลี้ยงในที่ให้แสง 10 ชั่วโมงต่อวัน เมื่อทำการทดลองเลี้ยงขมิ้นชันบนสูตรอาหารดังกล่าว ไม่สามารถชักนำให้เกิดเหง้าได้ อาจเป็นเพราะพันธุกรรมของต้นพันธุ์ที่ใช้และสภาพแวดล้อมยังไม่เหมาะสม โดยความเข้มแสงมีผลต่อการชักนำเหง้าในขมิ้นชัน พบว่าการเลี้ยงขมิ้นชันเพื่อให้เกิดเหง้าในที่มืด หรือเลี้ยงในที่ให้แสงตั้งแต่ 4 ชั่วโมงต่อวันจนถึงให้แสงปกติ 16 ชั่วโมงต่อวัน จากการทดลอง พบว่าการให้แสง 8 ชั่วโมงต่อวัน พืชจะมีการเจริญเติบโตน้อยกว่าพืชที่ได้รับแสงปกติ 16 ชั่วโมงต่อวัน เนื่องจากพืชต้องใช้แสงในการเกิดกระบวนการสังเคราะห์แสง หากพืชได้รับแสงน้อยลง ทำให้กระบวนการเมแทบอลิซึมเกิดน้อยลง น้ำตาลจึงถูกสะสมไว้ในบริเวณที่เป็นเนื้อเยื่อสะสมอาหาร อย่างไรก็ตามงานวิจัยของ Hashemy *et al.* (2009) กล่าวว่าเปอร์เซ็นต์การเกิดเหง้าในขมิ้นชันที่เลี้ยงในที่ให้แสง 8 ชั่วโมงต่อวัน และ 16 ชั่วโมงต่อวัน มีความแตกต่างกันไม่ชัดเจน และโอกาสที่พบการเกิดเหง้ามีน้อย คิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนพืชที่ทดลองทั้งหมด จึงต้องทดลองหาสูตรอาหารและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อไป

ในการทดลองครั้งนี้ ยังได้เลี้ยงขมิ้นชันในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 60 กรัมต่อลิตร บนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบต่อนาที ในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าต้นขมิ้นชันที่ได้มีการแตกยอดมาก ยอดมีสีเขียว ขนาดใหญ่ ขาว แตกใบสีเขียวขาว ส่วนโคนของยอดมีลักษณะอวบ พบการสะสมสารเคอร์คูมินอยด์ที่มีสีเหลืองบริเวณโคนยอด และมีรากเกิดขึ้นจำนวนมาก มีลักษณะเป็นสีขาวและเขียว มีขนาดใหญ่ อวบ มีขนรากจำนวนมาก ไม่พบการสะสมสารสีเหลืองเกิดขึ้นบริเวณราก (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 ยอดขมิ้นชันที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 60 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ (A) บริเวณโคนต้นที่มีการสะสมของสารเคอร์คูมินอยด์

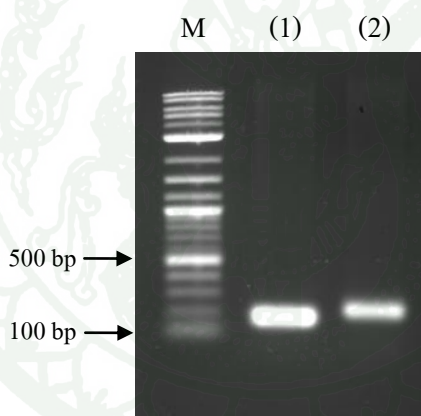
จากผลการทดลองพบว่าการสะสมสารเคอร์คูมินอยด์ในส่วนโคนต้นของขมิ้นชัน เหมือนกับการทดลองที่ใช้สูตรอาหารตามงานวิจัยของ Hashemy *et al.* (2009) บริเวณโคนต้นที่มีการสะสมสารสีเหลือง อาจเป็นส่วนของ primary microrhizome ที่เกิดขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Adelberg and Cousins (2007) พบว่าเกิด primary rhizome ในขมิ้นชันมีลักษณะเป็นรูปโคนหรือรูปไข่ที่บริเวณโคนต้น ใน 4-6 สัปดาห์ และเมื่อเลี้ยงขมิ้นชันในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสที่สูงเป็นเวลาต่อเนื่อง 15-24 สัปดาห์ จะพบ secondary rhizome มีลักษณะรูปแท่งคล้ายนิ้ว ยื่นออกมาจากโคน มีส่วนของข้อและตาเหมือนกับเหง้าขมิ้นชันที่พบตามธรรมชาติ และดังงานวิจัยของอนุพันธ์ และ วีระชน (2005) เหง้าที่ชักนำได้ คือบริเวณโคนต้นที่มีการสะสมสารเคอร์คูมินอยด์ เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 90 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 16 สัปดาห์ ดังนั้นการทดลองนี้จึงต้องใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงมากขึ้น และควบคุมปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในอาหารเพาะเลี้ยงให้ได้ค่าเหมาะสมคงที่ตลอดเวลา จึงจะสามารถชักนำเหง้าได้

2. การโคลนยีนเข้าสู่พลาสมิดสำหรับถ่ายยีน

2.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน *DCS* และ *CURSI*

เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน *DCS* และ *CURSI* จากดีเอ็นเอของขมิ้นชันขนาด 196 และ 229 คู่เบส ตามลำดับ (ภาพที่ 5) จากนั้นเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM[®]-T easy vector เพิ่มจำนวนและหาลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน *DCS* และ *CURSI* ของขมิ้นชันดังภาพที่ 6 เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม BlastN

(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome) พบว่าลำดับเบสที่ได้ ตรงกับลำดับเบสของยีน *DCS* และ *CURSI* ของขมิ้นชันที่มีในฐานข้อมูล และมีความคล้ายกับลำดับเบสของยีน *chalcone synthase* ในขิง (*Zingiber officinale*) คิดเป็น 97 เปอร์เซ็นต์ และ 84 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



ภาพที่ 5 แสดงการใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาถูกลูกโซ่โพลีเมอเรสจากดีเอ็นเอของขมิ้นชัน

(M) ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder

(1) ชิ้นดีเอ็นเอ *DCS*

(2) ชิ้นดีเอ็นเอ *CURSI*

>DCS: 196 bp

CCGAGCGATCCTGGACCAGGTGGAGGCGGGCTCGGACTGGAGAAGGACCGGCTCGCCGCGACGCGGCACGTACT
CAGCGAGTACGGCAACATGCAGAGCGCCACGGTGCTGTTTCATCCTGGACGAGATGCGGAACCGCTCGGCTGCGGA
GGGCCACGCCACCACCGGCGAGGGGCTCGACTGGGGCGTGCTGTTG

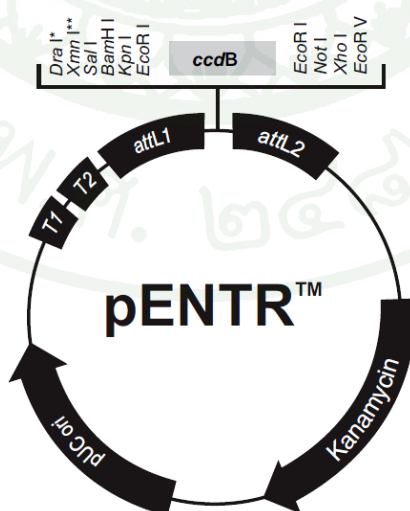
>CURS1: 229 bp

ATCATCGCCGACAACCTCGGGAGGAGCCTGGAGCGGGCGTTGGCGCCGCTGGGGGTGAGGGAGTGGAACGACGTC
TTCTGGGTGGCGCACCCGGGCAACTGGGCCATCATTGACGCCATCGAAGCCAAGCTGCAGCTGAGCCCGGACAAGC
TCAGCACCGCCCGCCACGTCTTCACAGAGTACGGCAACATGCAGAGCGCCACCGTGTACTTCGTGATGGATGAGCT
GA

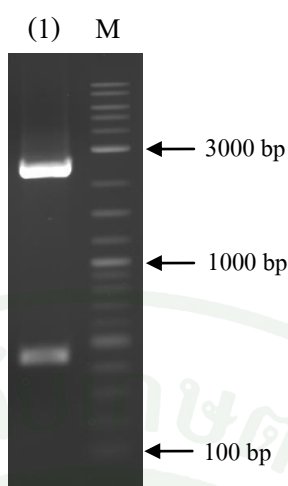
ภาพที่ 6 แสดงลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน *DCS* และ *CURS1* ของขมิ้นชัน

2.2 การสร้างพลาสมิด RNAi vector ที่มีชิ้นส่วนของยีนหันในทิศตรงข้าม (inverted repeat)

นำพลาสมิด pENTR™ 1A vector ขนาด 2,717 คู่เบส (ภาพที่ 7) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* ซึ่งจะได้พลาสมิดขนาดประมาณ 2,500 คู่เบส และส่วนที่มียีน *ccdB* ขนาดประมาณ 450 คู่เบส (ภาพที่ 8) นำมาดีเอ็นเอฟอสเฟตที่ปลาย 5' ออกด้วย alkaline phosphatase เพื่อป้องกันการกลับมาจับกันเองของพลาสมิด หลังจากนั้นตัดชิ้นพลาสมิดขนาดที่ต้องการและสกัดออกจากอะกาโรสเจล

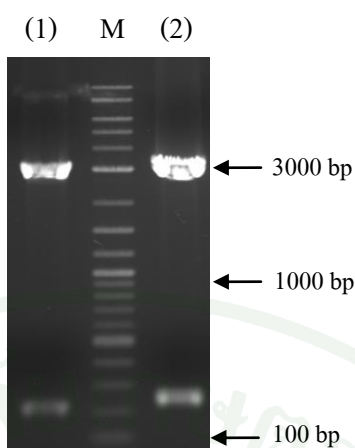


ภาพที่ 7 แผนที่พลาสมิด pENTR™ 1A vector



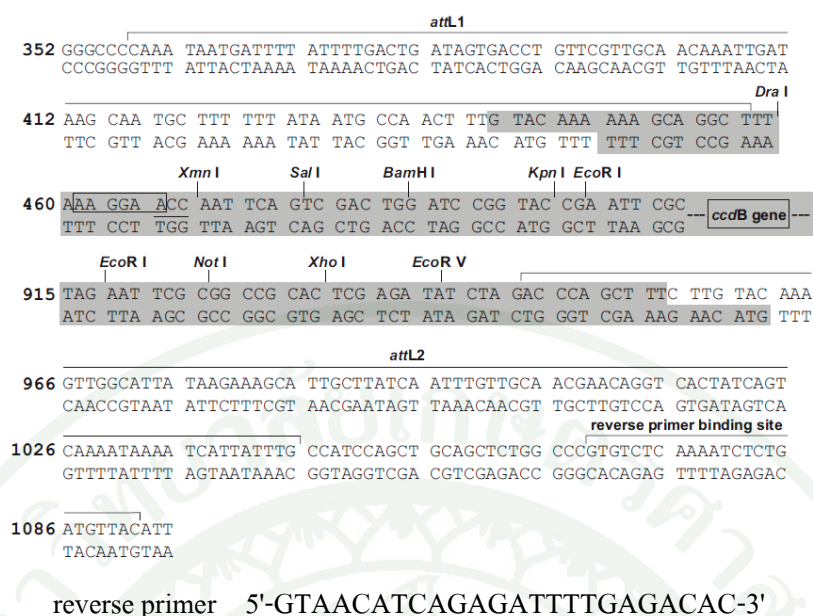
ภาพที่ 8 แสดงการใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพื่อตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดพลาสมิด pENTR™ 1A vector ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*
 (M) ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder
 (1) พลาสมิด pENTR™ 1A vector ตัดด้วย *EcoRI*

จากโคลนของยีน *DCS* และ *CURSI* ในข้อ 2.1 เลือกโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอแทรกอยู่ในพลาสมิด pGEM®-T easy vector ในทิศทางเดียวกันของแต่ละยีน ตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (ภาพที่ 9) หลังจากนั้นตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *DCS* ขนาดประมาณ 200 คู่เบส และยีน *CURSI* ขนาดประมาณ 250 คู่เบส และสกัดออกจากอะกาโรสเจล

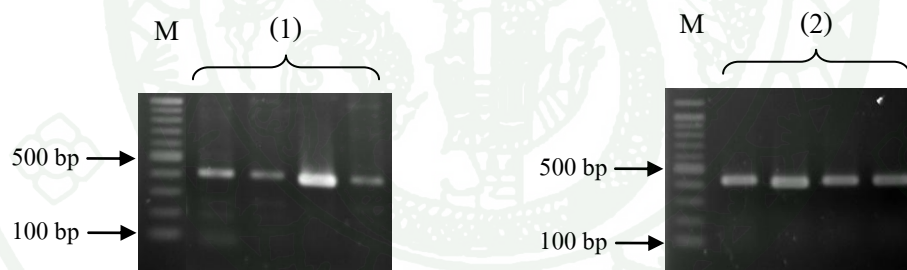


ภาพที่ 9 แสดงการใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดชิ้นดีเอ็นเอออกจากพลาสมิด pGEM®-T easy vector ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (M) ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder
 (1) พลาสมิด pGEM®-T easy vector ที่มีชิ้นส่วนยีน *DCS* ตัดด้วย *EcoRI*
 (2) พลาสมิด pGEM®-T easy vector ที่มีชิ้นส่วนยีน *CURS1* ตัดด้วย *EcoRI*

นำชิ้นดีเอ็นเอส่วนของยีน *DCS* และ *CURS1* ที่ได้มาเชื่อมกับพลาสมิด pENTR™ 1A vector และถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* คัดเลือกโคลนด้วยยาปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจสอบโคลนที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ reverse ที่อยู่บนพลาสมิด pENTR™ 1A vector (ภาพที่ 10) กับไพรเมอร์ของยีนแต่ละยีน คือ *DCS-F* และ *CURS1-F* ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 คู่เบส จากขนาดของชิ้นส่วนยีนประมาณ 200 คู่เบสรวมกับชิ้นส่วนพลาสมิดตั้งแต่ไพรเมอร์ reverse อีกประมาณ 200 คู่เบส (ภาพที่ 11) จากนั้นเลี้ยงเชื้อเพื่อสกัดพลาสมิดจากโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ ส่งเพื่อหาลำดับเบสได้ดังภาพที่ 12 จะเห็นว่าชิ้นดีเอ็นเอที่อยู่ในพลาสมิด pENTR™ 1A vector จะมีส่วนของบริเวณที่เป็น recombination site คือ *attL1* และ *attL2* อยู่ที่ปลายทั้งสองข้างของชิ้นดีเอ็นเอ เพื่อให้สามารถเกิดปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนกับพลาสมิดอื่นที่มีบริเวณดังกล่าวที่เหมาะสมกันได้



ภาพที่ 10 แสดงบริเวณ multiple cloning site และบริเวณที่ออกแบบไพรเมอร์ reverse บนพลาสมิด pENTR™ 1A vector



ภาพที่ 11 แสดงการใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อตรวจสอบโคลนที่ได้จากการถ่ายยีนด้วย ปฏิกิริยาถูกลูกโซ่โพลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ reverse กับไพรเมอร์ของยีน คือ DCS-F และ CURS1-F

(M) คีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder

(1) โคลนที่มีชิ้นส่วนยีน DCS (2) โคลนที่มีชิ้นส่วนยีน CURS1

>DCS

attL2

CAATAATGATTTTATTTTGAAGTATGACCTGTTTCGTTGCAACAAATTGATAAGCAATGCTTTCTTATAATGCCAA
 CTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAGATATCTCGAGTGCAGCCGCGAATTCGATTCAACAGCACGCCCCAGTCGAGC
 CCCTCGCCGGTGGTGGCGTGGCCCTCCGAGCCGAGCGGTTCGCGATCTCGTCCAGGATGAACAGCACCGTGGCGC
 TCTGCATGTTGCCGTACTCGCTGAGTACGTGCCGCGTCGCGGCGAGCCGCCCTTCTCCAGTCCGAGCCGCGCCTCC
 ACCTGGTCCAGGATCGCTCGGAATCACTAGTGAATTCGGTACCGGATCCAGTTCGACTGAATTGGTTCCTTTAAAGCC
 TGCTTTTTTGTACAAAGTTGGCATTATAAAAAAGCATTGCTTATCAATTTGTTGCAACGAACAGGTCACTATCAGTC
 AAAATAAAATCATTATTTG

attL1

>CURS1

attL2

CAATAATGATTTTATTTTGAAGTATGACCTGTTTCGTTGCAACAAATTGATAAGCAATGCTTTCTTATAATGCCAA
 CTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTAGATATCTCGAGTGCAGCCGCGAATTCAGTATGATATCATCGCCGACAACTC
 GGGAGGAGCCTGGAGCGGGCGTTGGCGCCGCTGGGGGTGAGGGAGTGGAACGACGTCTTCTGGGTGGCGCACCCG
 GGCAACTGGGCCATCATGGACGCCATCGAAGCCAAGCTGCAGCTGAGCCCGGACAAGCTCAGCACCGCCCGCCAC
 GTCTTACAGAGTACGGCAACATGCAGAGCGCCACCGTGTACTTCGTGATGGATGAGCTGAATCGAATTCGGTACC
 GGATCCAGTTCGACTGAATTGGTTCCTTTAAAGCCTGCTTTTTTGTACAAAGTTGGCATTATAAAAAAGCATTGCTTA
 TCAATTTGTTGCAACGAACAGGTCACTATCAGTCAAAAATAAAATCATTATTTG

attL1

ภาพที่ 12 ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน *DCS* และ *CURS1* ที่แทรกอยู่ในพลาสมิด pENTR™ 1A

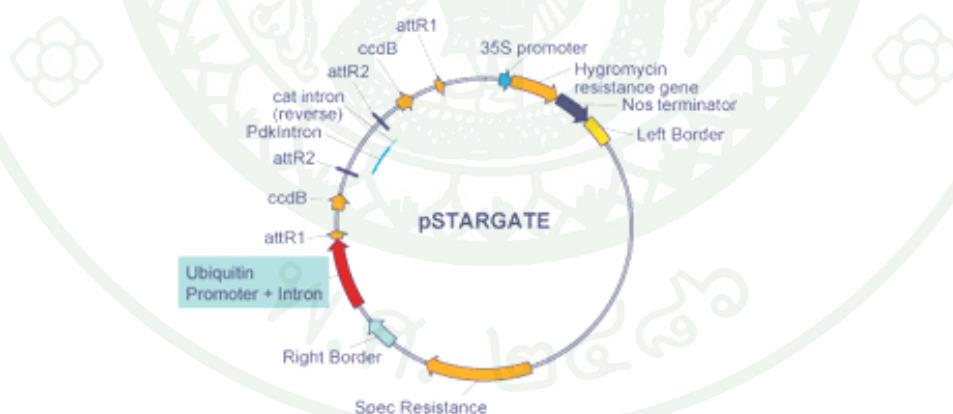
vector ตัวอักษรสีฟ้า คือ ลำดับเบสตำแหน่ง *attL1* และ *attL2* ตัวอักษรสีดำ คือ multiple cloning site และตัวอักษรสีแดง คือ ลำดับเบสของยีน *DCS* และ *CURS1*

2.3 การแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนยีนเข้าสู่พลาสมิด pSTARGATE vector ด้วยปฏิกิริยา LR clonase

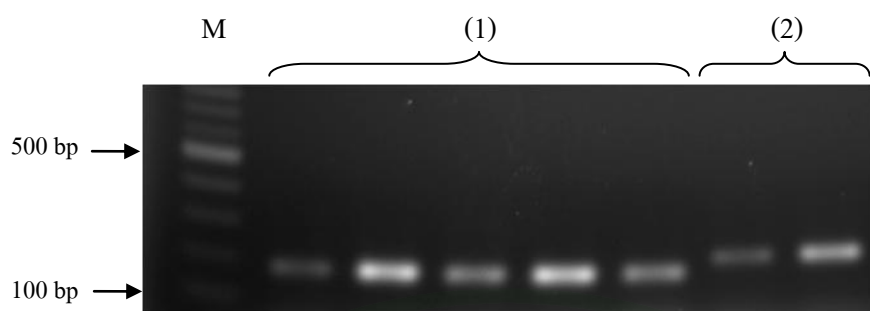
พลาสมิด pSTARGATE vector ขนาด 18,147 คู่เบส (ภาพที่ 13) จะมีส่วนที่เป็น recombination site คือ *attR1* และ *attR2* อยู่ปลายทั้งสองข้างของชิ้นส่วนยีน *ccdB* ทั้งสองยีนที่หันในทิศตรงข้าม เอนไซม์ LR clonase จะชักนำให้เกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างตำแหน่ง recombination site ของทั้งสองพลาสมิด โดยชิ้นส่วนยีนที่อยู่ในพลาสมิด pENTR™ 1A vector จะย้ายมาอยู่แทนที่ชิ้นส่วนยีน *ccdB* ในทิศตรงข้าม เกิดเป็น inverted repeat

หลังจากนั้นถ่ายพลาสมิดที่ได้เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* คัดเลือกโคลนด้วยยาปฏิชีวนะ สเปกโตรไมซินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจสอบโคลนที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ของยีนแต่ละยีน ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 196

และ 229 คู่เบสตามลำดับ (ภาพที่ 14) แสดงว่าชิ้นดีเอ็นเอของยีน *DCS* และ *CURSI* ได้แทรกอยู่ในพลาสมิด pSTARGATE vector เรียบร้อยแล้ว ตรวจสอบทิศของยีนที่แทรกอยู่ในพลาสมิดด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับเบสที่อยู่บนพลาสมิด ได้แก่ ไพรเมอร์ Star-F ที่ออกแบบอยู่ทางด้านปลาย 5' และ Star-R ที่ออกแบบไว้ทางด้านปลาย 3' จับคู่กับไพรเมอร์ของยีน *DCS* และ *CURSI* ทั้ง forward และ reverse ได้ดังนี้ คู่ Star-F กับ forward primer ของยีน, Star-F กับ reverse primer ของยีน, Star-R กับ forward primer ของยีน และ Star-R กับ reverse primer ของยีน โดยตรวจสอบทีละคู่ไพรเมอร์ จะพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 คู่เบสจากขนาดของชิ้นส่วนยีนที่แทรกอยู่ประมาณ 200 คู่เบส รวมกับความยาวจากไพรเมอร์ Star จนถึงตำแหน่งที่ยีนแทรกอยู่อีกประมาณ 200 คู่เบส โดยจะต้องพบแถบดีเอ็นเอจากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ 2 ใน 4 คู่ไพรเมอร์ เนื่องจากมีชิ้นส่วนยีนแทรกอยู่สองข้าง และหันในทิศตรงข้ามกัน ดังนั้นจึงต้องพบแถบดีเอ็นเอทั้งสองข้างของแต่ละยีน โดยหันในทิศใด ตรวจสอบได้จากไพรเมอร์ของยีนในคู่ที่พบแถบดีเอ็นเอ สำหรับยีน *DCS* พบแถบดีเอ็นเอในคู่ไพรเมอร์ Star-F กับ *DCS*-F และคู่ไพรเมอร์ Star-R กับ *DCS*-F แสดงว่าชิ้นส่วนยีนหันในทิศเส้นลบตามด้วยอินทรอนและชิ้นส่วนยีนที่หันในทิศเส้นบวก และยีน *CURSI* พบแถบดีเอ็นเอในคู่ไพรเมอร์ Star-F กับ *CURSI*-i-R และคู่ไพรเมอร์ Star-R กับ *CURSI*-i-R แสดงว่าชิ้นส่วนยีนหันในทิศเส้นบวกตามด้วยอินทรอนและชิ้นส่วนยีนหันในทิศเส้นลบตามลำดับ (ภาพที่ 15 และภาพที่ 16)



ภาพที่ 13 แผนที่พลาสมิด pSTARGATE vector

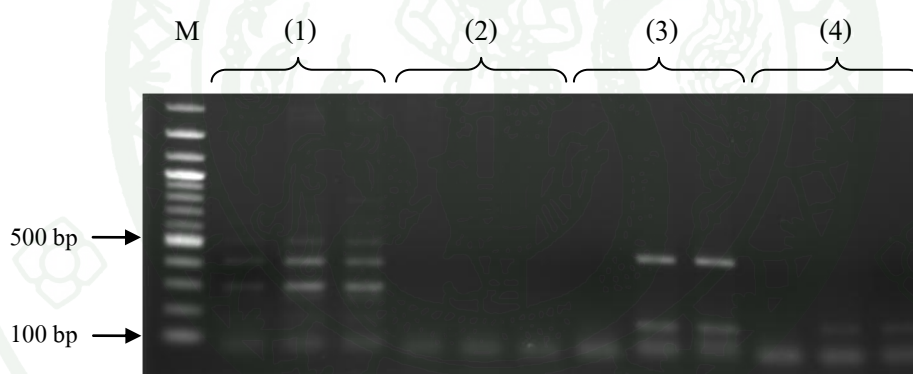


ภาพที่ 14 แสดงการใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อตรวจสอบโคลนที่ได้ด้วยปฏิกิริยาถูกละโซ่ โพลีเมอร์ส โดยใช้ไพรเมอร์ของยีน คือ DCS-F กับ DCSi-R และ CURS1-F กับ CURS1i-R

(M) ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder

(1) โคลนที่มีชิ้นส่วนยีน *DCS*

(2) โคลนที่มีชิ้นส่วนยีน *CURS1*



ภาพที่ 15 แสดงการใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อตรวจสอบโคลนที่ได้ด้วยปฏิกิริยาถูกละโซ่ โพลีเมอร์ส โดยใช้ไพรเมอร์ของยีน คือ DCS-F, DCSi-R, Star-F และ Star-R

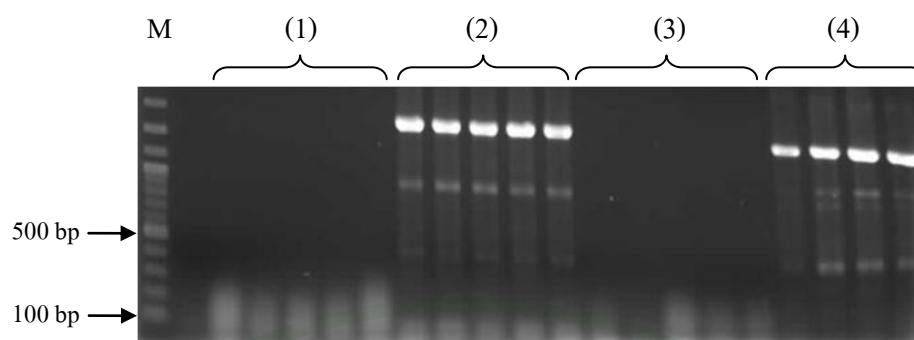
(M) ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder

(1) แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนด้วยไพรเมอร์ Star-F กับ DCS-F

(2) แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนด้วยไพรเมอร์ Star-F กับ DCSi-R

(3) แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนด้วยไพรเมอร์ Star-R กับ DCS-F

(4) แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนด้วยไพรเมอร์ Star-R กับ DCSi-R



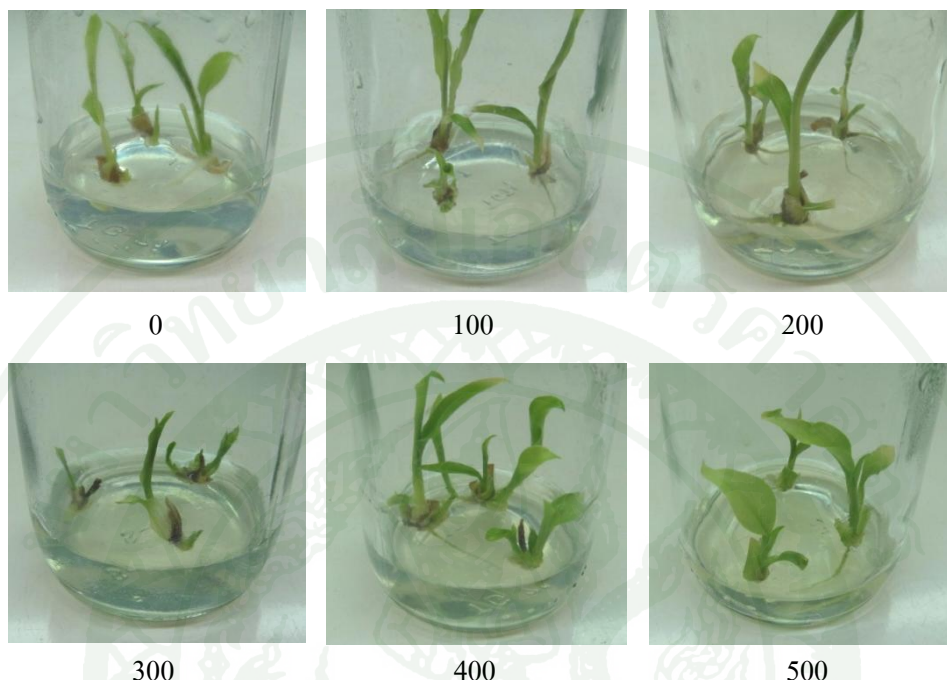
ภาพที่ 16 แสดงการใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อตรวจสอบโคลนที่ได้ด้วยปฏิกิริยาถูกละโซ โพลีเมอร์ส โดยใช้ไพรเมอร์ของยีน คือ CURS1-F, CURS1i-R, Star-F และ Star-R (M) ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (1) แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนด้วยไพรเมอร์ Star-F กับ CURS1-F (2) แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนด้วยไพรเมอร์ Star-F กับ CURS1i-R (3) แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนด้วยไพรเมอร์ Star-R กับ CURS1-F (4) แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนด้วยไพรเมอร์ Star-R กับ CURS1i-R

3. การถ่ายยีนเข้าสู่ยอดขมื่นชัน

3.1 ผลของยาปฏิชีวนะซีโฟแทกซิมต่อการเจริญเติบโตของขมื่นชัน

นำยอดขมื่นชันเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมยาปฏิชีวนะซีโฟแทกซิม ความเข้มข้น 0, 100, 200, 300, 400 หรือ 500 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่ายอดขมื่นชันที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมซีโฟแทกซิมมีความยาวยอด เพิ่มขึ้นและสามารถเพิ่มจำนวนยอดได้เหมือนกับยอดขมื่นชันที่เลี้ยงบนอาหารปกติที่ไม่เติมยา ปฏิชีวนะซีโฟแทกซิม พบว่ายอดขมื่นชันมีสีเขียว ยาว ใบแผ่ออก ส่วนของยอดที่แตกใหม่ มีจำนวน 2-5 ยอด (ภาพที่ 17) ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่นำมาใช้ในการฆ่าเชื้ออะโกรแบคทีเรียส่วน เกินที่ติดอยู่บนชิ้นยอดนั้น จะเลือกใช้ความเข้มข้นสูงที่สุดที่ต้นพืชสามารถเจริญเติบโตได้ จึงเลือก ใช้ยาปฏิชีวนะซีโฟแทกซิมความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเพื่อฆ่าเชื้ออะโกรแบคทีเรีย หลังจกล้างเชื้อร่วมกับยอดขมื่นชัน และเลือกใช้ซีโฟแทกซิมความเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร เพื่อฆ่าเชื้ออะโกรแบคทีเรียที่ยังหลงเหลืออยู่บนชิ้นเนื้อเยื่อเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร คัดเลือก โดยที่ยอดขมื่นชันสามารถเจริญเติบโตแตกยอดใหม่ได้ตามปกติ ซึ่งผลการทดลองที่ได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของกัลยา (2550) ที่พบว่าการใช้ซีโฟแทกซิมความเข้มข้น 300 ไมโครกรัม

ต่อมิลลิลิตรลงในอาหารเพาะเลี้ยงปทุมมา สามารถใช้ในการกำจัด *Agrobacterium tumefaciens* หลังได้รับการถ่ายยีนโดยไม่มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของแคลลัสปทุมมา

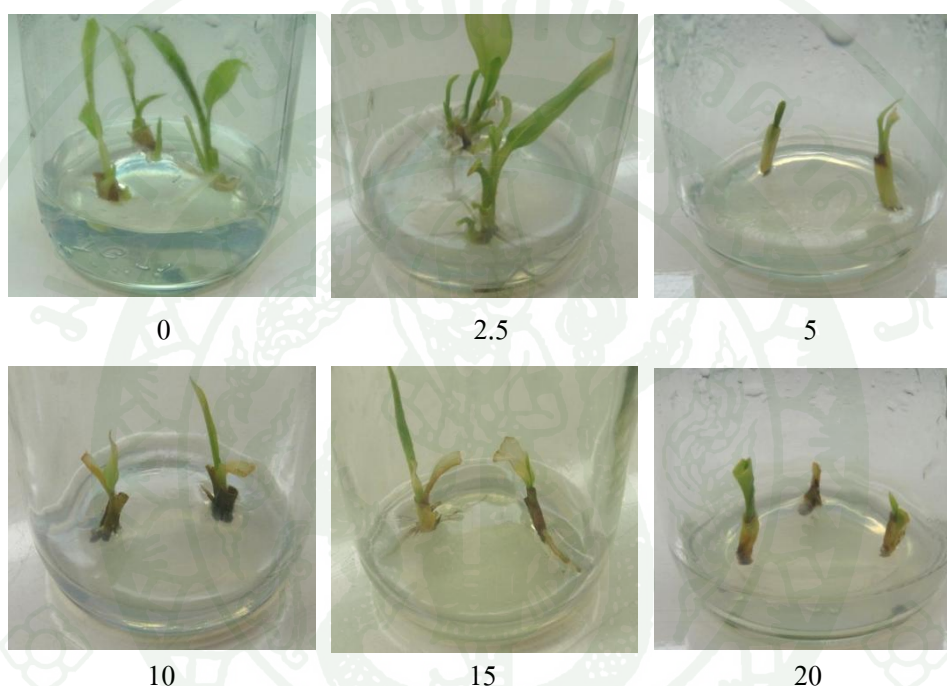


ภาพที่ 17 ยอดขมิ้นชันเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมซิโฟแทกซึมความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์

3.2 ผลของยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินต่อการเจริญเติบโตของขมิ้นชัน

เพาะเลี้ยงยอดขมิ้นชันบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้น 0, 2.5, 5, 10, 15 หรือ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่ายอดขมิ้นชันที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีการยึดของใบน้อยกว่ายอดที่เลี้ยงบนอาหารที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน รวมทั้งใบมีสีเขียวอ่อน ปลายใบเหลือง แต่ยังสามารถชักนำให้มีการเพิ่มปริมาณยอดได้ จำนวน 1-2 ยอด ในขณะที่ยอดขมิ้นชันที่เลี้ยงบนอาหารที่เติมไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้นตั้งแต่ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรขึ้นไป ไม่พบการแตกยอดใหม่ของขมิ้นชัน และชิ้นส่วนยอดไม่มีการยึดของใบ ใบเหลืองซีด จนค่อย ๆ เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและตาย (ภาพที่ 18) ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการคัดเลือกยอดขมิ้นชันที่ได้รับการถ่ายยีนที่สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินได้ จะเลือกใช้ความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ทำให้ต้นพืชตาย 100 เปอร์เซ็นต์ คือ ความเข้มข้น 10

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในการคัดเลือกยอดขมิ้นชันที่ได้รับการถ่ายยีน ในขณะที่งานวิจัยของกัลยา (2550) แคลคูลัสของปทุมมาสามารถเจริญเติบโตบนอาหารที่เติมยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 50-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับพืชใบเลี้ยงเดี่ยวชนิดอื่นที่มีความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะแตกต่างกัน ได้แก่ หญ้าเนเปียร์ แคระกล้าย และข้าว โดยเลือกให้ยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 10, 30 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ปาริสาฯ, 2547; Ozawa, 2008; Subramanyam *et al.*, 2011)



ภาพที่ 18 ยอดขมิ้นชันเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมไฮโกรมัยซินความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์

3.3 ถ่ายพลาสมิด RNAi vector เข้าสู่ต้นขมิ้นชัน

เลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียสายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pSTARGATE vector และชิ้นส่วนยีน *DCS* และ *CURSI* ในอาหารเหลวเป็นเวลา 2 วัน จากนั้นย้ายมาเลี้ยงในอาหารเหลวอีก 1 วัน จนมีค่า $OD_{600} = 0.5-0.6$ จึงตกตะกอนเชื้อ และละลายตะกอนในน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 50 มิลลิลิตร ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ นำยอดขมิ้นชันขนาด 0.5-1.0 เซนติเมตร จำนวน 50 ยอดเลี้ยงในสารละลายอะโกรแบคทีเรียปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่เติม acetosyringone ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที โดยอาศัยคลื่นเสียง sonicate ทำให้เกิดบาดแผลบนชิ้นเนื้อเชื้อจาก

นั้นเลี้ยงเชื้อร่วมกับชิ้นส่วนยอดในที่มีดเป็นเวลา 2 วัน นำเชื้ออะโกรแบคทีเรียด้วยน้ำกลั่นที่เติม ซีโฟแทกซิม ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 1 คืน จากนั้นจึงเลี้ยงชิ้นส่วนยอด ขมิ้นชันบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และซีโฟแทกซิม 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าในชุดทดลองถ่ายยีน DCS จากจำนวนต้นที่ถ่ายยีนทั้งหมด 500 ต้น พบต้นที่สามารถแตกยอดใหม่เจริญเติบโตได้บนอาหารที่เติมยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน จำนวน 3 ต้น คิดเป็น 0.6 เปอร์เซ็นต์ และชุดทดลองถ่ายยีน CURSI จากจำนวนต้นที่ถ่ายยีนทั้งหมด 500 ต้น พบต้นที่สามารถแตกยอดใหม่บนอาหารคัดเลือกที่เติมยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน จำนวน 4 ต้น คิดเป็น 0.8 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจึงนำยอดที่ได้รับการถ่ายยีนเลี้ยงบนอาหารสูตรเพิ่มปริมาณยอดต่อไป

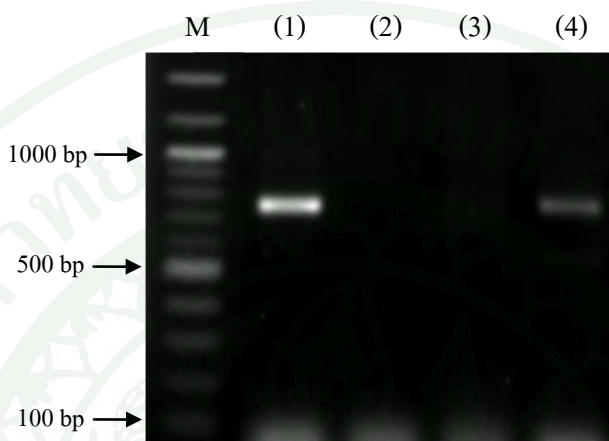
จากผลการทดลองถ่ายยีนเข้าสู่ต้นขมิ้นชันโดยอาศัยเชื้ออะโกรแบคทีเรีย พบต้นที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกจำนวนน้อย อาจเนื่องจากชิ้นส่วนยอดที่ใช้ในการทดลองยังไม่เหมาะสมสำหรับการถ่ายยีน ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพการถ่ายยีน ได้แก่ อายุ ขนาด ชิ้นส่วนที่นำมาใช้ในการถ่ายยีน (Hansen and Wright, 1999) นอกจากนั้นการเข้าบุกรุกของเชื้ออะโกรแบคทีเรียเป็นไปแบบสุ่ม เชื้ออาจเข้าไปบุกรุกบริเวณอื่นที่ไม่ใช่ส่วนกำเนิดยอดใหม่ ทำให้ไม่สามารถเกิดยอดที่เจริญบนอาหารคัดเลือกได้ และอีกสาเหตุหนึ่งเนื่องจากการถ่ายยีนโดยอาศัยเชื้ออะโกรแบคทีเรียมานั้น มักใช้ในพืชใบเลี้ยงคู่ประสบความสำเร็จได้ดีกว่าพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เพราะการส่งสัญญาณกระตุ้นให้ยีนที่เกี่ยวข้องกับการย้าย T-DNA เข้าสู่เซลล์พืชใบเลี้ยงเดี่ยวมีน้อย ดังนั้นการเติมสารประกอบพวก phenolic เช่น acetosyringone ความเข้มข้นที่เหมาะสมสามารถกระตุ้นการเกิดการย้ายส่วน T-DNA เข้าสู่เซลล์พืชได้ดี (Curtis, 2010) และการขนส่ง T-DNA จำเป็นต้องมีการแสดงออกของยีน *virG* และยีน *virE* มากกว่าปกติ (over-expression) (Gelvin, 2003) ซึ่งสามารถทำได้โดยการเพิ่มจำนวนชุดของยีนดังกล่าว หรือทำให้เกิดการกลายของยีน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการแสดงออก (Hansen and Wright, 1999)

4. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน

4.1 ตรวจสอบการมีอยู่ของยีน

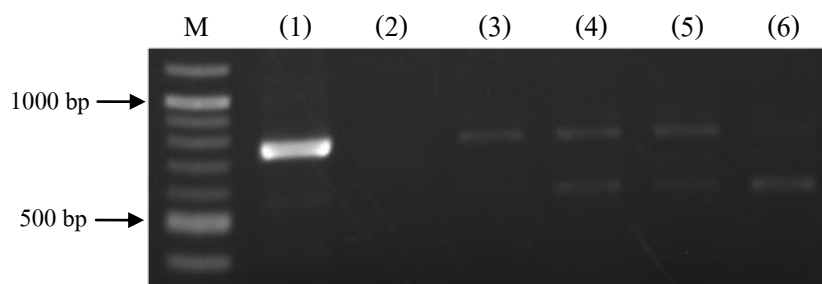
นำต้นขมิ้นชันที่ได้รับการถ่ายยีนมาสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีของ Agrawal *et al.* (1992) นำดีเอ็นเอที่ได้มาทำปฏิกิริยาถูกละโซลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ HPT-F กับ HPT-R เพื่อตรวจสอบการมีอยู่ของยีนเครื่องหมาย *hygromycin phosphotransferase (hpt)* จะได้แถบดีเอ็นเอขนาด 763 คู่เบส

จากชุดทดลองถ่ายยีน *DCS* ที่พบยอดขมิ้นชันสามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือก จำนวน 3 ต้น นั้น มีต้นที่ได้รับการถ่ายยีนหนึ่งต้นที่เกิดการปนเปื้อน จึงไม่สามารถนำมาตรวจสอบการแสดงออกของยีนได้ เมื่อนำต้นที่ได้รับการถ่ายยีนที่เหลือมาตรวจสอบ พบว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *DCS* ทั้งหมด 2 ต้น มีต้นหนึ่งที่พบแถบดีเอ็นเอ ส่วนอีกต้นหนึ่งไม่พบแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น (ภาพที่ 19)



ภาพที่ 19 แสดงการใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อตรวจสอบต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *DCS* ด้วยปฏิกิริยาถูกลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ของยีนเครื่องหมาย *hygromycin phosphotransferase (hpt)* คือ HPT-F และ HPT-R ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 763 คู่เบส (M) ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder
(1) พลาสมิด pSTARGATE vector
(2) ต้นขมิ้นชันที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน
(3) และ (4) ต้นขมิ้นชันที่ได้รับการถ่ายยีน *DCS*

สำหรับต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *CURSI* พบว่ายอดที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือก เมื่อตรวจสอบการมีอยู่ของยีนเครื่องหมาย พบว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *CURSI* ทั้ง 4 ต้น พบแถบดีเอ็นเอของยีนเครื่องหมาย *hygromycin phosphotransferase (hpt)* เกิดขึ้น (ภาพที่ 20)



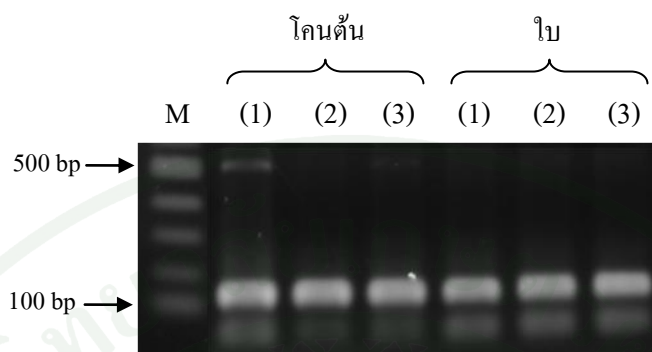
ภาพที่ 20 แสดงการใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อตรวจสอบต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *CURSI* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ของยีนเครื่องหมาย *hygromycin phosphotransferase (hpt)* คือ HPT-F และ HPT-R ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 763 คู่เบส (M) ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (1) พลาสมิด pSTARGATE vector (2) ต้นขมิ้นชันที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (3), (4), (5) และ (6) ต้นขมิ้นชันที่ได้รับการถ่ายยีน *CURSI*

จากต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *DCS* ทั้งหมด 2 ต้น ตรวจสอบพบแถบดีเอ็นเอของยีน *hygromycin phosphotransferase (hpt)* เพียง 1 ต้น อาจเนื่องมาจากยอดขมิ้นชันมีการกลายพันธุ์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (somaclonal variation) ทำให้สามารถเจริญบนอาหารคัดเลือกที่มียาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินได้ (นิคย์ศรี, 2551; สมพร, 2552) เมื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอ และทำปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลิเมอเรส จึงไม่พบแถบดีเอ็นเอของยีนเครื่องหมาย นอกจากนั้นการเข้าบูกูกของเชื้ออะโกรแบคทีเรียเป็นไปอย่างสุ่มในชิ้นส่วนตา ยอดที่นำมาถ่ายยีน เมื่อตา ยอดมีการพัฒนาสร้างยอดใหม่ขึ้นมา ยอดใหม่ที่เกิดขึ้นอาจไม่ได้กำเนิดมาจากเซลล์ต้นกำเนิดเดียวกัน ทำให้ยอดที่เกิดขึ้นใหม่ บางยอดอาจมีและไม่มียีนที่ถ่ายเข้าไป เป็นสาเหตุที่ทำให้การตรวจสอบการถ่ายยีนด้วยปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลิเมอเรสแล้ว ไม่พบยีนดังกล่าว สำหรับต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *CURSI* พบแถบดีเอ็นเอของยีนเครื่องหมายในทุกต้น แสดงว่าสามารถถ่ายยีนเข้าสู่ยอดขมิ้นชันได้

4.2 ตรวจสอบการแสดงออกของยีน

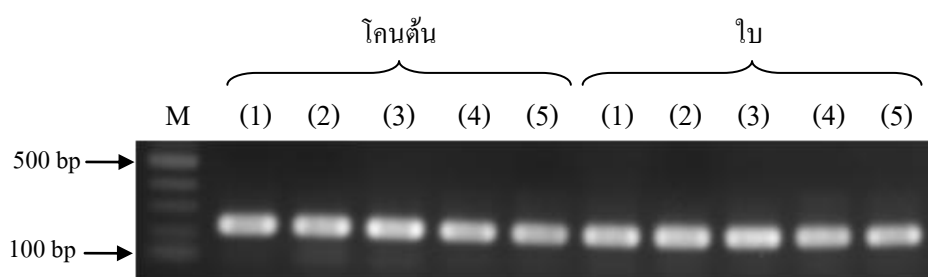
สกัดอาร์เอ็นเอจากส่วนใบและโคนต้นของขมิ้นชันที่ได้รับการถ่ายยีน *DCS* ตามวิธีของ Yu and Goh (2000) ทำปฏิกิริยาริเวอร์สทรานสคริปชันพีซีอาร์ (RT-PCR) ของอาร์เอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ของยีน ได้แก่ DCS-F และ DCSi-R ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 196 คู่เบสในทุกตัวอย่าง และ

แถบดีเอ็นเอมีความหนาเท่ากัน และพบว่าอาร์เอ็นเอที่สกัดจากส่วนโคนต้นขมิ้นชันและส่วนใบของขมิ้นชัน แถบดีเอ็นเอที่ได้ไม่มีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 20)



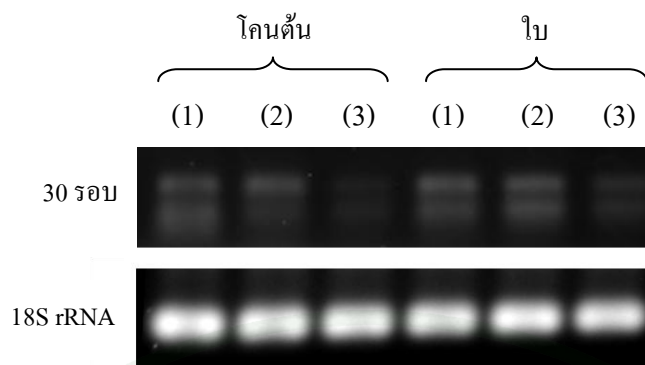
ภาพที่ 21 แสดงการใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนของต้นที่ได้รับการถ่ายยีน DCS ด้วยปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันพีซีอาร์ (RT-PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ของยีน ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 196 คู่เบส
(M) ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder
(1) อาร์เอ็นเอที่สกัดจากต้นขมิ้นชันที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน
(2) และ (3) อาร์เอ็นเอที่สกัดจากต้นขมิ้นชันที่ได้รับการถ่ายยีน DCS

สกัดอาร์เอ็นเอจากต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *CURSI* และเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน *CURSI* ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 229 คู่เบสในทุกตัวอย่าง ทั้งส่วนโคนต้นและใบมีปริมาณความเข้มของแถบดีเอ็นเอไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 22)



ภาพที่ 22 แสดงการใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนของต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *CURSI* ด้วยปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันพีซีอาร์ (RT-PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ของยีน ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 229 คู่เบส (M) คือเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder
(1) อาร์เอ็นเอที่สกัดจากต้นขมิ้นชันที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน
(2), (3), (4) และ (5) อาร์เอ็นเอที่สกัดจากต้นขมิ้นชันที่ได้รับการถ่ายยีน *CURSI*

จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนโดยการทำปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันพีซีอาร์ (RT-PCR) ของอาร์เอ็นเอแบบปกติ ไม่สามารถบอกได้ว่าระดับการแสดงออกของยีนในต้นปกติกับต้นที่ได้รับการถ่ายยีนมีความแตกต่างกันหรือไม่ จึงทดสอบโดยการทำปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันพีซีอาร์แบบกึ่งตรวจวัดปริมาณ (semi-quantitative RT-PCR) เมื่อทำปฏิกิริยาอุณหภูมิ 15, 20, 25, 30 และ 40 รอบ เมื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *DCS* พบความแตกต่างของความเข้มของแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นในการทำปฏิกิริยาจำนวน 30 รอบ โดยในต้นขมิ้นชันที่ได้รับการถ่ายยีน ที่ตรวจพบการมีอยู่ของยีนต้านทานยาปฏิชีวนะไฮโครมัยซิน คือ ต้นขมิ้นชันหมายเลข (3) มีความเข้มของแถบดีเอ็นเอน้อยกว่าในต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ทั้งในส่วนโคนต้นและใบของขมิ้นชัน (ภาพที่ 23)

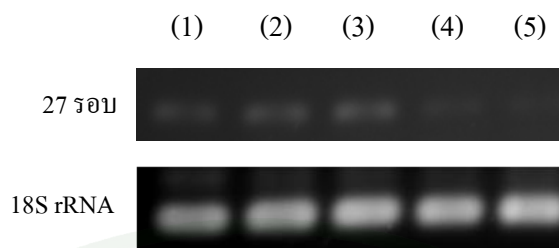


ภาพที่ 23 แสดงการใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนของต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *DCS* ด้วยการทำปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันพีซีอาร์แบบกึ่งตรวจวัดปริมาณ (semi-quantitative RT-PCR)

- (1) อาร์เอ็นเอที่สกัดจากต้นขมิ้นชันที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน
(2) และ (3) อาร์เอ็นเอที่สกัดจากต้นขมิ้นชันที่ได้รับการถ่ายยีน *DCS*

เมื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *CURSI* พบความแตกต่างของความเข้มของแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจำนวน 27 รอบ โดยต้นขมิ้นชันที่ได้รับการถ่ายยีนหมายเลข (4) และ (5) มีความเข้มของแถบดีเอ็นเอน้อยกว่าในต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ทั้งในส่วนโคนต้นและส่วนใบ และพบว่าส่วนใบของต้นขมิ้นชันหมายเลข (3) มีความเข้มของแถบดีเอ็นเอน้อยกว่าต้นปกติเช่นกัน (ภาพที่ 24)

โคนต้น



ใบ



ภาพที่ 24 แสดงการใช้อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิสเพื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนของต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *CURSI* ด้วยการทำปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันพีซีอาร์แบบกึ่งตรวจวัดปริมาณ (semi-quantitative RT-PCR)

(1) อาร์เอ็นเอที่สกัดจากต้นขมิ้นชันที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

(2), (3), (4) และ (5) อาร์เอ็นเอที่สกัดจากต้นขมิ้นชันที่ได้รับการถ่ายยีน *CURSI*

จากผลการทดลอง แสดงว่าต้นขมิ้นชันหมายเลข (3) ที่ได้รับการถ่ายยีน *DCS* และต้นขมิ้นชันหมายเลข (4) และ (5) ที่ได้รับการถ่ายยีน *CURSI* นั้น ชิ้นส่วนยีนที่ถ่ายได้แทรกเข้าสู่จีโนมของพืช เมื่อเกิดกระบวนการถอดรหัส ได้เป็นอาร์เอ็นเอ ชิ้นส่วนของยีนที่หันในทิศตรงข้าม (inverted repeat) เข้าคู่สมกันเป็น hairpin RNA และเกิดกระบวนการ RNA interference อาร์เอ็นเอสายคู่ถูกตัดเป็นชิ้นส่วนอาร์เอ็นเอขนาดเล็ก ซึ่งสามารถจับคู่กับเอ็มอาร์เอ็นเอของยีนที่เป็นบริเวณที่มีเบสคู่สมกัน ก่อให้เกิดการทำลายเอ็มอาร์เอ็นเอ ซึ่งจะทำให้ไม่สามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนหรือเอนไซม์ได้ นอกจากนั้นการใช้โปรโมเตอร์ ubiquitin ที่อยู่ในพลาสมิด pSTARGATE vector เป็นตัวควบคุมการทำงานของยีน สามารถเกิดกระบวนการถอดรหัสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการได้ ดังเช่นงานวิจัยของ Han *et al.* (2010) ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *PgSQE1* ในโสม (*Panax ginseng*) ด้วยการทำปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันพีซีอาร์ ไม่พบแถบดีเอ็นเอของยีน แสดงว่าเมื่อ

เกิดกระบวนการถอดรหัส เอ็มอาร์เอ็นเอของยีน *PgSQE1* ถูกยับยั้งการแสดงออกในระดับอาร์เอ็นเอทั้งหมดจากกระบวนการ RNA interference

จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *DCS* ในระดับอาร์เอ็นเอ เมื่อนำผลผลิตจากการทำปฏิกิริยาริเวอร์สทรานสคริปชันพีซีอาร์แบบกึ่งตรวจวัดปริมาณ วิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอพบว่า ในต้นขมิ้นชันหมายเลข (3) มีปริมาณความเข้มข้นสารละลายดีเอ็นเอน้อยกว่าในตัวอย่างขมิ้นชันที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน แสดงว่าปริมาณอาร์เอ็นเอของยีน *DCS* ที่สกัดได้ และนำมาใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน มีปริมาณลดลงเมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ทำให้ได้ความเข้มข้นดีเอ็นเอจากการทำปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสลดลงไปด้วย (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากผลผลิตจากการทำปฏิกิริยาริเวอร์สทรานสคริปชันพีซีอาร์แบบกึ่งตรวจวัดปริมาณของยีน *DCS* จำนวน 30 รอบ

ชิ้นส่วนพืช	ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ (นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)		
	ต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน		ต้นที่ได้รับการถ่ายยีน
	(1)	(2)	(3)
โคนต้น	235.3	238.9	117.0
ใบ	199.6	124.0	161.7

หมายเหตุ (1) ต้นขมิ้นชันที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

(2) ต้นขมิ้นชันที่ได้รับการถ่ายยีน *DCS* และไม่พบการมีอยู่ของยีน *hpt*

(3) ต้นขมิ้นชันที่ได้รับการถ่ายยีน *DCS* และพบการมีอยู่ของยีน *hpt*

สำหรับต้นขมิ้นชันที่ได้รับการถ่ายยีน *CURS1* เมื่อนำผลผลิตที่ได้จากการทำปฏิกิริยาริเวอร์สทรานสคริปชันพีซีอาร์แบบกึ่งตรวจวัดปริมาณ มาวัดปริมาณความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ พบว่าในต้นขมิ้นชันหมายเลข (4) และ (5) มีปริมาณความเข้มข้นสารละลายดีเอ็นเอน้อยกว่าในตัวอย่างขมิ้นชันที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน แสดงว่าปริมาณอาร์เอ็นเอของยีน *CURS1* ที่สกัดได้

และนำมาใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนอื่น มีปริมาณลดลงเมื่อเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากผลิตผลจากการทำปฏิกิริยาริเวอร์สทรานสคริปชันพีซีอาร์แบบกึ่งตรวจวัดปริมาณของยีน *CURSI* จำนวน 27 รอบ

ชิ้นส่วนพืช	ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ (นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)				
	ต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน		ต้นที่ได้รับการถ่ายยีน		
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
โคนต้น	343.1	382.1	352.5	306.1	211.7
ใบ	405.3	365.5	417.1	277.0	210.0

หมายเหตุ (1) ต้นขมิ้นชันที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

(2), (3), (4) และ (5) ต้นขมิ้นชันที่ได้รับการถ่ายยีน *CURSI* และพบการมีอยู่ของยีน *hpt*

จากผลการทดลองพบว่าต้นขมิ้นชันที่ได้รับการถ่ายยีนหมายเลข (5) มีปริมาณความเข้มข้นสารละลายดีเอ็นเอลดลงมากกว่าต้นขมิ้นชันต้นอื่น สาเหตุที่การยับยั้งการแสดงออกของยีนในแต่ละต้นแตกต่างกันนี้ เนื่องจากการถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดยอาศัยเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นไปอย่างสุ่ม ยีนที่ถ่ายเข้าไปอาจแทรกอยู่ในตำแหน่งที่ต่างกัน และจำนวนชุดของยีนที่แทรกเข้าสู่จีโนมพืชแต่ละต้นอาจมีจำนวนแตกต่างกัน จึงมีการยับยั้งการแสดงออกของยีนได้ต่างกัน ดังงานวิจัยของเบญจวรรณ (2552) ได้ถ่ายยีน antisense *ACO* เข้าสู่ต้นกล้วยไม้หวายพันธุ์ปอมปาดัวร์ พบว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีนมีจำนวนชุดของยีนแตกต่างกัน ตั้งแต่ 1-4 ชุด โดยพบว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีนที่มีจำนวนชุดยีน antisense มาก สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *ACO* ได้มากกว่าต้นที่มีจำนวนชุดของยีน antisense น้อย ทั้งนี้เมื่อยอดขมิ้นชันที่ได้รับการถ่ายยีนมีจำนวนชุดของยีน RNAi แทรกเข้าสู่จีโนมของพืชมาก เมื่อเกิดกระบวนการถอดรหัส จึงมีจำนวน hpRNA มากเช่นกัน จึงเกิดการยับยั้งแสดงออกของยีนได้มากกว่า

ส่วนใบในต้นขมิ้นชันหมายเลข (3) ที่พบว่ามีความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอลดลงเมื่อเทียบกับต้นปกติ นั้น เมื่อนำมาวัดปริมาณความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอพบว่ามีความเข้มข้นไม่แตกต่างจากต้นปกติ อาจเนื่องมาจากในขั้นตอนการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยใช้อะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส อาจดูผลผลิตผลปฏิกิริยามาหยอดลงบนอะกาโรสเจลน้อย จึงเห็นความเข้มแถบดีเอ็นเอลดลงเมื่อเทียบกับตัวอย่างอื่นๆ

ปริมาณความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอที่วัดได้จากตัวอย่างที่สกัดอาร์เอ็นเอจากส่วนโคนต้นมีปริมาณมากกว่าตัวอย่างที่สกัดจากส่วนใบของขมิ้นชัน ดังงานวิจัยของ Katsuyama *et al.* (2009b) พบว่ามีการแสดงออกของยีนในส่วนเหง้ามากกว่าส่วนใบ เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอของต้นที่ได้รับการถ่ายยีนที่สกัดจากส่วนโคนต้น มีความเข้มข้นลดลงอย่างเห็นได้ชัดกว่าในส่วนของใบ อาจเนื่องมาจากยีนมีการแสดงออกมากในส่วนเหง้า หรือโคนต้น เมื่อเกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีนบริเวณดังกล่าว จึงเห็นความแตกต่างจากต้นปกติได้ชัดเจน อย่างไรก็ตาม การถ่ายยีนโดยใช้เทคนิค RNA interference ในครั้งนี้ประสบผลสำเร็จ สามารถถ่ายยีนเข้าสู่ขมิ้นชันได้ และต้นที่ได้รับการถ่ายยีนมีการแสดงออกของยีนลดลงกว่าปกติ

จากงานวิจัยของ Katsuyama *et al.* (2009a, b) กล่าวว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สารเคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชันที่สำคัญ ได้แก่ ยีน *diketide-CoA synthase (DCS)* และ *curcumin synthase (CURS)* จากผลการทดลองนี้พบว่าการยับยั้งการแสดงออกของยีน *DCS* และ *CURSI* ทำให้ยีนมีการแสดงออกลดลง อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถสรุปได้ว่าการยับยั้งยีนทั้งสองชนิด มีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์สารเคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชันหรือไม่ จึงควรทำการศึกษาต่อไป

สรุปและข้อเสนอแนะ

1. การนำเหง้าขมิ้นชันที่เริ่มงอกมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการฟอกฆ่าเชื้อยดก่อนที่งอกจากตาเหง้าขมิ้นชันด้วยสารละลายเบตาดีน เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจุ่มในเอธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 วินาที และฟอกฆ่าเชื้อบริเวณผิวด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที สามารถได้ตาขมิ้นชันปลอดเชื้อ หลังจากนั้นเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยดก่อนของขมิ้นชันบนอาหารสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ สามารถเพิ่มจำนวนยดได้ 2-5 ยด สำหรับงานวิจัยนี้ยังไม่สามารถชักนำให้เกิดเหง้าขมิ้นชันได้ ปัจจัยที่มีผลต่อการชักนำเหง้าที่ควรศึกษาต่อไป ได้แก่ อายุ พันธุกรรมต้นขมิ้นชัน สูตรอาหารที่เหมาะสม ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง และสภาพแวดล้อมที่เพาะเลี้ยง เป็นต้น

2. นำชิ้นส่วนยีน *DCS* และ *CURSI* ขนาด 196 และ 229 คู่เบส แทรกในพลาสมิด pENTRY vector เพื่อทำการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนกับ pSTARGATE vector โดยอาศัย Gateway® recombination ได้พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนยีนหันในทิศทางตรงข้าม (inverted repeat)

3. ถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens* และเลี้ยงเชื้อร่วมกับชิ้นส่วนยดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีโฟแทกซึมความเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร พบยดที่ได้รับการถ่ายยีน *DCS* และ *CURSI* เจริญบนอาหารคัดเลือกได้จำนวน 3 และ 4 ยด คิดเป็น 0.6 และ 0.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

4. ตรวจสอบการมีอยู่ของยีนด้วยปฏิกิริยาถูกโซโพลีเมอเรส พบแถบดีเอ็นเอของยีน *hygromycin phosphotransferase (hpt)* ในต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *DCS* และ *CURSI* จำนวน 1 และ 4 ต้น ตามลำดับ จากนั้นตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ พบว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีน มีการแสดงออกของยีนลดลงเมื่อเทียบกับต้นปกติ แสดงว่าสามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนได้สำเร็จ ทั้งนี้ยังไม่สามารถตรวจสอบได้ว่ายีนทั้งสองชนิดมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์สารเคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชัน เนื่องจากตัวอย่างขมิ้นชันมีปริมาณน้อย ไม่สามารถนำไปวิเคราะห์ปริมาณสารเคอร์คูมินอยด์ได้ ควรหาวิธีตรวจสอบที่เหมาะสมต่อไป

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กัญญา แซ่เตียว และ สุเม อริญารณ. 2551. การถ่ายยีนเข้าสู่ปทุมมาโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย.

ว. วิทย. กษ. 39: 211-214.

กัลยา รัตนถาวรกิติ. 2550. การพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงแคลลัสเพื่อการถ่ายยีนในปทุมมา.

วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ช่อแก้ว จำปาเงิน. 2548. ชนิดและความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เหมาะสมในการขยายพันธุ์ของ
ขมิ้นชัน และว่านนางคำในสภาพปลอดเชื้อ. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี สาขาวิชา
เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เต็ม สมิตินันท์. 2544. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. ครั้งที่ 2. สวนพฤกษศาสตร์ป่าไม้
สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้, กรุงเทพฯ.

ธารธรรมแก้ว เชื้อเมือง. ม.ป.ป. สมุนไพรสำคัญที่ควรรู้. ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์ กำแก้ว, กรุงเทพฯ.

นิตยศรี แสงเดือน. 2551. พันธุศาสตร์พืช. ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,
กรุงเทพฯ

บุญยืน กิจวิจารณ์. 2544. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ครั้งที่ 2. โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา,
ขอนแก่น.

เบญจวรรณ สุวรรณเนตย์. 2552. การถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอทิลีนเข้าสู่กล้วยไม้สกุลหวาย
พันธุ์ป้อมปาดัวร์โดยใช้เวกเตอร์ pMAT21. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปาริธัชา แสงสุวรรณ. 2547. การโคลนยีน glutamine synthetase และการถ่ายยีน ascorbate peroxidase เข้าสู่หญ้าเนเปียร์แคระ (*Pennisetum purpureum* cv. Mott). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภาณุวรรณ. 2544. ขมิ้น ยอดสมุนไพรโบราณ. ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์น้ำฝน, กรุงเทพฯ.

มณีวรรณ สุขสมทิพย์. 2553. การโคลนยีนเบื่องต้น. ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

มนตรี แสนสุข. 2553. ขมิ้น-ข้า สมุนไพรพื้นบ้านต้านโรค. ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์ แพลนบี, กรุงเทพฯ.

รังสฤษฎ์ กาวิตะ. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการและเทคนิค. ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วัชรินทร์ รัตนพันธ์. 2548. ผลของเบนซิลแอไดนีนต่อการเจริญเติบโตของขมิ้นดำ ขมิ้นทอง และ ขมิ้นขาวในสภาพปลอดเชื้อ. ปัญหาพิเศษปริญญาโท ภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วราภรณ์ ภูตะลุง. 2551. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสมุนไพร: แนวทางการศึกษาเพื่อผลิตสารทุติยภูมิที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา. ครั้งที่ 1. บริษัท ขอนแก่นพิมพ์พัฒนา จำกัด, ขอนแก่น.

ศิวพงศ์ จำรัสพันธุ์. 2546. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏอุดรธานี, อุดรธานี.

สถาบันวิจัยสมุนไพร. 2544. มาตรฐานสมุนไพรไทย ขมิ้นชัน. ครั้งที่ 1. กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข โรงพิมพ์ ร.ส.พ., กรุงเทพฯ.

สมพร ประเสริฐส่งสกุล. 2552. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเกี่ยวกับการปรับปรุงพันธุ์พืช. ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์ โฟร์เพช, กรุงเทพฯ.

อนุพันธ์ กงบังเกิด และ วีระชน ขานะพันธ์. 2005. ผลของแสง น้ำตาล และสารชะลอการเจริญเติบโตต่อการชักนำให้เกิดเหง้าจืดของขมิ้นชันในหลอดทดลอง. **NU Sci. J.** 2: 73-86.

อรินทิพย์ ธรรมชัยพินิต. ม.ป.ป. พันธุศาสตร์โมเลกุล: โพรแคริโอต. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Adelberg, J.W. and M.M. Cousins. 2007. Development of micro- and minirhizomes of turmeric, *Curcuma longa* L., *in vitro*. **Acta Hort.** 756: 103-108.

Agrawal, G.K., R.N. Pandey and V.P. Agrawal. 1992. Isolation of DNA from *Choerospondias asillaris* leaves. **Biotech. Biodiv. Lett.** 2: 19-24.

Ashihara, H., X.-Q. Zheng, R. Katahira, M. Morimoto, S. Ogita and H. Sano. 2006. Caffeine biosynthesis and adenine metabolism in transgenic *Coffea canephora* plants with reduced expression of *N*-methyltransferase genes. **Phytochemistry** 67: 882-886.

Bernard P. and M. Couturier. 1992. Cell killing by the F plasmid ccdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. **J. Mol. Biol.** 226: 735-745.

Borgio J.F. 2009. RNA interference (RNAi) technology: a promising tool for medicinal plant research. **J. Med. Plant. Res.** 3: 1176-1183.

Cousins, M.M. and J.W. Adelberg. 2008. Short-term and long-term time course studies of turmeric (*Curcuma longa* L.) microrhizome development *in vitro*. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.** 93: 283-293.

Curtis, I.S. 2010. Genetic transformation-*Agrobacterium*. pp 199-214. In M.R. Davey and P. Anthony, eds. **Plant Cell Culture**. Wiley-Blackwell, West Sussex.

- Dale, J.W. and S.F. Park. 2003. **Molecular Genetics of Bacteria**. 4th ed. John Wiley and Sons Ltd, West Sussex.
- Doran, T. and C. Helliwell. 2009. **RNA Interference: Methods for Plants and Animals**. 1st ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Earley, K.W., J.R. Haag, O. Pontes, K. Oppen, T. Juehne, K. Song and C.S. Pikaard. 2006. Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. **Plant J.** 45: 616-629.
- Fahim, M., L. Ayala-Navarrete, A.A. Millar and P.J. Larkin. 2010. Hairpin RNA derived from viral *NIa* gene confers immunity to wheat streak mosaic virus infection in transgenic wheat plants. **Plant Biotechnol. J.** 8: 1-14.
- Fuentes G., C. Talavera, C. Oropeza, Y. Desjardins and J.M. Santamaria. 2005. Exogenous sucrose can decrease *in vitro* photosynthesis but improve field survival and growth of coconut (*Cocos nucifera* L.) *in vitro* plantlets. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant** 41: 69-76.
- Fukusaki E.-I., K. Kawasaki, S. Kajiyama, C.-I. An, K. Suzuki, Y. Tanaka and A. Kobayashi. 2004. Flower color modulations of *Torenia hybrida* by downregulation of chalcone synthase genes with RNA interference. **J. Biotechnol.** 111: 229-240.
- Gelvin, S.B. 2003. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “Genetic-Jockeying” tool. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 6: 16-37.
- Han, J.-Y., J.-G. In, Y.-S. Kwon and Y.-E. Choi. 2010. Regulation of ginsenoside and phytosterol biosynthesis by RNA interferences of squalene epoxidase gene in *Panax ginseng*. **Phytochemistry** 71: 36-46.

- Hansen, G. and M.S. Wright. 1999. Recent advances in the transformation of plants. **Trends Plant Sci.** 4: 226-231.
- Hashemy, T., H. Maki, Y. Yamada, T.S. Kaneko and K. Syono. 2009. Effects of light and cytokinin on *in vitro* micropropagation and microrhizome production in turmeric (*Curcuma longa* L.). **Plant Biotechnol.** 26: 237-242.
- Hiserodt, R., T.G. Hartman, C.-T. Ho and R.T. Rosen. 1996. Characterization of powdered turmeric by liquid chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. A** 740: 51-63.
- Islam, M.A., K. Klopstech and H.-J. Jacobsen. 2004. Efficient procedure for *in vitro* microrhizome induction in *Curcuma longa* L. (zingiberaceae) - a medicinal plant of tropical asia. **Plant Tiss. Cult.** 14: 123-134.
- Javed F. and S. Ikram. 2008. Effect of sucrose induced osmotic stress on callus growth and biochemical aspects of two wheat genotypes. **Pak. J. Bot.** 40: 1487-1495.
- Jo E.-A, R.K. Tewari, E.-J. Hahn and K.-Y. Paek. 2009. *In vitro* sucrose concentration affects growth and acclimatization of *Alocasia amazonica* plantlets. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.** 96: 307-315.
- Karimi, M., A. Depicker and P. Hilson. 2007. Recombinational cloning with plant gateway vectors. **Plant Physiol.** 145: 1144-1154.

- Katsumoto, Y., M. Fukuchi-Mizutani, Y. Fukui, F. Brugliera, T.A. Holton, M. Karan, N. Nakamura, K. Yonekura-Sakakibara, J. Togami, A. Pigeaire, G.-Q. Tao, N.S. Nehra, C.-Y. Lu, B.K. Dyson, S. Tsuda, T. Ashikari, T. Kusumi, J.G. Mason and Y. Tanaka. 2007. Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin. **Plant Cell Physiol.** 48: 1589-1600.
- Katsuyama, Y., T. Kita, N. Funa and S. Horinouchi. 2009a. Curcuminoid biosynthesis by two type III polyketide synthases in the herb *Curcuma longa*. **J. Biol. Chem.** 284: 11160-11170.
- Katsuyama, Y., T. Kita and S. Horinouchi. 2009b. Identification and characterization of multiple curcumin synthases from the herb *Curcuma longa*. **FEBS Lett.** 583: 2799-2803.
- Kim Y.-S., Y.-H. Lee, H.-S. Kim, M.-S. Kim, K.-W. Hahn, J.-H. Ko, H. Joung and J.-H. Jeon. 2008. Development of patatin knockdown potato tubers using RNA interference (RNAi) technology, for the production of human-therapeutic glycoproteins. **BMC Biotechnol.** 8: 36 doi:10.1186/1472-6750-8-36.
- Kita, T., S. Imai, H. Sawada, H. Kumagai and H. Seto. 2008. The biosynthetic pathway of curcuminoid in turmeric (*Curcuma longa*) as revealed by ¹³C-labeled precursors. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 72: 1789-1798.
- Klug, W.S., M.R. Cummings and C.A. Spencer. 2007. **Essentials of Genetics.** 6th ed. Pearson Prentice Hall, New Jersey.
- Mahadtanapuk, S., N. Topoonyanont, T. Handa, M. Sanguansermisri and S. Anuntalabhochai. 2006. Genetic transformation of *Curcuma alismatifolia* Gagnep. using retarded shoots. **Plant Biotechnol.** 23: 233-237.

- Mansoor, S., I. Amin, M. Hussain, Y. Zafar and R.W. Briddon. 2006. Engineering novel traits in plants through RNA interference. **Trends Plant Sci.** 11: 559-565.
- Miki, D. and K. Shimamoto. 2004. Simple RNAi vectors for stable and transient suppression of gene function in rice. **Plant Cell Physiol.** 45: 490-495.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue culture. **Plant Physiol.** 15: 473-497.
- Nayak, S. and P.K. Naik. 2006. Factors effecting *in vitro* microrhizome formation and growth in *Curcuma longa* L. and improved field performance of micropropagated plants. **Sci. Asia** 32: 31-37.
- Naz, S., S. Ilyas, S. Javad and A. Ali. 2009. *In vitro* clonal multiplication and acclimatization of different varieties of turmeric (*Curcuma longa* L.). **Pak. J. Bot.** 41: 2807-2816.
- Nishihara M., T. Nakatsuka and S. Yamamura. 2005. Flavonoid components and flower color change in transgenic tobacco plants by suppression of chalcone isomerase gene. **FEBS Lett.** 579: 6074-6078.
- Ozawa Kenjiro. 2008. Establishment of a high efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation system of rice (*Oryza sativa* L.) **Plant Sci.** 176: 522-527.
- Prathanturug, S., N. Soonthornchareonnon, W. Chuakul, Y. Phaidee and P. Saralamp. 2003. High-frequency shoot multiplication in *Curcuma longa* L. using thidiazuron. **Plant Cell Rep.** 21: 1054-1059.
- Rahman, M.M., M.N. Amin, H.S. Jahan and R. Ahmed. 2004. *In vitro* regeneration of plantlets of *Curcuma longa* Linn. A valuable spice plant in Bangladesh. **Asian J. Plant Sci.** 3: 306-309.

- Salvi, N.D., L. George and S. Eapen. 2002. Micropropagation and field evaluation of micropropagated plants of turmeric. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.** 68: 143-151.
- Shirgurkar, M.V., C.K. John and R.S. Nadgauda. 2001. Factors affecting *in vitro* microrhizome production in turmeric. **Plant Cell Tiss. Organ Cult.** 64: 5-11.
- Shirgurkar, M.V., V.B. Naik, S.V. Arnold, R.S. Nadgauda and D. Clapham. 2006. An efficient protocol for genetic transformation and shoot regeneration of turmeric (*Curcuma longa* L.) via particle bombardment. **Plant Cell Rep.** 25: 112-116.
- Snyder, L. and W. Champness. 2003. **Molecular Genetics of Bacteria**. 2nd ed. AMS press, Washington, D.C.
- Subramanyam K., K. Subramanyam, K.V. Sailaja, M. Srinivasulu and K. Lakshmidhevi. 2011. Highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of banana cv. Rasthali (AAB) via sonication and vacuum infiltration. **Plant Cell Rep.** 30: 425-436.
- Wei, S., X. Li, M.Y. Gruber, R. Li, R. Zhou, A. Zebarjadi and A. Hannoufa. 2009. RNAi-mediated suppression of *DET1* alters the levels of carotenoids and sinapate esters in seeds of *Brassica napus*. **J. Agric. Food Chem.** 57: 5326-5333.
- Wesley, S.V., C.A. Helliwell, N.A. Smith, M. Wang, D.T. Rouse, Q. Liu, P.S. Gooding, S.P. Singh, D. Abbott, P.A. Stoutjesdijk, S.P. Robinson, A.P. Gleave, A.G. Green and P.M. Waterhouse. 2001. Construct design for efficient, effective and highthroughput gene silencing in plants. **Plant J.** 27: 581-590.
- Xu F.-Q., X.-R. Li and Y.-L. Ruan. 2008. RNAi-mediated suppression of hexokinase gene *OsHKK10* in rice leads to non-dehiscent anther and reduction of pollen germination. **Plant Sci.** 175: 674-684.

Yu, H. and C.J. Goh. 2000. Identification and characterization of three orchid MADS-box genes of the AP1/AGL9 subfamily during floral transition. **Plant Physiol.** 123: 1325-1336.





>gi|226371522|dbj|AB495006.1| Curcuma longa DCS mRNA for diketide CoA synthase, complete cds

ATGGAAGCGAACGGCTACCGCATAACTCACAGCGCCGACGGGCCGGCGACGATCTTGGCCATCGGCACCGCCAACCCACCAACGT
CGTCGATCAGAACGCTTATCCCGACTTCTATTTCCGGGTACCAACTCCGAGTATCTGCAGGAACCTCAAAGCCAAGTTTAGGCGCA
TCTGTGAGAAAGCGGCCATCAGGAAGAGGCACTTGTACTTGACTGAGGAGATTTTGCGGGAGAATCCTAGCTTGCTGGCTCCCATG
GCGCCGTCGTTTCGACGCGCGGCAGGCGATCGTGGTGGAGGCGGTGCCGAAGCTGGCGAAGGAGGCGGCGAGAAGGCGATCAAGGA
GTGGGGCCGCCCAAATCGGACATCACGCACCTCGTCTTCTGCTCCGCGAGCGGAATCGACATGCCCGGCTCCGACCTGCAGCTTC
TCAAGCTGCTCGGGCTCCCGCGAGCGTCAATCGCGTCATGCTCTACAACGTCGGGTGCCACGCCGCTGGCACCGCCCTCCGCGTC
GCCAAGGACCTCGCGGAGAACAACCGCGGCGCGGGTGTCTCGCGTCTGCTCCGAGGTACCGTGTCTCTCTACCGCGGCCCCCA
CCCCGCCACATCGAGAGCTTCTCGTCCAAGCTCTGTTTGGCGACGGCGCCCGCGCGCTCGTGGTGGGTCCGACCCCGTCGATG
GCGTCGAGCGCCCATCTTCGAAATCGCCTCGGCATCCCAAGTGATGCTTCCGGAGAGCGAGAGGCGGTGGGCGGCCACCTCCGC
GAAATTGGGCTGACCTTCCACCTCAAGAGCCAGCTTCCGTCGATCATCGCGAGCAACATCGAGCAGACCTGACGACTGCGTGCTC
GCCGCTGGGGCTGTCTGACTGGAACAGCTGTTTGGGCGGTTACCCCCGGCGGCGGAGCGATCTGGACAGGTGGAGGCGCGGC
TCGGAAGTGGGAGGACCGGCTCGCCGCGACGCGGCACGTAATCGAGGATCGGCAACATCGAGAGCGCCACGGTGCTGTTTCATC
CTGGACGAGATGCGGAACCGCTCGGCTGCGGAGGCGCACGCCACCACCGCGAGGGGCTCGACTGGGGCGTGCTGTTGGGCTTCGG
CCCCGGACTCTCCATCGAGACCGTCTCTCCATAGTTGCAGACTGAACTAG

>gi|226371524|dbj|AB495007.1| Curcuma longa CURS1 mRNA for curcumin synthase, complete cds

ATGGCCAACCTCCACGCGTTGCGCAGGGAGCAGAGGGCTCAAGGTCTTGCCACCATCATGGCCATCGGGACCGCCACCCCTCCCAA
CCTCTACGAGCAGAGCACCTTCCCGACTTCTACTTCCGCGTCACCAACTCCGACGACAAGCAGGAGCTCAAGAAAAAGTTCCGCC
GCATGTGCGAGAAGACGATGGTGAAGAAGCGGTACCTGCACTTGACCGAGGAGATCCTGAAGGAGAGGCCAAGCTCTGCTCCTAC
AAGGAGGCGCTCGTTCGACACCGGCAGGACATCGTGGTGGAGGAGATACCGAGATTGGCTAAGGAAGCGGCGGAGAAGGCCATCAA
GGAGTGGGGGCGGCCAAATCGGAGATCACCCACCTGGTCTTCTGCTCCATCAGCGGGATCGACATGCCCGGCGCGGACTACCGCC
TCGCCACGCTCCTCGGGTCCCTCTCACCGTCAACCGCCTCATGATCTACAGCCAGGCTGCCACATGGGCGCCGCCATGCTCCGC
ATCGCCAAGGACCTCGCCGAGAACAAACAGGGGCGCGCGCTGCTGGTGGTTCGCTGCGAGATCACCGTGTCTAGCTTCCGCGGCC
GAACGAGGGCGACTTCGAGGCGCTCGCGGGGAGGCCGGCTTCGGCGACGGCGCGGGGCGGCTCGTCTCGGGGCGGACCGCTGG
AAGGAATTGAAAACCCATCTACGAGATCGCGGCGGCGATGCAGGAGACGGTGGCGGAGAGCCAGGGGCGGTGGGCGGCCACCTG
CGGGCCTTCGGCTGGACGTTCTACTTCTGAACAGCTGCCGGCGATCATCGCCGACAACCTCGGGAGGAGCCTGGAGCGGGCGTT
GGCGCCGCTGGGGGTGAGGAGTGGAACGACGCTTCTGGGTGGCGCACCCGGGCAACTGGGCCATCATTGACGCCATCGAAGCCA
AGCTGCAGCTGAGCCCGACAAGCTCAGCACCGCCCGCCACGTTTACAGAGTACGGCAACATGCAGAGCGCCACCCTGTACTTC
GTGATGGATGAGCTGAGGAAGCGGTCGGCGGTGGAGGGCGGAGCACCACCGCGACGGCTTGAGTGGGAGTTCTCTCGGTTT
TGGGCCGGGCTCAGCATCGAGACCGTTGTACTGCGCAGTATGCCACTGTAG

ภาพผนวกที่ 1 บริเวณที่ออกแบบไพรเมอร์ของยีน *DCS* และ *CURS1* จากฐานข้อมูล ()
= ไพรเมอร์ฟอว์เวิร์ด,  = ไพรเมอร์รีเวิร์ส)

dbj|AB495006.1| Curcuma longa DCS mRNA for diketide CoA synthase, complete cds
Length=1170

Score = 363 bits (196), Expect = 3e-97
Identities = 196/196 (100%), Gaps = 0/196 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 1      CCGAGCGATCCTGGACCAGGTGGAGGCGCGGCTCGGACTGGAGAAGGACCGGCTCGCCGC 60
            |||
Sbjct 915    CCGAGCGATCCTGGACCAGGTGGAGGCGCGGCTCGGACTGGAGAAGGACCGGCTCGCCGC 974

Query 61     GACGCGGCACGTACTCAGCGAGTACGGCAACATGCAGAGCGCCACGGTGCTGTTTCATCCT 120
            |||
Sbjct 975    GACGCGGCACGTACTCAGCGAGTACGGCAACATGCAGAGCGCCACGGTGCTGTTTCATCCT 1034

Query 121    GGACGAGATGCGGAACCGCTCGGCTGCGGAGGGCCACGCCACCACCGGCGAGGGGCTCGA 180
            |||
Sbjct 1035   GGACGAGATGCGGAACCGCTCGGCTGCGGAGGGCCACGCCACCACCGGCGAGGGGCTCGA 1094

Query 181    CTGGGGCGTGCTGTTG 196
            |||
Sbjct 1095   CTGGGGCGTGCTGTTG 1110
```

gb|AY873969.1| Zingiber officinale chalcone synthase mRNA, partial cds
Length=793

Score = 329 bits (178), Expect = 3e-87
Identities = 190/196 (97%), Gaps = 0/196 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query 1      CCGAGCGATCCTGGACCAGGTGGAGGCGCGGCTCGGACTGGAGAAGGACCGGCTCGCCGC 60
            |||
Sbjct 403    CCGAGCGATCCTGGACCAGGTGGAGGCGCGGCTCGGGCTGGAGAAGGACCGGCTCGCCGC 462

Query 61     GACGCGGCACGTACTCAGCGAGTACGGCAACATGCAGAGCGCCACGGTGCTGTTTCATCCT 120
            |||
Sbjct 463    GACGCGGCACGTACTCAGCGAGTACGGCAACATGCAGAGCGCCACCGTGCTGTTTCATCCT 522

Query 121    GGACGAGATGCGGAACCGCTCGGCTGCGGAGGGCCACGCCACCACCGGCGAGGGGCTCGA 180
            |||
Sbjct 523    GGACGAGATGCGGAACCGCTCGGCCGCGGACGGCCACGCCACCACCGGCGAGGGGCTCGA 582

Query 181    CTGGGGCGTGCTGTTG 196
            |||
Sbjct 583    CTGGGGCGTGCTTTTG 598
```

ภาพผนวกที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *DCS* ขนาด 196 คู่เบส กับฐานข้อมูล

dbj|AB495007.1| Curcuma longa CURS1 mRNA for curcumin synthase, complete cds
Length=1170

Score = 424 bits (229), Expect = 2e-115
Identities = 229/229 (100%), Gaps = 0/229 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1      ATCATCGCCGACAACCTCGGGAGGAGCCTGGAGCGGGCGTTGGCGCCGCTGGGGGTGAGG  60
            |||
Sbjct 820    ATCATCGCCGACAACCTCGGGAGGAGCCTGGAGCGGGCGTTGGCGCCGCTGGGGGTGAGG  879

Query 61     GAGTGAACGACGTCTTCTGGGTGGCGCACCCGGGCAACTGGGCCATCATTGACGCCATC  120
            |||
Sbjct 880    GAGTGAACGACGTCTTCTGGGTGGCGCACCCGGGCAACTGGGCCATCATTGACGCCATC  939

Query 121    GAAGCCAAGCTGCAGCTGAGCCCGGACAAGCTCAGCACCGCCCGCCACGTCTTCACAGAG  180
            |||
Sbjct 940    GAAGCCAAGCTGCAGCTGAGCCCGGACAAGCTCAGCACCGCCCGCCACGTCTTCACAGAG  999

Query 181    TACGGCAACATGCAGAGCGCCACCGTGTACTTCGTGATGGATGAGCTGA  229
            |||
Sbjct 1000   TACGGCAACATGCAGAGCGCCACCGTGTACTTCGTGATGGATGAGCTGA  1048

```

gb|JN017185.1| Curcuma longa chalcone synthase-like protein (ClPKS10) mRNA,
complete cds
Length=1452

Score = 363 bits (196), Expect = 4e-97
Identities = 219/230 (95%), Gaps = 2/230 (1%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1      ATCATCGCCGACAACCTCGGGAGGAGCCTGGAGCGGGCGTTGGCGCCGCTGGGGGTGAGG  60
            |||
Sbjct 931    ATCATCTCCAACAACATCGGGAAGAGCCTGGAGCGGGCGTTGGTGCCGCTGGGGGTGAGG  990

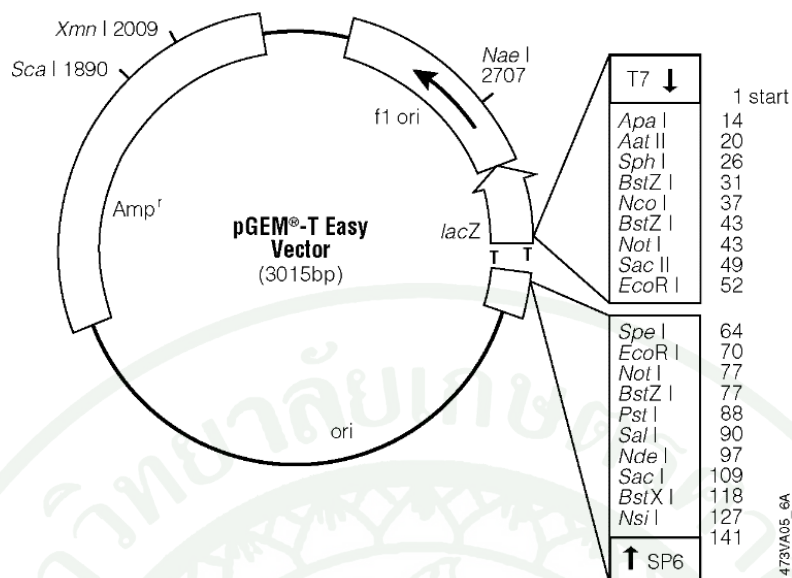
Query 61     GAGTGAACGACGTCTTCTGGGTGGCGCACCCGGGCAACTGGGCCATCATTGACGCCATC  120
            |||
Sbjct 991    GAGTGAACGACGTCTTCTGGGTGGCGCACCCGGGCAACTGGGCCATCATTGACGCCATC  1050

Query 121    GAAGCCAAGCTGCAGCTGAGCCCGGACAAGCTCAGCACCGCCCGCCACGTCTTCA-CAGA  179
            |||
Sbjct 1051   GAAGCCAAGCTGCAGCTGAGCCCGGACAAGCTCAGCACCGCCCGCCACGTCTTCA-CAG-  1109

Query 180    GTACGGCAACATGCAGAGCGCCACCGTGTACTTCGTGATGGATGAGCTGA  229
            |||
Sbjct 1110   GTACGGCAACATGCAGAGCGCCACCGTGTACTTCGTGATGGACGAGCTGA  1159

```

ภาพผนวกที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน *CURS1* ขนาด 229 คู่เบส กับฐานข้อมูล



ภาพผนวกที่ 4 แผนที่พลาสมิด pGEM®-T Easy vector

สูตรอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหาร LB

Tryptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
NaCl	10	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1 ลิตร หากต้องการเตรียมอาหารแข็ง ให้เติมผงวุ้นปริมาณ 1.5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรทั้งหมด แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

วิธีเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

Hao buffer

CTAB	1	กรัม
1 M Tris-HCl pH 7.5	5	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA	2	มิลลิลิตร
5 M NaCl	20	มิลลิลิตร
DEPC-water	26	มิลลิลิตร

ก่อนใช้ เติม PVP-90 ปริมาณ 0.5 กรัม และ mercaptoethanol จำนวน 1 มิลลิลิตร สำหรับปริมาตรรวม 50 มิลลิลิตร

การเตรียม competent cell

1. นำเชื้อ *E. coli* มา streak ลงบนอาหารแข็ง LB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
ข้ามคืน
2. เชื้อโคโลนีของเชื้อ *E. coli* มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เลี้ยงแบบเขย่า ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน
3. คูดสารละลายเชื้อ *E. coli* ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเลี้ยงต่อในอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงแบบเขย่า ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ได้ประมาณ 0.4-0.6
4. นำสารละลายเชื้อเทใส่หลอดขนาด 50 มิลลิลิตร แช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 10 นาที
5. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
6. เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 100 mM NaCl ที่เย็น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 10 นาที
7. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
8. เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 100 mM $CaCl_2$ ที่เย็น ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
9. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
10. เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 100 mM $CaCl_2$ ที่เย็น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติม glycerol ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 10 นาที

11. แบ่งสารละลายเชื้อใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตรหลอดละ 100 ไมโครลิตร แช่ในไนโตรเจนเหลว เก็บเซลล์ไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ต่อไป



ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นางสาวทิวาพรรณ บุญมา
เกิดวันที่	27 กันยายน 2528
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	ผู้นำเสนอผลงานภาคนิทรรศน์ยอดเยี่ยมในกลุ่มพันธุศาสตร์ด้านพืช การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 17 ระหว่างวันที่ 7-9 เมษายน 2554 เรื่อง การถ่ายยีน <i>diketide CoA synthase</i> เข้าสู่มีนชันแบบ RNA interference
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนผู้ช่วยสอน ประจำปีภาคปลาย ปีการศึกษา 2551 จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์