ชื่อโครงงาน “การโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของยีนควบคุมการสร้างโปรตีนในกระบวนการสังเคราะห์เอทิลีนในกล้วยไม้ไทยสกุลแวนด้า”

ถาวรยศ อภิชาตะพงศ์ ปรารถนา เผือกวิไล ธาวิณี วงศ์วิศว์ และ พัฒนา ศรีฟ้า ฮุนเนอร์ *

ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ * Email-address: fscipns@ku.ac.th

บทคัดย่อ

เอทิลีนเป็นตัวเร่งในการเหี่ยวและเสื่อมสภาพของดอกกล้วยไม้สกุลแวนด้า การทดลองครั้งนี้มุ่งเน้นการโคลนยีนที่ควบคุมการสร้างเอทิลีน เพื่อการนำไปใช้ในการยืดอายุการปักแจกันของดอกกล้วยไม้ด้วยวิธีทางพันธุวิศวกรรม การศึกษาองค์ประกอบของยีน ทำโดยการโคลนยีน *ACC oxidase (ACO)* และ *Ethylene receptor (ETR)* ในกล้วยไม้ไทยสกุลแวนด้า โดยสังเคราะห์ดีเอ็นเอของยีนทั้งสองชนิดจากเอ็มอาร์เอ็นเอ (Messenger RNA) ที่สร้างขึ้นในดอกกล้วยไม้สกุลแวนด้าด้วยวิธี RT-PCR (Reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction) ผลจากการทดลองพบว่า ยีน *ACO* และ *ETR* ที่สังเคราะห์ได้จากส่วนอนุรักษ์ของยีน มีขนาด 800 และ 900 คู่เบส ตามลำดับ นำผลผลิตที่ได้มาโคลนในพลาสมิด pGEM-T และนำพลาสมิดลูกผสมที่ได้ถ่ายสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* ได้โคลนยีน *ACO* ทั้งสิ้น คล้ายกับกล้วยไม้สกุลโดริแทนอปซิส และฟาแลนนอปซิส ที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล GenBank คิดเป็นร้อยละ 90 และยีน *ETR* ที่สังเคราะห์ได้มีความคล้ายกับกล้วยไม้สกุลออนซิเดียม และฟาแลนนอปซิส ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 84 และ 83 ตามลำดับ จากการศึกษาการแสดงออกของยีน โดยการตรวจหายีนในดอกกล้วยไม้ในส่วนกลีบดอก เส้าเกสร และปากดอก พบว่า ยีน *ACO* มีการแสดงออกที่บริเวณปากดอก ประโยชน์ที่ได้รับจากการทดลองนี้ เพื่อการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้ด้วยเทคนิค Antisense เพื่ออุตสาหกรรมการผลิตกล้วยไม้ต่อไปในอนาคต

บทนำ

ดอกกล้วยไม้ไทยเป็นที่นิยมอย่างมากทั้งตลาดภายในและภายนอกประเทศ มาเป็นระยะเวลายาวนานในแต่ละปี การส่งออกดอกกล้วยไม้ สร้างรายได้ให้แก่ประเทศหลายพันล้านบาท ปัญหาที่มักพบได้บ่อยในการผลิตดอกกล้วยไม้ คือ การลดลงของคุณภาพดอกกล้วยไม้ โดยเฉพาะในแง่ของอายุการใช้งานที่สั้น เป็นอุปสรรคที่สำคัญอย่างยิ่ง ต่อการพัฒนาการผลิตดอกกล้วยไม้เพื่อการส่งออก

ในขณะที่ดอกกล้วยไม้ถูกตัดแยกออกจากต้น ฮอร์โมนพืชยังคงทำหน้าที่ได้ ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในด้านต่างๆ ทั้งในด้านสรีระ ทางกายภาพ และทางชีวเคมี การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ล้วนส่งผลต่อคุณภาพ และอายุการใช้งานของดอกไม้ทั้งสิ้น (สายชล, 2531) โดยเฉพาะการสร้างก๊าซเอทิลีน เมื่อดอกเริ่มบานและแก่ ก๊าซเอทิลีนจะเป็นตัวเร่งทำให้ดอกเสื่อมสภาพและเหี่ยวเร็วขึ้น (Nadeau *etal*., 1993) เพื่อเป็นการรักษาคุณภาพของดอก และยืดอายุการใช้งาน ได้มีความพยายามที่จะคิดค้นสูตรน้ำยาแช่ดอกในช่วงปักแจกันเป็นจำนวนมาก ปัจจุบันได้มีการนำเอาเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมเข้ามาช่วยในการปรับปรุงอายุการใช้งานของดอกไม้ ในงานวิจัยครั้งนี้ได้เสนอการโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของยีนควบคุมการสร้างโปรตีนในกระบวนการสังเคราะห์เอทิลีน นั่นคือ ยีน *ACC oxidase (ACO)* (Tang *etal*.,1993) และ *Ethylene receptor (ETR)* (Lawton *etal*.,1989) ในกล้วยไม้ไทย

สกุลแวนด้า ซึ่งกล้วยไม้ชนิดนี้มีความไวต่อเอทิลีนสูง เนื่องจากยังไม่มีผู้ใดทำการศึกษามาก่อน ผลจากงานวิจัยนี้ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตกล้วยไม้ที่มีคุณภาพด้วยวิธีทางพันธุวิศวกรรมต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

1.การโคลนยีน การศึกษาลำดับเบส และการวิเคราะห์ข้อมูล

1.1 เตรียมตัวอย่างดอกกล้วยไม้

เก็บดอกกล้วยไม้สายพันธุ์มิสโจคิมสีม่วง และสายพันธุ์เข็มขาวxแวนทุย นำมาปลิดเกสร เพื่อกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของเอทิลีน แล้วนำไปสกัดอาร์เอ็นเอ

1.2 วิธีการแยกอาร์เอ็นเอรวมจากดอกกล้วยไม้

บดดอกกล้วยไม้แวนด้า 0.2 กรัมในไนโตรเจนเหลว เติม 1 มิลลิลิตร ของ Trizol reagent (บริษัท Gibco BRL สหรัฐอเมริกา) ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เติม 0.2 มิลลิลิตร ของคลอโรฟอร์ม ผสมให้เข้ากันอย่างแรง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงนาน 15 นาที ดูดน้ำส่วนใสใส่ในหลอดใหม่ เติม 500 ไมโครลิตรของไอโซโพรพานอล ผสมให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็ง 10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยง 10 นาที ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอ ด้วย 75 % เอธานอล นำไปหมุนเหวี่ยง เป็นเวลา 5 นาที ละลายตะกอนด้วยน้ำ 50 ไมโครลิตร นำมาตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟริซิสบน 0.8% อะกาโรสเจล

1.3 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากอาร์เอ็นเอด้วยวิธี RT-PCR

นำอาร์เอ็นเอรวมจากดอกบานของกล้วยไม้สกุลแวนด้าที่แยกได้มาเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอสายแรก (cDNA) ด้วย RTG KIT (Ready-To-Go™ You-Prime First-Strand Beads บริษัท Phamacia Biotech, สวีเดน)

โดยใช้ไพรเมอร์ :

ETR (antisense)

5'-CCGCATCTCATGGTTCATGAC-3'

*ACO (*antisense)

5'-CGCCTCAAATCTCCGGCT CCTT3'

1.4 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR

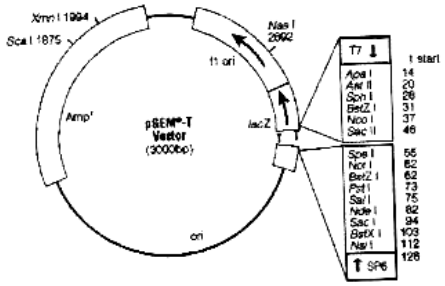
นำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้ เป็นต้นแบบในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้ชุดน้ำยาของบริษัท Finzyme นำสารละลายที่ได้ ไปเพิ่มปริมาณยีน *ACO* และ *ETR* โดยไพรเมอร์ *ACO* หรือ *ETR* sense และ antisense primer ด้วยเครื่อง Gene Amp PCR system 9600 (บริษัท Perkin Elmer สหรัฐอเมริกา) โดยดังโปรแกรมดังนี้

อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	5 นาที		1 รอบ
94 องศาเซลเซียส	45 วินาที		
45 องศาเซลเซียส	45 วินาที		5 รอบ
68 องศาเซลเซียส	3 นาที		
และอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	1 นาที		
55 องศาเซลเซียส	2 นาที		30 รอบ
72 องศาเซลเซียส	3 นาที		
รอบสุดท้ายใช้ที่			
อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	8 นาที		
อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส			

นำ 2 ไมโครลิตร ของสารละลายที่ได้จากการทำ PCR มาตรวจสอบโดยวิธีอิเลคโตรโฟริซีส บน 0.8% อะกาโรสเจล เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ 1 Kb DNA ladder marker ถ่ายภาพบนเครื่อง UV transilluminator

1.5 การโคลนยีน

นำชิ้นดีเอ็นเอผลผลิตจาก RT-PCR มาทำให้บริสุทธิ์ ด้วย NucleoSpin Extraction Kit นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM-T โดยอาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์ T_4 DNA ligase



ภาพที่1 แสดงแผนที่ของพลาสมิด pGEM-T

จากนั้น นำพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (*Escherichia coli* สายพันธุ์ XL1-blue) ด้วยวิธี Heat shock

1.6 การตรวจสอบโคโลนีที่คาดว่าได้รับพลาสมิดสายผสม

คัดเลือกโคโลนีสีขาวซึ่งคาดว่าได้รับพลาสมิดสายผสม มาเพิ่มปริมาณบนอาหาร LA ที่ผสมแอมพิซิลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจสอบขนาดของพลาสมิดที่ได้ ด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีสบน 0.8% อะกาโรสเจล เปรียบเทียบขนาดของพลาสมิดกับพลาสมิดที่ทราบขนาด วิธีนี้ใช้ในกรณีที่ได้โคโลนีสีขาวจำนวนมาก และนำโคโลนีที่คาดว่ามีพลาสมิดสายผสมไปเพิ่มปริมาณ และสกัดพลาสมิดจากเซลล์เจ้าบ้านด้วยวิธี Plasmid minipreparation: Alkaline lysis

1.7 การตรวจสอบพลาสมิดที่โคลนได้ด้วย Restriction Enzyme

นำพลาสมิดมาผสมกับ Buffer Y และเอนไซม์ตัดจำเพาะ (*Not*I และ *Nco*I) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาที่ 70 องศาเซลเซียส 10 นาที นำไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีสบน 0.8% อะกาโรสเจล เปรียบเทียบกับ 1 Kb DNA ladder marker (บริษัท Gibco BRL สหรัฐอเมริกา)

1.8 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และโปรตีนของยีนที่โคลนได้

นำสารละลายพลาสมิดสายผสมที่สกัดได้ มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Concert ™ plasmid purification kit (บริษัท LIFE TECHNOLOGY สหรัฐอเมริกา) จากนั้นเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และ dideoxy chain termination จำนวน 0.1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร โดยใช้ ABI Prism™ dye terminator cycle sequencing ready reaction kit (บริษัท Perkin-Elmer สหรัฐอเมริกา) นำดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ไปศึกษาการเรียงลำดับเบสโดยใช้เครื่อง ABI 373A Automatic DNA sequencer นำข้อมูลมาแปลรหัสเป็นโปรตีนโดย Website:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi วิเคราะห์ multiple alignment กับโปรตีนในพืชอื่นด้วยโปรแกรม ClustalW โดย Website: http://www.ebi.ac.uk/clustalW

2.การศึกษาการแสดงออกของยีน

2.1 เตรียมตัวอย่างดอกกล้วยไม้

เก็บดอกกล้วยไม้สายพันธุ์มิสโจคิมสีม่วง และสายพันธุ์เข็มขาวxแวนทุย นำมาปลิดเกสร ที่เวลา 0, 1, 2, 3 และ 24 ชั่วโมง เพื่อกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของเอทิลีน แล้วนำไปสกัดอาร์เอ็นเอ เช่นเดียวกับข้อ 1.2 โดยแยกส่วนของดอกกล้วยไม้ออกเป็น 3 ส่วน คือ กลีบดอก ปากดอก และเส้าเกสร

2.2 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากอาร์เอ็นเอ

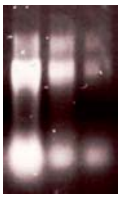
นำอาร์เอ็นเอรวมจากดอกบานของกล้วยไม้สกุลแวนด้าที่แยกด้วย Trizol reagent มาเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอสายแรกโดยใช้ Reverse Transcription Mix โดยเติมอาร์เอ็นเอ 3 ไมโครลิตร ไพรเมอร์สาย antisense 1 ไมโครลิตร ImPromII 5X reaction Buffer 4 ไมโครลิตร 25 mM $MgCl_2$ 2.4 ไมโครลิตร 10 mM dNTP 1 ไมโครลิตร RNasein Ribonuclease Inhibitor 1 ไมโครลิตร ImPromII Reverse Transcriptase 1 ไมโครลิตร Nuclease-Free Water 5.6 ไมโครลิตร และเพิ่มปริมาณยีนด้วยวิธี RT-PCR ดังได้กล่าวไว้ข้างต้น นำดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้มาแยกขนาดด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีสบน 0.8% อะกาโรสเจล

ผลการทดลอง

1.การโคลนยีน การศึกษาลำดับเบส และการวิเคราะห์ข้อมูล

1.1 วิธีการแยกอาร์เอ็นเอรวมจากดอกกล้วยไม้ด้วย Trizol reagent

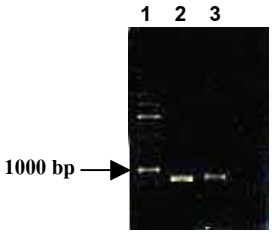
ผลแยกอาร์เอ็นเอจากดอกกล้วยไม้ทั้งสองสายพันธุ์จำนวน 0.2 กรัม โดยใช้ trizol reagent ได้ปริมาณอาร์เอ็นเอรวม จากดอกกล้วยไม้ในปริมาณมาก เพียงพอสำหรับการโคลนยีนต่อไป ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 การแยกอาร์เอ็นเอของดอกกล้วยไม้

1.2 การสังเคราะห์ยีน *ACO* และ *ETR* ด้วยวิธี RT-PCR

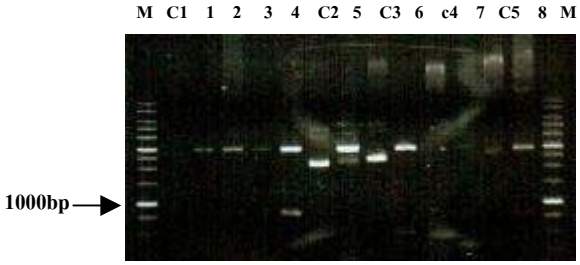
จากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของยีน *ACO* และ *ETR* จากเอ็มอาร์เอ็นเอที่แยกจากดอกกล้วยไม้สกุลแวนด้า พันธุ์มิสโจคิม ในระยะที่ดอกบานที่รวมทุกส่วนของดอก พบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้มีขนาดประมาณ 800 และ 900 คู่เบส ตามลำดับ (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ด้วยโดยวิธี RT-PCR จากกล้วยไม้สกุลแวนด้าพันธุ์มิสโจคิมสีม่วง **(1)** 1 Kb DNA ladder marker **(2)** ชิ้นดีเอ็นเอสังเคราะห์ของยีน *ACO* ซึ่งมีขนาด 800 คู่เบส **(3)** ชิ้นดีเอ็นเอสังเคราะห์ของยีน *ETR* ซึ่งมีขนาด 900 คู่เบส

1.3 การโคลนยีน *ACO* และการคัดเลือกโคลน

เมื่อนำโคโลนีสีขาวที่คัดเลือกได้มาสกัด พลาสมิดด้วยฟีนอลคลอโรฟอร์ม แล้วตรวจสอบขนาดของพลาสมิดด้วยวิธีอิเลคโทรโฟริซีส พบโคลนของยีน *ACO* ที่โคลนได้ 8 โคลน ได้แก่ โคลนที่ 3, 5, 14, 15, 23, 26, 31 และ 36 นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ คือ *Not*I และ *Nco*I พบว่าโคลนที่ 3, 5, 14, 15 และ 36 ถูกตัดได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 800 คู่เบส ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 รูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ คือ *Not*I และ *Nco*I บนโคลนที่คาดว่าเป็นยีน *ACC oxidase* **M**: marker pGem-3zf **1-8** : โคลนที่ 3, 4, 14, 15, 23, 26, 31 และ 36 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Not*I และ *Nco*I **C1-C5** : โคลนที่ไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์

1.4 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และโปรตีนของยีนที่โคลนได้

ยีน *ACO* ที่โคลนได้จากดอกกล้วยไม้แวนด้าพันธุ์มิสโจคิม มีขนาด 800 คู่เบส ดังนั้นโคลนที่ได้กำหนดการสร้างโปรตีนขนาด 266 เรซิดิว แต่การทดลองได้ทำการหาลำดับเบสเพียงครึ่งหนึ่งจากทั้งหมด ซึ่งได้โปรตีน 137 เรซิดิว ดังแสดงในภาพที่ 5

>Vanda ACO
EHYRRFREQRFKEFASKTLDSVEKVDSENLDWESTFFLRH
LPTSNISQIPDLDDDCRKTMKEFAVELEKLAERLLDLLCEDL
GLEKGYLKRVSCGGSDGCRRSGTKVSNYPRCPKPELIRGL
RAHTDAGGIILLFQD

ภาพที่ 5 การเรียงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน ACO ในกล้วยไม้แวนด้า พันธุ์มิสโจคิม

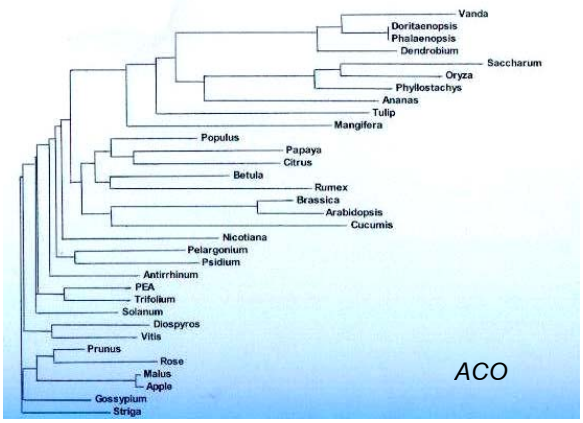
ยีน *ETR* ที่โคลนได้จากดอกกล้วยไม้แวนด้าพันธุ์มิสโจคิม มีขนาด 900 คู่เบส ดังนั้นโคลนที่ได้กำหนดการสร้างโปรตีนขนาด 300 เรซิดิว แต่การทดลองได้ทำการหาลำดับเบสเพียงครึ่งหนึ่งจากทั้งหมด ซึ่งได้โปรตีน 120 เรซิดิวดังแสดงในภาพที่ 6

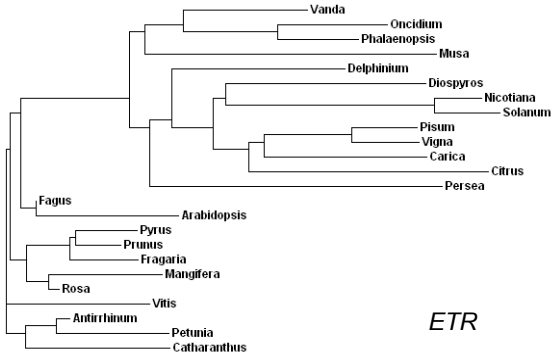
>Vanda ETR

TSMHQDTAIVMTVAKVLTAVVSCATAFMLVHIIPDLLSVKTR
ELFLRNKAEELDREMGLIRTQEETGRHVRMLTHEIRSTLDR
HTILKTTLVELGRTLDLAECALWIASRTGLISSFLIL

ภาพที่ 6 การเรียงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน ETRใน กล้วยไม้แวนด้า พันธุ์มิสโจคิม

การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน ACO จากดอกกล้วยไม้แวนด้า กับโปรตีนชนิดเดียวกันที่รายงานข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความสัมพันธ์กับกล้วยไม้สกุลโดริแทนอปซิส และฟาแลนนอปซิส ดังแสดงใน Phylogenetic tree โดยมีค่า % similarlity เท่ากัน คือเท่ากับ 90% ส่วนการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Ethylene receptor จากดอกกล้วยไม้แวนด้า กับโปรตีนชนิดเดียวกันในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความสัมพันธ์กับกล้วยไม้สกุลออนซิเดียม และฟาแลนนอปซิส ดังแสดงใน Phylogenetic tree โดยค่า % similarlity เท่ากับ 84% และ 83% ตามลำดับ



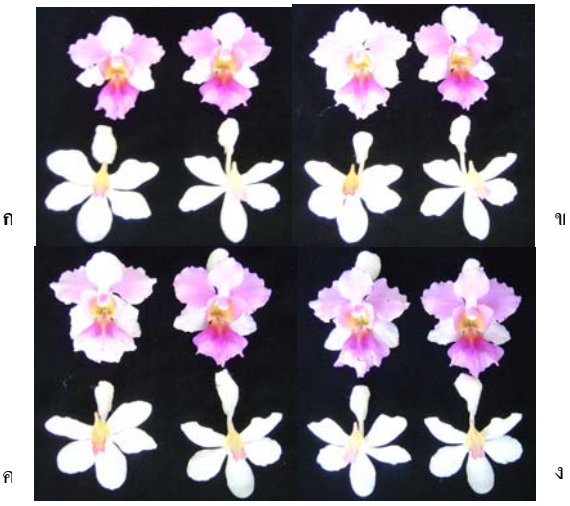


ภาพที่ 7 Phylogenetic tree แสดงระดับความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน ACC oxidase (บน) และโปรตีน Ethylene receptor (ล่าง) ในดอกกล้วยไม้สกุลแวนด้า กับโปรตีนชนิดเดียวกันในฐานข้อมูล GenBank

2. การศึกษาการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิค RT-PCR

2.1 เตรียมตัวอย่างดอกกล้วยไม้

เมื่อทำการปลิดเกสรดอกกล้วยไม้ที่เวลา 0, 1, 2, 3 และ 24 ชั่วโมง เพื่อกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของเอทิลีน ก่อนนำไปสกัดอาร์เอ็นเอ พบว่ากล้วยไม้แวนด้า พันธุ์มิสโจคิม เริ่มแสดงอาการสีดอกซีดหลังการปลิดเกสรเพียง 6 ชั่วโมง และเมื่อทิ้งไว้ข้ามคืน สีจะซีดขาวทั้งดอก การทดลองเปรียบเทียบกับกล้วยไม้แวนด้าพันธุ์เข็มขาวXแวนทุย ไม่พบการเปลี่ยนแปลง



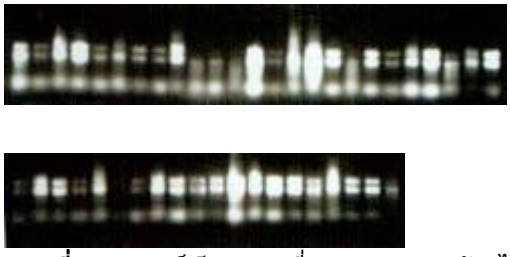
ภาพที่ 8 ดอกกล้วยไม้สกุลแวนด้า พันธุ์มิสโจคิม (สีม่วง) ปลิดเกสรเป็นเวลา **(ก)** 0 ชั่วโมง **(ข)** 1 ชั่งโมง **(ค)** 2 ชั่วโมง **(ง)** 3 ชั่วโมง (ซ้าย: ดอกที่ปลิดเกสร ขวา: ดอกควบคุม)

เมื่อปลิดเกสรดอกกล้วยไม้สกุลแวนด้าพันธุ์มิสโจคิมสีม่วง จะช่วยกระตุ้นให้ดอกกล้วยไม้สร้างเอทิลีนเพิ่มขึ้น ส่งผลให้สีดอกซีดลง ส่วนดอกกล้วยไม้สกุลแวนด้าพันธุ์เข็มขาวXแวนทุยใช้เป็นดอกควบคุม เนื่องจากไม่

ไวต่อเอทิลีน ซึ่งจะเห็นว่าดอกไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อปลิดเกสรออก

2.2 การแยกอาร์เอ็นเอรวมจากดอกกล้วยไม้ด้วย Trizol reagent

ในการแยกอาร์เอ็นเอรวมจากดอกกล้วยไม้นั้น ได้แบ่งดอกกล้วยไม้ออกเป็น 3 ส่วน คือ กลีบดอก ปากดอก และเส้าเกสร จากนั้นตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟริซิส ได้ผลดังภาพที่ 9



ภาพที่ 9 อาร์เอ็นเอรวมที่แยกจากดอกกล้วยไม้ส่วนกลีบดอก ปากดอก และเส้าเกสร ด้วย Trizol reagent

2.3 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี RT-PCR

เมื่อนำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้จากปากดอกกล้วยไม้สกุลแวนด้าพันธุ์มิสโจคิมสีม่วงที่ปลิดเกสรเป็นเวลา 0 ชั่วโมง เป็นต้นแบบในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน *ETR* และ *ACO* ด้วยวิธี RT-PCR สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอของยีน *ACO* และ *ETR* ได้ในรอบที่ 25 และ 30

ภาพที่ 10 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของยีน *ACO* และ *ETR* ด้วยวิธี RT-PCR ที่จำนวนรอบต่างๆ โดย **M**: 1 Kb DNA ladder marker **1-5:** ยีน *ACO* **และ 6-10:** ยีน *ETR* ซึ่งทำ RT-PCR รอบที่ 10, 15, 20, 25 และ 30 ตามลำดับ

สรุปและวิจารณ์

การโคลนยีน *ACC oxidase* (*ACO*) และ *Ethylene receptor* (*ETR*) ด้วยวิธี RT-PCR จากเอ็มอาร์เอ็นเอของดอกกล้วยไม้สกุลแวนด้า พันธุ์มิสโจคิม ดีเอ็นเอที่โคลนได้มีการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนใกล้เคียงกับรายงานของยีนชนิดเดียวกันในกล้วยไม้สายพันธุ์อื่น ดังนั้น ยีนที่โคลนได้สามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์กล้วยไม้เพื่อยืดอายุการปักแจกันต่อไป และจากการศึกษาการแสดงออกของยีนยพบว่า ส่วนของปากดอกกล้วยไม้สายพันธุ์นี้มีการแสดงออกของยีนทั้งสอง นอกจากนี้ ส่วนของกลีบดอก และเส้าเกสรยังพบการแสดงออกด้วยเช่นกัน

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานนี้ได้รับทุนอุดหนุนจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ฝ่ายอุตสาหกรรม โครงการโครงงานอุตสาหกรรมสำหรับปริญญาตรี ประจำปี 2546 และขอขอบคุณ คุณจิตติ รัตนเพียรชัย บริษัทออร์คิดแมกซ์ ผู้ร่วมโครงการ

เอกสารอ้างอิง

มณทินี ธีรารักษ์. การโคลนยีน 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) Synthase และ ACC Oxidase ที่กำหนดการสร้างเอทิลีนในกล้วยไม้ออนซิเดียม. วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท. 2544. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Lawton, K.A., B. Huang, P.B. Goldsbrough, and W.R. Woodson. 1989. Molecular cloning and characterization of senescence related gene carnation flower petals. Plant Phhysiol. 90 : 690-696.

Nadeau.J.A,. X.S. Zhang, H. Nair and S.D. O' Neill. 1993. Temporal and spatial regulation of 1-aminocyclopropane carboxylate oxidase in the pollination induced senescence of orchid flowers. Plant Physiol. 103 : 31-39.

Tang, X., H. Wang, A.S. Brandt and W.R. Woodson. 1993. Organization and structure of 1- aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family from *Petunia hybrida.* Plant Mol. Biol. 23 : 1151-1164.