



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

ปริญญา

พันธุศาสตร์

พันธุศาสตร์

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การโคลน การแสดงออก และการวิเคราะห์คุณลักษณะของยีน *AGAMOUS* ในสบู่ดำ

Cloning, Expression and Characterization of *AGAMOUS* Gene in *Jatropha curcas* L.

นามผู้วิจัย นางสาวปณิชาพร บริเวธานันท์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์สมพิศ สามิภักดิ์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิภา หงส์ตระกูล, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, Dr.Agr.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์สมศักดิ์ อภิสิทธิ์วานิช, Dr.Agr.Sci)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่

เดือน

พ.ศ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การโคลน การแสดงออก และการวิเคราะห์คุณลักษณะของยีน *AGAMOUS* ในสบู่ดำ

Cloning, Expression and Characterization of *AGAMOUS* Gene in *Jatropha curcas* L.

โดย

นางสาวบุณยาพร บริเวรานันท์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บุญยาพร บริเวรณันท์ 2555: การโคลน การแสดงออก และการวิเคราะห์คุณลักษณะของ ยีน *AGAMOUS* ในสบู่ดำ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์) สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพันธุศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์สมพิศ สามภักดิ์, Ph.D. 72 หน้า

ยีน *AGAMOUS* (*AG*) ควบคุมการสร้างอวัยวะดอกและถูกจัดอยู่ในกลุ่ม C ในโมเดลการสร้างดอก ABCE โดยมีหน้าที่ควบคุมการสร้างส่วนของเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมีย ในการศึกษาครั้งนี้ได้โคลนยีน *JcAG* ซึ่งเป็นยีน *AGAMOUS* homologue จากสบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) พบว่ามีขนาด 1,063 คู่เบส มีบริเวณที่สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 726 คู่เบส ซึ่งแปลเป็นสายโพลีเพปไทด์ได้ขนาด 241 กรดอะมิโน เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank โดยใช้โปรแกรม protein blast พบว่ามีความใกล้เคียงกับโปรตีน TcAG ซึ่งเป็นโปรตีน *AGAMOUS*-like ของโกโก้ (*Theobroma cacao* L.) ถึง 88% และแสดงบริเวณโดเมน 2 โดเมน คือ MADS superfamily และ K-box superfamily เมื่อยืนยันผลโดยการทำแผนภาพการจัดกลุ่มพบว่าโปรตีน *JcAG* จัดอยู่ในกลุ่มของโปรตีน *AGAMOUS* ของพืชใบเลี้ยงคู่ โดยแยกออกจากโปรตีน SHATTERPROOF (*SHP*) และโปรตีน SEEDSTICK (*STK*) ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่ม MADS box เช่นกันอย่างชัดเจน ผลของ Southern blot hybridization พบว่ายีน *JcAG* เป็นยีน single copy และจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *JcAG* ด้วยวิธี relative quantification real-time PCR พบว่ายีน *JcAG* มีการแสดงออกในดอกตูมขนาด 4-6 มิลลิเมตรสูงกว่าในดอกตูมขนาด 1-3 มิลลิเมตร ในอับละอองเรณูสูงกว่าในรังไข่ และพบว่าการแสดงออกเล็กน้อยในส่วนของอวัยวะเจริญ คือใบอ่อนและปลายยอด

ลายมือชื่อผู้ผลิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Poonyaporn Borivetanan 2012: Cloning, Expression and Characterization of *AGAMOUS* Gene in *Jatropha curcas* L. Master of Science (Genetics), Major Field: Genetics, Department of Genetics. Thesis Advisor: Ms. Sompid Samipak, Ph.D. 72 pages.

The *AGAMOUS* (*AG*) is a floral organ identity gene in C class of ABCE model which specifies stamen and carpel development. In this study, *JcAG* which is an *AGAMOUS* homologue gene of physic nut (*Jatropha curcas* L.) was cloned and reported a contig of nucleotide sequence which has 1,063 base pairs in length with 726 base pairs of open reading frame corresponding to 241 amino acid residues of predicted protein sequence. The amino acid sequence, *JcAG*, was compared with related sequences in GenBank protein database using protein blast. The result showed that the deduced *JcAG* sequence has 88% identity with *TcAG* (*AGAMOUS*-like protein of cocoa, *Theobroma cacao* L.) and shows the presence of MADS superfamily and K-box superfamily domains. Confirming by phylogenetic analysis, *JcAG* was situated in *AGAMOUS* dicotyledon subclade and was clearly separated from SHATTERPROOF (SHP) and SEEDSTICK (STK) subclades which are also MADS box family members. Southern blot hybridization indicated that the *JcAG* gene is a single copy gene in *J. curcas* genome. Relative quantification real-time PCR was used to detect the expressions of the gene in different organs of *J. curcas*. The data revealed that the expression level of *JcAG* in 4-6 millimeter flower bud was higher than in 1-3 millimeter flower bud, while the expression in anther was higher than in ovary. Low level of *JcAG* expression was also detected in vegetative tissues such as young leaf and shoot tip.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ดร. สมพิศ สามิภักดิ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก สำหรับการช่วยเหลือวางแผนงานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนให้
คำแนะนำและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. วิภา หงษ์ตระกูล
และ รศ.ดร. สุรินทร์ ปิยะ โขคณากุล กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ขอขอบพระคุณอาจารย์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้
จนสำเร็จ

ขอขอบคุณเพื่อน พี่ น้อง ในภาควิชาพันธุศาสตร์ ที่คอยให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจ
ในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้มาโดยตลอดโดยเฉพาะสมาชิกในห้องปฏิบัติการ 4615 ทุกคน

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงสำหรับคุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้ความรัก กำลังใจ
และให้การสนับสนุนด้านการศึกษาตลอดมา ขอขอบคุณทุกคนในครอบครัวที่ทำให้กำลังใจเสมอมา

บุญยาพร บริเวธนันท์
เมษายน 2555

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	15
อุปกรณ์	15
วิธีการ	15
ผลและวิจารณ์	28
สรุปและข้อเสนอแนะ	48
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	49
ภาคผนวก	56
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	72

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ผลการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของกรดอะมิโนของ โปรตีน <i>AGAMOUS</i> homologue ของสับูดากับพืชชนิดอื่นในฐานข้อมูล GenBank	40
2 ตารางแสดงชื่อโปรตีน <i>AGAMOUS</i> , <i>STK</i> และ <i>SHP</i> ของพืชชนิดอื่นในฐานข้อมูล GenBank ที่นำมาทำแผนภาพการจัดกลุ่มร่วมกับ โปรตีน <i>AGAMOUS</i> homologue ของสับูด้า	43
ตารางผนวกที่	
1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษา	71

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ผลการทำ multiple alignment ของลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>AGAMOUS</i> homologue ในพืช 4 ชนิด แสดงส่วนอนุรักษ์ที่ใช้ในการออกแบบ forward primer และ reverse primer	28
2	เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของอาร์เอ็นเอที่สกัดด้วย PureLink™ Plant RNA Reagent จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของสับจุ่ม	30
3	ผลจากการทำ PCR บริเวณอนุรักษ์ของยีน <i>AGAMOUS</i> homologue จาก cDNA ที่ได้จากสับจุ่ม โดยใช้ไพรเมอร์ JcAGF1 และ JcAGR1	31
4	ลำดับเบสในบริเวณอนุรักษ์ของยีน <i>AGAMOUS</i> homologue ที่ได้จากสับจุ่ม แสดงส่วนที่นำมาออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ (nJcAgF) สำหรับหาปลายด้าน 3' ของยีน	32
5	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน <i>AGAMOUS</i> ในพืช 10 ชนิด แสดงบริเวณ stop codon สำหรับออกแบบไพรเมอร์	32
6	ผลจากการทำ PCR บริเวณปลายด้าน 3' ของยีน <i>AGAMOUS</i> homologue จาก cDNA ที่ได้จากสับจุ่ม โดยใช้ไพรเมอร์ nJcAgF และ AG2degR	33
7	ผลจากการทำ PCR บริเวณปลายด้าน 3' ของยีน <i>AGAMOUS</i> homologue จาก cDNA ที่ได้จากสับจุ่ม โดยใช้ไพรเมอร์ nJcAgF และ Not12T	33
8	ลำดับเบสในบริเวณอนุรักษ์ของยีน <i>AGAMOUS</i> homologue ที่ได้จากสับจุ่มแสดงบริเวณที่นำมาออกแบบไพรเมอร์จำเพาะสำหรับหาปลายด้าน 5'	35
9	ผลที่ได้จากการทำ RACE PCR บริเวณปลายด้าน 5' ของยีน <i>AGAMOUS</i> homologue จาก cDNA ที่ได้จากสับจุ่ม โดยใช้ไพรเมอร์ nAgR5 และเสริมด้วยการทำ RACE PCR ด้วยไพรเมอร์ Not12T	36
10	ลำดับเบสของยีน <i>AGAMOUS</i> homologue ที่ได้จากสับจุ่มแสดงส่วนที่นำมาออกแบบไพรเมอร์แบบจำเพาะสำหรับหาส่วน open reading frame	38
11	ผลที่ได้จากการทำ PCR บริเวณ open reading frame ของยีน <i>AGAMOUS</i> homologue จาก cDNA ที่ได้จากสับจุ่มโดยใช้ไพรเมอร์ start และ stop	38
12	ลำดับเบสของยีน <i>AGAMOUS</i> homologue ที่ได้จาก cDNA สับจุ่ม	39
13	ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของยีน <i>AGAMOUS</i> homologue ที่ได้จาก cDNA สับจุ่ม	41

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	บริเวณ โดเมนของ MADS superfamily และ K-box superfamily บนสายโพลีเปปไทด์ ที่ได้จากการแปลรหัสของยีน <i>AGAMOUS</i> homologue ของต้นสนุ่นดำ	42
15	แผนภาพการจัดกลุ่มของโปรตีน <i>AGAMOUS</i> และ <i>AGAMOUS</i> -like (โปรตีน SHP และ STK) ในพืชชนิดต่างๆ	44
16	ผลการตรวจสอบจำนวนซ้ำของยีน <i>AGAMOUS</i> homologue ในสนุ่นดำโดยวิธี Southern blot hybridization	45
17	ระดับการแสดงออกของยีน <i>AGAMOUS</i> homologue ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของสนุ่นดำ เมื่อวิเคราะห์ด้วย relative quantification real-time PCR	46
ภาพผนวกที่		
1	แผนที่พลาสมิด pGEM-T [®] Easy vector	57
2	ลำดับเบสในบริเวณอนุรักษ์ของยีน <i>AGAMOUS</i> homologue ที่ได้จากสนุ่นดำ โดยใช้ ไพรเมอร์ JcAGF1 และ JcAGR1	58
3	การเปรียบเทียบลำดับเบสระหว่างบริเวณอนุรักษ์ของยีน <i>AGAMOUS</i> homologue ของสนุ่นดำกับยีน <i>AGAMOUS</i> ของต้นโกโก้ (<i>T. cacao</i> L.)	58
4	ลำดับเบสในบริเวณปลายด้าน 3' ของยีน <i>AGAMOUS</i> homologue ที่ได้จากสนุ่นดำ	59
5	ลำดับเบสจากบริเวณอนุรักษ์จนถึงปลายด้าน 3' ของยีน <i>AGAMOUS</i> homologue ที่ได้ จากสนุ่นดำ	60
6	ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากยีน <i>AGAMOUS</i> homologue ของสนุ่นดำ กับข้อมูลโปรตีนในฐานข้อมูลของ NCBI	61
7	ลำดับเบสจากบริเวณอนุรักษ์จนถึงปลายด้าน 5' ของยีน <i>AGAMOUS</i> homologue ที่ได้ จากสนุ่นดำ	62
8	ลำดับเบสจากปลายด้าน 5' จนถึงปลายด้าน 3' ของยีน <i>AGAMOUS</i> homologue ที่ได้ จากสนุ่นดำ	63
9	ผลการทำ real-time PCR ของยีน <i>AG</i> ในสนุ่นดำ	64

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

bp	=	base pair
CaCl ₂	=	calcium chloride
cDNA	=	complementary DNA
C _T	=	threshold cycle
CTAB	=	cetyltrimethylammonium bromide
DEPC	=	diethyl pyrocarbonate
DMSO	=	dimethyl sulfoxide
DNA	=	deoxyribonucleic acid
DNase	=	deoxyribonuclease
dNTP	=	deoxynucleotide triphosphate
<i>E. coli</i>	=	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	=	ethylene diamine tetraacetic acid
EtBr	=	ethidium bromide
EtOH	=	ethanol
HCl	=	hydrochloric
IPTG	=	isopropyl-β-D-thiogalactoside
kb	=	kilobasepair (1,000 base pair)
KCl	=	potassium chloride
LB agar	=	Luria-Bertani agar
LB broth	=	Luria-Bertani broth
M	=	molar
mg	=	milligram
MgCl ₂	=	magnesium chloride
mM	=	millimolar
mRNA	=	messenger ribonucleic acid
NaCl	=	sodium chloride
NaOAc	=	sodium acetate
ng	=	nanogram
nt	=	nucleotide

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

PCR	=	polymerase chain reaction
PEG	=	polyethylene glycol
RACE	=	Rapid Amplification of cDNA End
RNA	=	ribonucleic acid
RNase	=	ribonuclease
SDS	=	sodium dodecyl sulphate
<i>Taq</i>	=	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	=	Tris-Borate-EDTA
TE	=	Tris-EDTA buffer
T_m	=	melting temperature
Tris	=	2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
UV	=	ultraviolet
v/v	=	volume by volume
w/v	=	weight by volume
X-gal	=	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- beta-D-galactopyranoside
μg	=	microgram
μl	=	microliter
μM	=	micromolar

การโคลน การแสดงออก และการวิเคราะห์คุณลักษณะของยีน *AGAMOUS* ในสบู่ดำ

Cloning, Expression and Characterization of *AGAMOUS* Gene

in *Jatropha curcas* L.

คำนำ

เนื่องจากน้ำมันซึ่งเป็นแหล่งพลังงานหลักในปัจจุบันนั้นมีจำนวนจำกัดและมีราคาแพงขึ้น โดยเมื่อเปรียบเทียบกับปี 2539 พบว่ามีราคาสูงกว่าเดิมถึง 4 เท่า โดยมีการปรับราคาสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัดตั้งแต่ช่วงกลางปี 2548 และยังคงปรับตัวสูงขึ้นเรื่อยๆ จนถึงปัจจุบัน และนอกจากพลังงานที่ถูกปลดปล่อยออกมาแล้ว สารเคมีที่เป็นผล จากการเผาไหม้ของน้ำมันดีเซลยังมีผลเสียต่อสภาวะแวดล้อมและเป็นผลร้ายต่อสุขภาพของสิ่งมีชีวิตต่างๆ การจัดหาพลังงานชีวภาพขึ้นมาทดแทนพลังงานจากฟอสซิลนั้นเป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างเร่งด่วน เพราะนอกจากจะช่วยลดมลภาวะของโลกแล้ว การใช้พลังงานจากแหล่งทดแทนยังเป็นการช่วยชะลอการใช้ทรัพยากรธรรมชาติที่กำลังจะหมดไปจากโลกให้คงเหลืออยู่เป็นพลังงานที่ยั่งยืน อีกทั้งในประเทศที่ไม่สามารถขุดน้ำมันขึ้นมาใช้ได้เองอย่างประเทศไทย การใช้พลังงานชีวภาพจะช่วยลดการสูญเสียเงินตราในการนำเข้าน้ำมันเชื้อเพลิงซึ่งมีมูลค่าหลายแสนล้านบาท โดยน้ำมันไบโอดีเซลจะช่วยตอบสนองความต้องการสำหรับประเทศไทย ซึ่งมีความต้องการใช้น้ำมันดีเซลสูงสุดในบรรดาผลิตภัณฑ์น้ำมันชนิดต่างๆ ลดการสูญเสียเงินตราต่างประเทศในการนำเข้าน้ำมัน เพิ่มรายได้ให้แก่เกษตรกร ลดการปล่อยก๊าซที่ก่อให้เกิดภาวะเรือนกระจก (greenhouse effect) โดยเฉพาะก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อแก้ปัญหาโลกร้อน และปล่อยไอเสียที่มีมลพิษต่ำกว่าการใช้น้ำมันดีเซล (ไม่มีกำมะถันและสารก่อมะเร็งเป็นองค์ประกอบ)

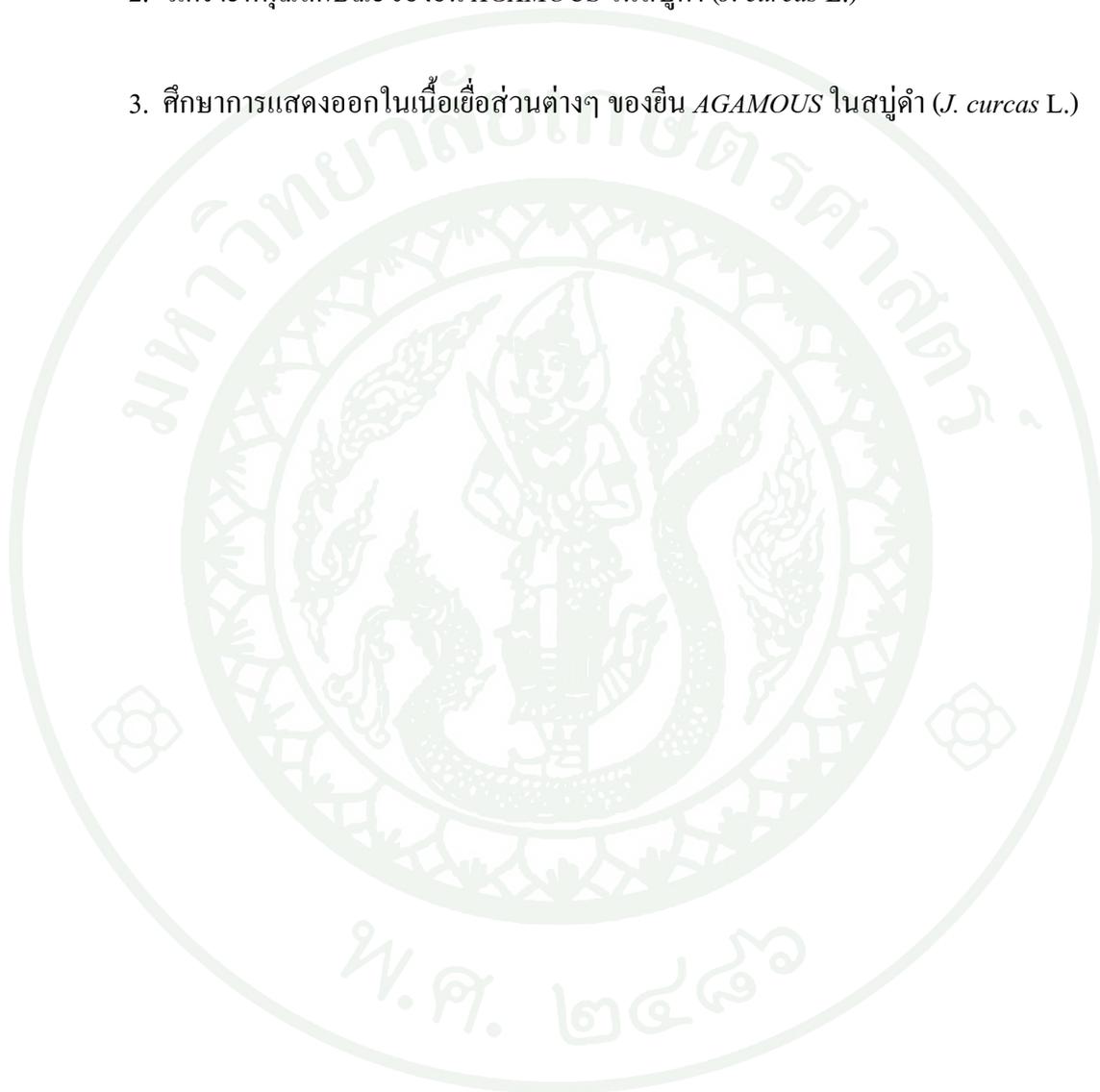
การพัฒนาไบโอดีเซลเพื่อใช้ทดแทนน้ำมันธรรมชาติเริ่มมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2513 มีจุดเริ่มต้นมาจากประเทศในแถบยุโรป โดยผลิตเป็นเชื้อเพลิงเหลวที่ได้จาก น้ำมันพืชและไขมันสัตว์ เช่น ปาล์ม มะพร้าว ถั่วเหลือง ทานตะวัน เมล็ดเรพ (rape seed) สบู่ดำ หรือ น้ำมันพืช น้ำมันสัตว์ที่ใช้แล้ว ซึ่งพืชน้ำมันเหล่านี้เป็นแหล่งทรัพยากรที่สามารถผลิตทดแทนได้ในธรรมชาติ โดยพบว่ามีความเป็นไปได้สูงที่ประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้จะเป็นฐานในการพัฒนาไบโอดีเซลจากผลปาล์ม และสบู่ดำขึ้นมาใช้ทดแทนปิโตรดีเซล โดยจะได้รับการจัดการโดยรัฐบาลของประเทศนั้นๆ แต่จะต้องมีการแก้ไขปัญหาเรื่องราคาที่สูงของผลิตภัณฑ์เมื่อเปรียบเทียบกับราคาน้ำมัน

ธรรมชาติ อาจจัดการให้มีผลผลิตที่สูงขึ้นหรือลดค่าใช้จ่ายในกระบวนการผลิต (Jayed *et al.*, 2009) ซึ่งสำหรับประเทศไทยนั้น พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวฯ ทรงมีพระราชดำริให้มีการสร้างโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม และทำการวิจัยและพัฒนาเพื่อนำมาใช้กับเครื่องยนต์ดีเซลในปี พ.ศ. 2528 ต่อมาทางรัฐบาลได้มีมติเห็นชอบยุทธศาสตร์การพัฒนาและส่งเสริมการใช้ไบโอดีเซล โดยเริ่มจากปาล์มและน้ำมันพืชใช้แล้วตั้งแต่ พ.ศ. 2548 และมีการส่งเสริมการปลูกและพัฒนาพืชน้ำมันชนิดอื่นๆ ต่อมาจนถึงปัจจุบัน

สบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) เป็นไม้พุ่มขนาดกลางอยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae มีความทนทานต่อสภาพแห้งแล้งและน้ำท่วม เจริญเติบโตง่าย ให้ผลผลิตเร็ว และมีอายุการเก็บเกี่ยวยาวนาน มีศักยภาพเป็นแหล่งทดแทนพลังงานจากฟอสซิลได้ เพราะน้ำมันที่ได้จากการบีบจากเมล็ดสามารถนำไปใช้แทนน้ำมันดีเซลในเครื่องยนต์ที่มีความเร็วรอบต่ำได้โดยตรง ในขณะนี้ทางภาครัฐได้มีการส่งเสริมการปลูกสบู่ดำเป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซลในระดับชุมชนเพื่อเศรษฐกิจพอเพียง หากแต่ยังไม่เป็นการแพร่หลายนัก ทั้งนี้เนื่องจากผลผลิตต่อไร่ที่ค่อนข้างต่ำทำให้ต้นทุนในการผลิตสูงและคู่ไม่คุ้มการลงทุนเมื่อเทียบกับผลผลิตของพืชน้ำมันชนิดอื่น วิธีการลดต้นทุนวิธีหนึ่งก็คือการเพิ่มผลผลิตต่อต้นต่อไร่ให้สูงขึ้น เนื่องจากสบู่ดำมีทั้งดอกเพศผู้และเพศเมียในช่อดอกเดียวกัน โดยดอกเพศผู้จะมีจำนวนมากกว่าดอกเพศเมีย หากสามารถลดจำนวนดอกเพศผู้และเพิ่มดอกเพศเมียในสบู่ดำได้จะทำให้ได้ผลผลิตต่อไร่มากขึ้น ในปัจจุบันนี้ยังไม่มีการศึกษาในระดับยีนที่ควบคุม กลไกการสร้างดอกในสบู่ดำ การตรวจหา ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างดอก เป็นพื้นฐานความรู้ที่สำคัญต่อการพัฒนาสบู่ดำพันธุ์ผลผลิตต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. โคลนและหาลำดับเบสของยีน *AGAMOUS* ในสนุ่นดำ (*Jatropha curcas* L.)
2. วิเคราะห์คุณลักษณะของยีน *AGAMOUS* ในสนุ่นดำ (*J. curcas* L.)
3. ศึกษาการแสดงออกในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของยีน *AGAMOUS* ในสนุ่นดำ (*J. curcas* L.)



การตรวจเอกสาร

1. สบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.)

สบู่ดำ เป็นพืชในวงศ์ Euphorbiaceae ชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Jatropha curcas* L. ชื่อสามัญคือ physic nut และมีชื่อพื้นเมืองได้แก่ สบู่ดำ สบู่ขาว โห่งเทก หมักเขา มะเยา มะโห่ง มะโห่งฮั่ว มะหุ่งฮั่ว มะฮั่ว สบู่หัวเทศ สลอคดำ สลอคป่า สลอคใหญ่ สีหลอด

สบู่ดำเป็นไม้พุ่มยืนต้นขนาดกลาง สูง 2-6 เมตร ลำต้นส่วนที่อายุน้อยมีสีเขียว ผิวเรียบ อวบน้ำ เป็นไม้เนื้ออ่อน เมื่ออายุมากมีสีน้ำตาลอมเทา น้ำยางใสไม่มีสี ใบเดี่ยวเรียงสลับ รูปหัวใจ ถึงรูปโล่ ก้านใบยาว 5-24 เซนติเมตร แผ่นใบขนาด 7-18 x 7-16 เซนติเมตร ขอบใบเรียบ มีรอยหยักเว้า 3-5 พู พูข้างปลายมน พูกลางปลายเรียวแหลม เส้นใบเบบร่างแห มักทิ้งใบในช่วงฤดูร้อน หรือช่วงแห้งแล้ง ช่อดอกแบบ compound dichasia เกิดตรงซอกใบใกล้ปลายกิ่ง ดอกย่อย 70-120 ดอกต่อ 1 ช่อดอก ดอกย่อยแยกเพศแต่อยู่ร่วมช่อดอกเดียวกัน ใบประดับรูปหอก ขอบเรียบ ปลายแหลม กลีบเลี้ยง 5 กลีบ สีเขียวอ่อนอมเหลือง กลีบดอก 5 กลีบ สีเหลืองอ่อนอมขาว มีต่อมน้ำหวานติดอยู่ที่โคนด้านในของกลีบ ดอกเพศผู้มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 6-8 มิลลิเมตร กลีบเลี้ยงเชื่อมติดกัน ปลายแยกเป็นแฉก ด้านในมีขน กลีบดอกเชื่อมติดกันเล็กน้อยที่บริเวณฐาน เกสรเพศผู้มี 10 อัน แบ่งออกเป็นวงชั้นนอก 5 อันเชื่อมติดกันเล็กน้อยเฉพาะบริเวณฐาน และวงชั้นใน 5 อันเชื่อมติดกัน อับเรณูสีเหลือง ดอกเพศเมีย กลีบดอกแยกจากกันหรือเชื่อมติดกันเล็กน้อยที่บริเวณฐาน มีเกสรเพศผู้ที่เป็นหมัน 10 อัน รังไข่มี 3 พู ยอดเกสรเพศเมียแยกเป็น 2 แฉก อัตราส่วนดอกเพศผู้ต่อดอกเพศเมียประมาณ 7:1 ผลค่อนข้างป้อมหรือรูปกระสวย เปลือกแข็ง มี 3 พู ขนาด 2-3 x 2.5-3.5 เซนติเมตร ผลอ่อนสีเขียว เมื่อสุกเปลี่ยนเป็นสีเหลือง ผลแก่แห้งค้ำตันจะเปลี่ยนเป็นสีดำ เมล็ดแบน รูปไข่หรือรูปกระสวยแกมขอบขนาน ขนาด 1 x 1.7 เซนติเมตร เปลือกหุ้มสีดำ มีเยื่อ albumin นูอยู่ภายในเป็นที่เก็บสะสมน้ำมันและสาร curcin เนื้อในสีขาว มี 2-3 เมล็ดต่อผล (วัลชลีย์, 2527; มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และสมาคมนิสิตเก่ามหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ในพระบรมราชูปถัมภ์, 2549; Chantharaprasong and Welzen, 2008)

จากการศึกษาจำนวน โครโมโซมของต้นสบู่ดำพบว่า มีโครโมโซม $2n = 2x = 22$ เป็นโครโมโซมขนาดเล็กชนิด metacentric และ submetacentric และจากการศึกษาจากประชากร 5 กลุ่ม พบว่าไม่มีความแตกต่างของจำนวนชุดหรือจำนวนโครโมโซมในประชากรแต่ละกลุ่ม ซึ่งอาจเป็นอุปสรรคต่อการสร้างลูกผสมเพื่อปรับปรุงพันธุ์ (Dahmer *et al.*, 2009)

จากรายงาน โดยมหาวิทยาลัยแม่โจ้ และสมาคมนิสิตเก่ามหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ในพระบรมราชูปถัมภ์ (2549) รายงานว่าสบู่ดำเป็นพืชที่ทนต่อความแห้งแล้งได้ดี สามารถเติบโตได้ในดินที่ไม่เหมาะสมต่อการปลูกพืช เช่น ดินด่าง (alkaline soil) ดินเค็ม (saline soil) ดินทราย (sandy soil) หรือดินที่มีหินมาก (stony soil) และพบว่ามีการนำไปปลูกในที่ต่างๆ ทั่วโลก แต่มีการปรับตัวได้ดีในเขตร้อน และเมื่อวิเคราะห์คุณสมบัติน้ำมันสบู่ดำเทียบกับน้ำมันดีเซล พบว่ามีค่าคุณสมบัติต่างๆ ใกล้เคียงกับน้ำมันดีเซลมาก เมื่อนำมาทดสอบใช้ในเครื่องยนต์ดีเซลพบว่า ความสิ้นเปลืองเชื้อเพลิงจำเพาะเบรค แรงบิด กำลังเบรค ความดันเฉลี่ยเบรค และประสิทธิภาพเชิงความร้อนในการเบรคมีผลการทดสอบใกล้เคียงและมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันกับน้ำมันดีเซล ถึงแม้ว่าน้ำมันสบู่ดำจะมีความหนืดสูงกว่า แต่มีการปล่อยก๊าซไฮโดรคาร์บอนและปริมาณควันค่าน้อยกว่า (กองเกษตรเคมี และกองเกษตรวิศวกรรม กรมวิชาการเกษตร, 2525)

การศึกษาของ ชาญรัตน์ (2550) เพื่อประกอบการกำหนดราคาของเมล็ดและน้ำมันสบู่ดำเพื่อสะท้อนถึงต้นทุนและผลผลิต พบว่าราคาของเมล็ดสบู่ดำในกรณีที่มีค่าเสียโอกาสของแรงงานมีค่าสูงถึง 16.58 บาท/กิโลกรัม ซึ่งมีค่าสูงกว่าราคาขายที่รัฐบาลกำหนดไว้ในปี พ.ศ. 2548 ที่ราคา 4 บาท/กิโลกรัม ถึง 4 เท่า แต่ในกรณีที่ไม่มีค่าเสียโอกาสของแรงงานจะมีราคาเพียง 1.38 บาท/กิโลกรัม เท่านั้น ทางด้านราคาของน้ำมันสบู่ดำก็เช่นเดียวกัน ในกรณีที่มีค่าเสียโอกาสของแรงงานมีราคาสูงถึง 106.55 บาท/ลิตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับราคาน้ำมันดีเซลในปัจจุบันที่ประมาณ 25 บาท/ลิตร พบว่าราคาน้ำมันสบู่ดำมีค่าสูงกว่าราคาน้ำมันดีเซลถึง 4 เท่า ซึ่งผลที่ได้มีความสอดคล้องกันกับการศึกษาในประเทศอินเดียและซิมบับเว ซึ่งพบว่าราคาน้ำมันสบู่ดำสูงกว่าน้ำมันดีเซล 3 เท่า แต่ทั้งนี้ในกรณีที่ไม่มีค่าเสียโอกาสของแรงงาน น้ำมันสบู่ดำจะมีราคาเพียง 8.28 บาท/ลิตร เท่านั้น ซึ่งจะพบว่าสิ่งที่ทำให้ราคาของน้ำมันสบู่ดำสูงเป็นผลมาจากค่าเสียโอกาสของแรงงาน ซึ่งสามารถลดค่าใช้จ่ายส่วนนี้ลงได้ด้วยการพัฒนาพันธุ์สบู่ดำให้มีผลผลิตที่สูงขึ้น และให้ผลผลิตเป็นฤดูกาลเพื่อเพิ่มรายได้และลดค่าแรงงานในการเก็บเกี่ยวผลผลิต

จากการศึกษาของ วัลชลิย์ (2527) พบว่า ดอกจะใช้เวลาดังแต่เริ่มมองเห็นด้วยตาเปล่าจนกระทั่งดอกบานเป็นเวลา 17 วัน โดยการเจริญของดอกจะเป็นไปอย่างรวดเร็วในช่วง 6 วันแรก และจะมีอัตราการเจริญลดลงในช่วงหลัง เกสรดอกเพศผู้จะแตกและปล่อยละอองเกสรในช่วง 8.00-10.00 น. แต่ยอดเกสรเพศเมียจะพร้อมรับละอองเกสรในช่วง 9.00-10.00 น. ซึ่งสังเกตได้จากการที่มีน้ำหวานเคลือบบริเวณยอดเกสรเพศเมีย และจากการศึกษาเกี่ยวกับการผสมเกสรของสบู่ดำในประเทศจีน พบว่าละอองเรณูจะมีประสิทธิภาพสูงสุดในช่วง 9 ชั่วโมงแรกหลังดอกบาน ส่วนยอดเกสรเพศเมียจะมีประสิทธิภาพในการผสมสูงในช่วง 1 ถึง 4 วันแรกหลังดอกบาน โดยดอกเพศ

เมียบส่วนมากในแต่ละช่อดอกจะบานในวันที่ 3 ถึงวันที่ 5 หลังจากดอกแรกในช่อบาน ซึ่งการบานในช่วงเวลาที่ต่างกันนี้จะเป็นการส่งเสริมการผสมข้ามและลดการผสมในต้นเดียวกัน (Li *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2007) และพบว่าในแต่ละช่อดอกจะติดผลเพียง 7-15 ผล แม้ว่าจะมีดอกย่อยในแต่ละช่อดอกมากถึง 70-120 ดอก ซึ่งสาเหตุหลักเกิดจากการที่จำนวนของดอกเพศเมียน้อยกว่าจำนวนดอกเพศผู้มาก โดยในแต่ละช่อดอกมีอัตราส่วนเพียง 1:7 เท่านั้น ซึ่งทำให้ในแต่ละช่อดอกมีดอกเพศเมียเพียง 10-15 ดอกเท่านั้นซึ่งตรงกับที่มีรายงานของมหาวิทยาลัยแม่โจ้ และสมาคมนิสิตเก่ามหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ในพระบรมราชูปถัมภ์ (2549) จึงทำให้ความสามารถในการติดผลของแต่ละช่อดอกต่ำลงด้วย นอกจากนี้ยังเป็นผลจากการที่ดอกของสบู่ดำเป็นดอกแยกเพศและพร้อมสืบพันธุ์ต่างเวลากัน โดยช่วงเวลากการปล่อยละอองเกสรช่วง 8.00-10.00 น. เกิดก่อนช่วงเวลาที่ยอดเกสรเพศเมียพร้อมรับละอองเกสร 9.00-10.00 น.

จากการที่สบู่ดำเป็นพืชที่มีผลผลิตต่ำจึงได้มีความพยายามในการปรับปรุงพันธุ์มาอย่างต่อเนื่อง และงานวิจัยพันธุ์ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์พบว่าพันธุ์ KUBP-16 ให้ผลผลิตสูงเนื่องจากมีจำนวนช่อดอกมาก ส่งผลให้จำนวนผลต่อต้นมากถึง 818 ผล (แอนนา และคณะ, 2549) จึงได้เลือกมาใช้ในการศึกษาในครั้งนี้

2. ปัจจัยที่ส่งผลต่อการสร้างดอก

ปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลต่อการสร้างดอกและช่วงเวลาในการสร้างดอกของพืชนั้นมีหลากหลาย โดยปัจจัยเหล่านั้นจะทำงานร่วมกันในการส่งเสริมหรือยับยั้งการสร้างดอกของพืช (Rachid, 2009) ปัจจัยดังกล่าวเหล่านั้น ได้แก่

1. phytochrome ซึ่งเป็นตัวรับแสงในพืช ได้แก่ PHY A และ PHY B ซึ่งจะส่งผลต่อช่วงเวลาที่จะสร้างดอก โดยจะตอบสนองต่อช่วงแสงที่พืชได้รับ

2. ช่วงแสงที่พืชได้รับ (daily light, dark cycles หรือ circadian rhythm) ซึ่งจะเปลี่ยนไปตามฤดูกาลและสภาพแวดล้อม โดยช่วงแสงที่ส่งผลให้เกิดการสร้างดอกนั้นจะแตกต่างกันไปตามชนิดของพืช ซึ่งสามารถแบ่งกว้างๆ ได้เป็นพืชวันสั้น (short day plant) และพืชวันยาว (long day plant)

3. ฮอว์โมนพืช เช่น จิบเบอเรลลิน (gibberellin) และเอทิลีน (ethylene) ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้พืชสร้างดอก โดยจะมีผลแตกต่างกันไปในพืชแต่ละชนิด

4. สิ่งกระตุ้นอื่นๆ ได้แก่จำนวนใบหรือการตัดแต่งกิ่ง

5. การใช้อุณหภูมิต่ำ (vernalization) ซึ่งอุณหภูมิและช่วงเวลาที่ส่งผลให้พืชเกิดการสร้างดอกจะแตกต่างกันออกไปตามชนิดพืช

6. การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องต่อการสร้างดอก ซึ่งจะเป็นตัวควบคุมการเปลี่ยนการเจริญเติบโต (vegetative growth) ไปเป็นการสืบพันธุ์ (reproductive growth)

3. ยีนที่ส่งผลต่อการสร้างดอก

โครงสร้างของดอกสมบูรณ์ (complete flower) มีวงของดอกครบทั้งสี่วง คือ กลีบเลี้ยง กลีบดอก เกสรเพศผู้และเกสรเพศเมีย โดยยีนต่างๆ ที่ควบคุมการสร้างดอกมีการศึกษาอย่างละเอียดใน *Arabidopsis thaliana* L. ซึ่งยีนเหล่านี้แบ่งอย่างคร่าว ๆ เป็นสี่กลุ่ม

1. กลุ่มที่เปลี่ยนการเจริญเติบโตไปเป็นการสืบพันธุ์เพื่อผลิตดอกแทนยอด (genes that switch vegetative growth to reproductive growth)

2. ยีนที่เกี่ยวข้องกับเวลาการสร้างดอก ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้ยีนที่ควบคุมการเกิดดอกทำงาน (genes in flowering time pathway that activate meristem identity genes)

3. ยีนควบคุมการเกิดดอก กระตุ้นให้ยีนควบคุมแต่ละส่วนของดอกทำงาน (meristem identity genes that activate the floral organ identity genes)

4. ยีนควบคุมการสร้างดอกทั้งสี่ส่วน กระตุ้นให้เกิดการสร้างดอกในแต่ละส่วน (floral organ identity genes that activate organs building genes)

กลุ่มยีนที่สนใจศึกษาได้แก่ กลุ่มควบคุมการสร้างดอก (meristem identity gene) และควบคุมการสร้างส่วนต่างๆ ของดอก (floral organ identity genes) โดยในอดีตที่ผ่านมาได้มีการ

อธิบาย การสร้างดอกด้วยโมเดล ABC (Bowman *et al.*, 1991a) โดยที่ยีนในกลุ่ม A ควบคุมการสร้างกลีบเลี้ยง ส่วนยีนในกลุ่ม A และยีนในกลุ่ม B ร่วมกันควบคุมการสร้างกลีบดอก ยีนในกลุ่ม B และยีนในกลุ่ม C ร่วมกันควบคุมการสร้างเกสรเพศผู้ และยีนในกลุ่ม C ควบคุมการสร้างเกสรเพศเมีย โดยพบว่ายีน *APETALA1 (AP1)* และยีน *AP2* เป็นยีนที่อยู่ในกลุ่ม A ส่วนยีน *AP3* และยีน *PISTILLATA (PI)* อยู่ในกลุ่ม B และยีน *AGAMOUS (AG)* เป็นยีนที่อยู่ในกลุ่ม C นอกเหนือจากนี้ในการสร้างดอกที่สมบูรณ์จำเป็นต้องมียีนอีกกลุ่มหนึ่งคือ กลุ่ม E ซึ่งประกอบไปด้วยยีน *SEPALLATA 1 (SEP1)* *SEP2* และ *SEP3* ควบคุมกลุ่ม A B และ C อีกชั้นหนึ่ง ซึ่งจากการทดลองลดการแสดงออกของยีนนี้ทำให้ทราบว่ายีน *SEP* มีหน้าที่ช่วยกำหนดการสร้าง กลีบดอก เกสรเพศผู้ และเกสรเพศเมียด้วย ดังนั้นการสร้างดอกในปัจจุบันจึงถูกอธิบายโดยใช้ ABCE โมเดล (Pelaz *et al.*, 2000; Goto *et al.*, 2001; Theissen, 2001; Theissen and Saedler, 2001; Jack, 2002)

ในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของดอกสามารถทำได้เมื่อทราบว่ายีนใดมีส่วนเกี่ยวข้องกับ การสร้างดอก เช่น การลดปริมาณโปรตีน โดย gene silencing หรือเพิ่มปริมาณโปรตีนโดย overexpression ตัวอย่างเช่นการทดลองใน *A. thaliana* L. โดยมีการเพิ่มปริมาณโปรตีนของยีน *AP3* และยีน *PI* พบว่าทำให้ได้ดอกที่มีกลีบดอกสองชุดและเกสรเพศผู้สองชุด (Krizek and Meyerowitz, 1996) ในขณะที่การลดปริมาณโปรตีนของยีน *AG* กลับทำให้มีการสร้างกลีบดอก แทนที่เกสรเพศผู้และมีการสร้างกลีบเลี้ยงแทนที่เกสรเพศเมีย (Bowman *et al.*, 1991a) รวมทั้งยังพบว่ามีความเป็นไปได้ที่บางยีนในกลุ่มยีนที่ควบคุมการสร้างดอกจะทำหน้าที่ควบคุมหรือยับยั้งยีน อื่นๆซึ่งควบคุมการสร้างดอกเช่นกัน (Sung *et al.*, 2003) ซึ่งการทดลองในลักษณะนี้กับยีนแต่ละ ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างดอกทำให้ทราบว่ายีนต่างๆ ในโมเดล ABCE นั้นครอบคลุม และเพียงพอที่จะก่อให้เกิดดอกในต้นไม้ได้ (Jack, 2004)

4. ยีนที่ส่งผลต่อการสร้างเกสรเพศเมีย

จากการศึกษายีน *AG* ใน *A. thaliana* L. พบว่าจะถอดรหัสเป็นโปรตีนซึ่งถูกจัดอยู่ในกลุ่ม MADS-box transcription factor เช่นเดียวกับโปรตีนที่ได้จากยีน *AP1*, *AP3* และ *PI* ซึ่งทำหน้าที่ในการควบคุมการพัฒนาส่วนของเกสรเพศผู้และรังไข่ โดยเมื่อยีน *AG* ถูกยับยั้งการแสดงออกจะทำให้พืชมีการสร้างกลีบเลี้ยงและกลีบดอกขึ้นแทนที่เกสรเพศผู้และรังไข่ (Jack, 2002) และเมื่อถูกยับยั้งการแสดงออกร่วมกับยีนอื่นๆ เช่น ยีน *AP1*, *AP2* และ *AP3* จะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของส่วนเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมียไปเป็นใบ กลีบเลี้ยง และกลีบดอก โดยการแสดงออกของยีน *AG* นั้นจะเกิดขึ้นก่อน โดยเริ่มในระยะที่ดอกเริ่มมีการสร้างส่วนของเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมีย

ในขณะที่ยีน *AP1* และ *AP3* จะไม่พบการแสดงออกในระยะดังกล่าว และยีน *PI* จะไม่มีการแสดงออกในระยะการสร้างเกสรเพศเมีย (Skryabin *et al.*, 2004)

จากการศึกษาต่อมาพบว่าการทำงานของยีน *AG* มีความเกี่ยวข้องกับยีนอื่นๆ อีกหลายยีน เช่น ยีน *LEAFY (LFY)* ยีน *WUSHEL (WUS)* ยีน *BELL1 (BEL1)* ยีน *AP2* ยีน *LEUNIG (LUG)* และยีน *BELLRINGER (BLR)* โดยมีส่วนของ cis element อยู่ในบริเวณอินทรอนที่สองของยีน *AG* โดยบริเวณดังกล่าวน่าจะมีบริเวณที่ยีนอื่นๆ (เช่นยีน *LFY*) จะมาจับและควบคุมการทำงานของยีน *AG* ได้ทั้งแบบส่งเสริมและแบบยับยั้ง ซึ่งส่วนนี้เป็นบริเวณที่กำหนดบริเวณการแสดงออกของยีน *AG* และเป็นบริเวณอนุรักษ์ของยีนนี้ หากเกิดการขาดหายไปของเบสในบริเวณนี้จะส่งผลต่อการทำงานของยีน *AG* โดยจะทำให้เกสรเพศผู้และเกสรเพศเมียเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นกลีบเลี้ยงและกลีบดอก (Liu and Liu, 2008; Causier *et al.*, 2009) และจากการศึกษาของ Wang *et al.* (2008) พบว่าเมื่อถ่ายยีน *Barnase* ที่ทำงานภายใต้การควบคุมของอินทรอนที่สองของยีน *AG* ลงในต้นยาสูบ จะได้ต้นยาสูบที่มีลักษณะดอกผิดปกติโดยจะพบลักษณะเป็นหมันทั้งในส่วนของเกสรเพศผู้และรังไข่ และยังส่งผลให้ได้ต้นยาสูบที่ไม่มีการสร้างดอก

สำหรับการทำงานของยีน *AG* นั้น พบว่ามีการแสดงออกในช่วงต้นๆ ของการสร้างดอก โดยจะทำงานร่วมกับยีน *WUS* และถูกควบคุมโดยการทำงานของยีน *LFY* ส่วนยีนที่ถูกควบคุมโดยการทำงานของยีน *AG* นั้นยังไม่มีผลการศึกษาที่แน่ชัดแต่มีความเป็นไปได้ว่าหน้าที่ยีนเหล่านั้นจะเพียงแต่ทำงานร่วมไปกับยีน *AG* ให้ยีน *AG* สามารถทำงานไปได้ตามปกติแต่ไม่ได้มีหน้าที่หลักในการสร้างอวัยวะต่างๆ ในดอก (Jack, 2002; Causier *et al.*, 2009)

จากการศึกษาของ Western and Haughn (2002) พบว่ายีน *AGAMOUS* มีหน้าที่ในการควบคุมการสร้างโอวูลเช่นเดียวกับยีน *BEL1* โดยทั้งสองยีนทำงานเป็นอิสระต่อกันแต่จะทำงานร่วมกันในการสร้างส่วนของ integument ต่อมา Brambilla *et al.* (2007) ได้รายงานว่าการพัฒนาของโอวูลในรังไข่ของเกสรเพศเมียนั้น จำเป็นต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของทั้งโปรตีน *BEL1* และโปรตีนในกลุ่ม MADS box family ได้แก่โปรตีน *SEEDSTICK (STK)*, *SHATTERPROOF1 (SHP1)*, *SHATTERPROOF2 (SHP2)* รวมไปถึงโปรตีน *AGAMOUS* ด้วย นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ทาง phylogenetic ยังพบว่ายีน *AG*, *STK*, *SHP1* และ *SHP2* ซึ่งเป็นยีนในกลุ่ม MADS box gene family ใน *A. thaliana* L. นั้นมีความใกล้เคียงกันมากและอาจจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันได้ (Steven *et al.*, 1995; Honma and Goto, 2001; Pinyopich *et al.*, 2003)

ทั้งนี้เนื่องจากไม่พบว่ามีการศึกษาอื่นที่เกี่ยวข้องกับการสร้างดอกในสับดูมาก่อน การตรวจสอบยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างดอก จึงอาศัยข้อมูลของยีนที่ทำหน้าที่เดียวกันในพืชชนิดอื่นที่ได้มีผู้ศึกษาไว้แล้วซึ่งจะมีความคล้ายคลึงกัน ดังเช่นที่เคยมีการทดลองในต้น โกโก้ (*Theobroma cacao* L.) ซึ่งพบว่ายีน *TcAG* ที่ศึกษาจากต้น โกโก้ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับยีน *AG* ใน *A. thaliana* L. และมีการแสดงออกควบคุมการพัฒนาของดอกในส่วนเดียวกัน (Chaidamsari *et al.*, 2006) เช่นเดียวกับยีน *SAG1* (*Spruce AGAMOUS-like*) ในต้น black spruce (*Picea mariana* (Mill.) Britton) และยีน *OMADSI* ในต้นกล้วยไม้ *Oncidium* ซึ่งผู้ศึกษาได้ทดลองถ่ายยีนดังกล่าวใส่ต้น *A. thaliana* L. และพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงในส่วนของอวัยวะสืบพันธุ์ในต้นสายพันธุ์กลาย เช่น มีการเปลี่ยนแปลงจากส่วนของกลีบเลี้ยงไปเป็นเกสรเพศเมีย และกลีบดอกไปเป็นเกสรเพศผู้ (Rutledge *et al.*, 1998; Hsu *et al.*, 2003) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายีน *AGAMOUS* homologue ที่พบในพืชชนิดอื่นๆ มีหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกในส่วนของเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมีย เช่นเดียวกับใน *A. thaliana* L.

5. การโคลนยีน

การโคลนยีนเป็นขั้นตอนที่ใช้เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจ เพื่อนำไปศึกษาหน้าที่ ลำดับเบส หรือถ่ายชิ้นส่วนดีเอ็นเอชิ้นนั้นเข้าสู่สิ่งมีชีวิต โดยจะเริ่มจากการเตรียมดีเอ็นเอที่ต้องการ ซึ่งได้จากการสกัดแยกดีเอ็นเอทั้งหมดจากสิ่งมีชีวิต (genomic DNA) หรือสังเคราะห์จาก เอ็มอาร์เอ็นเอเพื่อสร้าง complementary DNA (cDNA) และนำดีเอ็นเอที่ได้มาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ ได้เป็นดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA) แล้วนำไปถ่ายเข้าเซลล์ผู้รับ (host) ซึ่งเตรียมให้อยู่ใน ลักษณะ competent cell โดยใช้แบคทีเรียซึ่งเลี้ยงง่ายและเจริญเติบโตเร็ว จากนั้นจึงคัดเลือกเซลล์ที่มียีนที่ต้องการ (Wu, 1997; Sambrook *et al.*, 2003)

พลาสมิด pGEM[®]-T easy vector (Promega, USA) เป็นดีเอ็นเอเกลียวคู่วงแหวนปลายเปิด ขนาด 3,018 คู่เบส ในจุดตัดสำหรับเชื่อมต่อดีเอ็นเอจากภายนอกนั้นมีปลาย 3' ที่มีเบสไทมีน 1 ตัวยื่นออกมาทั้งสองด้าน มีส่วนของยีนต้านทานยาปฏิชีวนะแอมพิซิซิลิน (*Amp^r*) และยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์อัลฟาเพปไทด์ของเอนไซม์กาแล็กโทซิเดส (*lacZ*) (Promega, 1998)

โปรแกรม ClustalW เป็นโปรแกรมที่ใช้ในการเรียงเทียบลำดับข้อมูล (multiple sequence alignment) สำหรับสายดีเอ็นเอหรือโปรตีน โดยจะช่วยคำนวณเทียบส่วนของลำดับที่คล้ายกัน และแตกต่างของแต่ละสายสามารถมองเห็นได้ชัด ซึ่งจากการเทียบความเหมือนและความแตกต่างนี้ทำ

ให้สามารถเห็นความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้ และสามารถวาด Cladograms หรือ Phylograms ได้ (Larkin, 2007)

ในการสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน หรือเพื่อนำมาทำ cDNA เนื่องจากอาร์เอ็นเอนั้นถูกทำลายได้ง่าย ต้องรักษาภาพเนื้อเยื่อไว้ในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำเพื่อให้ อาร์เอ็นเออยู่ได้นานพอที่จะนำมาใช้ศึกษาหรือวิเคราะห์ใดๆ วิธีการสกัดอาร์เอ็นเอนั้นมีหลายวิธี และอาร์เอ็นเอจากเนื้อเยื่อที่แตกต่างกันจะมีวิธีการและสารเคมีสำหรับสกัดที่เหมาะสมต่างกัน ออกไป (Avison, 2007) โดยทั่วไปมีการใช้ guanidine thiocyanate หรือใช้ชุดสกัดที่มีวางขายเช่น TRIZOL reagent (Invitrogen, USA) ซึ่งแต่เดิมถูกผลิตขึ้นมาเพื่อใช้กับเนื้อเยื่อสัตว์ จึงไม่เหมาะกับ พืชบางชนิด เนื่องจากเนื้อเยื่อของพืชมี secondary metabolite และส่วนประกอบที่รบกวนการสกัด อยู่ภายในเซลล์เป็นจำนวนมาก ในกรณีของสับปะรดซึ่งมียางอยู่ในเนื้อเยื่อเป็นจำนวนมากก็เช่นกัน เนื่องจากปัญหาดังกล่าวทำให้มีการพัฒนาวิธีการและสารที่ใช้ช่วยในการสกัดอาร์เอ็นเอขึ้นหลายวิธี ซึ่งต่างก็สามารถนำไปใช้ได้ดีแตกต่างกันไปตามชนิดและส่วนของพืชที่นำมาใช้ เช่น การใช้ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), *N*-lauroyl sarcosine sodium (LSS) และ cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) ช่วยในการยับยั้งการทำงานของ RNase รวมถึงการ กำจัดสิ่งรบกวนจากเนื้อเยื่อโดยการใช้ sodium borate และ polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) ภายใต้สภาวะที่ถูก deoxidize ซึ่งเมื่อนำไปใช้กับเนื้อเยื่อของต้นลิ้นจี่ (*Litchi chinensis* Sonn.) พบว่า ได้ผลดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นๆ และพบว่าวิธีนี้สามารถนำไปใช้กับต้นยางพารา (*Hevea brasiliensis* Mull.) ซึ่งอยู่ในวงศ์เดียวกับสับปะรดได้ (Wang *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังมีวิธี acid phenol-silica ซึ่งใช้ silica ในการสกัดอาร์เอ็นเอภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ สูงร่วมกับเอทานอล และโซเดียมอะซิเตต ซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ ค่าใช้จ่ายไม่สูง และให้ผล มาก (Ding, 2008) ในการศึกษาที่ใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป PureLink™ Plant RNA Reagent (Invitrogen, USA) ซึ่งมีคุณสมบัติสามารถสกัดเนื้อเยื่อพืชได้อาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพ มีปริมาณสูง และสามารถทำ ได้สะดวก โดยเฉพาะจากเนื้อเยื่อพืชที่มีสารพวกแป้งหรือ polyphenolic มาก เช่น จากหัวมันฝรั่ง หรือใบมะเขือเทศ

6. Rapid amplification of cDNA end (RACE)

RACE คือ วิธีการใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (polymerase chain reaction, PCR) เพื่อ โคลนลำดับเบสที่สมบูรณ์จากบางส่วนของ cDNA ที่ได้จากการ โคลนเฉพาะบริเวณอนุรักษ์ของยีน หรือจากการคัดเลือกโคลนของห้องสมุด cDNA ซึ่งบริเวณปลาย 5' หรือ 3' อาจจะขาดหายไป โดย

วิธีการทำ RACE แบบเก่าจะเติมพอลิเอ (poly(A)) โดยเอนไซม์ terminal deoxytransferase (TdT) หรือโดยการเชื่อม oligonucleotide adaptor เข้าไปที่ปลาย 3' ของ cDNA ที่ได้จากปฏิกิริยา รีเวอร์สทรานสคริปชัน และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนเป้าหมายและ adaptor ทำปฏิกิริยา PCR แต่อย่างไรก็ตามอาจจะได้ปลาย 5' ที่ไม่สมบูรณ์ เนื่องจากอาร์เอ็นเอเริ่มแรกไม่สมบูรณ์ สำหรับในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ชุด GeneRacer™ RACE Ready cDNA Kit (Invitrogen, USA) ซึ่งได้มีการพัฒนาเทคนิคเป็น RLM-RACE (RNA ligase mediated rapid amplification of cDNA end) โดยในขั้นตอนแรกจะกำจัดหมู่ฟอสเฟตที่ปลาย 5' ของเอ็มอาร์เอ็นเอที่ไม่สมบูรณ์ หรืออาร์เอ็นเอชนิดอื่นออก โดยเอ็มอาร์เอ็นเอที่สมบูรณ์จะมีส่วน cap อยู่ทำให้ไม่ถูกกำจัด จึงสามารถต่อ adaptor ได้ หลังจากกำจัด cap ดังนั้นปลาย 5' ที่โคลนได้จะมีความสมบูรณ์ (Maruyama and Sugano, 1994; Volloch *et al.*, 1994; Schaefer, 1995)

7. Real-time PCR

ปฏิกิริยา PCR จัดเป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอต้นแบบที่มีความไวสูง สะดวก และไม่ยุ่งยาก ทำให้มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน แต่อย่างไรก็ตามปฏิกิริยา PCR แบบดั้งเดิม (conventional PCR) ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณ (quantitative analysis) ได้ อย่างถูกต้องแม่นยำ และมีความสามารถในการทำซ้ำ (reproducibility) ต่ำ แม้ว่าจะมีการพัฒนา quantitative PCR รูปแบบต่างๆ (Reischl *et al.*, 1999) เช่น semi-quantitative PCR แต่ส่วนใหญ่วิธีการจะค่อนข้างยุ่งยาก มีโอกาสเกิดความผิดพลาดในการทำจึงส่งผลต่อความถูกต้องแม่นยำ ทำให้มีการพัฒนาเทคนิค real-time PCR หรือ kinetic PCR (Higuchi *et al.*, 1993) ขึ้น ความสำเร็จของเทคนิค real-time PCR เกิดจากการพัฒนาเทคโนโลยี 2 ส่วนใหญ่ ๆ คือ การพัฒนาเทคโนโลยีในการตรวจหาผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ในสารละลายโดยการใช้สารเรืองแสง (fluorescence reporter) และการพัฒนาเครื่อง thermocycler ซึ่งแต่เดิมเป็นแค่เครื่องควบคุมอุณหภูมิขึ้นลงตามระยะเวลาที่กำหนด มาเป็นเครื่อง real-time thermocycler โดยเพิ่มส่วนที่เป็นแหล่งกำเนิดแสงเพื่อไปก่อให้เกิดการเรืองแสงของผลผลิตของปฏิกิริยา และส่วนตรวจวัดการเรืองแสงที่เกิดจากผลผลิตในหลอดปฏิกิริยา ดังนั้นการทำ real-time PCR จึงเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยที่สามารถตรวจวัดปริมาณผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง ณ เวลานั้นๆ ซึ่งต่างจากปฏิกิริยา PCR แบบดั้งเดิม โดยการตรวจจะทำหลังจากปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณสิ้นสุดแล้ว ในการตรวจวัดผลผลิตของปฏิกิริยาทำได้ โดยการเกิดสัญญาณการเรืองแสง ซึ่งมีอยู่ด้วยกัน 2 วิธีใหญ่ๆ คือ การใช้ intercalating dye และการใช้ probe ติดฉลากสารเรืองแสง (fluorochrome)

การใช้ intercalating dye เช่น เอธิเดียมโบรไมด์ (Higuchi *et al.*, 1993), SYBR Green I (Wittwer *et al.*, 1997a; Wittwer *et al.*, 1997b) หรือ Oxazole yellow derivative (Ishiguro *et al.*, 1995) intercalating dye เป็นสารเรืองแสงประเภทหนึ่งที่สามารถเข้าจับกับ minor groove ของ ดีเอ็นเอสายคู่ เมื่อ intercalating dye เกาะกับดีเอ็นเอสายคู่และถูกกระตุ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต จะมีการคายพลังงานออกมาในรูปของแสงในช่วงคลื่น (λ) ที่ยาวขึ้น และสามารถตรวจจับได้ด้วย ตัวรับสัญญาณแสงที่ติดตั้งอยู่กับเครื่อง real-time thermocycler การจับของ intercalating dye กับ ดีเอ็นเอสายคู่ เป็นแบบไม่จำเพาะและไม่สามารถแยกผลที่เกิดจากการทำปฏิกิริยา PCR จากหลายๆ คู่ไพรเมอร์ได้ในครั้งเดียว เนื่องจากสัญญาณการเรืองแสง (fluorescence signal) จะเกิดจากผลรวม ของปริมาณของดีเอ็นเอสายคู่ ซึ่งได้แก่ ผลของปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอเป้าหมาย (specific amplified product) ผลจากการจับกันเองของไพรเมอร์ (primer-dimer) และ/หรือ ผลของ ปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะ ดังนั้นจึงต้องตรวจสอบโดยทำให้ผลของปฏิกิริยาที่ได้เสียสภาพ แล้ว เปรียบเทียบค่า T_m (อุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอสายคู่เกิดการแยกกัน 50 เปอร์เซ็นต์) โดยค่า T_m เป็น คุณสมบัติเฉพาะของดีเอ็นเอสายคู่แต่ละสาย แปรผันโดยตรงกับ % GC content และความยาวของดี เอ็นเอสายคู่ การหาค่า T_m จากเครื่อง real-time thermocycler สามารถวิเคราะห์ได้จาก melting curve (Ririe *et al.*, 1997) โดยสัญญาณการเรืองแสงที่ลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง สำหรับผลจากปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะ หรือผลจากการจับกันเองของไพรเมอร์ จะมีค่า T_m แตกต่างจาก specific amplified product เช่น T_m ของผลจากการจับกันเองของไพรเมอร์จะมีค่าต่ำ เนื่องจากมี ขนาดสั้น (15-30 คู่เบส) ต่างจากดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ ซึ่งจะมีขนาดยาวกว่า (มากกว่า 100 คู่เบส) และมีค่า T_m ที่สูงกว่า แต่อย่างไรก็ตาม intercalating dye ก็มีราคาถูก จึงนิยมใช้กัน ในงานด้านต่างๆ รวมถึงการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณเพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน แต่จะ ต้องมีการทำ melting curve ทุกครั้งเพื่อหาค่า T_m และนำมาใช้ยืนยันผล และเป็นวิธีการที่นำมาใช้ ในการศึกษาครั้งนี้

อีกวิธีหนึ่งคือการใช้ probe คัดลอกสารเรืองแสง โดยอาศัยเทคโนโลยีของ fluorescence resonance energy transfer (FRET) ในกรณีที่ต้องการความจำเพาะสูงสุด เช่น การบ่งชี้ single nucleotide mutation ในดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งไม่สามารถกระทำได้โดยการใช้ intercalating dye ใน กรณีนี้จะใช้สารเรืองแสง 2 ประเภทติดลอกเข้ากับสายของ specific probe เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสง พลังงานสูง สารเรืองแสงตัวแรก เรียกว่า quencher จะดูดซับพลังงานเอาไว้ และถ่ายทอดพลังงาน ให้สารเรืองแสงตัวที่สองที่เรียกว่า reporter dye โดยไม่สูญเสียพลังงานออกสู่ระบบภายนอก จากนั้น reporter molecule จึงจะปลดปล่อยพลังงานออกสู่ระบบภายนอกในรูปของแสง ซึ่ง สามารถตรวจวัดได้ (Cardullo *et al.*, 1998) ชนิดของ probe ที่ติดลอกสารเรืองแสงเพื่อให้เครื่อง

real-time PCR ตรวจจับสัญญาณเรืองแสง ได้มีหลายชนิด เช่น hybridization probe (Bernard and Wittwer, 2000) hydrolysis probe (Taqman) (Lee *et al.*, 1993) และ molecular beacons (Tyagi and Kramer, 1996)

การวัดปริมาณด้วย real-time PCR มี 2 วิธี คือ การวัดปริมาณแบบสัมพัทธ์ (relative quantification) และการวัดปริมาณแบบสัมบูรณ์ (absolute quantification) การวัดปริมาณแบบสัมพัทธ์เป็นการหาปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นที่ต่างกันระหว่างสองตัวอย่าง โดยการเปรียบเทียบจากค่า threshold cycle (C_T) ซึ่งจะได้ออกมาเป็นจำนวนเท่า (fold change) จึงจำเป็นต้องมีตัวอย่างที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (calibrator) โดยนำค่า C_T ของยีนที่เป็น internal standard หรือ reference gene (house keeping gene) เช่น *actin*, *GADPH* หรือ *18S rRNA* เป็นต้น มาใช้เป็นค่าอ้างอิงในการเปรียบเทียบจำนวนเท่าของการแสดงออกของยีน (expression level) จะคำนวณได้จากวิธี delta/delta C_T ($\Delta\Delta C_T$ method) (Livak and Schmittgen, 2001) จากสมการ

$$R = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

$$R = 2^{-[(C_T \text{ sample} - C_T \text{ house keeping gene}) - (C_T \text{ calibrator} - C_T \text{ house keeping gene})]}$$

การวัดปริมาณแบบสัมบูรณ์ ทำได้โดยนำดีเอ็นเอเริ่มต้นที่ทราบปริมาณแน่นอนแล้ว ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ มาวิเคราะห์หาค่า C_T แล้วนำมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐานระหว่างค่า log ของดีเอ็นเอเริ่มต้นที่ทราบความเข้มข้นกับ ค่า C_T ของค่าความเข้มข้น วิเคราะห์ด้วยสมการถดถอย (linear regression analysis) จากนั้นสามารถนำค่า C_T ของตัวอย่างที่ยังไม่ทราบค่าความเข้มข้นมาคำนวณด้วยสมการที่ได้สร้างขึ้น นอกจากนี้สามารถตรวจสอบประสิทธิภาพของปฏิกิริยา PCR ได้จากความชันของกราฟมาตรฐาน (Kubista *et al.*, 2006) ดังสมการ

$$\text{PCR efficiency (\%)} = [(10^{-1/\text{slope}}) - 1] \times 100$$

โดยถ้าความชันมีค่าเท่ากับ -3.322 จะมีประสิทธิภาพของปฏิกิริยา PCR เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

ปัจจุบันมีการนำเทคนิค real-time PCR มาใช้วิเคราะห์การแสดงออกของยีนอย่างกว้างขวางในงานด้านต่างๆ เนื่องจากเป็นวิธีการที่มีความสะดวกและไม่ยุ่งยาก มีความไวในการตรวจวัด มีความถูกต้องแม่นยำ และมีความสามารถในการทำซ้ำสูง

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

ชนิดของพืชที่ใช้ในการศึกษา

สบู่ดำ (*Jatropha curcas* L.) พันธุ์ KUBP-16 ซึ่งเป็นหนึ่งในสายพันธุ์ที่ได้รับการพัฒนาจากอาจารย์แอนนา สายมณีรัตน์ เนื่องจากให้ผลผลิตต่อต้นค่อนข้างสูง

วิธีการ

1. การออกแบบไพรเมอร์

เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาอื่นที่เกี่ยวข้องกับการสร้างดอกในต้นสบู่ดำ จึงรวบรวมข้อมูลของยีน *AGAMOUS* ในพืชอื่นๆ โดยได้สืบค้นในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) และศึกษากรดอะมิโนที่ได้จากยีนดังกล่าวโดยแปลรหัสจากดีเอ็นเอ และนำไปทำ multiple sequence alignment โดยใช้โปรแกรม ClustalW (www.ebi.ac.uk/clustalw/) จากนั้นเลือกบริเวณที่อนุรักษ์ที่สุดจากผลที่ได้ทั้งสำหรับ forward primer และ reverse primer และออกแบบไพรเมอร์แบบไม่จำเพาะ (degenerate primer) จากส่วนนั้น โดยเลือกใช้รูปแบบเบสที่มักจะปรากฏในพันธุกรรมของสบู่ดำโดยอาศัยข้อมูลจาก Codon Usage Database (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>) นำ degenerate primer ที่ออกแบบได้ไปตรวจสอบระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการแยกดีเอ็นเอเป็นสายเดี่ยวของไพรเมอร์ (T_m) ปริมาณของ GC content ที่เหมาะสม การเกิดโครงสร้างทุติยภูมิ และการจับกันเองของคู่ไพรเมอร์ ด้วยโปรแกรม Net primer (www.premierbiosoft.com/netprimer)

2. การเตรียมตัวอย่างพืชสำหรับการสกัดอาร์เอ็นเอ

เก็บตัวอย่างต้นสบู่ดำพันธุ์ KUBP-16 ส่วนใบอ่อน ยอดอ่อน ดอกตูมขนาด 1-3 มิลลิเมตร ดอกตูมขนาด 4-6 มิลลิเมตร อับละอองเรณู (เฉพาะส่วนอับละอองเรณูจากดอกเพศผู้ซึ่งตัดกลีบเลี้ยงกลีบดอกออกแล้ว) และรังไข่ (เฉพาะส่วนอับละอองเรณูจากดอกเพศผู้ซึ่งตัดกลีบเลี้ยง กลีบดอก

ออกแล้ว) แยกแต่ละชนิดใส่หลอดทดลอง เก็บใส่ในโตรเจนเหลว และนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3. การสกัดแยกอาร์เอ็นเอ (RNA isolation)

สกัดอาร์เอ็นเอจากส่วนต่างๆ ของพืช 6 ส่วน ได้แก่ ดอกตูมขนาด 1-3 มิลลิเมตร ดอกตูมขนาด 4-6 มิลลิเมตร อับละอองเรณู ริงไข่ ใบอ่อน และยอดอ่อน โดยใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป PureLink™ Plant RNA Reagent (Invitrogen, USA) โดยการเติม PureLink™ Plant RNA Reagent ที่เย็นปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ต่อเนื้อเยื่อ 0.1 กรัม ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นจึงนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที นำสารละลายส่วนบนมาเติม 5M NaCl 0.1 มิลลิลิตร และคลอโรฟอร์ม 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำสารละลายส่วนบนมาเติมไอโซโพรพานอลในปริมาตรที่เท่ากันเพื่อตกตะกอนอาร์เอ็นเอ ผสมให้เข้ากันและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที อีกครั้งแล้วนำตะกอนที่ได้มาล้างด้วยแอลกอฮอล์ 75 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที เทแอลกอฮอล์ทิ้ง นำตะกอนที่ได้มาละลายใน RNase-free water 10-30 ไมโครลิตร และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

4. การแยกเอ็มอาร์เอ็นเอ

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3 มาแยกเอ็มอาร์เอ็นเอ โดยใช้ชุด Dynabeads mRNA Direct Micro kit (invitrogen, USA) โดยผสมสารละลายอาร์เอ็นเอที่ได้จากแต่ละเนื้อเยื่อเข้ากับ Dynabeads Oligo (dT)₂₅ ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เพื่อให้ Dynabeads Oligo (dT)₂₅ จับกับ poly (A)+ ในสายเอ็มอาร์เอ็นเอ โดยให้สารละลายมีการเขย่าตลอดเวลาบน orbital shaker จากนั้นนำไปตั้งไว้ในบล็อกแม่เหล็กเพื่อยึด Dynabead และดูดสารละลายทิ้ง ล้าง Dynabeads Oligo (dT)₂₅ ด้วย washing buffer A ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และนำไปตั้งในบล็อกแม่เหล็กเพื่อทำตามขั้นตอนที่กล่าวมาข้างต้นอีก 2 ครั้ง นำ Dynabeads Oligo (dT)₂₅ ที่ได้มาล้างด้วย washing buffer B ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และนำไปวางในบล็อกแม่เหล็ก ดูดสารละลายทิ้ง แยกเอ็มอาร์เอ็นเอออกจาก Dynabeads Oligo (dT)₂₅ โดยเติม

10 mM Tris-HCl ที่เย็นปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปตั้งในบล็อคมะเหล็ก ดูดสารละลายที่ได้ใส่ในหลอดใหม่ แล้วเก็บตัวอย่างที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

5. การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA)

นำเอ็มอาร์เอ็นเอของแต่ละตัวอย่างที่ได้มาทำ reverse transcription เพื่อเปลี่ยนเป็น cDNA โดยชุด SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (LifePro Thermal Cycler, Bioer, China) โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยอาร์เอ็นเอ 5.0 ไมโครกรัม, primer oligo (dT)₂₀ ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ 1.0 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP mix 1.0 ไมโครลิตร และเติม RNase-free, DNase-free water ให้ปริมาตรครบ 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วนำไปแช่น้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 1 นาที เติม 10X RT buffer 2 ไมโครลิตร, DL-dithiothreitol (DTT) ความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ 2 ไมโครลิตร, สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ 4 ไมโครลิตร, RNaseOUT™ 1 ไมโครลิตร และ SuperScript™ III RT 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อทำปฏิกิริยา reverse transcription จากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ สารละลายที่ได้จะนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสและใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาถูกลูโซโฟลิเมอเรส

6. การทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณอนุรักษ์ของยีน *AGAMOUS* homologue

ทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณอนุรักษ์ของยีน *AGAMOUS* homologue โดยใช้ไพรเมอร์แบบไม่จำเพาะที่ออกแบบไว้ และใช้เทคนิค step up PCR ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (LifePro Thermal Cycler, Bioer, China) โดยใช้เอนไซม์ *i-Taq* DNA Polymerase (Intron Biotechnology, Korea) โดยมีส่วนผสมดังนี้ น้ำ 16.2 ไมโครลิตร, 10X PCR buffer 2.5 ไมโครลิตร, 10mM dNTP 1.0 ไมโครลิตร, *i-Taq* DNA Polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) 0.3 ไมโครลิตร, forward primer: JcAGF1 (5'-GCG CGA ATT CGG NAA RAT HGA RAT HAA-3') และ reverse primer: JcAGR1 (5'-GCG CAA GCT TTT YTG CAT RTA NTC DAT-3') อย่างละ 1.5 ไมโครลิตร และ cDNA 2 ไมโครลิตร ในหลอดขนาด 200 ไมโครลิตร ทำ PCR วิธี step up โดยใช้โปรแกรม 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อด้วย 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 35 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที และ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 6 รอบ ตามด้วย

94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 45 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที และ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 25 รอบ และขั้นตอนสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำผลที่ได้ไปตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ในเจลอะกาโรส 1.0% ในสารละลาย 0.5X Tris-borate EDTA pH 8.0 (0.5X TBE) เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ 100 bp GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentus, USA) ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator

7. การเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สังเคราะห์เข้ากับพลาสมิด

หลังจากการตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ตัดเจลส่วนที่มีแถบดีเอ็นเอที่ต้องการและสกัดแถบดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุด NucleoSpin® (MACHEREY-NAGEL, Germany) โดยใส่เจลในหลอดไมโครเซนทริฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม buffer NT 200 ไมโครลิตร ต่อเจล 100 มิลลิกรัม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที กลับหลอดทุกๆ 2-3 นาที จนเจลละลายผสมเข้ากันเป็นเนื้อเดียว คูดสารละลายใส่คอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g นาน 1 นาที เทสารละลายทิ้ง ล้างด้วย buffer NT3 600 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g นาน 1 นาที เทสารละลายทิ้งแล้วปั่นเหวี่ยงอีกครั้งนาน 2 นาที เปลี่ยนคอลัมน์ใส่หลอดใหม่ ละลายตะกอนด้วย elution buffer NE 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g นาน 1 นาที นำสารละลายดีเอ็นเอไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.0% เนื่องจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR อาจมีขนาดเท่ากันแต่ไม่ได้เป็นชนิดที่เราต้องการทั้งหมด จากนั้นจึงโคลนเข้าไปในพลาสมิดโดยเชื่อม (ligation) ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้เข้ากับเวกเตอร์ pGEM®-T easy (Promega, USA) ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase (2.5 ยูนิต ต่อ 100 ไมโครลิตร) ผสมกับ 2X reaction buffer และบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8. การเตรียมเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้าน (competent cell) สำหรับเพิ่มปริมาณพลาสมิด

เตรียม competent cell จากเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ XL1-blue เพื่อใช้เป็นแบคทีเรียเจ้าบ้านสำหรับเพิ่มปริมาณพลาสมิด โดยดัดแปลงจากวิธีมาตรฐานของ Sambrook *et al.* (2003) เกลี่ยเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ XL1-Blue ให้ได้โคโลนีเดี่ยวบนอาหาร Luria-Bertani agar (LB agar) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวลงในอาหาร Luria-Bertani broth (LB broth) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง นำเชื้อปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในอาหาร LB 50 มิลลิลิตร (อัตรา 1:100) และนำเชื้อไปเลี้ยงต่อนาน 3-4 ชั่วโมง จนเซลล์มีความเข้มข้น 1×10^8

เซลล์ต่อมิลลิลิตร หรือมีค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.4-0.6 ย้ายเชื้อใส่หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร แช่น้ำแข็งที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ตกตะกอนเซลล์โดยการหมุนเหวี่ยง 4,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เทอาหารทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย TSS (LB, 10% (w/v) PEG, 5% (v/v) DMSO, 20 mM MgCl₂) ที่เย็นจัดปริมาณ 10 มิลลิลิตร แช่น้ำแข็ง นาน 5 นาที ตกตะกอนเซลล์เบคทีเรียอีกครั้งโดยนำมาหมุนเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เทอาหารทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วย TSS 1 มิลลิลิตร แช่น้ำแข็งนาน 5 นาที แบ่งเซลล์ที่ได้ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร สำหรับนำไปใช้ต่อไป

9. การโคลนยีนที่สังเคราะห์ได้ในเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*

ถ่ายเวกเตอร์ที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอเชื่อมเข้าสู่แบคทีเรียอยู่โดยวิธี heat shock โดยผสม competent cell หลอดละ 100 ไมโครลิตร กับพลาสมิดที่เชื่อมกับชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการไว้แล้วปริมาณ 5 ไมโครลิตร นำมาแช่น้ำแข็งนาน 30 นาที ทำ heat shock โดยบ่มในน้ำที่มีอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ย้ายหลอดไปแช่น้ำแข็งทันที นาน 2 นาที เติมน้ำในอาหาร LB broth ปริมาตร 800 ไมโครลิตร เช้าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 60-90 นาที นำมาตกตะกอนโดยหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทอาหารส่วนบนทิ้ง แล้วนำแบคทีเรียที่ได้ไปเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB Agar ที่ผสมยาปฏิชีวนะ แอมพิซิลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติมน้ำตาล isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG) 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารละลาย 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-gal) 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

10. การคัดเลือกโคลนที่ต้องการด้วยการทำ PCR

ใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อเขี่ยโคโลนีแบคทีเรียสีขาวไปใส่ในหลอด PCR ขนาด 200 ไมโครลิตร ซึ่งมี DNase-free water ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงให้เซลล์เบคทีเรียตกไปอยู่ที่ก้นหลอด นำสารละลายใส่ส่วนบนปริมาณ 1.5 ไมโครลิตร ไปเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ PCR โดยมีส่วนผสมดังนี้ 10X PCR buffer 2.0 ไมโครลิตร, 10mM dNTP 1.5 ไมโครลิตร, *i-Taq* DNA Polymerase (5 หน่วยต่อไมโครลิตร) 0.2 ไมโครลิตร, forward primer: T7 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GA-3') และ reverse primer: SP6 (5'- ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAT AC-3') อย่างละ 2.0 ไมโครลิตร และเติมน้ำจนครบ 20 ไมโครลิตร ทำ PCR โดยใช้โปรแกรม 94

องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อด้วย 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 25 รอบ และขั้นสุดท้ายคือ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที ตรวจสอบผล PCR โดยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิส ในเจลอะกาโรส 1.0% ในสารละลาย 0.5X TBE เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ 1 Kb GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentus, USA) ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator เลือกพลาสมิดที่ให้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่าที่คาดหวังไว้ 137 คู่เบส เนื่องจากจะมีส่วนของพลาสมิดรวมเข้าไปด้วย ส่งชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ขึ้นไปหาลำดับเบส นำข้อมูลลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับยีนที่มีรายงานในพืชชนิดอื่นจากฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST และใช้เป็นข้อมูลในการทำ PCR เพื่อศึกษาลำดับเบสให้ครบทั้งยีนต่อไป

11. การเปรียบเทียบลำดับเบสและกรดอะมิโนของยีนที่ได้

นำข้อมูลลำดับเบสของยีนที่โคลนได้มาศึกษาและนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของลำดับเบส (sequence alignment) โดยใช้โปรแกรม BLAST โดยเปรียบเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล GenBank เพื่อยืนยันว่าเป็นลำดับเบสของยีน *AGAMOUS* homologue ในสับงูดำ

12. การสังเคราะห์ส่วนของยีนด้านปลาย 3' ด้วยวิธี PCR

ใช้เทคนิค PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนปลายด้าน 3' ของยีน *AGAMOUS* homologue ในสับงูดำต่อจากปลายด้าน 3' ของชิ้นแรกที่โคลนได้ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (LifePro Thermal Cycler, Bioer, China) โดยนำ cDNA มาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการสังเคราะห์ ออกแบบ forward primer: nJcAgF (5'-AAT CTC TCG GAG GCA TTA AT-3') จากปลายด้าน 3' ของชิ้นส่วนของยีนที่มี และใช้ reverse primer: AG2degR (5'-AAC AAG TTG ARR ARM HRK TTG ATC-3') ซึ่งเป็นแบบไม่จำเพาะที่ออกแบบจากกรดอะมิโน 8 ตัวสุดท้ายของโปรตีน *AGAMOUS* ในพืชชนิดอื่นๆ ที่รายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank ผสม PCR reaction mix (น้ำ 8.9 ไมโครลิตร, 10X PCR บัฟเฟอร์ 2.0 ไมโครลิตร, 10mM dNTP 1.5 ไมโครลิตร, *i-Taq* DNA Polymerase 0.2 ไมโครลิตร, forward และ reverse primer (2 ไมโครโมลาร์) อย่างละ 2.0 ไมโครลิตร, สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ (25 มิลลิโมลาร์) 2.4 ไมโครลิตร และ cDNA 1.0 ไมโครลิตร) ในหลอดขนาด 200 ไมโครลิตร ทำ PCR โดยใช้โปรแกรม 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อด้วย 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 30 รอบ

และขั้นตอนสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที จากการทำ PCR นี้จะได้ชิ้นส่วนของยีนด้านปลาย 3' จนถึง stop codon นอกจากนี้ได้ทำ PCR โดยใช้ forward primer: nJcAgF (5'-AAT CTC TCG GAG GCA TTA AT-3') และใช้ oligo dT เป็น reverse primer เพื่อให้จับกับ poly (A)+ ที่ด้านปลาย 3' ของยีนเพื่อให้ได้ชิ้นส่วนของยีนด้านปลาย 3' จนถึงส่วนของ 3'UTR (3' untranslated region) โดยผสม PCR reaction mix (น้ำ 9.3 ไมโครลิตร, 10X PCR บัฟเฟอร์ 2.0 ไมโครลิตร, dNTP (10 มิลลิโมลาร์) 1.5 ไมโครลิตร, *i-Taq* DNA Polymerase 0.2 ไมโครลิตร, forward และ reverse primer (2 ไมโครโมลาร์) อย่างละ 2.0 ไมโครลิตร, สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ (25 มิลลิโมลาร์) 2.0 ไมโครลิตร และ cDNA 1.0 ไมโครลิตร) ในหลอดขนาด 200 ไมโครลิตร ทำ PCR โดยใช้โปรแกรม 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อด้วย 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 30 รอบ และที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที นำผล PCR มาตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิส ในเจลอะกาโรส 1% ในสารละลาย 0.5X TBE เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ 1 Kb GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentus, USA) ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator จากนั้นจึงส่งชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ไปหาลำดับเบส นำข้อมูลลำดับเบสที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ เปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของลำดับเบสกับยีนที่มีรายงานในพีชชนิดอื่นโดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank

13. การทำ 5' RACE

ทำเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน *AGAMOUS* homologue ในสไปด้าจากบริเวณดีเอ็นเอชิ้นแรกที่ได้ไปจนถึงปลายด้าน 5' ของยีน โดยใช้ชุด GeneRacer™ RACE Ready cDNA Kit (Invitrogen, USA) ซึ่งจะเปลี่ยนเอ็มอาร์เอ็นเอเป็น cDNA และต่อ adaptor เข้าไปที่บริเวณ 5' end ของชิ้นส่วน cDNA นั้น และนำมา 1.0 ไมโครลิตร ใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณยีนที่บริเวณปลาย 5' โดยใช้เอนไซม์ RBC *Taq* DNA Polymerase (RBC Bioscience, USA) เติม 10X PCR buffer 2.0 ไมโครลิตร, 10mM dNTP 1.5 ไมโครลิตร, forward primer: 10X UPM (Invitrogen, USA) ซึ่งประกอบด้วย Longupm (5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAA GCA GTG GTA TCA ACG CAG AGT-3') และ Shortupm (5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3') ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ 0.4 ไมโครลิตร, reverse primer: nAgR5 (5'-GCA TAC TCA TAG AGG CGA CCG CGG C-3') ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ 0.4 ไมโครลิตร, เอนไซม์ RBC *Taq* DNA Polymerase 0.2 ไมโครลิตร เติมน้ำให้มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR 2 โปรแกรม ซึ่งทั้ง 2 โปรแกรมมีระดับความแตกต่างของอุณหภูมิ โดยโปรแกรมแรก

ประกอบด้วย 6 ขั้นตอน ขั้นตอนที่ 1 ที่ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อด้วยขั้นตอนที่ 2 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 5 รอบ ขั้นตอนที่ 3 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 70 องศาเซลเซียส 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 5 รอบ ขั้นตอนที่ 4 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 68 องศาเซลเซียส 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 5 รอบ ขั้นตอนที่ 5 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 65 องศาเซลเซียส 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 20 รอบ และขั้นตอนสุดท้ายคือที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที จำนวน 1 รอบ โปรแกรมที่ 2 ประกอบด้วย 5 ขั้นตอน ขั้นตอนที่ 1 ที่ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อด้วยขั้นตอนที่ 2 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที (อุณหภูมิลดลงรอบละ 1 องศาเซลเซียส) 72 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 7 รอบ ขั้นตอนที่ 3 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 65 องศาเซลเซียส 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 14 รอบ ขั้นตอนที่ 4 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 63 องศาเซลเซียส 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 14 รอบ และขั้นตอนสุดท้ายคือที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที จำนวน 1 รอบ

นำผลที่ได้จากการทำ PCR ทั้ง 2 โปรแกรมมาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออีกครั้งโดยเจือจาง 10 เท่า นำมาใช้ปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร และเติม 10X PCR buffer 2.0 ไมโครลิตร, 10mM dNTP 1.5 ไมโครลิตร, forward primer (10X UPM) ซึ่งประกอบด้วย Longupm (5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAA GCA GTG GTA TCA ACG CAG AGT-3') และ Shortupm (5'-CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3') ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ 0.4 ไมโครลิตร, reverse primer: JCAGA2 (5'-AGA GCA ACC TCA GCA TCA CAT-3') ซึ่งออกแบบใหม่ให้มีความจำเพาะกับยีนในบริเวณที่ใกล้กับด้านปลาย 5' มากขึ้น (ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์) 0.4 ไมโครลิตร, เอนไซม์ RBC *Taq* DNA Polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) 0.2 ไมโครลิตร เติมน้ำให้มีปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ใช้โปรแกรม 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อด้วย 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 60-67 องศาเซลเซียส 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 30 รอบ และที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที ตรวจสอบผล PCR โดยวิธี อิเล็กโทรโฟรีซิส ในเจลอะกาโรส 1% ในสารละลาย 0.5X TBE เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ 100 bp GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentus, USA) ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator เชื่อมชิ้นส่วนของยีนที่ได้เข้ากับเวกเตอร์ pGEM®-T easy (Promega, USA) และถ่ายพลาสมิดเข้าสู่ competent cell นำไปเลี้ยงและคัดเลือกโคลนด้วยวิธี PCR โดยใช้ forward primer: T7 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GA-3') และ reverse primer: SP6 (5'-ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAT AC-3') ส่งชิ้นดีเอ็นเอที่ได้นี้ไป

หาลำดับเบส (DNA sequencing) นำข้อมูลลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับยีนที่มีรายงานในพีชชนิดอื่นจากฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST

14. การเปรียบเทียบและวิเคราะห์ลำดับเบสและกรดอะมิโนของยีนที่ได้

นำลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทดลองแต่ละชิ้นมาหาส่วนที่ซ้อนทับกัน ต่อลำดับเบสของแต่ละชิ้นดีเอ็นเอเพื่อให้ได้ลำดับเบสทั้งหมดของยีน *AGAMOUS* ในสปีดโดยใช้โปรแกรม CAP3 Sequence Assembly Program (<http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>) นำลำดับเบสที่ได้ไปวิเคราะห์หาบริเวณที่มีการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน (open reading frame) และแปลเป็นกรดอะมิโนด้วยรหัสมาตรฐานโดยโปรแกรม Baylor college of medicine search launcher (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/seq-util.html>) เปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของลำดับเบสและกรดอะมิโนกับยีนในพีชชนิดอื่นที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank และนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของโปรตีนโดยการสร้าง phylogenetic tree ของโปรตีน *AGAMOUS* ที่แปลรหัสจากยีนในต้นสปีดเปรียบเทียบกับพีชอื่นๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรม MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007) โดยใช้วิธี Neighbor-joining และวิเคราะห์ทั้งหมด 5,000 ซ้ำ

15. การตรวจสอบจำนวน copy ของยีน *AGAMOUS* homologue ในสปีดด้วยวิธี Southern blot hybridization

15.1 การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอจากสปีด

เตรียมดีเอ็นเอจากใบอ่อนสปีด ด้วยวิธีสกัดดีเอ็นเอของ Lodhi และคณะ (1994) โดยนำสารละลาย 4X CTAB 700 ไมโครลิตร มาเติม 2-mercaptone ปริมาตร 2 ไมโครลิตรแล้วนำไปอุ่นที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง บดตัวอย่างประมาณ 0.1 กรัม ให้เป็นผงละเอียดด้วยโกร่งและสากโดยมีการเติมไนโตรเจนเหลวอยู่เรื่อยๆ ตักผงใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำที่อุ่นเตรียมไว้ลงไป ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที โดยกลับหลอดไปมาทุกๆ 10-15 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2-3 นาที เติมน้ำกลอโรฟอร์มผสมไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 24:1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แล้วกลับหลอดไปมาเบาๆ เพื่อผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายส่วนใสด้านบนไปใส่หลอดใหม่ เติมน้ำกลอ

10% CTAB (10% CTAB และ 0.7 M NaCl) 50 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ ให้เข้ากัน แล้วเติมคลอโรฟอร์มผสมไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 24:1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ก่อนจะผสมสารให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดไปมาเบาๆ อีกครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ เติมไอโซโพรพานอลที่เย็นจัด 500 ไมโครลิตร กลับหลอดให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนใสที่ล้างตะกอนด้วยสารละลาย 70% เอทานอลที่เย็นจัด 700 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ดูดส่วนใสที่ล้างตะกอนอีกครั้งด้วยสารละลาย 90% เอทานอลที่เย็นจัด 700 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง เปิดฝาคั่วหลอดทิ้งไว้ให้ตะกอนแห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นหรือ TE บัฟเฟอร์

นำดีเอ็นเอสุบู่ปริมาณ 80 ไมโครกรัม มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI, *Hind*III, *Dra*I, *Eco*RV และ *Xba*I (Fermentus, USA) โดยใช้บัฟเฟอร์ตามที่บริษัทแนะนำในปฏิกริยารวม 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน เพื่อให้เกิดการตัดดีเอ็นเออย่างสมบูรณ์ จากนั้นแบ่งดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร มาตรวจสอบการตัดของเอนไซม์โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ในเจลอะกาโรส 0.8% ในสารละลาย 0.5X TBE นำดีเอ็นเอที่ตัดสมบูรณ์แล้วมาตกตะกอนด้วยการเติม 0.1 เท่า โดยปริมาตรของ 3 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตด pH 5.2 และ 2.5 เท่า โดยปริมาตรของเอทานอลที่เย็นจัด ทิ้งไว้ข้ามคืนที่ -20 องศาเซลเซียส ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เทส่วนของเหลวทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70% เอทานอล ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ทำให้ตะกอนแห้งภายใต้สูญญากาศ ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่น 30 ไมโครลิตร แยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ในเจลอะกาโรส 0.8% ใน 0.5X TBE โดยเปรียบเทียบขนาดกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA ladder marker (Fermentus, USA) จากนั้นบันทึกภาพเจลพร้อมกับไม้บรรทัดเพื่อใช้เปรียบเทียบกำลังขยายของภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

15.2 การถ่ายดีเอ็นเอจากเจลอะกาโรสสู่แผ่นไนลอนเมมเบรน

ถ่ายดีเอ็นเอที่จะตรวจสอบจากเจลอะกาโรสไปสู่แผ่นไนลอนเมมเบรน โดยนำแผ่นเจลอะกาโรสที่ได้จากข้อ 15.1 แช่ลงในสารละลาย depurination (0.25M HCl) ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที หรือจนกว่าสีของ bromphenol blue จะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง นำแผ่นเจลไปแช่ในสารละลาย

denaturation (0.5M NaOH และ 1.5M NaCl) เขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที แล้วนำไปแช่
 ต่อในสารละลาย neutralization (0.5M Tris-HCL pH 8.0 และ 1.5 M NaCl) เขย่าเบา ๆ ที่
 อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที จากนั้นย้ายดีเอ็นเอจากเจลลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรน
 Nytran^R SuPerCharge Nylon transfer membrane (Schleicher & Schuell, Germany) โดยตัดแผ่น
 ไนลอนเมมเบรนให้มีขนาดเท่ากับเจลและทำเครื่องหมายด้านที่จะสัมผัสกับเจลไว้ จุ่มแผ่น
 ไนลอนเมมเบรนในน้ำกลั่นที่นิ่งมาเชื้อ แล้วนำมาแช่ใน 20X SSC ที่ pH 7.0 (3.0M NaCl และ
 0.3M Sodium citrate) ให้เปียกจนทั่วแผ่น ย้ายดีเอ็นเอไปสู่แผ่นไนลอนเมมเบรนโดยใช้หลักการ
 upward capillary transfer (Southern, 1975) โดยใช้สารละลาย 20X SSC ช่วยในการพาชิ้นดีเอ็นเอ
 จากแผ่นเจลไปสู่แผ่นไนลอนเมมเบรน นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นใช้ปากกีดึงแผ่น
 ไนลอนเมมเบรนออกจากเจล นำแผ่นเจลที่เหลือไปตรวจสอบประสิทธิภาพการถ่ายดีเอ็นเอภายใต้
 แสงอัลตราไวโอเล็ต และยัดดีเอ็นเอไว้กับแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเล็ต
 (UV-crosslinking) นาน 5 นาที นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

15.3 การเตรียมโพรบของยีน *AGAMOUS* homologue ในสนับค้ำ

เตรียมโพรบสำหรับยีน *AGAMOUS* homologue โดยทำ PCR เพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอ
 บริเวณ open reading frame จาก cDNA จากดอกตูมของต้นสนับค้ำโดยมีส่วนผสมดังนี้ 10X PCR
 buffer 2.0 ไมโครลิตร, 10mM dNTP 1.5 ไมโครลิตร, *i-Taq* DNA Polymerase (5 ยูนิตต่อ
 ไมโครลิตร) 0.2 ไมโครลิตร, forward primer: start (5'-ATG GCA TAC CCC AGC GAT TCC C-
 3') และ reverse primer: stop (5'-AAC TAA CTG GAG GGC CAT TTG ATC TTG-3') ความ
 เข้มข้น 2 ไมโครโมลาร์ อย่างละ 2.0 ไมโครลิตร และเติมน้ำจนครบ 20 ไมโครลิตร ทำ PCR โดย
 ใช้โปรแกรม 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อด้วย 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 55
 องศาเซลเซียส 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ และที่ 72 องศาเซลเซียส 10
 นาที นำผล PCR มาตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ในเจลอะกาโรส 1% ในสารละลาย 0.5X
 TBE เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ 1 Kb GeneRulerTM DNA Ladder Mix (Fermentus, USA)
 ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator ใต้อินเทอร์เน็ตที่มีขนาด
 ประมาณ 720 คู่เบส นำดีเอ็นเอที่ได้มาเจือจางให้มีความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และ
 นำดีเอ็นเอ 10 ไมโครลิตร ไปต้มในน้ำเดือด 5 นาทีแล้วนำไปแช่น้ำแข็งทันที นำดีเอ็นเอที่ได้ไปติด
 ฉลากโดยใช้ชุด Amersham Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System (GE
 Healthcare Biosciences, USA) โดยการนำดีเอ็นเอที่ผ่านการต้มแล้วไปผสมกับ reaction buffer 10

ไมโครลิตร labeling reagent 2 ไมโครลิตร และ crosslinker 10 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บไว้บนน้ำแข็ง

15.4 การไฮบริไดเซชัน

ทำไฮบริไดเซชันโดยใช้ชุด Amersham Gene Images AlkPhos Direct Labeling and Detection System (GE Healthcare Biosciences, USA) โดยอุ่น hybridization buffer (เติม NaCl (0.5 โมลาร์) และ 4% blocking reagent) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที นำแผ่นไนลอนเมมเบรนไปบ่มใน hybridization buffer ที่อุ่นไว้โดยใช้ปริมาตร 0.125 มิลลิลิตร ต่อตารางเซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสใน shaking water bath ที่ความเร็ว 60 รอบต่อนาที เป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาที เติมโพรบที่ติดฉลากไว้แล้วลงใน hybridization buffer เขย่าผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วบ่มต่อใน shaking water bath ที่ความเร็ว 60 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

15.5 การตรวจสอบผลการไฮบริไดเซชัน

อุ่น primary wash buffer (2M Urea, 0.1% SDS, 50mM Na phosphate, 150mM NaCl, 1mM MgCl₂ และ 0.2% blocking reagent) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ล้างแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วย primary wash buffer ที่อุ่นเตรียมไว้ปริมาตร 300 มิลลิลิตร โดยเขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ล้างซ้ำ 2 ครั้ง นำแผ่นไนลอนเมมเบรนมาล้างอีกครั้งใน secondary wash buffer ที่ pH 10.0 (1M Tris base และ 2M NaCl) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร โดยเขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที ล้างซ้ำ 2 ครั้ง ใช้ปากคีบคีบแผ่นไนลอนเมมเบรนอย่างระมัดระวัง ชั้ secondary wash buffer ออก วางลงบนถาดพลาสติก หยด detection reagent ลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรนด้านที่มีดีเอ็นเอ โดยใช้ปริมาตร 30 ไมโครลิตรต่อตารางเซนติเมตร ทิ้งไว้ 5 นาที ปิดผนึกถาดพลาสติกด้วยเครื่องปิดผนึกแล้วนำไปวางใน film cassette นำเข้าห้องมืดแล้วประกบแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วยแผ่นฟิล์ม X-omat™ X (Kodak, USA) ทิ้งไว้ข้ามคืน นำฟิล์มออกและล้างแผ่นฟิล์มด้วยสารละลาย developer และสารละลาย fixer ตรวจสอบภาพที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์ม

16. การศึกษาการแสดงออกของยีน *AGAMOUS* homologue ในส่วนต่างๆ ของสปลูมด้วยวิธี relative quantification real-time PCR

16.1 การเตรียมตัวอย่างอาร์เอ็นเอ และการสร้าง cDNA

สกัดอาร์เอ็นเอรวมจากส่วนต่างๆ ของสปลูม 6 ส่วน ได้แก่ ดอกตูมขนาด 1-3 มิลลิเมตร ดอกตูมขนาด 4-6 มิลลิเมตร อับละอองเรณู ไร่ไข ใบอ่อน และยอดอ่อน และคัดเลือกเฉพาะเอ็มอาร์เอ็นเอจากส่วนต่างๆ ของสปลูมตามวิธีในข้อ 3 และข้อ 4 จากนั้นสังเคราะห์ cDNA ตามวิธีการในข้อ 5 โดยใช้เอ็มอาร์เอ็นเอปริมาณ 500 นาโนกรัม

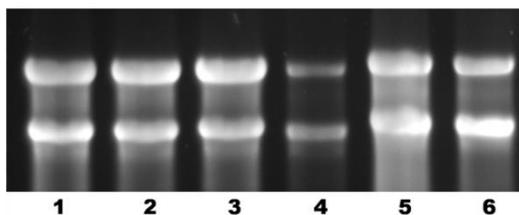
16.2 การศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน *AGAMOUS* homologue ด้วยวิธี relative quantification real-time PCR

นำ cDNA ที่ได้จากการสังเคราะห์จากข้อ 16.1 มาใช้เป็นต้นแบบในการวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของยีน *AGAMOUS* homologue ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของสปลูมด้วยชุด Quantimix Easy SYG Kit (Biotools, Spain) โดย specific primer ที่ใช้ในการสังเคราะห์ยีน *AGAMOUS* homologue ได้แก่ forward primer: nJcAgF (5' - AAT CTC TCG GAG GCA TTA AT -3') และ reverse primer: Ag2F (5' - GAT CTC TGC AAA CAA CAG CTC A -3') และ specific primer ที่ใช้ในการสังเคราะห์ยีน *actin* เพื่อใช้เป็นยีนเปรียบเทียบ (reference gene) ได้แก่ forward primer: JcActinF (5' - GGT AAC ATT GTG CTC AGT GGT GG -3') และ reverse primer: JcActinR (5' - AAC CAC CTT AAT CTT CAT ACT GC -3') โดยมีส่วนผสมของสารละลายที่ใช้ทำปฏิกิริยา ดังนี้ first strand cDNA 0.5 ไมโครลิตร, forward primer ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ 0.3 ไมโครลิตร, reverse primer ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ 0.3 ไมโครลิตร, QuantiSYG 2X 5.0 ไมโครลิตร และ RNase free water 3.9 ไมโครลิตร จะได้ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ใส่สารละลายที่เตรียมไว้ลงในหลอด real time PCR ขนาด 200 ไมโครลิตร (Axygen, USA) ทำปฏิกิริยาในเครื่อง Mastercycler Realplex (Eppendorf, USA) ด้วยโปรแกรม 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94 องศาเซลเซียส 10 วินาที 60 องศาเซลเซียส 10 วินาที 72 องศาเซลเซียส 15 วินาที จำนวน 35 รอบ และขั้นตอนสุดท้ายที่ 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที และโปรแกรม melting curve ที่ 60-95 องศาเซลเซียส 20 นาที จำนวน 1 รอบ บันทึกและวิเคราะห์ผล

หลังจากได้ตำแหน่งอนุรักษ์ของลำดับกรดอะมิโนที่เหมาะสมในการออกแบบไพรเมอร์แล้ว ได้แปลลำดับกรดอะมิโนให้เป็นลำดับเบส และนำไปวิเคราะห์การเลือกใช้ลำดับเบสที่พบมากในสปีชีส์โดยอาศัยข้อมูลจาก Codon Usage Database และคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมโดยใช้โปรแกรม Net Primer ตรวจสอบค่า T_m ของไพรเมอร์ให้อยู่ระหว่าง 55-65 องศาเซลเซียส คู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาไม่ควรต่างกันเกิน 5 องศาเซลเซียส ไพรเมอร์ที่มี GC สูง จะเกาะกับดีเอ็นเอต้นแบบได้อย่างสมบูรณ์ และมีเสถียรภาพ ส่วนไพรเมอร์ที่มี AT สูง จะให้ค่า T_m ของไพรเมอร์ต่ำ ต้องทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่ำเกินไป ทำให้ตำแหน่งเกาะจะไม่ถูกต้อง GC content ควรอยู่ที่ประมาณ 40-60 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้นำไปตรวจสอบการเกิดโครงสร้างทุติยภูมิ และการจับกันเองของคู่ไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Net primer ไพรเมอร์ที่ดีต้องไม่เกิดโครงสร้างทุติยภูมิ หรือค่า ΔG ไม่ควรต่ำกว่า -3 kcal/mol ถ้าต่ำกว่านี้จะมีโอกาสเกิด hairpin loop ได้ การจับกันเองของไพรเมอร์ไม่ควรเกิน 4 พันธะ และแต่ละช่วงไม่ควรติดกัน รวมตลอดสายไม่ควรเกิน 8 พันธะ หลังจากคัดเลือกไพรเมอร์แล้วได้เป็น forward primer: JcAGF1 (5'-GCG CGA ATT CGG NAA RAT HGA RAT HAA-3') และ reverse primer: JcAGR1 (5'-GCG CAA GCT TTT YTG CAT RTA NTC DAT-3')

2. ผลการสกัดอาร์เอ็นเอด้วย PureLink™ Plant RNA Reagent

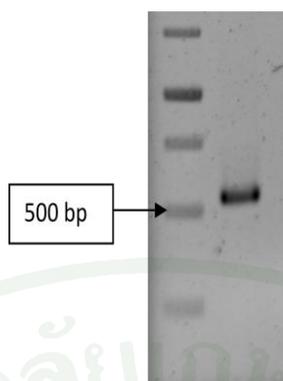
จากการสกัดอาร์เอ็นเอจากส่วนต่างๆ ของสปีชีส์ KUBP-16 โดยใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป PureLink™ Plant RNA Reagent (Invitrogen, USA) ละลายตะกอนที่ได้ใน RNase-free water ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นำสารละลายอาร์เอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ในเจลอะกาโรส 1.0% ในสารละลาย 0.5X TBE พบว่าสามารถแยกอาร์เอ็นเอจากส่วนต่างๆ ของสปีชีส์ได้ โดยปริมาณอาร์เอ็นเอที่สกัดได้แตกต่างกัน (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของอาร์เอ็นเอที่สกัดด้วย PureLink™ Plant RNA Reagent จากเนื้อเยื่อ (1) ดอกตูมขนาด 1-3 มิลลิเมตร (2) ดอกตูมขนาด 4-6 มิลลิเมตร (3) รังไข่ (4) อับละอองเรณู (5) ใบอ่อน (6) ยอดอ่อน

3. ผลการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณอนุรักษ์ของยีน *AGAMOUS* homologue

นำ cDNA ของดอกตูมสับคามาเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์เพิ่มชิ้นดีเอ็นเอบริเวณอนุรักษ์ของยีน *AGAMOUS* ด้วย forward primer: JcAGF1 และ reverse primer: JcAGR1 ตรวจสอบผล PCR โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ในเจลอะกาโรส 1.0% ในสารละลาย 0.5X TBE เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ 1 Kb GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentus, USA) ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator พบว่าสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 คู่เบส (ภาพที่ 3) ซึ่งคาดว่าเป็นส่วนของยีน *AGAMOUS* homologue ของสับคากา จึงแยกขนาดดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ในเจลอะกาโรส 0.8% สกัดแถบดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุด NucleoSpin® นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pGEM®-T easy เพื่อถ่ายเข้าไปใน competent cell ซึ่งเป็นแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ XL-1 Blue คัดเลือกแบคทีเรียบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน เลือกโคลนที่มีโคโลนีสีขาว และสีฟ้ามาตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้ในแต่ละโคลนด้วยวิธี PCR โดยใช้แต่ละโคลนเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ ใช้คู่ไพรเมอร์ T7 และ SP6 ทำ PCR นำผล PCR มาตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ในเจลอะกาโรส 1.0% ในสารละลาย 0.5X TBE เลือกโคลนที่มีผลเป็นชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 600-650 คู่เบส เพื่อส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบส นำผลลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่าลำดับเบสที่ได้เมื่อนำไปแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนแล้วมีความคล้ายคลึงกับโปรตีน *AGAMOUS* ของต้นโกโก้ (*Theobroma cacao* L.) accession no. ABA39727 มากที่สุด โดยมีความคล้ายคลึงกันถึง 83% จึงนำลำดับเบสที่ได้มาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีนนี้เพื่อนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนบริเวณปลาย 3' และ 5' ต่อไป



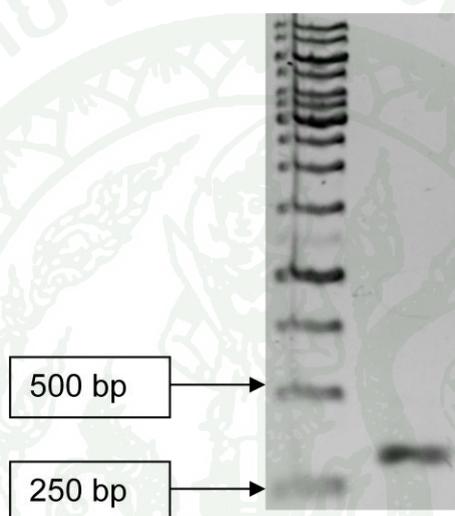
ภาพที่ 3 ผลจากการทำ PCR บริเวณอนุรักษ์ของยีน *AGAMOUS* homologue จาก cDNA ที่ได้จาก สบู่ดำ โดยใช้ไพรเมอร์ JcAGF1 และ JcAGR1

4. ผลการออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณปลาย 3' ของยีน *AGAMOUS* homologue

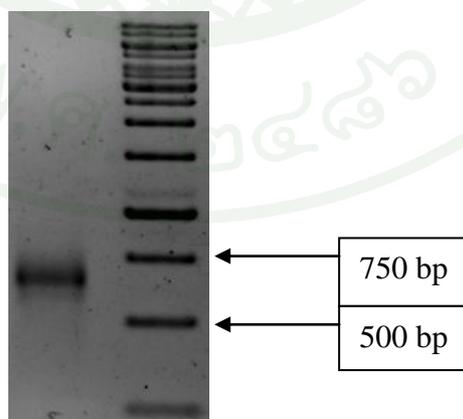
เพื่อหาข้อมูลลำดับเบสของยีน *AGAMOUS* homologue ของสบู่ดำในบริเวณปลาย 3' จึงได้ออกแบบ forward primer: nJcAgF (5'-AAT CTC TCG GAG GCA TTA AT-3') จากข้อมูลลำดับเบสปลายด้าน 3' ของบริเวณอนุรักษ์ที่ได้มาจากขั้นตอนที่แล้ว (ภาพที่ 4) และเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน *AGAMOUS* ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม ClustalW ในพืชอื่น 10 ชนิด คือ *T. cacao* L. accession no. ABA39727, *Citrus unshiu* Marcow. accession no. BAF34911, *Populus balsamifera* L. accession no. AAC06238, *Corylus avellana* L. accession no. AAD03486, *Prunus serotina* Ehrh. accession no. ACH72974, *Prunus mume* Siebold & Zucc. accession no. ABU41518, *Glycine max* (L.) Merr. accession no. AAR26530, *Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser. accession no. BAG74745, *Betula pendula* Roth accession no. CAB95649 และ *Gossypium hirsutum* L. accession no. ACF93432 แล้วเลือกลำดับอะมิโนในบริเวณ stop codon เพื่อนำมาออกแบบไพรเมอร์ (ภาพที่ 5) ได้ผลเป็น reverse primer: AG2degR (5'-AAC AAG TTG ARR ARM HRK TTG ATC-3') และเพื่อให้ได้ชิ้นส่วนของยีนด้านปลาย 3' จนถึงส่วนของ 3'UTR (3' untranslated region) จึงได้ใช้ไพรเมอร์อีกชนิดหนึ่งคือ reverse primer: Not12T (5'-GAG CGG CCG CTT TTT TTT TTT T-3') ซึ่งมีบริเวณของ oligo dT เพื่อให้จับกับ poly (A)+ ที่ด้านปลาย 3' ของยีน

5. ผลการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณปลายด้าน 3' ของยีน *AGAMOUS* homologue

นำ cDNA ของดอกตูมสับค้ำมาเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์เพิ่มชิ้นดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ nJcAgF กับไพรเมอร์แบบไม่จำเพาะ AG2degR นำผลการทำ PCR ที่ได้มาตรวจสอบโดยวิธี อิเล็กโทรโฟรีซิส ในเจลอะกาโรส 1.0% พบว่าสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 คู่เบส (ภาพที่ 6) นอกจากนี้ยังเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ nJcAgF คู่กับไพรเมอร์ Not12T พบว่าสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 600 คู่เบส (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 6 ผลจากการทำ PCR บริเวณปลายด้าน 3' ของยีน *AGAMOUS* homologue จาก cDNA ที่ได้ จากสับค้ำ โดยใช้ไพรเมอร์ nJcAgF และ AG2degR



ภาพที่ 7 ผลจากการทำ PCR บริเวณปลายด้าน 3' ของยีน *AGAMOUS* homologue จาก cDNA ที่ได้ จากสับค้ำ โดยใช้ไพรเมอร์ nJcAgF และ Not12T

นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ทั้ง 2 ครั้ง มาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pGEM[®]-T easy เพื่อถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ XL-1 Blue ที่ได้เตรียมไว้ คัดเลือกแบคทีเรียบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน เลือกโคลนที่มีโคโลนีสีขาว และสีฟ้ามาตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้ในแต่ละ โคลนด้วยวิธี PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ T7 และ SP6 ทำ PCR เลือกโคลนที่มีผลเป็นชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 คู่เบส และ 700 คู่เบส เพื่อส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบส ซึ่งขนาดที่เพิ่มขึ้นเป็นผลจากการที่มีส่วนของ พลาสมิดรวมเข้าไปด้วยอีก 137 คู่เบส นำผลลำดับเบสในบริเวณที่น่าเชื่อถือของข้อมูลลำดับเบสทั้ง 2 ชุดที่ได้มาหาส่วนที่ซ้อนทับกับลำดับเบสในส่วนอนุรักษ์ที่ได้ก่อนหน้านี้โดยใช้โปรแกรม CAP3 Sequence Assembly พบว่าลำดับเบสชุดใหม่ทั้ง 2 ชุดต่างสามารถเชื่อมต่อกับข้อมูลเดิมได้เป็น ลำดับเบสชุดใหม่ 2 ชุดที่มีความยาว 978 คู่เบส และ 1,012 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลทั้ง 2 ชุด มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่าลำดับเบสที่ได้มีความคล้ายคลึงกับโปรตีน AGAMOUS ของต้นโกโก้ (*T. cacao* L.) accession no. ABA39727 มากที่สุด โดยมีความคล้ายคลึงกันถึง 88% และ 89% ตามลำดับ

6. ผลการออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณปลาย 5' ของยีน *AGAMOUS* homologue

เพื่อหาข้อมูลลำดับเบสของยีน *AGAMOUS* homologue ของสบู่ดำในบริเวณปลาย 5' จึงได้ออกแบบ reverse primer: nAgR5 (5'-GCA TAC TCA TAG AGG CGA CCG CGG C-3') จากข้อมูลลำดับเบสปลายด้าน 5' ของบริเวณอนุรักษ์ที่ได้มาจากขั้นตอนที่ 3 (ภาพที่ 8) และได้ ออกแบบอีกหนึ่งไพรเมอร์ซึ่งมีความจำเพาะกับยีนบริเวณที่ใกล้กับปลายด้าน 5' มากกว่าไพรเมอร์ เดิมเพื่อให้ได้ผล PCR ที่มีความจำเพาะมากขึ้น ได้ผลเป็น reverse primer: JCAGA2 (5'-AGA GCA ACC TCA GCA TCA CAT-3') (ภาพที่ 8)

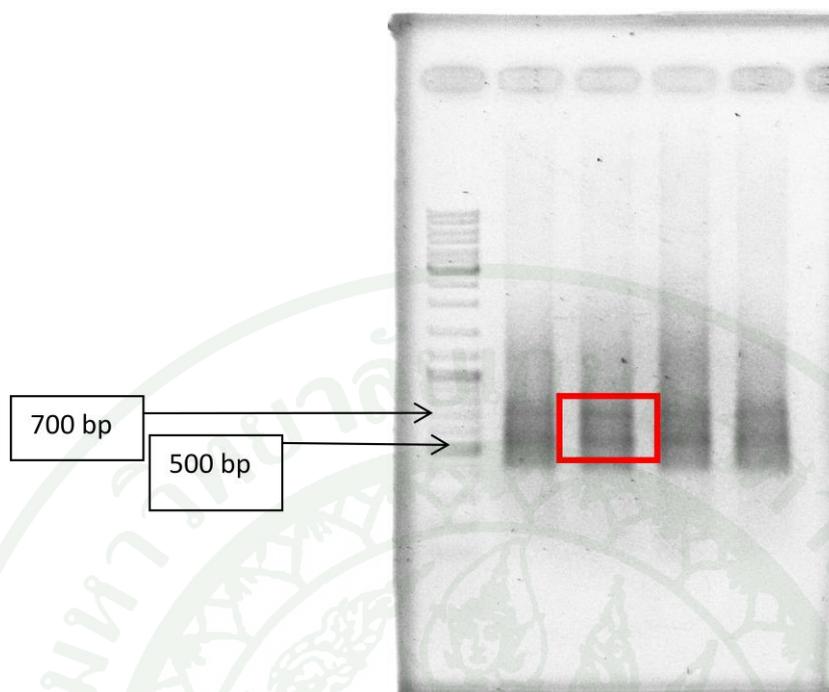
>conserve

GCGCGAATTCGGCAAGATAGAGATAAAAGCGGATCGAAAAACACCACAAATCGCCAAGTCACCTTTCTGCAA
 AAGAAGAAATGGTTTGGCTCAAGAAAGCCTATGAATTATCTGTTTTATGTGATGCTGAGGTTGCTCTCAT
 CGTATTCTCTAGCCCGGGTCGCCTCTATGAGTATGCTAATAATAGTGTTAAATCTACAATTGAGAGGTA
 CAAGAAAGCATGTGCAGATTCATCAAATACTGGATCTGTTTCTGAAGCTAATGCCAGTTCTATCAGCA
 ACAAGCTGCCAAGCTGCGTGATCAAATTAGCGGCTTGCAGAAATCAATCAGGAACATGCTGGGTGAATC
 TCTCGGAGGCATTAATCCCAAGGACCTTAGGGGCTTGGAGAGCAGGCTAGAGAAAAGGAATTAGTAGAAT
 TCGGTCCAAAAAGAATGAGCTGTTGTTTGCAGAGATCGAATACATGCAGAAAAGCTTGCCG

ภาพที่ 8 ลำดับเบสในบริเวณอนุรักษ์ของยีน *AGAMOUS* homologue ที่ได้จากสับดูค่าแสดงบริเวณที่นำมาออกแบบไพรเมอร์จำเพาะสำหรับหาปลายด้าน 5' (แถบสี ■ แสดงบริเวณที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ nAgR5, แถบสี ■ แสดงบริเวณที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ JCAGA2)

7. ผลการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณปลายด้าน 5' ของยีน *AGAMOUS* homologue

นำดีเอ็นเอสายแรกของคอกคุมสับดูค่ามาเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์เพิ่มขึ้นดีเอ็นเอ โดยชุด GeneRacer™ RACE Ready cDNA Kit (Invitrogen, USA) โดยใช้ reverse primer: nAgR5 (5'-GCA TAC TCA TAG AGG CGA CCG CGG C-3') ร่วมกับ forward primer: 10X UPM (Invitrogen, USA) ทำ PCR 2 โปรแกรม ตามวิธีที่อธิบายไว้ในขั้นของวิธีการทดลอง แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออีกครั้งโดยใช้ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณมาแล้วเป็นต้นแบบ โดยใช้ reverse primer: JCAGA2 (5'-AGA GCA ACC TCA GCA TCA CAT -3') ร่วมกับ forward primer: 10X UPM (Invitrogen, USA) พบว่าสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 คู่เบส และ 700 คู่เบส (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 ผลที่ได้จากการทำ RACE PCR บริเวณปลายด้าน 5' ของยีน *AGAMOUS* homologue จาก cDNA ที่ได้จากสับดูคา โดยใช้ไพรเมอร์ nAgR5 และเสริมด้วยการทำ RACE PCR ด้วยไพรเมอร์ Not12T

สกัดแถบดีเอ็นเอทั้ง 2 ขนาดออกจากเจลโดยใช้ชุด NucleoSpin® นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pGEM®-T easy เพื่อถ่ายเข้าไปใน competent cell คัดเลือกแบคทีเรียบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน เลือกโคลนที่มีโคโลนีสีขาว และสีฟ้า (negative control) มาตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้ในแต่ละโคลนด้วยวิธี PCR โดยใช้แต่ละโคลนเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ ใช้คู่ไพรเมอร์ T7 และ SP6 เลือกโคลนที่มีผลเป็นชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 650 คู่เบส และ 850 คู่เบส ซึ่งขนาดที่เพิ่มขึ้นเป็นผลจากการที่มีส่วนของพลาสมิดรวมเข้าไปด้วยอีก 137 คู่เบส ส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสและนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ ได้ผลเป็นลำดับเบสในบริเวณปลาย 5' ความยาว 190 คู่เบส เมื่อนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่าลำดับเบสที่ได้มีความคล้ายคลึงกับโปรตีน *AGAMOUS* ของต้นโกโก้ (*T. cacao* L.) accession no. ABA39727 มากที่สุด โดยมีความคล้ายคลึงกันถึง 89%

เมื่อนำลำดับเบสดังกล่าวมาหาส่วนซ้อนทับกับข้อมูลที่ได้ก่อนหน้านี้โดยใช้โปรแกรม CAP3 Sequence Assembly ได้เป็นลำดับเบสที่มีความยาว 1,063 คู่เบส นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่าลำดับเบสที่ได้มีความคล้ายคลึงกับโปรตีน AGAMOUS ของต้นโกโก้ (*T. cacao* L.) accession no. ABA39727 มากที่สุด โดยมีความคล้ายคลึงกันถึง 86%

8. ผลการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน open reading frame ของยีน *AGAMOUS* homologue ในต้นสบู่ดำ

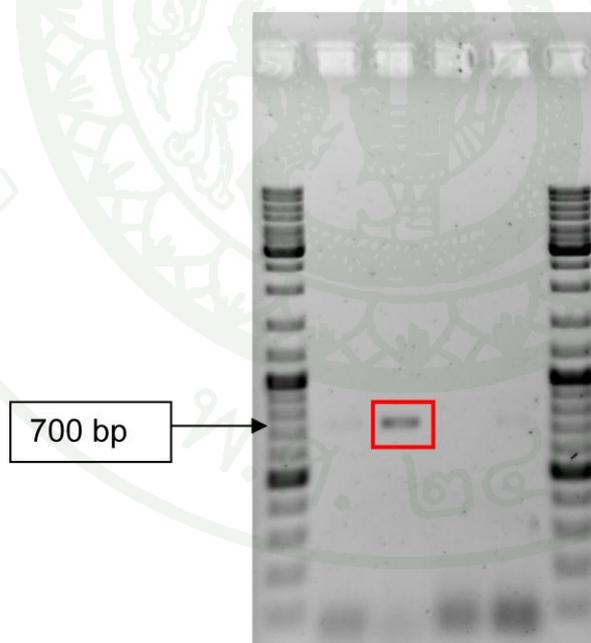
นำดีเอ็นเอสายแรกของดอกตูมสบู่ดำมาเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์เพิ่มขึ้นดีเอ็นเอ ด้วย forward primer: start (5'-ATG GCA TAC CCC AGC GAT TCC C-3') กับ reverse primer: stop (5'-AAC TAA CTG GAG GGC CAT TTG ATC TTG-3') ซึ่งออกแบบจากข้อมูลลำดับเบสที่ได้ (ภาพที่ 10) พบว่าสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 คู่เบส (ภาพที่ 11) ส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบส นำผลที่ได้มาวิเคราะห์และหาส่วนซ้อนทับกับข้อมูลที่ได้ก่อนหน้านี้โดยใช้โปรแกรม CAP3 Sequence Assembly ได้เป็นลำดับเบสที่มีความยาว 1,063 คู่เบส เมื่อแปลรหัสลำดับเบสเป็นลำดับกรดอะมิโนได้โพลีเพปไทด์ขนาด 241 กรดอะมิโน (ภาพที่ 12) โดยมี start codon อยู่ในบริเวณลำดับเบสที่ 167 และ stop codon อยู่ในบริเวณลำดับเบสที่ 890

```

>new contig
TCATCTTGCTTCCATTTTCTGCATCTCTCCTACTCAGATTTGTAGAAACAAAGAAGCTGAGAAACCCACA
ACCCAAAAGGCCTTTGTTTCTCTCCTCAATTAGCATCTCTACTTCTCCTTTTCTCTTCACTTTGTTTA
TTTCCTTACCAAGCTAGAAACAGCTGCCATGGCATACCCCAGCGATTCCCGGGGAGACTTCACCGCAGAG
GAGAATGGGTAGGGGAAAGATCGAGATCAAGCGGATCGAAAACACCACAAATCGCCAAGCCACTTTCTG
CAAAAGAAGAAATGGTTTGTCTCAAGAAAGCCTATGAATTATCTGTTTTATGTGATGCTGAGGTTGCTCT
CATCGTATTCTCTAGCCGCGGTTCGCTCTATGAGTATGCTAATAATAGTGTTAAATCTACAATTGAGAG
GTACAAGAAAGCATGTGCAGATTCATCAAATACTGGATCTGTTTCTGAAGCTAATGCCCAGTTCTATCA
GCAACAAGCTGCCAAGCTGCGTGATCAAATTAGCGGCTTGCGAGAAATCAATCAGGAACATGCTGGGTGA
ATCTCTCGGAGGCATTAATCCCAAGGACCTTAGGGGCTTGAGAGCAGGCTAGAGAAAGGAATTAGTAG
AATTCGGTCCAAAAGAATGAGCTGTTGTTTGCAGAGATAGAGTACATGCAAAAAGGGAAATTGATTT
GCACAATAATAACCAGCTTCTCCGAGCGAAGATTGCTGAGAAATGAAAGGAAGCAACAGAACATGAATCT
GATGCCAGGAGGAGGTAACTATGAGATAATTCAGTCTCAGCCATTTGACAATCCAAACTATTTTCAAGT
CAATGCATTACAACCCACCAATCATTATCCACAACAAGATCAAATGGCCCTCCAGTTAGTTTAATAAGC
TTTGAGAGTGAGCATCAACTTCTTGCCCTCTATTAGTCTCTGTAGATCAACCTCACGTATTTACCTTC
TGAAAGCTGCAAGTATATATCTATATATATACAAAAATTTCTTGCATAAATCAAGTTTGCCTGAAAAC TG
GCTGCGCCAGAAATGTGCTATCCACCAT

```

ภาพที่ 10 ลำดับเบสของยีน *AGAMOUS* homologue ที่ได้จากสปูดำแสดงส่วนที่นำมาออกแบบไพรเมอร์แบบจำเพาะสำหรับหาส่วน open reading frame (แถบสี ■ แสดงบริเวณที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ start, แถบสี ■ แสดงบริเวณที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ stop)



ภาพที่ 11 ผลที่ได้จากการทำ PCR บริเวณ open reading frame ของยีน *AGAMOUS* homologue จาก cDNA ที่ได้จากสปูดำโดยใช้ไพรเมอร์ start และ stop

9. ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนองค์ประกอบของโปรตีนที่โคลนได้

ผลการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของยีน *AGAMOUS* homologue ของสบู่ดำที่โคลนได้ พบว่าได้โพลีเพปไทด์ที่มีขนาดความยาว 241 กรดอะมิโน และพบลำดับเบสที่ใช้เป็นรหัสหยุดการสังเคราะห์โปรตีนในยีน *AGAMOUS* homologue ของสบู่ดำ มีรหัสคือ TAA อยู่ลำดับเบสที่ 891 เมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank (ภาพที่ 13) พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่ได้มีความคล้ายคลึงกับโปรตีน *AGAMOUS* ของต้นโกโก้ (*T. cacao* L.) accession no. ABA39727 ขนาด 241 กรดอะมิโน มากที่สุด โดยมีความคล้ายคลึงกันถึง 88% (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของกรดอะมิโนของโปรตีน *AGAMOUS* homologue ของสบู่ดำกับพืชชนิดอื่นในฐานข้อมูล GenBank

Accession no.	Plant species	Gene	Amino acid size	% Amino acid identity
				<i>Jatropha curcas</i>
ABA39727	<i>Theobroma cacao</i> L.	<i>AG</i>	241	88
BAF34911	<i>Citrus unshiu</i> Marcow.	<i>AG</i>	245	83
ADP02394	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	<i>AG</i>	246	83
AER30448	<i>Passiflora edulis</i> Sims	<i>AG</i>	255	83
AAC06237	<i>Populus trichocarpa</i> Torr. et A.Gray	<i>AG</i>	241	80
ACH72974	<i>Prunus serotina</i> Ehrh.	<i>AG</i>	243	81
AER34988	<i>Mangifera indica</i> L.	<i>AG</i>	242	83
CAA86585	<i>Panax ginseng</i> C.A.Mey.	<i>AG</i>	242	76

ก.

>JCAG

MAYPSDSRETSQPQRRMGRGKIEIKRIENTTNRQVTFCKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVALIVFSSRGRL
 YEYANNSVKSTIERYKKACADSSNTGSVSEANAQFYQQQAAKLRDQISGLQKSIRNMLGESLGGINPKD
 LRGLESRLKGISRIRSKKNELLFAEIEYMQKREIDLHNNNQLLRAKIAENERKQQNMNLMPPGGGNYEII
 IQSQPFDRNRYFQVNALQPTNHYPQQDQMALQLV

ข.

>gb|ABA39727.1| AGAMOUS-like protein [Theobroma cacao]
 Length=241

Score = 419 bits (1078), Expect = 3e-148
 Identities = 211/241 (88%), Positives = 224/241 (93%), Gaps = 0/241 (0%)
 Frame = +1

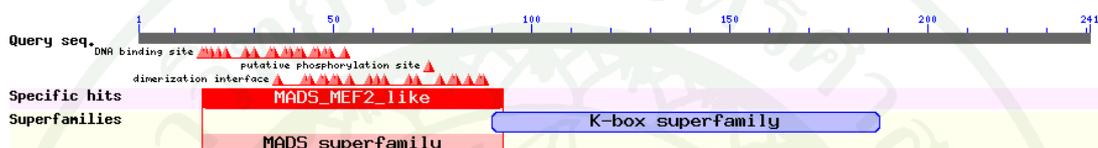
Query	1	MAYPSDSRETSQPQRRMGRGKIEIKRIENTTNRQVTFCKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVAL	180
		M YP++S ETSPQ++MGRGKIEIKRIENTTNRQVTFCKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVAL	
Sbjct	1	MVYPNESCETSQKKMGRGKIEIKRIENTTNRQVTFCKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVAL	60
Query	181	IVFSSRGRLYEYANNSVKSTIERYKKACADSSNTGSVSEANAQFYQQQAAKLRDQISGLQ	360
		IVFSSRGRLYEYANNSVK+TIERYKK CADSSNTGSVSEANAQFYQQ+AAKLR QI LQ	
Sbjct	61	IVFSSRGRLYEYANNSVKATIEERYKKT CADSSNTGSVSEANAQFYQQEAAKLRVQIGNLQ	120
Query	361	KSIRNMLGESLGGINPKDLRGLESRLKGISRIRSKKNELLFAEIEYMQKREIDLHNNNQ	540
		S R+MLGESL + KDLR LE+RLEKGISRIRSKKNELLFAEIEYMQKREIDLHNNNQ	
Sbjct	121	NSNRHMLGESLSALPMKDLRSLENRLEKGISRIRSKKNELLFAEIEYMQKREIDLHNNNQ	180
Query	541	LLRAKIAENERKQQNMNLMPPGGGNYEIIQSQPFDRNRYFQVNALQPTNHYPQQDQMALQL	720
		LLRAKIAENERKQQN+NLMPGG N+EI+ SQPFDRNRYFQVNALQP NHYP QDQMALQL	
Sbjct	181	LLRAKIAENERKQQNINLMPPGGSNFEIMHSQPFDRNRYFQVNALQPANHYPHQDQMALQL	240
Query	721	V 723	
		V	
Sbjct	241	V 241	

ภาพที่ 13 ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของยีน *AGAMOUS* homologue ที่ได้จาก cDNA
 สบู่ดำ มีความยาว 241 กรดอะมิโน

(ก) ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของยีน *AGAMOUS* homologue ที่ได้จาก
 cDNA สบู่ดำ

(ข) การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของยีน *AGAMOUS*
 homologue ที่ได้จาก cDNA สบู่ดำกับโปรตีน *AGAMOUS* ของต้นโกโก้ (*T. cacao* L.)

จากสายโพลีเพปไทด์ที่ได้ พบโดเมน 2 โดเมน ของ MADS super family และ K-box superfamily (ภาพที่ 14) ซึ่งโดเมน MADS box เป็นบริเวณอนุรักษ์ของโปรตีน AGAMOUS ทำหน้าที่เป็นบริเวณจับของดีเอ็นเอ (DNA binding domain) และโดเมน K-box ซึ่งทำหน้าที่เป็นบริเวณจับกับโปรตีนชนิดอื่น (protein-protein interaction) และพบว่ามีความจำเป็นต่อการทำงานของโปรตีน AGAMOUS โดยโดเมนทั้ง 2 โดเมนนี้สามารถพบได้ในยีน *AGAMOUS like* อื่นๆ ได้แก่ ยีน *SHATTERPROOF (SHP)* และยีน *SEEDSTICK (STK)* (Ma *et al.*, 1991; Rounsley *et al.*, 1995; Mizukami *et al.*, 1996)

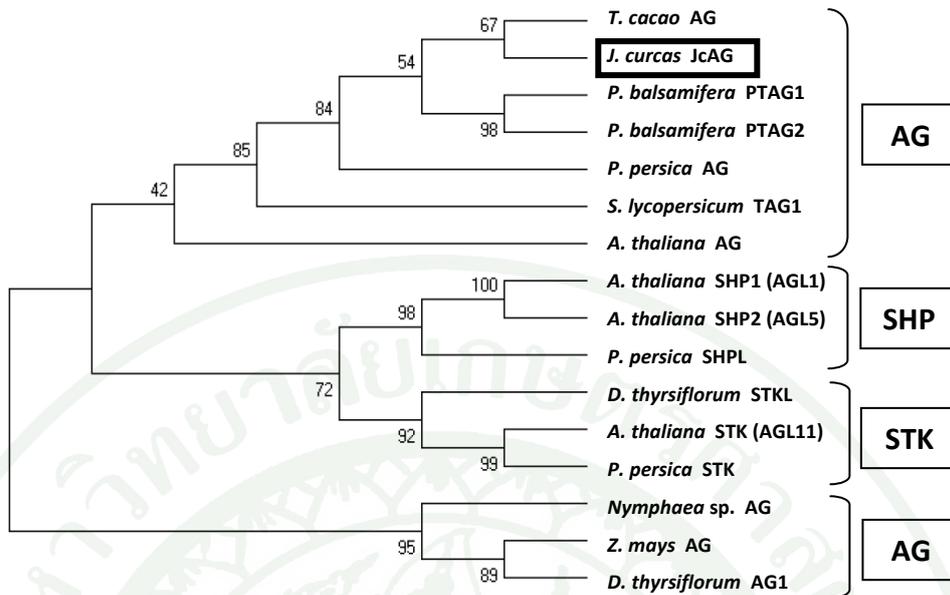


ภาพที่ 14 บริเวณโดเมนของ MADS superfamily และ K-box superfamily บนสายโพลีเพปไทด์ที่ได้จากการแปลรหัสของยีน *AGAMOUS* homologue ของต้นสนุ่นดำ

จากการจัดกลุ่มโดยเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสของยีน *AGAMOUS* homologue ในสนุ่นดำ กับ โปรตีน AGAMOUS ในพืชชนิดอื่น รวมทั้งเปรียบเทียบกับโปรตีน SHP และ STK ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่ม MADS box ซึ่งมีโดเมน MADS box และโดเมน K-box และมีการแสดงออกในส่วนสืบพันธุ์ (Ma *et al.*, 1991; Rounsley *et al.*, 1995) เช่นเดียวกับโปรตีน AGAMOUS (ตารางที่ 2) พบว่ายีน *AGAMOUS* homologue ในสนุ่นดำที่โคลนได้จัดอยู่ในกลุ่มของโปรตีนจากยีน *AGAMOUS* ของพืชใบเลี้ยงคู่ โดยแยกออกจากยีน *SHP* และ *STK* ซึ่งเป็นยีนในกลุ่ม MADS box อย่างชัดเจน (ภาพที่ 15)

ตารางที่ 2 ตารางแสดงชื่อโปรตีน AGAMOUS, STK และ SHP ของพืชชนิดอื่นในฐานข้อมูล GenBank ที่นำมาทำแผนภาพการจัดกลุ่มร่วมกับโปรตีน *AGAMOUS* homologue ของ สบู่ดำ

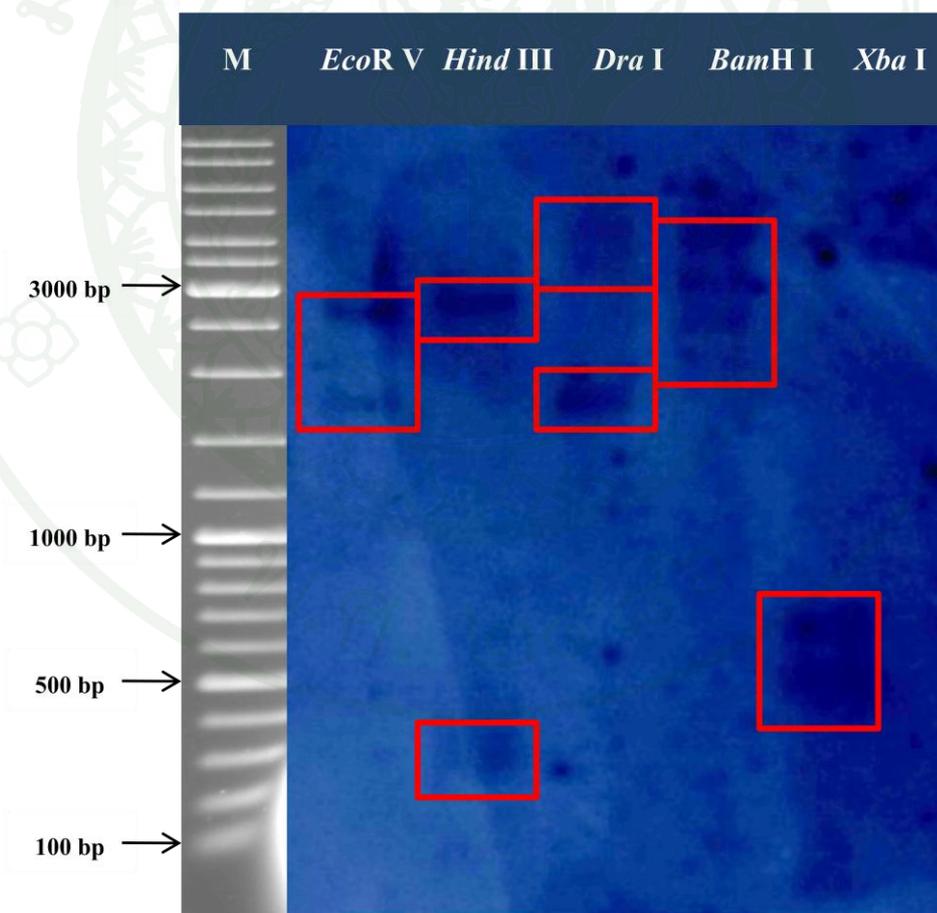
Accession no.	Plant species	Gene	Amino acid size
-	<i>Jatropha curcas</i> L.	<i>AG</i>	241
P17839	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	<i>AG</i>	252
ABA39727	<i>Theobroma cacao</i> L.	<i>AG</i>	241
AAB81103	<i>Zea mays</i> L.	<i>AG</i>	259
AAS45692	<i>Nymphaea</i> sp.	<i>AG</i>	224
XP 002317315	<i>Populus balsamifera</i> L.	<i>AG</i>	238
XP 002305048	<i>Populus balsamifera</i> L.	<i>AG</i>	241
AAA34197	<i>Solanum lycopersicum</i> L.	<i>AG</i>	248
P29381	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	<i>SHP1</i>	248
NP 192734	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	<i>STK</i>	230
ABQ85556	<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch	<i>STK</i>	222
AAAY86364	<i>Dendrobium thyrsiflorum</i> Rchb.F. ex André	<i>AG</i>	233
ABU50335	<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch	<i>AG</i>	243
AAAY86365	<i>Dendrobium thyrsiflorum</i> Rchb.F. ex André	<i>STK</i>	234
ABG75908	<i>Prunus persica</i> (L.) Batsch	<i>SHP</i>	244



ภาพที่ 15 แผนภาพการจัดกลุ่มของโปรตีน AGAMOUS และ AGAMOUS-like (โปรตีน SHP และ STK) ในพืชชนิดต่างๆ

9. ผลการตรวจสอบจำนวน copy ของยีน *AGAMOUS* ด้วยวิธี Southern blot hybridization

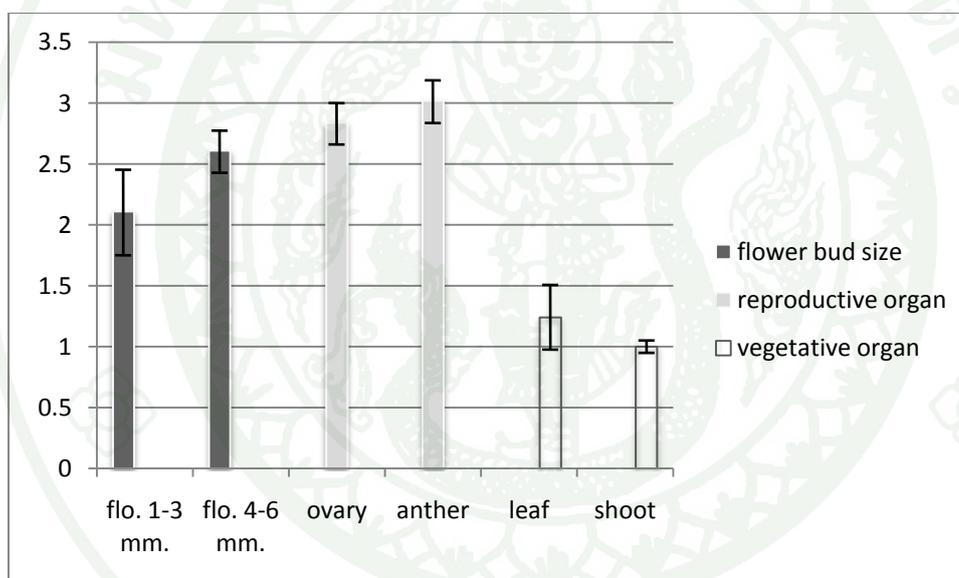
นำตัวอย่างสไปด์มาแยกดีเอ็นเอ แล้วตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 6 เบส ทั้งหมด 5 ชนิด คือ *EcoRV*, *HindIII*, *DraI*, *BamHI* และ *EcoRI* ซึ่งไม่มีจุดตัดใน cDNA ของยีน *AGAMOUS* โดยใช้ยีน *AGAMOUS* ที่ได้จากการทำ PCR จาก cDNA ในบริเวณ open reading frame ขนาด 720 คู่เบส สำหรับเป็นตัวตรวจสอบ ทำ Southern blot hybridization โดยใช้ชุด Amersham Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System (GE Healthcare Biosciences, USA) ผลจากการตรวจสอบจำนวนซ้ำของยีน *AGAMOUS* ของสไปด์ พบว่า ยีน *AGAMOUS* เกิดแถบดีเอ็นเอจำนวน 2-4 แถบ (ภาพที่ 16) โดยแถบที่เล็กที่สุดมีขนาดเล็กกว่าส่วน โพรบที่ใช้เป็นตัวตรวจสอบ ทำให้สรุปได้ว่ามีจุดตัดในส่วนของ intron ของยีนนี้ และคาดว่ายีน *AGAMOUS* น่าจะเป็นยีนที่มี single copy



ภาพที่ 16 ผลการตรวจสอบจำนวนซ้ำของยีน *AGAMOUS* homologue ในสไปด์โดยวิธี Southern blot hybridization

10. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *AGAMOUS* homologue ในสปลูมด้วยวิธี relative quantification real-time PCR

จากการตรวจสอบปริมาณอาร์เอ็นเอของยีน *AGAMOUS* homologue ด้วยวิธี relative quantification real-time PCR จากเนื้อเยื่อสปลูม 6 ชนิด คือ ดอกตูมขนาด 1-3 มิลลิเมตร ดอกตูมขนาด 4-6 มิลลิเมตร รังไข่ อับละอองเรณู ใบอ่อน และยอดอ่อน โดยเปรียบเทียบกับการแสดงออกของยีน *actin* ที่แสดงออกในเนื้อเยื่อแต่ละส่วนของสปลูม (reference gene) และตรวจสอบ melting curve ผลที่ได้พบว่าการแสดงออกของยีน *AGAMOUS* homologue ในเนื้อเยื่อดอกตูมขนาด 4-6 มิลลิเมตรมีปริมาณสูงกว่าในดอกตูมขนาด 1-3 มิลลิเมตร ในอับละอองเรณูสูงกว่าในรังไข่ และมีการแสดงออกเล็กน้อยในส่วนของใบอ่อน และยอดอ่อน (ภาพที่ 17)



ภาพที่ 17 ระดับการแสดงออกของยีน *AGAMOUS* homologue ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของสปลูมเมื่อวิเคราะห์ด้วย relative quantification real-time PCR

จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่ายีน *AGAMOUS* homologue มีการแสดงออกในดอกตูมในช่วงเริ่มแรก (ขนาด 1-3 มิลลิเมตร) น้อยกว่าในดอกตูมที่ใกล้บาน (ขนาด 4-6 มิลลิเมตร) ซึ่งไม่สอดคล้องกับรายงานการศึกษาในดอกของ *A. thaliana* L. โดย Jack (2002) และผลการศึกษาของ Western and Haughn (2002) ที่กล่าวว่ายีน *AG* มีการแสดงออกสูงในช่วงต้นๆ ของการสร้างดอก และจะมีการแสดงออกลดลงในช่วงท้ายๆ โดยในช่วงแรกของการสร้างดอกนั้นเป็นช่วงที่ยีน *AG* มีการแสดงออกในบริเวณที่จะพัฒนาเป็นเกสรเพศผู้ และในทุกเซลล์ของเกสรเพศผู้ทั้งหมด รวมถึงในบริเวณที่จะพัฒนาเป็นเกสรเพศเมียและทุกเซลล์ของโอวุล ในขณะที่การแสดงออกนั้นจะลดลงเหลือเฉพาะในบริเวณเนื้อเยื่อที่จำเพาะยิ่งขึ้นในช่วงท้ายๆ ของการสร้างดอก ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการทดลองนี้ใช้อาร์เอ็นเอจากเนื้อเยื่อของดอกตูมทั้งหมด ไม่ได้ตัดแยกเฉพาะบริเวณเนื้อเยื่อที่จะพัฒนาไปเป็นเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมียนั้น ทำให้ค่าการแสดงออกของยีนในดอกตูมที่ได้จากการทดลองลดลงกว่าความจริง ประกอบกับการที่เนื้อเยื่อที่มีการแสดงออกของยีนในช่วงท้ายๆ ของการสร้างดอกนั้นมีขนาดใหญ่ขึ้นตามการพัฒนาของดอก เมื่อเปรียบเทียบกับ reference gene (*actin*) จึงทำให้ได้ค่าการแสดงออกที่คลาดเคลื่อนไป สำหรับผลการเปรียบเทียบระหว่างเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมียในสับดูค่านั้นพบว่าการแสดงออกในส่วนของอับละอองเรณูมากกว่าในส่วนของรังไข่ซึ่งเป็นส่วนของเกสรเพศเมีย สอดคล้องกับการศึกษาในดอก *A. thaliana* L. (Bowman *et al.*, 1991b) ซึ่งรายงานว่าในช่วงปลายของการสร้างดอกจะไม่พบการแสดงออกของยีน *AG* ในเกสรเพศผู้ในส่วน of microspore หรือละอองเรณู (pollen grain) แต่จะพบเฉพาะในส่วน of ผนังอับละอองเรณูและบริเวณขั้วของอับละอองเรณูของเกสรเพศผู้ ส่วนในเกสรเพศเมียจะมีการแสดงออกเฉพาะในส่วน of เซลล์ชั้นนอกกรอบๆ embryo sac เท่านั้น ซึ่งคิดเป็นสัดส่วนที่น้อยทำให้มีระดับการแสดงออกที่ต่ำกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกในส่วน of ไข่เจริญ คือ ส่วนใบอ่อนและปลายยอด เช่นเดียวกับที่เคยมีรายงานจากการศึกษาในต้น poplar (Brunner *et al.*, 2000)

สรุปและข้อเสนอแนะ

1. ยีน *AGAMOUS (AG)* ที่โคลนได้จากสับดูดำมีความยาว 1,063 คู่เบส และมีลำดับเบสเหมือนกับเอ็มอาร์เอ็นเอของยีน *AGAMOUS (AG)* ในต้นโกโก้ถึง 86%
2. ยีนที่โคลนได้มีบริเวณ open reading frame ความยาว 726 คู่เบส ซึ่งสามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้สายโพลีเพปไทด์ที่มีความยาว 241 กรดอะมิโน มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับโปรตีน *AGAMOUS (AG)* ในต้นโกโก้ถึง 88% และมีบริเวณ MADS box domain และ K-box domain
3. การตรวจสอบจำนวน copy ของยีนด้วยวิธี Southern blot hybridization โดยการตัดด้วย เอนไซม์ 5 ชนิด พบแถบ DNA 2-4 แถบ และเมื่อดูจากขนาดแล้วสรุปได้ว่ายีน *AGAMOUS* homologue เป็นยีนที่มี single copy ในต้นสับดูดำ
4. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *AGAMOUS* homologue ในสับดูดำด้วยวิธี relative quantification real-time PCR พบว่ามีการแสดงออกสูงในส่วนของอับละอองเรณูและรังไข่ และพบการแสดงออกที่น้อยกว่าในส่วนของดอกตูม นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกเล็กน้อยในส่วนของใบอ่อนและยอดอ่อนซึ่งเป็นอวัยวะเจริญ
5. ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *AGAMOUS* homologue ในสับดูดำต่อไปในอนาคตอาจควรมีการสกัดอาร์เอ็นเอจากเฉพาะบริเวณเนื้อเยื่อที่ต้องการตรวจสอบเท่านั้น เพื่อให้ได้ผลที่มีความแม่นยำมากขึ้น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กองเกษตรเคมี และกองเกษตรวิศวกรรม กรมวิชาการเกษตร. 2525. **เดินเครื่องด้วยน้ำมัน “สบู่ดำ”**. ม.ป.ท.

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

มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และสมาคมนิสิตเก่ามหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ในพระบรมราชูปถัมภ์. 2549. **รายงานฉบับสุดท้ายโครงการการคัดเลือกพันธุ์สบู่ดำเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิง**.

วัลชลีย์ หุหลานนท์. 2527. การศึกษาลักษณะทางชีววิทยาของดอกและการติดผลของสบู่ดำ. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

Avison, M.B. 2007. **Measuring Gene Expression**. Taylor and Francis Group. New York.

Bernard, P.S. and C.T. Wittwer. 2000. Real-time PCR technology for cancer diagnostics. **Clin. Chem.** 46: 147-148.

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

- Bowman, J.L., G.N. Drews and E.M. Meyerowitz. 1991b. Expression of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *AGAMOUS* is restricted to specific cell types late in flower development. **Plant Cell** 3: 749-758.
- Brambilla, V., R. Battaglia, M. Colombo, S. Masiero, S. Bencivenga, M.M. Kater and L. Colombo. 2007. Genetic and molecular interactions between BELL1 and MADS box factors support ovule development in *Arabidopsis*. **Plant Cell** 19: 2544-2556.
- Brunner, A.M., W.H. Rottmann, L.A. Sheppard, K. Krutovskii, S.P. Difazio, S. Leonardi and S.H. Strauss. 2000. Structure and expression of duplicate *AGAMOUS* orthologues in poplar. **Plant Mol. Biol.** 44: 619-634.
- Cardullo, R.A., S. Agrawal, C. Flores, P.C. Zamecnick and D.E. Wolf. 1998. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 85: 8790-8794.
- Causier, B., D. Bradley, H. Cook and B. Davies. 2009. Conserved intragenic elements were critical for the evolution of the floral C-function. **Plant J.** 58: 41-52.
- Chaidamsari, T., Samanhudi, H. Sugiarti, D. Santoso, G.C. Angenent and R.A. Maagd. 2006. Isolation and characterization of an *AGAMOUS* homologue from cocoa. **Plant Sci.** 170: 968-975.
- Chantharaprasong, J. and P.C.V. Welzen. 2008. **Flora of Thailand: Euphorbiaceae**. National Herbarium Nederland. Available Source: <http://www.nationaalherbarium.nl/ThaiEuph/ThJspecies/ThJatrophaT.htm>, April 20, 2008.
- Dahmer, N., M.T.S. Wittmann and L.A. dos Santo Dias. 2009. Chromosome numbers of *Jatropha curcas* L.: An important agrofuel plant. **Crop Breed. Appl. Biot.** 9: 386-389.

- Ding, L.W., Q.Y. Sun, Z.Y. Wang, Y.B. Sun and Z.F. Xu. 2008. Using silica particles to isolate total RNA from plant tissues recalcitrant to extraction in guanidine thiocyanate. **Anal. Biochem.** 374: 426-428.
- Goto, K., J. Kyojuka and J.L. Bowman. 2001. Turning floral organs into leaves, leaves into floral organs. **Curr. Opin. Genet. Dev.** 11: 449-456.
- Higuchi, R., C. Fockler, G. Dollinger and R. Watson. 1993. Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reaction. **Bio-Technology** 11: 1026-1030.
- Honma, T. and K. Goto. 2001. Complexes of MADS-box proteins are sufficient to convert leaves into floral organs. **Nature** 409: 525-529.
- Hsu, H.F., C.H. Huang, L.T. Chou and C.H. Yang. 2003. Ectopic expression of an orchid (*Oncidium* Gower Ramsey) *AGL6*-like gene promotes flowering by activating flowering time genes in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiol.** 44: 783-794.
- Ishiguro, T., J. Saitoh, H. Yawata, H. Yamagishi, S. Iwasaki and Y. Mitoma. 1995. Homogeneous quantitative assay of hepatitis C virus RNA by polymerase chain reaction in the presence of a fluorescent intercalator. **Anal. Biochem.** 229: 207-213.
- Jack, T. 2002. New members of floral organ identity *AGAMOUS* pathway. **Trends Plant Sci.** 7: 286-287.
- Jack, T. 2004. Molecular and genetic mechanisms of floral control. **Plant Cell** 16: 1-17.
- Jayed, M.H., H.H. Masjuki, M.A. Kalam and M.I. Jahirul. 2009. Environmental aspects and challenges of oilseed produced biodiesel in Southeast Asia. **Renew. Sust. Energ. Rev.** 13: 2452-2462.

- Krizek, B. A. and E. M. Meyerowitz. 1996. The *Arabidopsis* homeotic genes *APETALA3* and *PISTILLATA* are sufficient to provide the B class organ identity function. **Development** 122: 11-22.
- Kubista, M., J. M. Andrade, M. Bengtsson, A. Forootan, J. Jonák, K. Lind, R. Sindelka, R. Sjöback, B. Sjögreen, L. Strömbom, A. Ståhlberg and N. Zoric. 2006. The real-time polymerase chain reaction. **Mol. Aspects Med.** 27: 95-125.
- Larkin, M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson and D.G. Higgins. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics** 23: 2947-2948.
- Lee, L.G., C.R. Connell and W. Bloch. 1993. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. **Nucleic Acids Res.** 21: 3761-3766.
- Li, K., W.L. Yin and C.W. Luo. 2007. Breeding system and pollination ecology in *Jatropha curcas*. **For. Res.** 20: 775-781.
- Liu, Z. and Z. Liu. 2008. The second intron of *AGAMOUS* drives carpel and stamen-specific expression sufficient to induce complete sterility in *Arabidopsis*. **Plant Cell Rep.** 27: 855-863.
- Livak, K.J., T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$. **Method. Methods** 25: 402-408.
- Lodhi, M.A., G.N. Ye, N.F. Weeden and B.I. Reisch. 1994. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. **Plant Mol. Biol. Rept.** 12: 6-13.
- Luo, C.W., K. Li, Y. Chen and Y.Y. Sun. 2007. Floral display and breeding system of *Jatropha curcas* L. **For. Stud. China.** 9: 114-119.

- Ma, H., M.F. Yanofsky and E.M. Meyerowitz. 1991. *AGL1-AGL6*, an *Arabidopsis* gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes. **Genes Dev.** 5: 484-495.
- Maruyama, K., and S. Sugano. 1994. Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides. **Gene** 138: 171-174.
- Mizukami, Y., H. Huang, M. Tudor, Y. Hu and H. Ma. 1996. Functional domains of the floral regulator AGAMOUS: characterization of the DNA binding domain and analysis of dominant negative mutations. **Plant Cell** 8: 831-845.
- Pelaz, S., G.S. Ditta, E. Baumann, E. Wisman and M.F. Yanofsky. 2000. B and C floral organ identity functions require *SEPALLATA* MADS-box genes. **Nature** 405: 200-203.
- Pinyopich, A., G.S. Ditta, B. Savidge, S.J. Liljegren, E. Baumann, E. Wisman and M.Y. Yanofsky. 2003. Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. **Nature** 424: 85-88.
- Promega cooperation. 1998. **pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems :Technical Manual No. 042.** n.p.
- Rachid, A. 2009. **Molecular Physiology and Biotechnology of flowering Plants.** Alpha Science International LTD. Oxford.
- Reischl, U. and B. Kochanowski. 1999. Quantitative PCR, pp. 3-30 . **In Methods in Molecular Medicine: Quantitative PCR Protocols.** Kochannowski B. and Reischl U. Humana Press, New Jersey.
- Ririe, K.M., R.P. Rasmussen and C.T. Wittwer. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. **Anal. Biochem.** 245: 154-160.

- Rounsley, S.D., G.S. Ditta and M.F. Yanofsky. 1995. Diverse roles for MADS box genes in *Arabidopsis* development. **Plant Cell** 7: 1259-1269.
- Rutledge, R., S. Regan, O. Nicolas, P. Fobert, C. Cote, W. Bosnich, C. Kauffeldt, G. Sunohara, A. Seguin and D. Stewart. 1998. Characterization of an *AGAMOUS* homologue from the conifer black spruce (*Picea mariana*) that produces floral homeotic conversions when expressed in *Arabidopsis*. **Plant J.** 15: 625-634.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 2003. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual** 3rd ed. Cold spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Schaefer, B.C. 1995. Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: new strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends. **Anal. Biochem.** 227: 255-273.
- Skryabin, K.G., D.V. Alekseev, T.A. Ezhova, V.N. Kozlov, V.B. Kudryavtsev, M.V. Nosov, A.A. Penin, V.V. Choob, S.V. Shestakov and O.A. Shul'ga. 2004. Mathematical model of genetic control of determination of floral organ identity in *Arabidopsis thaliana*. **Genetics** 31: 421-430.
- Steven, D.R., S.D. Gary and F.Y. Martin. 1995. Diverse roles for MADS box genes in *Arabidopsis* development. **Plant Cell** 7: 1259-1269.
- Sung, Z.R., L. Chen, Y.H. Moon and K. Lertpiriyapong. 2003. Mechanisms of floral repression in *Arabidopsis*. **Curr. Opin. Plant Biol.** 6: 29-35.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **J. Mol. Evol.** 29: 233-245.
- Theissen, G. 2001. Development of floral organ identity: stories from the MADS house. **Curr. Opin. Plant Biol.** 4: 75-85.

Theissen, G. and H. Saedler. 2001. Plant biology: floral quartets. **Nature** 409: 469-471.

Tyagi, S. and F.R. Kramer. 1996. Molecular Beacon: Probes that fluorescence upon hybridization. **Nature Biotech.** 14: 303-308.

Volloch, V., B. Schweitzer and S. Rits. 1994. Ligation-mediated amplification of RNA from murine erythroid cells reveals a novel class of beta-globin mRNA with an extended 5'-untranslated region. **Nucl. Acids Res.** 22: 2507-2511.

Wang, H.Z., B. Hu, G.P. Chen, N.N. Shi, Y. Zhao, Q.C. Yin and J.J. Liu. 2008. Application of *Arabidopsis AGAMOUS* second intron for the engineered ablation of flower development in transgenic tobacco. **Plant Cell Rep.** 27: 251-259.

Wang, X., W. Tian and Y. Li. 2007. Development of an efficient protocol of RNA isolation from recalcitrant tree tissue. **Mol. Biotechnol.** 38: 57-64.

Western, T.L. and G.W. Haughn. 2002. *BELL1* and *AGAMOUS* genes promote ovule identity in *Arabidopsis thaliana*. **Plant J.** 18: 329-336.

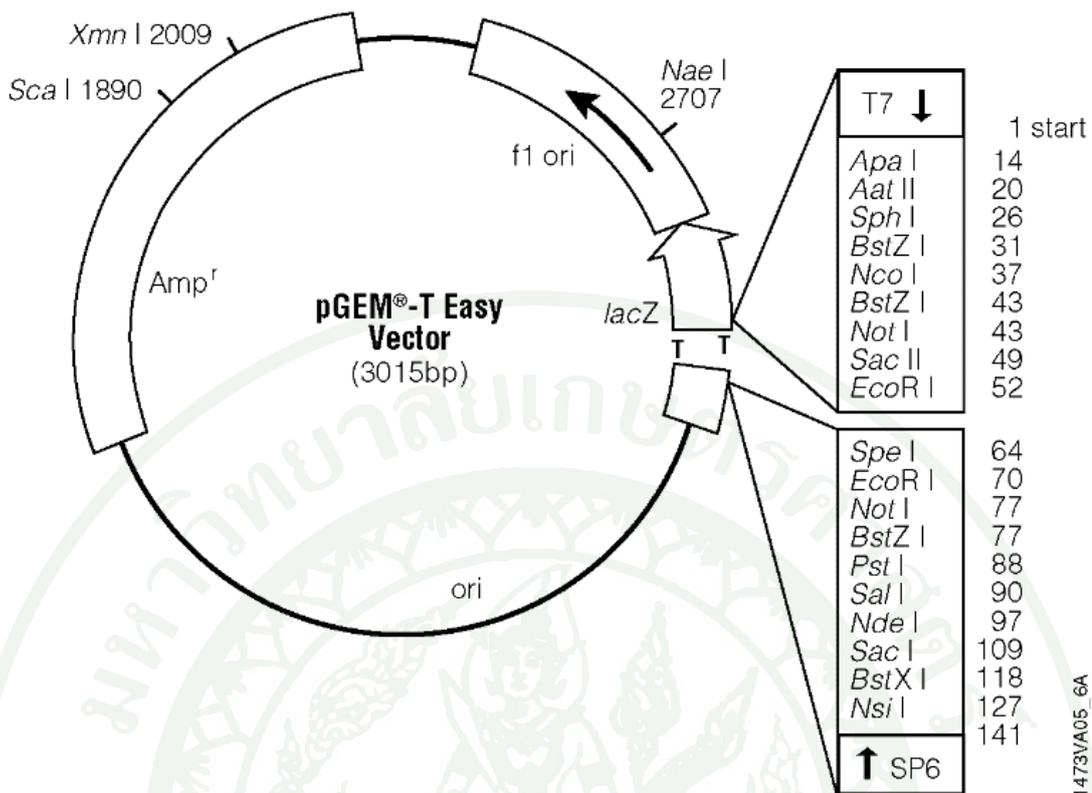
Wittwer, C.T., K.M. Ririe, R.V. Andrew, D.A. David, R.A. Gundry and U.J. Balis. 1997a. The Light Cycler: A microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. **Biotechniques** 22: 176-181.

_____, M.G. Herrmann, A.A. Moss and R.P. Rasmussen. 1997b. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. **Biotechniques** 22: 130-138.

Wu, W.W., M.J. Welsh, P.B. Kaufman and H.H. Zhang. 1997. **Method in Gene Biology**. CRC Press. New York.



ภาคผนวก



ภาพผนวกที่ 1 แผนที่พลาสมิด pGEM-T[®] Easy vector

ที่มา: Promega (1998)

```
>conserve
GCGCGAATTCGGCAAGATAGAGATAAAAGCGGATCGAAAAACACCACAAATCGCCAAGTCACCTTTCTGCAA
AAGAAGAAATGGTTTGGCTCAAGAAAAGCCTATGAATTATCTGTTTTATGTGATGCTGAGGTTGCTCTCAT
CGTATTCTCTAGCCGCGGTCGCCTCTATGAGTATGCTAATAATAGTGTTAAATCTACAATTGAGAGGTA
CAAGAAAGCATGTGCAGATTCATCAAATACTGGATCTGTTTCTGAAGCTAATGCCAGTTCTATCAGCA
ACAAGCTGCCAAGCTGCGTGATCAAATAGCGGCTTGCAGAAATCAATCAGGAACATGCTGGGTGAATC
TCTCGGAGGCATTAATCCCAAGGACCTTAGGGGCTTGGAGAGCAGGCTAGAGAAAAGGAATTAGTAGAAT
TCGGTCCAAAAAGAATGAGCTGTTGTTTGCAGAGATCGAATACATGCAGAAAAGCTTGCGC
```

ภาพผนวกที่ 2 ลำดับเบสในบริเวณอนุรักษ์ของยีน *AGAMOUS* homologue ที่ได้จากสมุนไพร โดยใช้ โปรแกรม JcAGF1 และ JcAGR1

```
>gblABA39727.1 AGAMOUS-like protein [Theobroma cacao]
Length=241

Score = 262 bits (670), Expect = 1e-87
Identities = 136/152 (89%), Positives = 141/152 (93%), Gaps = 0/152 (0%)
Frame = +2

Query 11 GKIEIKRIENTTNRQVTFCKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVALIVFSSRGRLYEYANNSVK 190
Sbjct 19 GKIEIKRIENTTNRQVTFCKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVALIVFSSRGRLYEYANNSVK 78

Query 191 STIERYKKCADSSNTGSVSEANAQFYQQAAKLRDQISGLQKSIRNMLGESLGGINPKD 370
+TIERYKK CADSSNTGSVSEANAQFYQQ+AAKLR QI LQ S R+MLGESL + KD
Sbjct 79 ATIERYKKT CADSSNTGSVSEANAQFYQQEAAKLRVQIGNLQNSNRHMLGESLSALPMKD 138

Query 371 LRGLESRLEKGISRIRSKKNELLF AEI EYM QK 466
LR LE+RLEKGISRIRSKKNELLF AEI EYM QK
Sbjct 139 LRSLENRLEKGISRIRSKKNELLF AEI EYM QK 170
```

ภาพผนวกที่ 3 การเปรียบเทียบลำดับเบสระหว่างบริเวณอนุรักษ์ของยีน *AGAMOUS* homologue ของสมุนไพรกับยีน *AGAMOUS* ของต้นโกโก้ (*T. cacao* L.)

ก

>AG2degR

CGGGCTGGAGAGCAGGCTAGAGAAGGAATTAGTAGAATTCGGTCCAAAAAGAATGAGCTGTTGTTTGCAG
 GAGATCGAGTACATGCAAAAAAGGGAAATTGATTTGCACAATAATAACCAGCTTCTCCGAGCGAAGATT
 GCTGAGAATGAAAGGAAGCAACAGAACATGAATCTGATGCCAGGAGGAGGTAACATATGAGATAAATTCAG
 TCTCAGCCATTTGACAATCGAAACTATTTTCAAGTCAATGCATTACAACCCACCAATCATTATCCACAA
 CAAGATCAAATATTTCTCAAACCTGTATGAGACGCTTTGAGAGTGAGAATCCACTTCGTGCCCACTATT
 AGTCTCTGTAGATCAAACAGTTTCTCAAACCTGTAGGTGTCAAGTCAATTCCTTGGACCCACCAAAAAAT
 TCCCCAAAAACAAGAAAAAAAACCTGTTGCACTTGCTAGTCTCTTGGACGTTACTGACCCTAAAGAACGA
 AAGCCTGGGGAACCAAACTGACTAAAAATCCCTTGTATCCCCCTCGTAACCTTTGGCGCTTGGTGGGG
 GGACCTCTCCTCGGCCCTGCGCCGAACCTACGCCATTAATTCCTCCGCGG

ข

> NotI12T

TTGGAANAAAAGGCTANAGAAAAGGAATTAGTAGAATTCGGTCCAAAAAGAATGAGCTGTTGTTTGCAGA
 GATCGAGTACATGCAAAAAAGGGAAATTGATTTGCACAATAATAACCAGCTTCTCCGAGCGAAGATTGC
 TGAGAATGAAAGGAAGCAACAGAACATGAATCTGATGCCAGGAGGAGGTAACATATGAGATAAATTCAGTC
 TCAGCCATTTGACAATCCAAACTATTTTCAAGTCAATGCATTACAACCCACCAATCATTATCCACAA
 AGATCAAATGGCCCTCCAGTTAGTTAATAAGCTTTGAGAGTGAGCATCAACTTCTTGCCTTATTAG
 TCTCTGTAGATCAACCTCACGTATTTACCTTCTGAAAGCTGCAAGTATATATCTATATATACCAAAAA
 TTTCTTGCATAAATCAAGTTTGCCTGAAAACCTGGCTGCGCCAGAAATGTGCTATCCACCATGTGCTACA
 AATGTGTACTCCAACCTAAGACATTTAAGTATTGTTGTAAGACAAGGATTTCTTTTTTGGATGTTTAAA
 ACTACTATGCCATTCTCCCTCCTTAGCCACACAAAATAAATCTGCACTGTTACATTTTCCCCCTGTATC
 CCGAAAACCTCTTC

ภาพผนวกที่ 4 ลำดับเบสในบริเวณปลายด้าน 3' ของยีน *AGAMOUS* homologue ที่ได้จากสปูดำ

(ก) ลำดับเบสที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ nJcAgF และ AG2degR

(ข) ลำดับเบสที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ nJcAgF และ Not12T

ก

>contigAG2degR

GCGCGAATTCGGGAAAATTGAAATTAAGCGGATCGAAAACACCACAAATCGCCAAGTCACCTTTCTGCAA
 AAGAAGAAATGGTTTGGCTCAAGAAAGCCTATGAATTATCTGTTTTATGTGATGCTGAGGTTGCTCTCAT
 CGTATTCTCTAGCCGCGGTTCGCTCTATGAGTATGCTAATAATAGTGTTAAATCTACAATTGAGAGGTA
 CAAGAAAGCATGTGCAGATTCATCAAATACTGGATCTGTTTCTGAAGCTAATGCCAGTTCTATCAGCA
 ACAAGCTGCCAAGCTGCGTGATCAAATTAGCGGCTTGCAGAAATCAATCAGGAACATGCTGGGTGAATC
 TCTCGGAGGCATTAATCCCAAGGACCTTAGGGGCTTGGAGAGCAGGCTAGAGAAAAGGAATTAGTAGAAT
 TCGGTCCAAAAAGAATGAGCTGTTGTTTGCAGAGATAGAGTACATGCAAAAAAGGGAAATTGATTTGCA
 CAATAATAACCAGCTTCTCCGAGCGAAGATTGCTGAGAATGAAAGGAAGCAACAGAACATGAATCTGAT
 GCCAGGAGGAGGTAACATGAGATAATTCAGTCTCAGCCATTTGACAATCGAAACTATTTTCAAGTCAA
 TGCATTACAACCCACCAATCATTATCCACAACAAGATCAAATATTTCTCAAACCTTGATGAGACGCTTT
 GAGAGTGAGAATCCACTTCGTGCCACTATTAGTCTCTGTAGATCAAACAGTTTCTCAACTTGTAGGT
 GTCAGTCAATTCCTTGGACCCACCAAAAATTCCTCAAAACAGAAAAAACCTGTTGCACCTGCTAG
 TCTCTTGGACGTTACTGACCCTAAAGAACGAAAGCCTGGGGAACCAAACCTGACTAAAATCCCTTGTAT
 CCCCCCTCGTAACCTTTGGCGCTTGGTGGGGGACCTCTCCTCGGCCCTGCGCCGAACCTACGCCATT
 AATTCCCCGCGG

ข

> NotI12T

GCGCGAATTCGGGAAAATTGAAATTAAGCGGATCGAAAACACCACAAATCGCCAAGTCACCTTTCTGCAA
 AAGAAGAAATGGTTTGGCTCAAGAAAGCCTATGAATTATCTGTTTTATGTGATGCTGAGGTTGCTCTCAT
 CGTATTCTCTAGCCGCGGTTCGCTCTATGAGTATGCTAATAATAGTGTTAAATCTACAATTGAGAGGTA
 CAAGAAAGCATGTGCAGATTCATCAAATACTGGATCTGTTTCTGAAGCTAATGCCAGTTCTATCAGCA
 ACAAGCTGCCAAGCTGCGTGATCAAATTAGCGGCTTGCAGAAATCAATCAGGAACATGCTGGGTGAATC
 TCTCGGAGGCATTAATCCCAAGGACCTTAGGGGCTTGGAGAGCAGGCTAGAGAAAAGGAATTAGTAGAAT
 TCGGTCCAAAAAGAATGAGCTGTTGTTTGCAGAGATAGAGTACATGCAAAAAAGGGAAATTGATTTGCA
 CAATAATAACCAGCTTCTCCGAGCGAAGATTGCTGAGAATGAAAGGAAGCAACAGAACATGAATCTGAT
 GCCAGGAGGAGGTAACATGAGATAATTCAGTCTCAGCCATTTGACAATCCAACTATTTTCAAGTCAA
 TGCATTACAACCCACCAATCATTATCCACAACAAGATCAAATGGCCCTCCAGTTAGTTTAATAAGCTTT
 GAGAGTGAGCATCAACTTCTTGCCCTCTATTAGTCTCTGTAGATCAACCTCACGTATTTACCTTCTGA
 AAGCTGCAAGTATATATCTATATATACCAAAAAATTTCTTGCAATAATCAAGTTTGCCTGAAAACGGCT
 GCGCCAGAAATGTGCTATCCACCATGTGCTACAAATGTGTACTCCAACCTAAGACATTTAAGTATTGTT
 GTAAGACAAGGATTTCTTTTTTGGATGTTTAAAACTACTATGCCATTTCTCCCTCCTTAGCCACACAAA
 TAAATCTGCACTGTTACATTTTCCCCCTGTATCCCGAAAACCTCTTC

ภาพผนวกที่ 5 ลำดับเบสจากบริเวณอนุรักษ์จนถึงปลายด้าน 3' ของยีน *AGAMOUS* homologue ที่
 ได้จากสมูค้ำ

(ก) ลำดับเบสที่ได้จากบริเวณอนุรักษ์และคู่ไพรเมอร์ nJcAgF และ AG2degR

(ข) ลำดับเบสที่ได้จากบริเวณอนุรักษ์และคู่ไพรเมอร์ nJcAgF และ Not12T

ก

>gb|ABA39727.1| AGAMOUS-like protein [Theobroma cacao]
Length=241

Score = 387 bits (995), Expect = 3e-134
Identities = 196/223 (88%), Positives = 207/223 (93%), Gaps = 0/223 (0%)
Frame = +2

```

Query 11  GKIEIKRIENTTNRQVTFCKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVALIVFSSRGRLYEYANNSVK 190
Sbjct 19  GKIEIKRIENTTNRQVTFCKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVALIVFSSRGRLYEYANNSVK 78

Query 191  STIERYKKACADSSNTGSVSEANAQFYQQAAKLRDQISGLQKSIRNMLGESLGGINPKD 370
Sbjct 79  ATIERYKKT CADSSNTGSVSEANAQFYQQEAAKLRVQIGNLQNSNRHMLGESLSALPMKD 138

Query 371  LRGLESRLEKGISRIRSKKNELLFAEIEYMQKREIDLHNNNQLLRAKIAENERKQQNMNL 550
Sbjct 139  LRSLENRLEKGISRIRSKKNELLFAEIEYMQKREIDLHNNNQLLRAKIAENERKQQNINL 198

Query 551  MPGGGNYEIIQSQPFDRNYFQVNALQPTNHYPQQDQIFLKL 679
Sbjct 199  MPGG N+EI+ SQPFD+RNYFQVNALQP NHYP QDQ+ L+LV
MPGGSNFEIMHSQPFDSRNYFQVNALQPANHYPHQDQMALQLV 241

```

ข

>gb|ABA39727.1| AGAMOUS-like protein [Theobroma cacao]
Length=241

Score = 390 bits (1002), Expect = 4e-135
Identities = 198/223 (89%), Positives = 207/223 (93%), Gaps = 0/223 (0%)
Frame = +2

```

Query 11  GKIEIKRIENTTNRQVTFCKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVALIVFSSRGRLYEYANNSVK 190
Sbjct 19  GKIEIKRIENTTNRQVTFCKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVALIVFSSRGRLYEYANNSVK 78

Query 191  STIERYKKACADSSNTGSVSEANAQFYQQAAKLRDQISGLQKSIRNMLGESLGGINPKD 370
Sbjct 79  ATIERYKKT CADSSNTGSVSEANAQFYQQEAAKLRVQIGNLQNSNRHMLGESLSALPMKD 138

Query 371  LRGLESRLEKGISRIRSKKNELLFAEIEYMQKREIDLHNNNQLLRAKIAENERKQQNMNL 550
Sbjct 139  LRSLENRLEKGISRIRSKKNELLFAEIEYMQKREIDLHNNNQLLRAKIAENERKQQNINL 198

Query 551  MPGGGNYEIIQSQPFDRNYFQVNALQPTNHYPQQDQMALQLV 679
Sbjct 199  MPGG N+EI+ SQPFD+ NYFQVNALQP NHYP QDQMALQLV
MPGGSNFEIMHSQPFDSRNYFQVNALQPANHYPHQDQMALQLV 241

```

ภาพผนวกที่ 6 ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากยีน *AGAMOUS* homologue ของหนู
ดำกับข้อมูลโปรตีนในฐานข้อมูลของ NCBI

(ก) การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนจากบริเวณนอร์คีย์ถึงปลายด้าน 3' ที่ได้จาก
ไพรเมอร์ AG2degR กับ โปรตีน *AGAMOUS* ของต้นโกโก้ (*T. cacao* L.)

(ข) การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนจากบริเวณนอร์คีย์ถึงปลายด้าน 3' ที่ได้จาก
ไพรเมอร์ Not12T กับ โปรตีน *AGAMOUS* ของต้นโกโก้ (*T. cacao* L.)

ก.

```
>AG5end
AGCTGCCATGGCATAACCCAGCGATTCCCGGGAGACTTCACCGCAGAGGAGAATGGGTAGGGGAAAGAT
CGAGATCAAGCGGATCGAAAACACCACAAATCGCCAAGCCACTTTCTGCAAAAAGAAGAAATGGTTTGCT
CAAGAAAGCCTATGAATTATCTGTTTTATGTGATGCTGAGGTTGCTCTCATC
```

ข.

```
>gb|ABA39727.1| AGAMOUS-like protein [Theobroma cacao]
Length=241
```

```
Score = 112 bits (281), Expect = 2e-30
Identities = 54/61 (89%), Positives = 58/61 (95%), Gaps = 0/61 (0%)
Frame = +2
```

```
Query 8 MAYPSDSRETSPORRMGRGKIEIKRIENTTNRQATFCKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVAL 187
M YP++S ETSPQ++MGRGKIEIKRIENTTNRQ TFCKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVAL
Sbjct 1 MVYPNESCETSPQKKMGRGKIEIKRIENTTNRQVTFCKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVAL 60

Query 188 I 190
I
Sbjct 61 I 61
```

ภาพผนวกที่ 7 ลำดับเบสจากบริเวณอนุรักษ์จนถึงปลายด้าน 5' ของยีน *AGAMOUS* homologue ที่ได้จากสมุดคำ

(ก) ลำดับเบสบริเวณปลาย 5' ที่ได้จากการทำ RACE PCR

(ข) การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนปลายด้าน 5' ที่ได้จากการทำ RACE PCR กับโปรตีน *AGAMOUS* ของต้นโกโก้ (*T. cacao* L.)

ก.

>new contig

```
AGCTGCCATGGCATAACCCAGCGATTCCCGGGAGACTTCACCCGAGAGGAGAATGGGTAGGGGAAAGAT
CGAGATCAAGCGGATCGAAAAACACCACAAATCGCCAAGCCACTTTCTGCAAAAAGAAGAAATGGTTTGCT
CAAGAAAGCCTATGAATTATCTGTTTTATGTGATGCTGAGGTTGCTCTCATCGTATTCTCTAGCCGCGG
TCGCCTCTATGAGTATGCTAATAATAGTGTAAATCTACAATTGAGAGGTACAAGAAAGCATGTGCAGA
TTCATCAAATACTGGATCTGTTTCTGAAGCTAATGCCAGTTCTATCAGCAACAAGCTGCCAAGCTGCG
TGATCAAATTAGCGGCTTGCGAGAAATCAATCAGGAACATGCTGGGTGAATCTCTCGGAGGCATTAATCC
CAAGGACCTTAGGGGCTTGAGAGAGCAGGCTAGAGAAAAGGAATTAGTAGAATTCGGTCCAAAAAGAATGA
GCTGTTGTTTGCAGAGATAGAGTACATGCAAAAAAGGGAAATGATTTGCACAATAATAACCAGCTTCT
CCGAGCGAAGATTGCTGAGAATGAAAGGAAGCAACAGAACATGAATCTGATGCCAGGAGGAGGTAACATA
TGAGATAATTCAGTCTCAGCCATTTGACAATCCAACTATTTTCAAGTCAATGCATTACAACCCACCAA
TCATTATCCACAACAAGATCAAATGGCCCTCCAGTTAGTTAATAAGCTTTGAGAGTGAGCATCAACTT
CTTGCCCTCTATTAGTCTCTGTAGATCAACCTCACGTATTTTACCTTCTGAAAGCTGCAAGTATATATC
TATATATACCAAAAATTTCTTGCATAAATCAAGTTTGCCTGAAAAGCTGGCTGCGCCAGAAATGTGCTAT
CCACCATGTGCTACAAATGTGTACTCCAACCTTAAGACATTTAAGTATTGTTGTAAGACAAGGATTTCTT
TTTTGGATGTTTTAAAAGTACTATGCCATTCTCCCTCCTTAGCCACACAAATAAATCTGCACTGTTACA
TTTTCCCTGTATCCCGAAAAGTCTTC
```

ข.

>gb|ABA39727.1| AGAMOUS-like protein [Theobroma cacao]
Length=241

Score = 415 bits (1067), Expect = 4e-114
Identities = 209/241 (86%), Positives = 222/241 (92%), Gaps = 0/241 (0%)
Frame = +2

Query	8	MAYPSDSRETSPORRMGRGKIEIKRIENTTNRQATFCKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVAL	187
		M YP++S ETSPO++MGRGKIEIKRIENTTNRQ TFCRRNGLLKKAYELSVLCDAEVAL	
Sbjct	1	MVYPNESCETSPOKMMGRGKIEIKRIENTTNRQVTFCKRRNGLLKKAYELSVLCDAEVAL	60
Query	188	IVFSSRGRLYEYANNSVKSTIERYKKCADSSNTGSVSEANAQFYQQQAALRDQISGLQ	367
		IVFSSRGRLYEYANNSVK+TIERYKK CADSSNTGSVSEANAQFYQQ+AAKLR QI LQ	
Sbjct	61	IVFSSRGRLYEYANNSVKATIERYKKTADSSNTGSVSEANAQFYQQEAAKLRVQIGNLQ	120
Query	368	KSIRNMLGESLGGINPKDLRGLSRLEKGISRIRSKKNELLFAEIEYMQKREIDLHNNNQ	547
		S R+MLGESL + KDLR LE+RLEKGISRIRSKKNELLFAEIEYMQKREIDLHNNNQ	
Sbjct	121	NSNRHMLGESLSALPMKDLRSLNLRLEKGISRIRSKKNELLFAEIEYMQKREIDLHNNNQ	180
Query	548	LLRAKIAENERKQQNMNLMPPGGNYEIIQSQPFDPNPNYFQVNALQPTNHYPQQDQMALQL	727
		LLRAKIAENERKQQN+NLMPPG N+EI+ SQPFD+ NYFQVNALQP NHYP QDQMALQL	
Sbjct	181	LLRAKIAENERKQQNINLMPPGNSFEIMHSQPFDSRNYFQVNALQPANHYPHQDQMALQL	240
Query	728	V 730	
		V	
Sbjct	241	V 241	

ภาพผนวกที่ 8 ลำดับเบสจากปลายด้าน 5' จนถึงปลายด้าน 3' ของยีน *AGAMOUS* homologue ที่ได้
จากสุนัขดำ

(ก) ลำดับเบสบริเวณปลาย 5' จนถึงปลายด้าน 3' ของยีน *AGAMOUS* homologue
ที่ได้จากสุนัขดำ

(ข) การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนปลายด้าน 5' จนถึงปลายด้าน 3' ของยีน
AGAMOUS homologue ที่ได้จากสุนัขดำกับโปรตีน *AGAMOUS* ของต้นโกโก้ (*T. cacao* L.)

Document information

Software:	realplex 1.5	
File Name:	EPPENDORF\29.10.10	
Printed by:	EPPENDORF	
Created:	Oct/29/2010 11:04	
Serial No. Thermo Module:	5345 7363	
Serial No. realplex Module.:	630200043	
Acquisition Start Time:	EPPENDORF	Oct/29/2010 13:41
Acquisition End Time:	EPPENDORF	Oct/29/2010 15:31
Last updated:	EPPENDORF	n/a
Background:	tube bioactive	Jan/12/2005 12:04
Color Calibration:	SYBR	Dec/14/2005 13:31
Evaluations for Dye SYBR:		
Evaluation 1:	Quantification	Oct/29/2010 15:37
Evaluation 2:	+/- Assay (PCR Data)	Oct/29/2010 15:37
Evaluation 3:	Gene Identification (PCR Data)	Oct/29/2010 15:37
Evaluation 4:	Relative Quantification	Oct/29/2010 15:38
Evaluation 5:	Melting Curve	Oct/29/2010 15:38
Comment:		

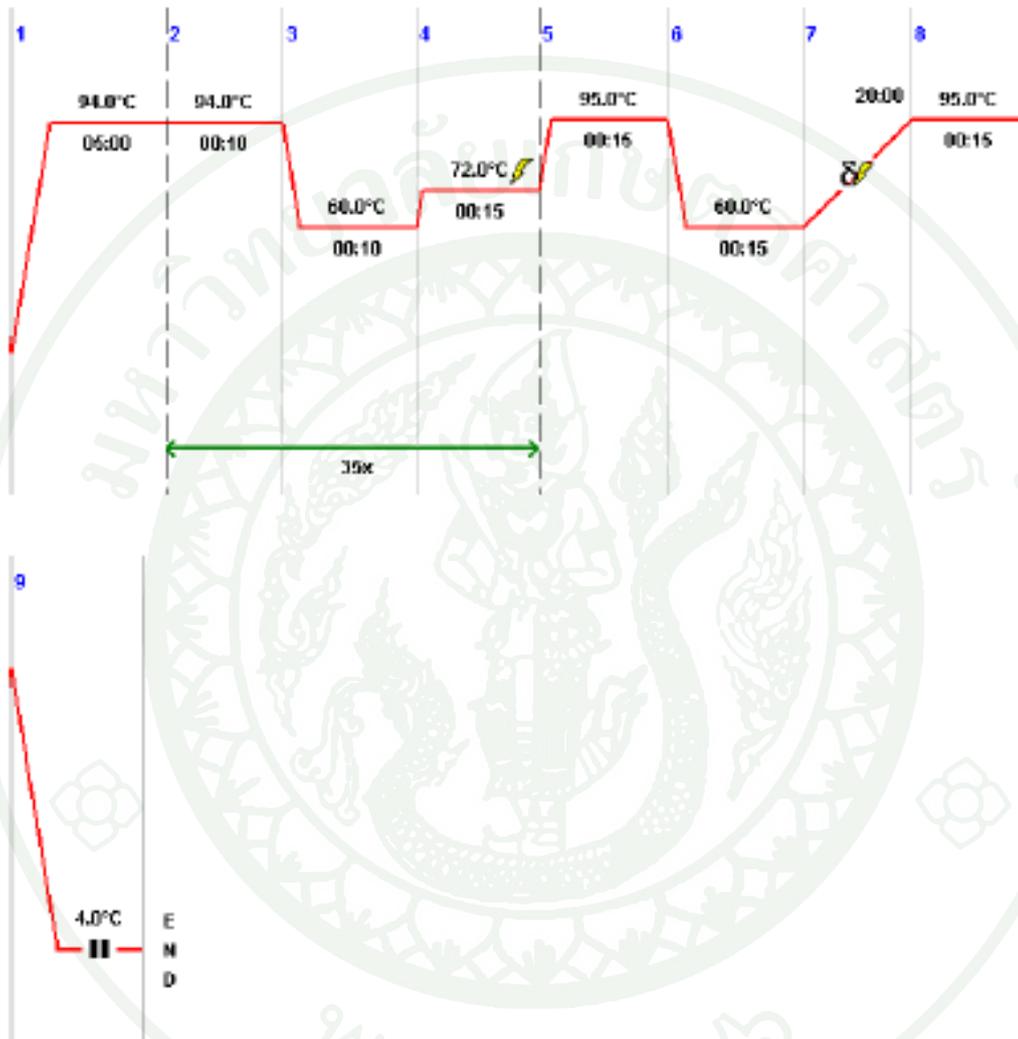
ภาพผนวกที่ 9 ผลการทำ real-time PCR ของยีน AG ในสบู่น้ำ

Plate layout

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B				1-31 g	461 g	ov.1 g	ov.1.1 g	11 g	st.1 g			
C				1-32 g	462 g	ov.2 g	ov.2.2 g	12 g	st.2 g			
D				1-33 g	463 g	ov.3 g	ov.3.3 g	13 g	st.3 g			
E				1-31 c 1. HKG	461 c 1. HKG	ov.1 c 1. HKG	ov.1.1 c 1. HKG	11 c 1. HKG	st.1 c 1. HKG			
F				1-32 c 1. HKG	462 c 1. HKG	ov.2 c 1. HKG	ov.2.2 c 1. HKG	12 c 1. HKG	st.2 c 1. HKG			
G				1-33 c 1. HKG	463 c 1. HKG	ov.3 c 1. HKG	ov.3.3 c 1. HKG	13 c 1. HKG	st.3 c 1. HKG			
H												

ภาพผนวกที่ 9 (ต่อ)

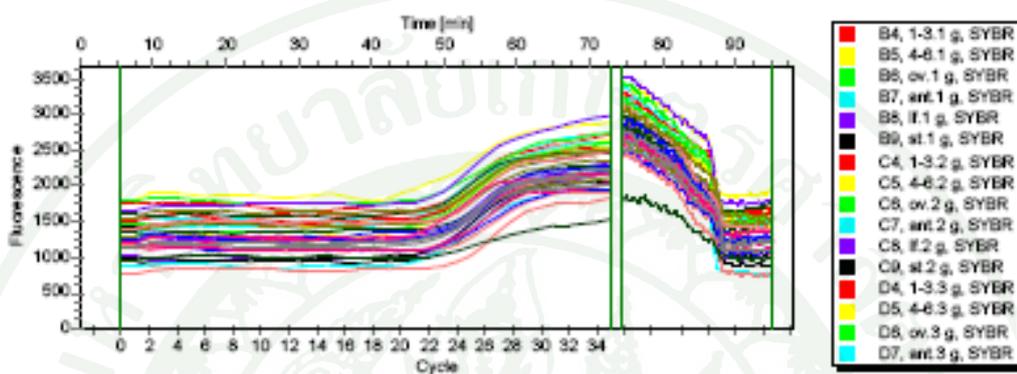
PCR Program



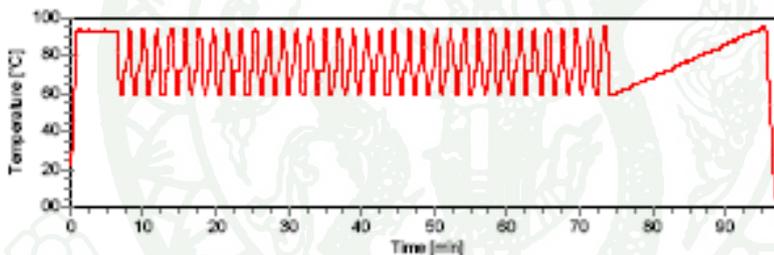
ภาพผนวกที่ 9 (ต่อ)

Raw Data SYBR

Fluorescence Profile



Temperature Profile



ภาพผนวกที่ 9 (ต่อ)

Relative Quantification SYBR

Pos	Name	Ct SYBR	Ct Mean SYBR	Ct Dev. SYBR	Expr. Level SYBR	Range SYBR
1	B4	23.71	24.11	0.40	2.11	1.28 - 3.54
1	B5	23.34	23.15	0.27	2.61	2.14 - 3.18
1	B6	23.51	23.72	0.70	2.84	0.871 - 12.0
1	B7	22.80	23.07	0.41	3.02	2.08 - 4.42
1	B8	23.37	23.64	0.31	1.24	0.558 - 2.77
1	B9	23.88	23.79	0.09		
1	C4	24.50	24.11	0.40	2.11	1.28 - 3.54
1	C5	23.28	23.15	0.27	2.61	2.14 - 3.18
1	C6	24.51	23.72	0.70	2.84	0.871 - 12.0
1	C7	23.34	23.07	0.41	3.02	2.08 - 4.42
1	C8	23.57	23.64	0.31	1.24	0.558 - 2.77
1	C9	23.80	23.79	0.09		
1	D4	24.12	24.11	0.40	2.11	1.28 - 3.54
1	D5	22.84	23.15	0.27	2.61	2.14 - 3.18
1	D6	23.14	23.72	0.70	2.84	0.871 - 12.0
1	D7	23.29	23.07	0.41	3.02	2.08 - 4.42
1	D8	23.98	23.64	0.31	1.24	0.558 - 2.77
1	D9	23.70	23.79	0.09		
1	E4	26.03	25.40	0.83		
1	E5	24.09	24.75	0.09		
1	E6	23.78	25.44	1.96		
1	E7	25.30	24.68	0.36		
1	E8	24.81	24.17	1.11		
1	E9	24.07	24.01	0.05		
1	F4	25.41	25.40	0.83		
1	F5	24.71	24.75	0.09		
1	F6	24.95	25.44	1.96		
1	F7	24.70	24.68	0.36		
1	F8	24.81	24.17	1.11		
1	F9	23.97	24.01	0.05		
1	G4	24.77	25.40	0.83		
1	G5	24.88	24.75	0.09		
1	G6	27.80	25.44	1.96		
1	G7	24.85	24.68	0.36		
1	G8	22.88	24.17	1.11		
1	G9	23.99	24.01	0.05		

Operator: EPPENDORF

EPPENDORF.10.10

8/17

ภาพผนวกที่ 9 (ต่อ)

Melting Curve SYBR

Pos	Name	No. Tm SYBR	Tm(x) (°C) SYBR	Mean SYBR	Dev. SYBR
74	1-3.1 g	1	81.8	81.5	0.3
75	4-6.1 g	1	81.4	81.3	0.2
76	ov.1 g	1	81.2	81.0	0.2
77	ent.1 g	1	81.4	81.2	0.2
78	tl.1 g	1	81.4	81.3	0.1
79	sl.1 g	1	81.7	81.4	0.2
80	1-3.2 g	1	81.3	81.5	0.3
81	4-6.2 g	1	81.3	81.3	0.2
82	ov.2 g	1	80.9	81.0	0.2
83	ent.2 g	1	81.0	81.2	0.2
84	tl.2 g	1	81.2	81.3	0.1
85	sl.2 g	1	81.4	81.4	0.2
86	1-3.3 g	1	81.3	81.5	0.3
87	4-6.3 g	1	81.1	81.3	0.2
88	ov.3 g	1	80.9	81.0	0.2
89	ent.3 g	1	81.1	81.2	0.2
90	tl.3 g	1	81.2	81.3	0.1
91	sl.3 g	1	81.2	81.4	0.2
92	1-3.1 c	1	82.4	82.6	0.2
93	4-6.1 c	1	82.1	82.2	0.2
94	ov.1 c	1	82.2	82.1	0.1
95	ent.1 c	1	82.3	82.3	0.1
96	tl.1 c	1	82.2	82.4	0.1
97	sl.1 c	1	82.2	82.5	0.3
98	1-3.2 c	1	82.5	82.6	0.2
99	4-6.2 c	1	82.4	82.2	0.2
100	ov.2 c	1	82.1	82.1	0.1
101	ent.2 c	1	82.2	82.3	0.1
102	tl.2 c	1	82.4	82.4	0.1
103	sl.2 c	1	82.6	82.5	0.3
104	1-3.3 c	1	82.8	82.6	0.2
105	4-6.3 c	1	82.1	82.2	0.2
106	ov.3 c	1	82.1	82.1	0.1
107	ent.3 c	1	82.3	82.3	0.1
108	tl.3 c	1	82.4	82.4	0.1
109	sl.3 c	1	82.8	82.5	0.3

Operator: EPPENDORF

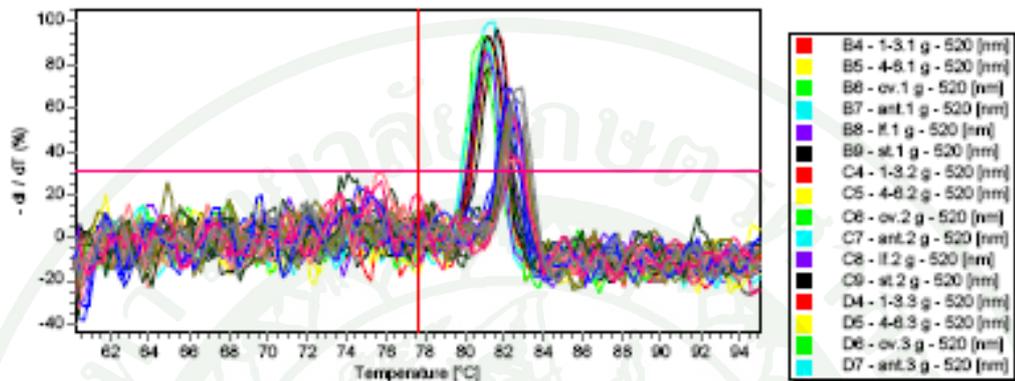
EPPENDORF/29.10.10

10/17

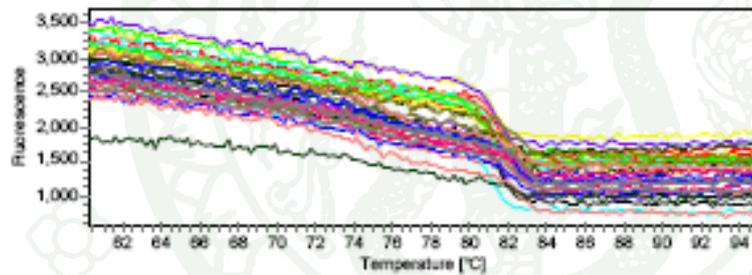
ภาพผนวกที่ 9 (ต่อ)

Pos	Name	No. Tin SYBR	Tm(s) (°C) SYBR	Mean SYBR	Dev. SYBR
-----	------	--------------	-----------------	-----------	-----------

Melting curve



Threshold 32%



ภาพผนวกที่ 9 (ต่อ)

ตารางผนวกที่ 1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษา

Primer's name	Nucleotide sequence
JcAGF1	5'-GCG CGA ATT CGG NAA RAT HGA RAT HAA-3'
JcAGR1	5'-GCG CAA GCT TTT YTG CAT RTA NTC DAT-3'
AG2degR	5'-AAC AAG TTG ARR ARM HRK TTG ATC-3'
nJcAgF	5'-AAT CTC TCG GAG GCA TTA AT-3'
Not12T	5'-GAG CGG CCG CTT TTT TTT TTT T-3'
nAgR5	5'-GCA TAC TCA TAG AGG CGA CCG CGG C-3'
JCAGA2	5'- AGA GCA ACC TCA GCA TCA CAT -3'
start	5'- ATG GCA TAC CCC AGC GAT TCC C -3'
stop	5'- AAC TAA CTG GAG GGC CAT TTG ATC TTG -3'

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ นางสาวปุณยาพร บริเวธานันท์
เกิดวันที่ 28 พฤศจิกายน พ.ศ. 2527
สถานที่เกิด เขตยานนาวา จังหวัดกรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา วท.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

