



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

ปริญญา

พันธุศาสตร์

พันธุศาสตร์

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การโคลนและศึกษาการแสดงออกของ *flavonol synthase / anthocyanidin synthase*
ในกล้วยไม้สกุลหวาย และสกุลแอสโคเซนด้า

Molecular cloning and expression of *flavonol synthase / anthocyanidin synthase* in
Dendrobium and *Ascocenda* orchids

นามผู้วิจัย นายประดิพันธ์ ทองแถม ณ ออยุธยา

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์พัฒนา ศรีฟ้า สุนเนอร์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์อมรา ทองปาน, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์เลิศลักษณ์ เงินศิริ, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การโคลนและศึกษาการแสดงออกของ *flavonol synthase* / *anthocyanidin synthase* ในกล้วยไม้
สกุลหวาย และสกุลแอสโคเซนด้า

Molecular Cloning and Expression of *flavonol synthase* / *anthocyanidin synthase* in *Dendrobium*
and *Ascocenda* orchids

โดย

นายประดิพันธ์ ทองแถม ณ อุษยา

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

พ.ศ. 2552

ประคิพันธ์ ทองแถม ณ อยุธยา 2552: การโคลนและศึกษาการแสดงออกของ *flavonol synthase / anthocyanidin synthase* ในกล้วยไม้สกุลหวาย และสกุลแอสโคเซนด้า
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์) สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: รองศาสตราจารย์พัฒนา ศรีฟ้า สุนเนอร์, Ph.D. 93 หน้า

ยีน *anthocyanidin synthase (ans)* จากกล้วยไม้ 2 สกุล ได้แก่ กล้วยไม้หวายโซเนียเอียสกุล (*Dendrobium Sonia Earsakul*) และกล้วยไม้แอสโคเซนด้าพริ้นเซสมิกาสา (*Ascocenda Princess Mikasa*) ถูกนำมาโคลนและวิเคราะห์ชนิดของยีน โดยเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในฐานข้อมูล ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการถอดรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ans* ที่โคลนได้ มีความคล้ายคลึงกับ โปรตีน flavonol synthase (FLS) 63 - 76 % คล้ายคลึงกับโปรตีน anthocyanidin synthase (ANS) 45 - 86 % และคล้ายคลึงถึง 86 % กับ ANS กับกล้วยไม้ออนซิเดียม จึงทำให้ไม่สามารถสรุปได้อย่างชัดเจนว่ายีน *ans* ที่โคลนได้นี้คือยีน *ans* หรือ *fls* การแสดงออกของยีน *ans/fls* ในเนื้อเยื่อราก ใบ ดอกตูม และดอกบานของกล้วยไม้ทั้งสองสกุล เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค dot blot hybridization และ qPCR พบว่ามีการแสดงออกมากของยีนมากที่สุด ในเนื้อเยื่อของดอกตูม เมื่อทำการตรวจสอบสารสีในดอกด้วยวิธี thin – layer chromatography (TLC) พบว่าดอกกล้วยไม้หวายโซเนียเอียสกุลสีม่วงแดง และดอกกล้วยไม้แอสโคเซนด้าพริ้นเซสมิกาสาสีชมพู มีไซยานิดิน เป็นองค์ประกอบหลักของสารสีแอนโทไซยานิน อย่างไรก็ตามไซยานิดิน และเดลฟินิดินจัดเป็นสารสีที่มีผลทำให้เกิดสีม่วงน้ำเงินในดอกกล้วยไม้แอสโคเซนด้าพริ้นเซสมิกาสาน้ำเงิน

Pradipunt Thongtam na Ayudhaya 2009: Molecular Cloning and Expression of *flavonol synthase / anthocyanidin synthase* in *Dendrobium* and *Ascocenda* orchids.

Master of Science (Genetics), Major Field: Genetics, Department of Genetics.

Thesis Advisor: Associate Professor Pattana Srifah Hunhne, Ph.D. 93 pages.

Anthocyanidin synthase gene (*ans*) from two orchid genera, i.e., *Dendrobium* Sonia Earsakul and *Ascocenda* Princess Mikasa was successfully cloned and identified by the nucleotide sequences in the database. The amino acid sequences derived from the nucleotide sequences of these cloned genes were found to be 63 - 76 % similar to flavonol synthase (FLS) and 45 - 86 % similar to anthocyanidin synthase (ANS) in the database and as high as 86 % similar to ANS of *Oncidium* orchid, thus, making this cloned gene ambiguous between *ans* and *fls* (*ans/fls*). Gene expression of *ans/fls* in the two orchid species were determined using dot blot hybridization and qPCR in different tissues (root, leaf, flower bud and flower) and was found to have the highest expression in flower bud. Thin – layer chromatography (TLC) results indicated that cyanidin is the main anthocyanin compounds in the *Dendrobium* Sonia Earsakul purple flower and *Ascocenda* Princess Mikasa pink. However cyanidin and delphinidin are the major pigments contributing to the colorful bluish purple of *Ascocenda* Princess Mikasa blue orchid.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พัฒนา ศรีฟ้า สุนเนอร์ ประธานกรรมการ
ที่ปรึกษา ที่ได้ช่วยเหลือวางแผนงานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนให้คำแนะนำและตรวจ
แก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อมรา ทองปาน กรรมการที่พิจารารอง

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และนักวิจัยของสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวก
ในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้จนสำเร็จ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ให้ทุนการศึกษานับสนุนในการทำ
วิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบคุณคุณจิตติ รัตนเพียรชัย ประธานกรรมการ บริษัททอकिเม็กซ์ ไทยแลนด์ จำกัด ที่
ให้การสนับสนุนตัวอย่างของต้นและดอกกล้วยไม้

ขอขอบคุณเพื่อน พี่ น้อง ในภาควิชาพันธุศาสตร์ และคุณณฤทัย วันชูเพลลา และ คุณนวนิตย์
คล่องแคล่ว ที่คอยให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้มาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอกราบขอพระคุณเป็นอย่างสูงสำหรับคุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัวที่
ให้ความรักและกำลังใจ ให้การสนับสนุนในการศึกษาตลอดมา

ประดิพันธ์ ทองแถม ณ อยุธยา

พฤษภาคม 2552

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	13
ผลและวิจารณ์	31
สรุปและข้อเสนอแนะ	67
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	68
ภาคผนวก	77
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	93

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตำแหน่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สำคัญบนยีน <i>ans/fls</i> ของกล้วยไม้หวายไซเนีย เอียสกุลและกล้วยไม้แอสโคเซินด้า มิกาซา	47
2	ผลการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของกรดอะมิโนองค์ประกอบของยีน <i>ans/fls</i> ของดอกกล้วยไม้หวายและแอสโคเซินด้ากับพืชชนิดอื่น	53
3	ผลของสารละลายตัวพาต่อการแยกสารสีดอกกล้วยไม้โดยใช้วิธี TLC	62
ตารางผนวกที่		
1	โครงสร้างของสารแอนโทไซยานิน	87
2	การเกิดสีของฟลาโวนอยด์เมื่อทำปฏิกิริยากับสารต่าง ๆ	88
3	ค่า expression ratio ที่ได้จากการทำ qPCR โดยคำนวณค่าตามวิธีการของ Livak and Schmittgen (2001)	89
4	ค่า expression ratio ที่ได้จากการทำ qPCR จากเครื่อง Realplex	90

สารบัญญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	เจลอิเล็กโทรโฟริซิสของการสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธี LiCl	33
2	ขนาดชิ้นของดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ANS(S)390 และ (T ₁₂)BamHI	35
3	เจลอิเล็กโทรโฟริซิสของขนาดชิ้นดีเอ็นเอยีน <i>ans</i> ที่สังเคราะห์ได้จากอาร์เอ็นเอของกล้วยไม้หวายโชนิเยียสกุล และ กล้วยไม้มีกาชา	36
4	Phenol – Chloroform Screening ของพลาสมิดสายผสม	37
5	พลาสมิดที่ได้รับยีนจากการทำการสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkali lysis	38
6	พลาสมิด p-GEMT easy ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ <i>EcoRI</i>	39
7	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนที่ 64 ที่แยกมาได้จากดอกกล้วยไม้หวายโชนิเยียสกุล <i>Dendrobium Sonia Earsakul</i>	41
8	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนที่ 219 ที่แยกมาได้จากดอกกล้วยไม้แอสโคเซินด้า <i>Ascocenda Princess Mikasa (blue)</i>	42
9	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนที่ 251 ที่แยกมาได้จากดอกกล้วยไม้แอสโคเซินด้า <i>Ascocenda Princess Mikasa (white)</i>	43
10	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนที่ 313 ที่แยกมาได้จากดอกกล้วยไม้แอสโคเซินด้า <i>Ascocenda Princess Mikasa (pink)</i>	44
11	การวิเคราะห์ multiple alignment ระหว่างโปรตีนของยีน <i>ans/fls</i> ในดอกกล้วยไม้หวายและแอสโคเซินด้ามีกาชา	45
12	ตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะของยีน <i>ans/fls</i> ที่แยกจากกล้วยไม้หวายโชนิเยียสกุล (ก.) กล้วยไม้มีกาชาสีน้ำเงิน (ข.) กล้วยไม้มีกาชาสีขาว (ค.) และกล้วยไม้มีกาชาสีชมพู (ง.)	47
13	การวิเคราะห์ multiple alignment ระหว่างโปรตีนของยีน <i>ans/fls</i> ในดอกกล้วยไม้หวายและแอสโคเซินด้ากับโปรตีน FLS และ ANS ในพืชอื่น	48
14	Phylogenetic tree แสดงระดับความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนองค์ประกอบระหว่างโปรตีน ANS และ FLS ในดอกกล้วยไม้หวายและแอสโคเซินด้ากับโปรตีนในกลุ่มเดียวกับของพืชชนิดอื่น	56
15	Dot blot hybridization ของยีน <i>ans/fls</i> ในส่วนต่างๆ ของเนื้อเยื่อกล้วยไม้	57

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
16	ระดับการแสดงออกของยีน <i>ans/fls</i> ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของกล้วยไม้ 4 ชนิด	59
17	Southern blot hybridization ของกล้วยไม้หวาย โชนิเยียสกุลและแอสโคเซ็นดามี กาศาสีน้ำเงิน ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>EcoRI</i> , <i>HindIII</i> และ <i>HincII</i>	60
18	โครมาโตแกรมของการตรวจสอบสารสีจากดอกกล้วยไม้มีกาศาสีน้ำเงิน (MB) มีกาศาสีชมพู (MP) หวาย โชนิเยียสกุล (Ear) และ กล้วยไม้กสุลหวายสีม่วง (DV) ตามลำดับด้วย TLC	61
19	โครมาโตแกรมของการตรวจแยกสารสีของดอกไม้ 7 ชนิด ที่สกัดด้วยเมธานอล : กรดเกลือ (99 : 1) และใช้บิวทานอล : กรดอะซิติก : น้ำกลั่น (4 : 1 : 2) เป็น สารละลายตัวพา	64
ภาพผนวกที่		
1	ลักษณะวง A และ B ซึ่งเป็นโครงสร้างของฟลาโวนอยด์	78
2	กระบวนการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานิน	79
3	กระบวนการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ซึ่งให้สาร <i>kampferol</i> , <i>quercetin</i> และ <i>myricetin</i> ที่เป็นสาร substrate ที่จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารแอนโทไซยานินสีต่างๆ	80
4	ผลของหมู่ไฮดรอกซิล หรือหมู่เมทอกซิล ต่อการเกิดการเปลี่ยนแปลงของสี	81
5	ผลของ pH ต่อการเปลี่ยนแปลงสีรงควัตถุ	81
6	การเกิด anthocyanin interactions	82
7	กระบวนการสร้างสาร anthocyanidin โดยเอนไซม์ anthocyanidin synthase (ANS) ในขั้นตอนสุดท้ายของการสร้างแอนโทไซยานินก่อนการเติมน้ำตาลด้วยเอนไซม์ flavonoid 3-glucosyl transferase	82
8	กระบวนการสร้างสารฟลาโวนอยด์	83
9	กระบวนการสร้างสาร flavonol โดยเอนไซม์ flavonol synthase	84
10	การทำ thin – layer chromatography	84
11	แผนที่ยีนของพลาสมิด pGEM-T easy	85
12	ความแตกต่างของการทำหน้าที่ของเอนไซม์ ANS และ FLS	85
13	ข้อมูลดิบที่ได้จากการทำ qPCR	86

การโคลนและศึกษาการแสดงออกของ *flavonol synthase* / *anthocyanidin synthase* ใน
กล้วยไม้ สกุลหวาย และสกุลแอสโคเซนต้า

Molecular Cloning and Expression of *flavonol synthase* / *anthocyanidin synthase*
in *Dendrobium* and *Ascocenda* orchids

คำนำ

กล้วยไม้เป็นไม้ดอกที่สำคัญของประเทศไทย ซึ่งเป็นที่ยอมรับจากต่างประเทศว่าประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตกล้วยไม้เมืองร้อนที่สำคัญของโลก (สมชายและคณะ, 2535) มีการปลูกเลี้ยงคิดเป็นพื้นที่ประมาณ 17,500 ไร่ และทำรายได้ให้กับอุตสาหกรรมกล้วยไม้ ทั้งจากการใช้บริโภคภายในประเทศ และการส่งออกประมาณปีละ 2,000 ล้านบาท โดยในปี พ.ศ. 2545 มีการส่งออกดอกกล้วยไม้คิดเป็นมูลค่าประมาณ 1,653 ล้านบาท และส่งออกต้นกล้วยไม้คิดเป็นมูลค่าประมาณ 332.5 ล้านบาท (ครรชิต, 2547) แต่ปัญหาที่สำคัญที่เกิดกับตลาดกล้วยไม้ในประเทศไทยปัจจุบันคือ มีการผลิตกล้วยไม้มาจากทุกมุมโลก การแข่งขันเริ่มสูงขึ้น ทำให้เกิดการพัฒนาทั้งด้านคุณภาพและพันธุ์ใหม่ที่แปลกตา

จากการที่กล้วยไม้ในประเทศไทยกำลังเผชิญปัญหาการขาดแคลนกล้วยไม้พันธุ์ใหม่ๆ ส่งผลให้ราคากกล้วยไม้ในปัจจุบันต่ำลงเรื่อยๆ จนอาจถึงภาวะขาดทางแก้ไขก็คือการแสวงหาพันธุ์ใหม่เพื่อรักษาตลาดการส่งออกกล้วยไม้ไทยไว้ ซึ่งวิธีที่นิยมใช้ก็คือ การผสมเกสรข้ามสายพันธุ์ ซึ่งต้องใช้เวลานานถึง 3-4 ปี ในการผสมพันธุ์ เพาะเมล็ด ไปจนถึงการออกดอก โอกาสที่ได้พันธุ์ใหม่ก็มีความไม่แน่นอน อีกทั้งต้องการเนื้อที่สำหรับการเพาะเลี้ยงต้นอ่อนจำนวนมากเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ลูกผสม ทำให้สิ้นเปลืองเงิน วัสดุ และเนื้อที่จำนวนมาก ลูกผสมที่ได้ อาจมีการเปลี่ยนแปลงในเรื่องของรูปร่าง ขนาด ความคงทนแข็งแรง และอายุในการปักแจกันของดอกกล้วยไม้ การแก้ปัญหานี้ทำได้โดย หาเทคนิคการปรับปรุงพันธุ์ของดอกกล้วยไม้ โดยเฉพาะสีของดอกกล้วยไม้ให้มีความหลากหลายมากขึ้นในกล้วยไม้พันธุ์เดิม ซึ่งต้องเป็นวิธีทางพันธุวิศวกรรมที่มีประสิทธิภาพและรวดเร็ว โดยเปลี่ยนแปลงโดยตรงกับยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะที่ต้องการ ในปัจจุบันนักวิจัยในประเทศสหรัฐอเมริกา นิวซีแลนด์ จีน ไต้หวัน และญี่ปุ่น ได้ศึกษาเกี่ยวกับการปรับปรุงสายพันธุ์ดอกกล้วยไม้ให้มีสีสรรหลากหลายมากขึ้น เนื่องจากในธรรมชาติ พืชเศรษฐกิจบางชนิดขาดความหลากหลายของสีดอก กล้วยไม้สกุลหวายที่เป็นไม้ตัดดอกที่สำคัญของประเทศไทย ซึ่งมีข้อจำกัด

ในด้านสีดอกเช่นกัน โดยพบเฉพาะสีม่วงแดงและสีขาว ดังนั้นเทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรมจึงเข้ามามีบทบาทในการปรับปรุงพันธุ์พันธุ์กล้วยไม้ในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาและโคลนยีน *anthocyanidin synthase (ans)* จากดอกกล้วยไม้สกุลหวาย และสกุล แอสโคเซนด้า ที่มีอิทธิพลต่อการเกิดเป็นระดับสีที่แตกต่างกันในดอกไม้
2. ศึกษาความแตกต่างของลำดับเบสของยีน *ans* ของกล้วยไม้กับพืชชนิดอื่น
3. ศึกษาการแสดงออกของยีนในดอกกล้วยไม้ที่มีสีแตกต่างกันเพื่อตรวจวิเคราะห์ยีนที่ กลายในกล้วยไม้ต่างพันธุ์ เพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงสีดอกของกล้วยไม้ต่อไปในอนาคต
4. ศึกษาองค์ประกอบของสารสีในดอกกล้วยไม้สีต่างๆ

การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทั่วไปของกล้วยไม้

กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวจัดอยู่ในวงศ์ Orchidaceae ซึ่งเป็น 1 ใน 3 ของวงศ์ที่มีจำนวนชนิดพืชมากที่สุดในโลก มีวิวัฒนาการและการปรับตัวอย่างสูงในหลายรูปแบบจึงสามารถกระจายพันธุ์อยู่ได้ทั่วทุกภูมิภาคของโลก บางชนิดพบเฉพาะถิ่น บางชนิดพบทั่วไปในระดับประเทศ ระดับทวีปหรือระดับโลก จากการสำรวจพบกล้วยไม้ที่ขึ้นบนต้นไม้ (epiphyte) ร้อยละ 70 ขึ้นตามพื้นป่า (terrestrial) ร้อยละ 25 และอีกร้อยละ 5 พบขึ้นบนวัสดุได้หลายชนิด แม้กระทั่งหิน คาดว่ามีต้นกล้วยไม้ประมาณ 17,000-35,000 ชนิด ปัจจุบันสำรวจพบและจำแนกได้มากกว่า 800 สกุล ประมาณ 25,000 ชนิด (Dressler, 1993) แหล่งกำเนิดกล้วยไม้ที่สำคัญของโลกมี 2 แหล่งใหญ่ ๆ ด้วยกันคือ ลาตินอเมริกากับเอเชียแปซิฟิก สำหรับลาตินอเมริกาเป็นอาณาบริเวณระหว่างอเมริกากลางติดต่อกับเขตเหนือของอเมริกาใต้ ส่วนแหล่งกำเนิดกล้วยไม้ในเขตภูมิภาคเอเชียและแปซิฟิกนั้นมีประเทศไทยเป็นศูนย์กลาง จากการค้นพบประเทศไทยมีพันธุ์กล้วยไม้ป่าเป็นจำนวนมาก ประมาณ 1,125 ชนิด จาก 177 สกุล (จิตราพรธม, 2546) แสดงให้เห็นว่าประเทศไทยมีสภาพแวดล้อมที่เอื้ออำนวยต่อการเจริญงอกงามของกล้วยไม้มากและกล้วยไม้ป่าที่พบในภูมิภาคแถบนี้มีลักษณะเด่นที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัวแตกต่างจากกล้วยไม้ในลาตินอเมริกา (มาลินี, 2542) ลักษณะทั่วไปของกล้วยไม้ ประกอบด้วยส่วนที่เป็นลำต้น ราก ใบ ดอก และผลหรือที่เรียกว่าฝัก ดอกกล้วยไม้จัดเป็นดอกสมบูรณ์เพศคือ มีทั้งเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียอยู่ในดอกเดียวกัน นอกจากนี้เกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียยังอยู่บนส่วนเดียวกันเรียกว่า เส้าเกสร แม้ว่ากล้วยไม้จะมีดอกสมบูรณ์เพศแต่ก็มักจะไม่ได้ผสมตัวเอง เนื่องจากเกสรตัวผู้อยู่ในอับที่มีฝาปิดต้องให้แมลงหรือคนช่วยในการผสมเกสร (ระพี, 2530) กล้วยไม้เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว มีทั้งที่ชอบความชุ่มชื้นและที่ทนแล้ง ให้ดอกที่มีสีสันสวยงามแปลกตา มีขนาด รูปร่างและลักษณะหลากหลายเป็นอันมาก เป็นพืชที่มีวิวัฒนาการและการปรับตัวอย่างสูงในหลายรูปแบบ เช่น สามารถเก็บน้ำและอาหารไว้ในส่วนต่างๆ ของลำต้นเพื่อใช้ในภาวะวิกฤติ สามารถพัฒนาอวัยวะที่เกี่ยวกับการผสมเกสรให้เหมาะสมกับพาหะต่างๆ อีกทั้งยังสามารถสืบพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ ทำให้สามารถกระจายพันธุ์ได้ในทุกภูมิภาคของโลก ดำรงชีวิตอยู่รอดและเจริญเผ่าพันธุ์ได้แม้ในสภาพธรรมชาติวิกฤติที่ไม่เอื้ออำนวยต่อพืชชนิดอื่น

กล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium* spp.) เป็นกล้วยไม้สกุลใหญ่ที่สุด มีการแพร่กระจายพันธุ์ ออกเป็นบริเวณกว้าง นักพฤกษศาสตร์ได้จำแนกกล้วยไม้สกุลนี้ออกเป็นหมู่ประมาณ 20 หมู่ จากการรวบรวมกล้วยไม้ชนิดนี้ที่ค้นพบแล้วได้ประมาณ 1,000 ชนิดพันธุ์ โดยมีลักษณะการเจริญเติบโตแบบฐานร่วม (sympodial) คือ เมื่อดำต้นเจริญเติบโตเต็มที่แล้วจะแตกหน่อเป็นลำต้นใหม่ และเติบโตเป็นกอ ระบบรากเป็นแบบกิ่งอากาศ มีรูปร่างลักษณะทั้งดอก ใบ และลำลูกกล้วยแตกต่างกันออกไปอย่างกว้างขวาง กล้วยไม้สกุลหวายมีกลีบชั้นนอกที่มีขนาดยาวไล่เลี่ยกัน กลีบนอกคู่ล่างจะเชื่อมติดกับฐานของเส้าเกสร และที่รอยต่อนี้จะปลุกออกมา เรียกว่า เดือยดอก มีเรณู 4 ก้อน ติดอยู่ที่ปลายของเส้าเกสร จำนวนก้อนเรณูนี้เป็นลักษณะสำคัญที่นักพฤกษศาสตร์ใช้แบ่งกล้วยไม้สกุลหวายกับสกุลอื่นี้ออกจากกัน เพราะกล้วยไม้สกุลอื่นี้อมีเรณู 8 ก้อน (มาลินี, 2542)

กล้วยไม้สกุลหวาย มีลักษณะการเจริญเติบโตแบบซิมโพเดียล คือ มีลำลูกกล้วย เมื่อดำต้นเจริญเติบโตเต็มที่แล้วจะแตกหน่อเป็นลำต้นใหม่และเป็นกอ ใบแข็งแรงสีเขียว ดอกมีลักษณะทั่วไปของกลีบชั้นนอกคู่บนและคู่ล่างขนาดยาวพอ ๆ กัน โดยกลีบชั้นนอกบนจะอยู่อย่างอิสระเดี่ยวๆ ส่วนกลีบชั้นนอกคู่ล่างจะมีส่วนโคน ซึ่งมีลักษณะยื่นออกไปทางด้านหลังของส่วนล่างของดอกประสานเชื่อมติดกับฐานหรือสันหลังของเส้าเกสร และส่วนโคนของกลีบชั้นนอกคู่ล่างและส่วนฐานของเส้าเกสรซึ่งประกบกันจะปลุกออกมา มีลักษณะคล้ายเดือยที่เรียกว่า “เดือยดอก” สำหรับกลีบชั้นในทั้งสองกลีบมีลักษณะต่างๆ กันแล้วแต่ชนิดพันธุ์ของกล้วยไม้นั้นๆ

กล้วยไม้แอสโคเซนด้า (*Ascocenda*) เป็นกล้วยไม้ลูกผสมระหว่างสกุลเข็มกับสกุลแวนด้า ซึ่งจะทำให้ได้กล้วยไม้ที่มีสีสรรสวยงามขึ้น ออกดอกดกขึ้น ดอกบานทนและปลุกเลี้ยงง่ายขึ้น ขนาดของดอกจัดอยู่ในประเภทดอกขนาดกลาง ช่อดอกรูปทรงกระบอกตั้ง

2. รงควัตถุในดอกไม้

สีของดอกไม้เกิดจากรงควัตถุชนิดต่าง ๆ แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) กลุ่มคาโรทีนอยด์ (carotenoid) และกลุ่มเบตาเลน (betalain) คาโรทีนอยด์ให้สีเหลืองและสีส้ม เช่น ในดอกทานตะวันและผลมะเขือเทศ (Bartley and Scolnik, 1995) เบตาเลนให้ระดับสีเหลืองจนถึงสีแดง โดยจะพบได้เฉพาะในพืชกลุ่ม caryophyllales (Mol *et al.*, 1998) ฟลาโวนอยด์เป็นรงควัตถุหลักในการสร้างสีดอกไม้ให้ระดับเหลืองไปจนถึงสีแดง สีม่วงและสีน้ำเงิน

องค์ประกอบของฟลาโวนอยด์มีอะโรมาติกคาร์บอน 2 วง (A และ B) (ภาคผนวกที่ 1) ต่อเข้ากับคาร์บอน 3 อะตอม ซึ่งตำแหน่งและจำนวนของการเกิดออกซิเดชันที่คาร์บอน 3 อะตอม นั้น

ก่อให้เกิดฟลาโวนอยด์ชนิดต่างๆ กันเช่น ฟลาโวน (flavone) ฟลาวาโนน (flvanone) ฟลาโวนอล (flavonol) ออโรน (aurone) แอนโทไซยานิน (anthocyanidin) และ ซาลิโคน (chalcone) เป็นต้น โดยสารแต่ละชนิดจะให้สีที่แตกต่างกัน แอนโทไซยานินจัดเป็นรงควัตถุกลุ่มใหญ่ที่สุดในกลุ่มของฟลาโวนอยด์ที่มีการสะสมอยู่ในแวคิวโอลของเซลล์ให้ได้ทั้งสีแดง สีแดงเลือดหมู สีม่วงเงิน สีม่วง และสีเหลือง แบ่งตามลักษณะทางโครงสร้างทางเคมีออกเป็น 10 กลุ่มย่อย ได้แก่ ออแรนทีนิน (aurantinidin) ไซยานิน (cyanidin) เดลฟินิดิน (delphinidin) ยูโรปินิน (europinidin) ลูทีโอ-นิน (luteolinidin) เพลาโกนิน (pelargonidin) มาลิวิดิน (malvidin) เพโอนิน (peonidin) พิทูนิน (petunidin) และโรซินิน (rosinidin) ซึ่งแตกต่างกันตามจำนวนและตำแหน่งของหมู่ไฮดรอกซิลที่วงอะโรมาติก (ตารางผนวกที่ 1) และชนิดของหมู่น้ำตาลที่เข้ามาจับ ซึ่งทำให้สารในกลุ่มแอนโทไซยานินมีความหลากหลาย มากกว่า 300 ชนิด โดยสารแอนโทไซยานินที่พบมากที่สุดคือ ไซยานิน (Kong *et al.*, 2003) และหมู่ไฮดรอกซิลที่เพิ่มขึ้นจะมีผลในการเปลี่ยนความยาวคลื่นในการดูดกลืนแสง (Forkmann, 1991; Stevenson, 1991; Van Tunen *et al.*, 1991)

สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์นี้ยังมีความสำคัญต่อกระบวนการต่างๆ ของพืช ได้แก่ การเกิดสีต่างๆ ของดอกเพื่อเรียกแมลงให้เกิดการผสมเกสร การตอบสนองต่อฮอร์โมนต่างๆ การป้องกันรังสี UV-B และ การตอบสนองต่อแสงในฤดูใบไม้ร่วงที่มีผลต่อการร่วงของใบ ต่อต้านเชื้อโรคต่างๆ (Holton and Cornish, 1995; Dixon and Steele 1999) นอกจากนี้คุณสมบัติเหล่านี้แล้ว ยังมีคุณสมบัติที่สำคัญคือ เป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระซึ่งนำมาใช้เป็นอาหารเสริมในคนอีกด้วย (Pietta, 2000; Potapovich and Kostyuk, 2003)

การศึกษาสมบัติทางเคมีของฟลาโวนอยด์ในด้านโครงสร้าง การกระจายตัว การสกัดให้บริสุทธิ์ และการชี้บ่งคุณลักษณะด้วยวิธีการทางเคมีและฟิสิกส์ เช่น การใช้ proton-NMR และคุณสมบัติการดูดกลืนแสง ทำให้ทราบว่าฟลาโวนอยด์จัดเป็นสารประกอบพวกฟีนิลโพรพานอยด์ (phenyl-propanoid) ละลายได้ในน้ำและเก็บสะสมในแวคิวโอลของเซลล์โดยเฉพาะในเซลล์ epidermis ของกลีบดอก การสังเคราะห์สีของดอกไม้เริ่มต้นจากกรดอะมิโนเฟนิลอลานิน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีลักษณะเป็นวงเกิดการเปลี่ยนแปลงกลายเป็นวง B ของโครงสร้างฟลาโวนอยด์ ส่วนวง A นั้นได้มาจาก malonyl CoA ช่วงแรกของการสร้างฟลาโวนอยด์เป็นกระบวนการสังเคราะห์ฟีนิลโพรพานอยด์พวก lignin, cinnamic, ester, coumarin และ phytoalexin โดยขั้นตอนแรกเริ่มต้นที่กระบวนการดีอะมิเนชันของเฟนิลอลานิน โดยมีเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase (PAL) ทำให้เกิดสารพวก transcinnamic acid ขั้นตอนที่สองคือการเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 4 โดยเอนไซม์ cinnamate 4-hydroxylase (C4H) ซึ่งจะได้ผลผลิตเป็น *p*-coumaric acid ขั้นตอนต่อมาคือการสร้าง 4-coumaroyl-CoA โดยเอนไซม์ 4-coumarate : CoA ligase (4CL) ซึ่งถือว่าเป็นขั้นตอน

สุดท้ายของกระบวนการสร้างฟีนิลโพรพานอยด์ ต่อมาจะเกิดการรวมตัวของฟีนิลโพรพานอยด์กับ malonyl CoA 3 โมเลกุล โดยเอนไซม์ chalcone synthase (CHS) ทำให้ได้สารสีเหลืองคือ tetrahydrochalcone จากนั้นจะเกิดการไอโซเมอไรเซชัน โดยเอนไซม์ chalcone isomerase (CHI) จนได้นารินจีนิน (naringenin) ซึ่งเป็นสารไม่มีสี และเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ชนิดต่างๆ รวมถึงแอนโทไซยานินด้วย โดยการเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 โดยเอนไซม์ F3H จนได้ dihydrokaempferol (DHK) ซึ่งยังคงไม่มีสี จากนั้นวงแหวน B ของ DHK จะถูกเติมหมู่ไฮดรอกซิลได้สองแบบ คือ ที่ตำแหน่ง 3' หรือที่ตำแหน่ง 3' และ 5' เพื่อเปลี่ยนไปเป็น dihydroquercetin (DHQ) และ dihydromyricetin (DHM) ตามลำดับ ซึ่งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยานี้คือ flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) และ flavonoid 3', 5'-hydroxylase (F3'5'H) เอนไซม์ F3'H ทำหน้าที่เปลี่ยน DHK เป็น DHQ และเปลี่ยนนารินจีนินไปเป็นอีริโอดิกโทออล (eriodictyol) ส่วนเอนไซม์ F3'5'H ทำปฏิกิริยาเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3' และ 5' ของ DHK และนารินจีนิน เปลี่ยนไปเป็น pentahydroxyflavanone นอกจากนี้เอนไซม์ F3'5'H สามารถเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 5' ของอีริโอดิกโทออลและ DHQ เปลี่ยนไปเป็น DHM ได้อีกด้วย (Stotz and Forkmann, 1982) ซึ่งรูปแบบการเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งต่างๆ ของวงแหวน B มีความสำคัญมากในการสังเคราะห์รงควัตถุ (ภาคผนวกที่ 2) หลังจากขั้นตอนนี้ เอนไซม์ anthocyanidin synthase (ANS) จะทำหน้าที่เปลี่ยน โมเลกุลให้อยู่ในรูปเพลาโกนินดิไฮซานิน และเคลฟิโนดิไฮซานิน แล้วเอนไซม์ flavonoid 3-glucosyl transferase (3GT) หรือ UDP-glucose flavonoid glucosyl transferase (UGFT) จะเปลี่ยนสารไม่มีสีเป็นแอนโทไซยานินที่มีสีต่างกันซึ่งแสดงในภาคผนวกที่ 2 และ 3 ภายหลังจากการเพิ่ม โมเลกุลน้ำตาลกลูโคสซึ่งจะช่วยเพิ่มความสามารถในการขนย้าย และช่วยรักษาความเสถียรในการสะสมรงควัตถุในแวคิวโอลแล้ว อาจจะมีการเพิ่ม โมเลกุลน้ำตาล rhamnose (rhamnosylation) ไปเกาะติดกับน้ำตาลกลูโคส (Johnson *et al.*, 1984) นอกจากนี้ยังผ่านกระบวนการต่างๆ เช่น glucosylation, acylation และ methylation ทำให้ได้สาร 3 ชนิด ที่แตกต่างกัน ซึ่งมีผลต่อสีดอกที่ต่างกันด้วย ได้แก่ cyanidin 3-glucoside ให้สีแดง pelargonidin 3-glucoside ให้สีส้ม และ delphinidin 3-glucoside ให้สีม่วงหรือน้ำเงิน

จากรายงานของ Van Tunen *et al.* (1991), Brouillard and Dangles (1994), Forkmann (1993), และ Mol *et al.* (1998) อธิบายถึงปัจจัยอื่นที่มีผลต่อระดับสีดอกนอกเหนือจากชนิดและความเข้มข้นของแอนโทไซยานินในแวคิวโอล ดังต่อไปนี้

1. การแทนที่อะตอมไฮโดรเจนด้วยหมู่ OH ที่คาร์บอนตำแหน่ง 3' 4' และ 5' ในวงแหวน B ของแอนโทไซยานิน พบว่าถ้าตำแหน่งดังกล่าวถูกแทนที่ด้วยหมู่ OH มากเท่าใด ก็จะทำให้

โมเลกุลของรงควัตถุเปลี่ยนสีเป็นระดับฟ้าอมม่วงมากขึ้นเท่านั้น ในทางกลับกันถ้าตำแหน่ง 3' และ 5' ในวงแหวน B ของแอนโทไซยานินมีการแทนที่ด้วยหมู่ OCH_3 ก็จะเปลี่ยนกลับมาเป็นสีแดง กล่าวคือ โครงสร้างในส่วนของวงแหวนฟีนอลมีจำนวนหมู่ไฮดรอกซิล หรือหมู่เมทอกซิลที่เพิ่มขึ้น จะมีผลต่อสีของแอนโทไซยานิน เช่น การเพิ่มหมู่ไฮดรอกซิลให้มากขึ้นจะทำให้มีสีเข้มขึ้น และสีจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินมากขึ้นด้วย และการเพิ่มหมู่เมทอกซิลแทนที่หมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง 3 และ 5 จะทำให้สีแดงเพิ่มขึ้น (Rein, 2005) ดังภาคผนวกที่ 4

2. ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของสารละลายรอบๆ โมเลกุลรงควัตถุในแวคิวโอลมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสี ค่า pH ที่เป็นกรดอ่อนหรือกลางจะทำให้โมเลกุลอยู่ในรูปที่ไม่มีสี pH ที่สูงขึ้นหรือมีสภาพเป็นด่างจะทำให้เกิดสีน้ำเงิน และ pH ที่ต่ำลงหรือสภาพที่เป็นกรดจะทำให้เกิดสีแดง (ภาคผนวกที่ 4) ดอกไม้มักจะมียีนที่ผลิตสีน้ำเงินเข้มมากขึ้นเมื่อดอกไม้มีอายุเพิ่มมากขึ้น ซึ่งสัมพันธ์กับค่า pH ที่เพิ่มขึ้นในแวคิวโอล (Van Tunen *et al.*, 1991) การเกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งต่างๆ 7 ตำแหน่ง (*ph1-ph7*) ในพิทูเนียพบว่าจะทำให้ดอกไม้ไม่มีสีน้ำเงิน ซึ่งการเกิดการกลายพันธุ์ดังกล่าวไม่ได้ทำให้ส่วนประกอบของโมเลกุลแอนโทไซยานินเปลี่ยนไป แต่ทำให้สารสกัดที่ได้จากกลีบดอกเหล่านี้มีค่า pH สูงขึ้น หนึ่งในตำแหน่ง (locus) เหล่านี้คือ ตำแหน่งโลคัสที่ 6 (*ph6*) ที่แยกด้วยการใช้ทรานสโพอซอน *Ac* ของข้าวโพด และการโคลนยีน anthocyanin 1 (*an1*) พบว่า *an1* และ *ph6* เป็นคู่อัลลีลในตำแหน่งเดียวกัน นอกจากนี้ยังมียีน *an2* และ *an11* ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง pH ได้เมื่อมีการกลายพันธุ์ ในปัจจุบันพบว่ายีน *ph4* และ *an1* ทำงานในขั้นตอนแรกของกระบวนการควบคุมระดับ pH และยีน *ph3* ทำงานในขั้นตอนต่อมา ดังนั้นการศึกษากลไกการควบคุม pH ทั้งหมดนั้นยังคงต้องอาศัยการโคลนยีน *ph* ตำแหน่งต่างๆ และการวิเคราะห์การทำงานของยีนเหล่านั้นต่อไป

3. อีออนของโลหะ เช่น เหล็ก อะลูมิเนียม และแมกนีเซียม สามารถรวมตัวกับแอนโทไซยานิน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีได้ เป็นผลจากการเกาะตัวกันของโมเลกุลรงควัตถุ (steaking) ซึ่งอาจจะอยู่ในรูปของการเกาะกันเอง หรือเกาะกันอยู่ในรูปรงควัตถุร่วม (co-pigmentation) กับสารพวกฟลาโวนอลหรือฟลาโวน ส่วนการเกิดรงควัตถุร่วมที่ดึงเอาอีออนของโลหะเข้าไปทำให้เกิดโครงสร้างซับซ้อนขนาดใหญ่ส่งผลให้รงควัตถุที่ได้สามารถดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่นสูงขึ้น และเรืองแสงสีสดออกมาได้ (Forkmann, 1993)

4. รูปร่างของเซลล์ที่ทำหน้าที่สะสมแอนโทไซยานิน มีผลกระทบต่อค่าการดูดกลืนแสงของดอกไม้ พบว่าเซลล์ผิว (inner epidermis) ของกลีบดอก *Antirrhinum majus* เป็นรูปทรงกรวย

ทำให้มีคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นสูง และทำให้มีลักษณะเงางามเหมือนกำมะหยี่ ส่วนต้นพันธุ์ที่มีเซลล์ epidermal ที่มีลักษณะแบนจะมีดอกสีจาง (Mol *et al.*, 1998)

3. Anthocyanidin synthase gene

Anthocyanidin synthase gene เป็นยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ anthocyanidin synthase (ANS) หรือ leucoanthocyanidin dioxygenase (LDOX) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มของ 2-oxoglutarate dependent dioxygenases (2-ODDs) และเป็นเอนไซม์ตัวสุดท้ายในวิถีการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานิน ก่อนกระบวนการเติมหมู่น้ำตาล (Holton and Cornish, 1995) ยีนมีขนาดประมาณ 1,000 – 1,300 คู่เบส จัดเป็น 1 ใน 4 ของเอนไซม์ในกลุ่ม dioxygenase ของวิถีการสังเคราะห์สารฟลาโวนอยด์ ทำหน้าที่เปลี่ยนโครงสร้างสาร leucoanthocyanidin ซึ่งเป็นสารไม่มีสี ไปเป็น anthocyanidin (ภาคผนวกที่ 6 และ 7) สารที่ทำให้เกิดสีดอกของพืช เอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดในกลุ่ม dioxygenase นี้ ประกอบด้วย anthocyanidin synthase (ANS), flavanone 3 hydroxylase (F3H), flavonol synthase (FLS) และ flavone synthase I (FS I) Gebhardt *et al.* (2005) พบว่าเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด ในพืชกลุ่ม Apiaceae มีหน้าที่และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้เคียงกันมาก เช่นเดียวกับกับการทดลองของ Ambavaram *et al.* (2007) ซึ่งทำการเปรียบเทียบยีนทั้ง 4 ชนิดนี้ในข้าว พบว่ามีความคล้ายคลึงกัน ในส่วนของ 2-oxoglutarate Fe^{2+}/O_2 -binding motif

4. Flavonol synthase gene

Flavonol synthase gene (*fls*) เป็นยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ flavonol synthase (FLS) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่ม dioxygenase ของวิถีการสังเคราะห์สารฟลาโวนอยด์ (ภาคผนวกที่ 8) เช่นเดียวกับ anthocyanidin synthase (ANS) แต่จะทำหน้าที่เปลี่ยนสาร dihydroflavonol ไปเป็น flavonol (ภาคผนวกที่ 9) ยีนนี้อยู่ในวิถีการสังเคราะห์สาร flavonol ได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง ได้แก่ ข้าวโพด พืชุนี และ ลินมั่งกร (Holton and Cornish, 1995) ซึ่งทั้งสาร แอนโทไซยานิน และฟลาโวนอลนี้ ถูกเปลี่ยนมาจากสาร dihydroflavonol (dihydrokaempferol, dihydroquercetin และ dihydromyricetin) โดยจะมีการเกิดปฏิกิริยาการเติมและดึงหมู่ -OH ที่วง B ที่ตำแหน่ง 3 ด้วยเอนไซม์ flavonoid 3-hydroxylase (F3H) และที่ตำแหน่ง 3 และ 5 ด้วยเอนไซม์ flavonoid 3,5-hydroxylase (F3,5H) ได้สารคือ dihydroquercetin (DHQ) และ dihydromyricetin (DHM) ซึ่งจะถูกลูกเปลี่ยนเป็น delphinidin ที่มีสีม่วงน้ำเงิน และ cyanidin ที่มีสีม่วงแดง ตามลำดับ โดยสารในกลุ่มฟลาโวนอลนี้พบว่ามีผลต่อการเกิดสีของดอกที่แตกต่างออกไปจาก

สีดอกชรรมา ซึ่ง Takahashi *et al.* (2007) พบว่าในสีของดอกถั่วเหลือง เมื่อขาดเอนไซม์ชนิดนี้จะทำให้สีของดอกเปลี่ยนไปจากสีม่วงเป็นสีชมพู

5. รงคเลขพิวบาง (Thin - layer chromatography, TLC)

คำว่า chromatography มาจากภาษากรีก chromatós แปลว่า สี ความหมายเดิมของ chromatography หมายถึงการแยกของผสมที่มีสี ในปัจจุบันหมายถึงเทคนิคที่ใช้แยกสารผสมออกจากกัน โดยอาศัยความสัมพันธ์ระหว่างสารกับเฟสคงที่ (stationary phase) และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เฟสคงที่อาจเป็นของแข็งหรือของเหลว ถ้าเป็นของแข็งการแยกจะเป็นแบบดูดซับ (adsorption) ถ้าเป็นของเหลวการแยกจะเป็นแบบแบ่งละลาย (partition) เฟสเคลื่อนที่อาจจะเป็นของเหลวหรือแก๊สทำหน้าที่พาสารแต่ละชนิดในสารผสมให้เคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วแตกต่างกัน จึงทำให้สารแยกออกจากกันได้ (ภาคผนวกที่ 10)

กระบวนการโครมาโตกราฟีเกิดขึ้น เนื่องจากสารที่ต้องการแยกมีการเคลื่อนที่ในอัตราที่แตกต่างกัน ซึ่งเนื่องมาจากแรง 2 แรง คือ แรงผลักดัน (propelling forces) เกิดเนื่องจากการไหลของตัวเฟสเคลื่อนที่หรือความสามารถในการละลายของสารในตัวเฟสเคลื่อนที่ และแรงดึง (retarding forces) หมายถึงแรงที่เฟสคงที่ดึงดูดสารไว้ เช่น แรงแวนเดอวาลส์ แรงพันธะไฮโดรเจน เป็นต้น

Thin - layer chromatography เป็นกระบวนการที่ใช้แยกสารต่างๆออกจากกัน โดยแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นเฟสคงที่ (stationary phase) และส่วนที่เป็นเฟสของเหลว (moving phase) (ภาคผนวกที่ 10) เป็นโครมาโตกราฟีแบบดูดซับ solid-liquid chromatography ของผสมที่ถูกแยกจะถูกดูดซับโดยเฟสคงที่ที่เป็นของแข็ง เฟสคงที่ที่นิยมใช้คือ silica gel ($\text{SiO}_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$) และ alumina (Al_2O_3) ในขณะที่เฟสเคลื่อนที่ซึ่งเป็นของเหลวก็จะพาสารให้เคลื่อนที่ไป เนื่องจากสารที่มีโครงสร้างต่างกันจะได้รับแรงดึงและแรงผลักดันต่างกันด้วย ดังนั้นสารแต่ละชนิดจึงเคลื่อนที่ในอัตราที่แตกต่างกัน (Fried and Sherma, 1999) สารที่ถูกดูดซับได้ดีกว่าจะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าสารที่ถูกดูดซับน้อย จึงทำให้เกิดการแยกของสารขึ้นเป็นแถบๆ เรียกว่า chromatogram เฟสคงที่จะทำหน้าที่ 2 ลักษณะ คือ รับ โมเลกุลของสารเข้ามาสัมผัสกับตัวมัน เรียกว่าเกิด adsorption และปล่อยให้โมเลกุลของสารเคลื่อนที่ต่อไป เรียกว่าเกิด desorption เฟสคงที่มีหลายชนิด ในการเลือกใช้จึงต้องเลือกให้เหมาะสมกับสารที่ต้องการแยกตัว จะต้องไม่ละลายในเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการแยกและต้องไม่เป็นตัวเร่งของปฏิกิริยา

เฟสเคลื่อนที่ที่ใช้ในขบวนการโครมาโตกราฟีมีหลายชนิด ซึ่งเรียงลำดับความเป็นขั้วจากต่ำไปหาสูง ดังนี้ เฮกเซน < คาร์บอนเตตระคลอไรด์ < เบนซีน < อีเทอร์ < คลอโรฟอร์ม < เอทิลอะซิเตต < อะซีโตน < เอทานอล < น้ำ

ในบางกรณีเฟสเคลื่อนที่ที่ใช้มีความเป็นขั้วไม่พอ และเฟสคงที่มีความเป็นขั้วสูงกว่า ไม่มีมีความเป็นขั้วมากเกินไป จึงไม่สามารถจะใช้ตัวเคลื่อนที่ชนิดเดียวได้ จำเป็นต้องใช้ตัวทำละลายผสม เพื่อที่จะได้ตัวทำละลายที่เหมาะสม

ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีนี้ การแยกสารด้วยเทคนิค TLC เป็นวิธีที่นิยมใช้กันทั่วไปในการตรวจสอบชนิดของสารในเบื้องต้น เนื่องจาก ง่าย สะดวก รวดเร็ว และไม่ต้องใช้ความเชี่ยวชาญมาก สามารถทำการตรวจสอบได้ครั้งละหลายๆ ตัวอย่าง ผลจากการตรวจสอบได้ผลดี และมีค่าใช้จ่ายต่ำ สามารถทำการตรวจสอบตัวอย่างที่เป็นสารผสม หรือไม่บริสุทธิ์ได้โดยตรง ซึ่งไม่ต้องทำให้บริสุทธิ์ก่อน และไม่มีการสูญเสียสารที่แยกได้อันเนื่องมาจากผลจากการมีขั้วหรือไม่มีขั้วของสาร ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ทั้งหมดบนแผ่น TLC (Fodor *et al.*, 2006; Kato *et al.*, 2007)

สำหรับการแยกสารแอนโธไซยานินและฟลาโวนอลด้วยวิธี TLC นั้น Anderson and Francis (1985) ได้ทำการแยกสารฟลาโวนอลโดยใช้ผลึกเซลลูโลสที่เคลือบบนแผ่นกระจก โดยใช้กรดเกลือ กรดฟอร์มิก และน้ำในอัตราส่วน 24.9 : 23.7 : 51.4 เป็นสารตัวทำละลาย Matysik (1992) ได้ทำการแยกสารแอนโธไซยานินจากดอกปอปปี้สีแดงโดยใช้ผลึกซิลิกา ซึ่งใช้ เอทิลอะซิเตต ไอโซโพรพานอล และ กรดอะซิติกในอัตราส่วน 23.4 : 38.6 : 38 เป็นสารตัวทำละลาย ซึ่งจะสามารถตรวจสอบองค์ประกอบของสารสีหลักในดอกไม้ได้

Fuleki and Francis (1968) ใช้ EtOH เป็นตัวทำละลายในการสกัดแอนโธไซยานินจากผล cranberry แทนการใช้ MeOH เนื่องจาก EtOH เป็นสารที่ไม่เป็นพิษ และพบว่าสารละลาย EtOH : 1.5 M HCl ในอัตราส่วน 85 : 15 โดยปริมาตร เป็นตัวทำละลายที่มีประสิทธิภาพการสกัดสูง และการใช้ HCl จะช่วยให้แอนโธไซยานินที่สกัดได้มีเสถียรภาพดีขึ้น เนื่องจากแอนโธไซยานินมีความคงตัวดีในสารละลายที่เป็นกรด เช่นเดียวกันกับ Chiriboga and Francis (1970) ที่ได้ทำการสกัดแอนโธไซยานินจากกากของผล cranberry ด้วยตัวทำละลายต่างๆ พบว่า MeOH และ EtOH มีประสิทธิภาพการสกัดสูงกว่าตัวทำละลายอื่นๆ เช่น น้ำ ethylene glycol, propylene glycol และ isopropanol การใช้ HCl ใน MeOH ความเข้มข้นร้อยละ 0.03 จะให้ประสิทธิภาพการสกัดสูงสุดในขณะที่ Weiss and Halevy (1989) สกัดแอนโธไซยานินจากกลีบดอกพิทูเนีย (*Petunia hybrida*)

ใน 1% HCl ใน MeOH อนุพันธ์ O-methyl ของแอนโทไซยานินมีโมเลกุลของน้ำตาลต่ออยู่ต่างตำแหน่งต่างชนิดกัน และส่วนที่เป็นน้ำตาลที่มีกลุ่ม OH ที่สามารถเปลี่ยนให้เป็นเอสเทอร์หลายชนิด จึงทำให้เกิดแอนโทไซยานินจำนวนมาก ในดอกไม้มักมีแอนโทไซยานินหลายชนิดผสมอยู่ ขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของดอกไม้ เช่น สีขาว สีเหลือง หรือสีแดง สีของดอกไม้ นอกจากขึ้นกับชนิดของแอนโทไซยานินแล้วยังขึ้นกับรงควัตถุร่วมตัวอื่นด้วย และจากความหลากหลายของหมู่แทนที่นี้ทำให้คุณสมบัติของฟลาโวนอยด์มีความแตกต่างกันเมื่อทำปฏิกิริยากับสารต่างๆ Markham (1982) ตรวจสอบฟลาโวนอยด์พบว่าจุดที่สามารถมองเห็นได้บนโครมาโตกราฟีแบบกระดาษภายใต้สภาวะที่แตกต่างกันแสดงถึงการมีสารประกอบ flavonoid ทั้งสิ้น ซึ่ง Harborne (1984) ได้สรุปผลดังแสดงในตารางผนวกที่ 2

สำหรับการแยกสารด้วยวิธี TLC นั้น Tatsuzawa *et al.* (2004) ได้ทำการแยกสารโดยใช้แผ่น cellulose ในการแยกสารสีออกจากดอกไม้กล้วยไม้ลูกผสมแวนด้า 2 สี คือ สีม่วงแดง และ สีม่วงน้ำเงิน โดยใช้สารละลายตัวพา คือ BAW, BuHCl (n-BuOH-2 N HCl, 1:1), 1% HCl and AHW สำหรับใช้ในการแยกสารแอนโทไซยานิน และใช้ BAW, EAA (EtOAc-HOAc-H₂O, 3:1:1) และ ETN (EtOH-NH₄OH-H₂O, 16:1:3) สำหรับใช้แยกกรดอินทรีย์และหมู่ น้ำตาล โดยที่การใช้ BAW จะสามารถใช้ในการแยกได้ทั้ง 2 แบบ พบว่ากล้วยไม้ทั้งสองชนิดมีสาร cyanidin และ delphinidin เป็นสารสีแอนโทไซยานินหลัก ซึ่งส่งผลให้ดอกไม้ไม่มีสีม่วงแดง และสีม่วงน้ำเงิน

จากคุณสมบัติของสารที่เป็นเฟสเคลื่อนที่ข้างต้น การใช้ BAW ซึ่งประกอบด้วย buthanol, acetic acid และ น้ำ ทำให้เฟสเคลื่อนที่มีคุณสมบัติเป็นสารละลายที่มีขั้วค่อนข้างสูง ในการแยกสารแอนโทไซยานินจึงอาศัยคุณสมบัติการมีขั้วของสารแอนโทไซยานินเพื่อให้เกิดการละลายและเคลื่อนที่ไปบนเฟสคงที่

อุปกรณ์และวิธีการ

ชนิดพืชที่ศึกษา

1. ดอกกล้วยไม้สกุลหวาย ได้แก่ *Dendrobium Sonia Earsakul* นำมาจากสวนกล้วยไม้ระพี สาคริก มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยนำส่วนของราก ใบ ดอกตูม และดอกบาน มาใช้ศึกษา

2. ดอกกล้วยไม้สกุลแอสโคเซนด้า ได้แก่ กล้วยไม้มีกาชาสีน้ำเงิน (*Ascocenda Princess Mikasa blue*) กล้วยไม้มีกาชาสีชมพู (*Ascocenda Princess Mikasa pink*) และกล้วยไม้มีกาชาสีขาว (*Ascocenda Princess Mikasa white*) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทออร์คิดเม็ทซ์ประเทศไทย จำกัด โดยนำส่วนของราก ใบ ดอกตูม และดอกบาน มาใช้ศึกษา

ชนิดไพรเมอร์

1. ไพรเมอร์สำหรับการสังเคราะห์ยีน *ans/fls* บริเวณกลางยีน ได้แก่

ANS(S)390 5 -GA(GA)GAGAAGGAGAAGTAT-3

ANS(A)713 5 -TGAGGGCATTTCGGGTAGTAG-3

ANS94(R) 5 -GGCCAGACGTTATGAAACAA-3

2. ไพรเมอร์สำหรับการสังเคราะห์ยีน *ans/fls* บริเวณท้ายยีน ปลาย 3' ได้แก่

(T₁₂)BamHI 5 -TTGGATCCTTTTTTTTTTTTTT-3

3 RACE232 5 -GACTCGAGTCGACATCG-3

3 RACE233 5 -GACTCGAGTCGACATCGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3

3. ไพรเมอร์สำหรับการสังเคราะห์ยีน *ans/fls* ด้วยวิธี RACE PCR FirstChoice[®] RLM-RACE Kit (Ambion, สหรัฐอเมริกา)

5 RACE Adaptor 5 -GCUGAUGGCGAUGAAUGAACACUGCGUUUGCUG
GCUUUGAUGAAA-3

5 RACE outer primer 5 -GCTGATGGCGATGAATGAACACTG-3

5 RACE Inner Primer 5 -CGCGGATCCGAACACTGCGTTTGCTGGCTTTG
ATG-3

4. ไพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *ans/fls* ได้แก่

ans/fls RT607F 5 -AAATAAATTATTACCCTCCATGCC-3

ans/fls RT844R 5 -ACATCCTCGTCTTCTCCTTGTTCA-3

5. ไพรเมอร์สำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้แก่

T7 5 -ACGTTGTAAAACGACGG-3

SP6	5 GATAAGAATTTACACA-3
6. ไพรเมอร์สำหรับการสังเคราะห์ cDNA <i>actin</i> ได้แก่	
Actin 5	5 -GCTCCGGCATGTGCAA-3
Actin 3	5 -AGGATCTTCATGAGGTAGT-3

1. ศึกษาเปรียบเทียบวิธีการแยกอาร์เอ็นเอ 2 วิธี

1.1 วิธีการแยกอาร์เอ็นเอด้วย Trizol reagent (Gibco BRL สหรัฐอเมริกา)

บดดอกกล้วยไม้ 0.2 กรัม ในไนโตรเจนเหลว ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เติม Trizol reagent (Gibco BRL สหรัฐอเมริกา) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 5 นาที เติมคลอโรฟอร์ม 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ดูดส่วนใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ ตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยไอโซโพรพานอล 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 g นาน 10 นาที ล้างตะกอนด้วย 70 % เอทานอล 1 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยง 11,000 g นาน 5 นาที ทำให้ตะกอนแห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น (DEPC treated water) 30 ไมโครลิตร

1.2 วิธีการแยกอาร์เอ็นเอรวมด้วยวิธี LiCl (Lievens *et al.*, 1997)

บดตัวอย่างกล้วยไม้ 0.2 กรัม ในไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดเป็นผง ตักใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ประมาณ 1 ใน 3 ของหลอด (ประมาณ 100 มิลลิกรัมของตัวอย่าง) สกัดอาร์เอ็นเอด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (0.2M Tris-HCl, pH7.5, 0.1M LiCl, 5mM EDTA, 1% SDS) 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เติมฟีนอลคลอโรฟอร์มไอโซอเมิล อัตราส่วน 25: 24: 1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ดูดสารละลายด้านบนใส่หลอดใหม่ 300 ไมโครลิตร ตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 6M LiCl ปริมาตร 300 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบา ๆ 30 วินาที บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ล้างตะกอนด้วย 3M LiCl ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เติสารละลายทิ้งแล้ว brift spin ให้สารละลายที่เหลือตกลง

มาที่ก้นหลอดแล้วใช้ปิเปตดูดออกให้หมด ทำให้ตะกอนอาร์เอ็นเอแห้งด้วยเครื่องดูดอากาศ นาน 5-10 นาที แล้วละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยน้ำ 31 ไมโครลิตร นำ 1 ไมโครลิตร ไปตรวจสอบผลที่ได้ด้วยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และนำสารละลายอาร์เอ็นเอที่เหลือเติม 0.1M NaOAc, pH 5.2 ปริมาตร 0.1 เท่า และเอทานอลบริสุทธิ์ปริมาตร 2 เท่า เพื่อเก็บอาร์เอ็นเอ โดยเก็บที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส

2. การโคลนยีน *ans* จากดอกกล้วยไม้แอสโคเซนด้าและกล้วยไม้หวาย

2.1 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากอาร์เอ็นเอด้วยวิธีอาร์ทีพีซีอาร์ (RT-PCR)

2.1.1 การสังเคราะห์ยีน *ans* จากอาร์เอ็นเอของดอก

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายแรก (First strand cDNA synthesis)

ในการทดลองจะใช้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายแรก โดยใช้ Ready-To-Go T-Prime first strand kit (GE Healthcare Biosciences, สหรัฐอเมริกา)

ละลายอาร์เอ็นเอที่ได้จากการแยกจากดอกกล้วยไม้ในข้อ 1 ด้วยน้ำกลั่นหรือ TE buffer (DEPC) ให้ได้ความเข้มข้นทั้งหมด 1 ไมโครกรัม ปริมาตร 33 ไมโครลิตร นำไปอุ่นที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นนำไปอุ่นพร้อมกับหลอด first strand kit ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ย้ายอาร์เอ็นเอ 33 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด first strand kit ห้ามผสม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จึงผสมให้เข้ากัน ด้วยการดูดขึ้นลงด้วยปิเปต หมุนเหวี่ยงช่วงสั้นให้สารตกไปที่ก้นหลอด แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ต่อนาน 60 นาที

2.1.2 การเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์

ทำการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Mastercycler[®] gradient, Eppendorf, สหรัฐอเมริกา) ในหลอดทดลองขนาด 200 ไมโครลิตร โดยใช้เอนไซม์ i-taq DNA Polymerase (Intron Biotecnology, เกาหลี) 0.3 ไมโครลิตร 10X บัฟเฟอร์ 2.5 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอสายแรก (cDNA) ที่ได้จากข้อ 2.1.1 ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ ANS(S)390 และ (T₁₂)BamHI ความเข้มข้น 10 nmol อย่างละ 0.4 ไมโครลิตร ปรับปริมาณด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 25 ไมโครลิตร ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตั้งโปรแกรมที่ 1 ที่ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ และโปรแกรมที่ 2 ที่ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที ที่ 55 องศาเซลเซียส 1 นาที และ

72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 30 รอบ นำผลที่อาร์มาตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสบนอะกาโรสเจล 1% เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ 1 Kb DNA ladder marker (Bio Basic, แคนาดา)

2.2 การโคลนยีน *ans* ด้านปลาย 5 โดยใช้ FirstChoice[®] RLM-RACE Kit (Ambion, สหรัฐอเมริกา)

2.2.1 การเติมปลาย 5 ของอาร์เอ็นเอ

นำอาร์เอ็นเอรวมที่ได้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์ calf intestine alkaline phosphatase (CIP) 2 ไมโครลิตร, 10X CIP บัฟเฟอร์ 2 ไมโครลิตร เติมน้ำให้ได้ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาของ CIP โดยเติมสารละลายแอมโมเนียม อะซิเตด 15 ไมโครลิตร acid phenol-chloroform 150 ไมโครลิตร เติมน้ำ 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยง 9,000 g คุณส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติมคลอโรฟอร์ม 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยง 9,000 g คุณส่วนใส ตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยไอโซโพรพานอล 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แช่น้ำแข็งนาน 10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 g นาน 10 นาที ล้างตะกอนด้วย 70% เอทานอล 1 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยง 11,000 g นาน 5 นาที ทำให้ตะกอนแห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น (DEPC treated water) 11 ไมโครลิตร นำตะกอนที่ละลายด้วยน้ำกลั่นมาใช้ 5 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์ tobacco acid pyrophosphatase (TAP) 2 ไมโครลิตร 10XTAP บัฟเฟอร์ 1 ไมโครลิตร เติมน้ำให้ครบ 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ทำการเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adaptor โดยเติมส่วนผสมของบัฟเฟอร์ 1 ไมโครลิตร 5 RACE adaptor 1 ไมโครลิตร เอนไซม์ T4 RNA ligase 2 ไมโครลิตร อาร์เอ็นเอ 1 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำให้ครบ 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง

2.2.2 การสังเคราะห์ cDNA สายแรก

นำอาร์เอ็นเอที่ได้จากข้อ 2.2.1 2 ไมโครลิตร เติม dNTP mix 4 ไมโครลิตร random decamers 2 ไมโครลิตร บัฟเฟอร์ 2 ไมโครลิตร RNase inhibitor 1 ไมโครลิตร เอนไซม์ M-MLV reverse transcriptase 1 ไมโครลิตร เติมน้ำให้ครบ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 42 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง

2.2.3 การเพิ่มปริมาณยีน *ans* ด้วยวิธี RACE PCR

นำดีเอ็นเอที่เตรียมได้โดยใช้ FirstChoice[®] RLM-RACE Kit (Ambion, สหรัฐอเมริกา) ซึ่งต่อกับ adaptor 1 ไมโครลิตร เพื่อเป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณยีน *ans* ที่บริเวณปลาย 5' เดิม 10X PCR บัฟเฟอร์ 5 ไมโครลิตร dNTP mix 4 ไมโครลิตร 5 RACE outer primer (5 GCTGATGGCGATGAATGAACACTG-3) ความเข้มข้น 10 M 2 ไมโครลิตร ไพรมเมอร์ ANS(A)713 อย่างละ 1 ไมโครลิตร เอนไซม์ DNA polymerase 0.25 ไมโครลิตร เติมน้ำให้ครบ 50 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ Ambion Super-Taq[™] ตามที่บริษัท แนะนำด้วยโปรแกรมที่มีระดับความแตกต่างของอุณหภูมิ โดยโปรแกรมที่ 1 ที่ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ โปรแกรมที่ 2 ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ และโปรแกรมที่ 3 ที่ 72 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอซ้ำโดยใช้ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณในครั้งที่หนึ่ง โดยใช้ 5 RACE inner primer 1 ไมโครลิตร เดิม 10X PCR บัฟเฟอร์ 5 ไมโครลิตร dNTP mix 4 ไมโครลิตร ไพรมเมอร์ ANS94(R) 2 ไมโครลิตร เอนไซม์ DNA polymerase 0.25 ไมโครลิตร เติมน้ำให้ครบ 50 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ด้วยเอนไซม์ Ambion Super-Taq[™] ตามที่บริษัท แนะนำด้วยโปรแกรมที่มีระดับความแตกต่างของอุณหภูมิ โดยโปรแกรมที่ 1 ที่ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ โปรแกรมที่ 2 ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 35 รอบ และโปรแกรมที่ 3 ที่ 72 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นนำผลพีซีอาร์มาตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 1% เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ 1 kb DNA ladder marker (Fermentas, แคนาดา)

2.3 การเชื่อมต่อชิ้นยีน *ans* กับพลาสมิด

นำชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากกระบวนการพีซีอาร์มาทำอิเล็กโตรโฟรีซิส เพื่อแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้บนอะกาโรสเจล 1% สกัดดีเอ็นเอออกจากเจล โดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, เยอรมนี) เติบบัฟเฟอร์ QG 3 เท่าโดยปริมาตรต่อ 1 เท่าของน้ำหนักเจล (ประมาณ 100 มิลลิกรัม -100 ไมโครกรัม) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จนเจลละลายผสมให้เข้ากัน คูลสารละลายใส่ในคอลัมน์ หมุนเหวี่ยงที่ 11,000 g นาน 1 นาที เติบบัฟเฟอร์ QG 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 11,000 g นาน 1 นาที ล้างตะกอนด้วยการเติบบัฟเฟอร์ PE 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที หมุนเหวี่ยงที่ 11,000 g นาน 1 นาที เทบัฟเฟอร์ทิ้งแล้วหมุนเหวี่ยงอีกครั้งนาน 1 นาที ละลายตะกอนด้วยการเติบบัฟเฟอร์ EB 30 ไมโครลิตร ผ่านคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 11,000 g

นาน 1 นาที นำสารละลายดีเอ็นเอไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 1% นำดีเอ็นเอที่ได้มาเชื่อมต่อกับ pGEM-T easy vector (Promega, สหรัฐอเมริกา) ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase (2.5 ยูนิต ต่อ 100 ไมโครลิตร) ผสมกับ 1X reaction buffer (Promega, สหรัฐอเมริกา) นำไปบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส

2.4 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้าน (competent cell) สำหรับเพิ่มปริมาณพลาสมิด

เตรียมแบคทีเรียเจ้าบ้าน โดยดัดแปลงจากวิธีมาตรฐานของ Sambrook *et al.* (1989) ดังนี้ เลี้ยงแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ XL1-Blue ที่ได้จากโคลนเดี่ยวในหลอดทดลอง ซึ่งบรรจุอาหาร LB broth 3 มิลลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำเชื้อ 1 มิลลิตร ไปเลี้ยงต่อในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิตร ที่มีอาหาร LB broth 50 มิลลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ให้มีค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.4-0.6 นำแบคทีเรียที่ได้มาเทใส่หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิตร ที่แช่เย็น แล้วแช่บนน้ำแข็งนาน 20 นาที ตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 3,000 g นาน 5 นาที เทอาหารทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย TSS ที่เย็นจัด 10 มิลลิตร แช่น้ำแข็ง 5 นาที ตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียอีกครั้งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 3,000 g นาน 5 นาที เทอาหารทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย TSS (LB, 10% (w/v) PEG, 5% (v/v) DMSO, 20 mM MgCl₂) 1 มิลลิตร แช่บนน้ำแข็ง 5 นาที ผสมด้วยเครื่องผสมสารให้เซลล์กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ ทำให้สารละลายเซลล์เย็นอยู่ตลอดเวลาด้วยการแช่น้ำแข็ง แบ่ง competent cell 100 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจขนาด 1.5 มิลลิตร ที่แช่เย็น สำหรับนำไปใช้ต่อไปในขั้นตอน 2.5

2.5 การนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านด้วยวิธี heat shock

เติมดีเอ็นเอสายผสมที่ได้ในข้อ 2.2 จำนวน 5 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจที่มีคอมพิเทนตเซลล์ 150 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็งนาน 15 นาที บ่มในน้ำที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที แล้วแช่น้ำแข็งทันที 2 นาที นำเซลล์ที่ผ่านการทำ heat shock เลี้ยงในอาหาร SOC (2% tryptone, 0.5% yeast extract, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ และ 20 mM glucose) จำนวน 800 ไมโครลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 2 ชั่วโมง นำมาตกตะกอนโดยหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 g นาน 2 นาที เทอาหารส่วนบนทิ้ง คูดอาหารเลี้ยงแบคทีเรียที่เหลืออยู่รวมทั้งเซลล์แบคทีเรียมาเกลี่ยบนผิวหน้าอาหาร LB agar ที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เติม IPTG (isopropylthio-β-D-galactoside) 200

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) 20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

2.6 การตรวจสอบโคโลนีที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิดสายผสม

นำโคโลนีสีขาวเพิ่มปริมาณบนอาหาร LB agar ที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ชุดเซลล์แบคทีเรียละลายใน TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) 50 ไมโครลิตร เดิมฟีนอล:กลอโรฟอร์ม (1:1 โดยปริมาตร) 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หมุนเหวี่ยงที่ 11,000 g เป็นเวลา 1 นาที นำสารละลายส่วนบนที่ได้ มาตรวจสอบขนาดของพลาสมิดที่ได้โดยวิธีอิเล็กโตโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 0.8% เปรียบเทียบกับพลาสมิดที่ทราบขนาดแน่นอน วิธีนี้ใช้ในกรณีที่ได้โคลนสีขาวจำนวนมาก และนำโคลนที่คาดว่าจะมี พลาสมิดสายผสมไปเพิ่มปริมาณและสกัดพลาสมิดออกจากเซลล์เข้าบ้านเพื่อนำพลาสมิดไปใช้ศึกษาต่อ

2.7 การสกัดพลาสมิดจากแบคทีเรียด้วยวิธีอัลคาไลน์ไลซิส (alkali lysis)

เลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร LB broth 2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 3,000 g เป็นเวลา 5 นาที ละลายเซลล์ด้วย GTE (50 mM glucose, 10 mM EDTA และ 25 mM Tris-HCl pH 8.0) 400 ไมโครลิตร เติมสารละลาย alkaline/SDS solution (0.2 N NaOH และ 1% SDS เตรียมก่อนใช้) 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา แช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที เติม 3 M KOAc (29.4 กรัม potassium acetate (MW 98.14), 11.5 glacial acetic acid) 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา แช่น้ำแข็งนาน 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 11,000 g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดสารละลายใส่หลอดใหม่ เติม DNase-free RNase (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 5 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที สกัดส่วนใสด้วยฟีนอล : กลอโรฟอร์ม (1:1) 400 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 11,000 g เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดส่วนใสส่วนบนมาเติม กลอโรฟอร์ม 400 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 11,000 g เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดส่วนใสส่วนบนมาเติม 95% เอทานอล 1 มิลลิลิตร ที่เย็นจัด ผสมให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงนาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างตะกอนด้วย 70% เอทานอล 1 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยง 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดเอทานอลทิ้งไป ทำให้ตะกอนแห้ง ละลายตะกอนในน้ำหรือ TE 50 ไมโครลิตร

2.8 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ans*

นำแบคทีเรียที่มีพลาสมิดสายผสมที่คาดว่าเป็นยีน *ans* มาแยกสกัดให้ได้ พลาสมิดบริสุทธิ์โดยวิธีอัลคาไลน์ไลซิสด้วย AxyPrep Plasmid Miniprep kit (Axygen Bioscience, สหรัฐอเมริกา) เลี้ยงเชื้อจากโคลนที่ถูกต้องในอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าข้ามคืน นำมาหมუნเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์แบคทีเรีย ละลายเซลล์ 250 ไมโครลิตร ของ บัฟเฟอร์ S1 แล้วเติม 250 ไมโครลิตร ของ S2 ผสมให้เข้ากัน เติม 350 ไมโครลิตร ของ บัฟเฟอร์ S3 ผสมให้เข้ากัน นำไปหมუნเหวี่ยง 11,000 g นาน 10 นาที นำส่วนใสบรรจุลงในคอลัมน์ นำไปหมუნเหวี่ยง 1 นาที ล้างตะกอนด้วย บัฟเฟอร์ W2 หมุนเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อให้คอลัมน์แห้ง จากนั้นจึงเติม TE ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นำไปหมუნเหวี่ยงเก็บส่วนใสส่วนที่มีพลาสมิดละลายอยู่ นำมาตรวจสอบความเข้มข้นโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส เพิ่มปริมาณซันดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์และ BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, สหรัฐอเมริกา) ด้วยไพรเมอร์ SP6 5'-ACGTTGTAACGACGG-3' และ T7 5'-GATAAGAATTCACACA-3' ตั้งโปรแกรมเครื่องพีซีอาร์ที่มีความแตกต่างของอุณหภูมิโดยที่ 95 องศาเซลเซียส 10 วินาที 50 องศาเซลเซียส 15 วินาที และ 60 องศาเซลเซียส 4 นาที จำนวน 25 รอบ นำไปศึกษาการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้เครื่อง ABI 373A automatic DNA sequencer

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่ได้บางส่วนมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ เปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์กับยีนที่มีรายงานในต่างประเทศในเว็บไซค์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการคัดเลือกโคลนเพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ให้ครบทั้งโคลนต่อไป

2.9 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน *ans* กับข้อมูลใน database

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ans* บริเวณท้ายยีนมาหาตำแหน่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยโปรแกรม webcutter และเปลี่ยนเป็นลำดับกรดอะมิโนด้วยรหัสมาตรฐานที่ Baylor College of Medicine Search Launcher (BCM) เว็บไซค์ <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/seq-util.html> จากนั้นนำลำดับกรดอะมิโนไปวิเคราะห์ multiple alignment กับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน ANS ในพืชอื่นด้วยโปรแกรม ClustalW (1.81) ที่เว็บไซค์ <http://www.ebi.ac.uk> และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนของยีน *ans* ด้วย phylogenetic tree

3. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *ans* ในดอกกล้วยไม้ด้วยวิธี Northern blot hybridization และ RNA dot blot hybridization

3.1 Northern blot hybridization

3.1.1 การเตรียมตัวอย่างอาร์เอ็นเอ

ทำการสกัดอาร์เอ็นเอของกล้วยไม้จากราก ใบ ดอกตูมและดอกบาน ด้วยวิธีของ LiCl (Lievens *et al.*, 1997) ในข้อ 1.2

3.1.2 การถ่ายดีเอ็นเอลงแผ่นไนลอนเมมเบรน

เตรียมอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในตู้ดูดควันโดยใช้ agarose 1.5 กรัม ผสมน้ำ 72 มิลลิลิตร นำไปอุ่นด้วยตู้ไมโครเวฟ นาน 2 นาที นำออกมารอให้อุณหภูมิตกลงจนเหลือ 55 องศาเซลเซียส จึงเติม 10X MOP (Eppendorf, สหรัฐอเมริกา) 10 มิลลิลิตร formaldehyde 18 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ได้ปริมาตรรวม 100 มิลลิลิตร เทใส่ถาดแล้วเสียบหวี ทิ้งให้เจลแข็งนาน 20-30 นาที นำตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่แยกได้จากส่วนต่างๆของกล้วยไม้หวาย โชนิเยอเยสกุล กล้วยไม้มีกาชาสีน้ำเงิน กล้วยไม้มีกาชาสีชมพู และดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดพลาสมิด pANS219 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร จำนวน 10 ไมโครลิตร ไปบ่มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่น้ำแข็งทันที ก่อนผสมกับ formaldehyde loading dye 2 ไมโครลิตร (Ambion Inc., สหรัฐอเมริกา) โดยหยอดตัวอย่างที่เตรียมข้างต้นลงในหลุมเจล แยกขนาดอาร์เอ็นเอของกล้วยไม้ใช้ 1X MOP เป็นบัฟเฟอร์ ด้วยกระแสไฟฟ้าที่ 75 โวลต์ เวลานานประมาณ 45 นาที ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ โดยแช่ไว้เวลานาน 10 นาทีแล้วย้ายเจลไปแช่ไว้ในน้ำกลั่น นาน 10 นาที จากนั้นบันทึกภาพพร้อมกับวางไม้บรรทัดเพื่อใช้เปรียบเทียบกำลังขยายของภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

3.1.3 การเตรียมดีเอ็นเอตัวตรวจสอบ

เตรียมโพรบสำหรับยีน *ans* โดยการนำชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 900 คู่เบส ที่ตัดจากที่พลาสมิด pANS219 ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* (Promega, สหรัฐอเมริกา) ความเข้มข้น 0.5 ยูนิตต่อไมโครลิตร 1 ไมโครลิตร ใช้บัฟเฟอร์ตามที่บริษัทแนะนำ ปรับปริมาตรน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำชิ้นดีเอ็นเอความเข้มข้น 50 - 200

นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จำนวน 10 ไมโครลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วนำไปแช่น้ำแข็งทันที นำดีเอ็นเอที่ได้ไปติดฉลากด้วย [³²P] radioactive (Perkin-Elmer, สหรัฐอเมริกา) 0.5 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดชุด Ready-To-Go T-Labeling kit (GE Healthcare Biosciences, สหรัฐอเมริกา) เติมน้ำให้ครบ 50 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง กรองผ่านเซฟาเด็กซ์ G50 (GE Healthcare Biosciences, สหรัฐอเมริกา) ที่บรรจุในหลอดชนิดขนาด 1 มิลลิลิตร นำหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ ที่ตัดฝาออก รอรับสารละลายที่ได้หลังจากการ หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3000g เป็นเวลา 5 นาที เก็บสารละลายที่ได้เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.1.4 การ hybridization

อุ่นไฮบริไดเซชันบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 0.5 M NaHPO₄ pH 7.2, 1% BSA, 1 mM EDTA, 7% SDS ในขวดไฮบริไดเซชัน ทำ prehybridization โดยนำแผ่นไนลอนเมมเบรนใส่ในขวดไฮบริไดเซชัน ที่มีไฮบริไดเซชันบัฟเฟอร์ เขย่าที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อตารางเซนติเมตร ก่อนเติมดีเอ็นเอตัวตรวจสอบจากข้อ 3.1.3 ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ที่ต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แช่น้ำแข็งทันที เขย่าเบาๆ ที่ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

3.1.5 การตรวจสอบสัญญาณบนแผ่นไนลอน

ล้างแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วย primary wash buffer (1X SSC, 0.1% SDS) โดยล้างเขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที เท primary wash buffer ที่เต็ม secondary wash buffer (0.5X SSC, 0.1% SDS) เขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที เทบัฟเฟอร์ที่ใช้ล้างทิ้ง ค่อย ๆ ใช้ปากคีบคีบแผ่นไนลอนเมมเบรนออกจากหลอดอย่างระมัดระวัง วางลงบนถาดพลาสติก ปิดฉนวนด้วยเครื่องปิดฉนวน ตรวจสอบสัญญาณด้วยเครื่องตรวจสอบปริมาณรังสี (geiger counter) นำไปประกบลงบนแผ่น Phospho screen (GE healthcare biosciences, สหรัฐอเมริกา) ปิดคาสเซ็ทให้แน่น ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง นำแผ่น Phospho screen ไปวางบนเครื่อง Storm imager (GE healthcare biosciences, สหรัฐอเมริกา) เพื่อตรวจสอบสัญญาณ แล้วนำฟิล์มไปตรวจสอบสัญญาณภาพโดยวางลงบนคาสเซ็ท นำเข้าห้องมืด แล้วประกบแผ่นฟิล์ม X-omat™ X (Kodak) หรือ Hyperfilm MP (GE healthcare biosciences, สหรัฐอเมริกา) ในที่มืดทิ้งข้ามคืน ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นำฟิล์มออก ล้างแผ่นฟิล์มด้วยสารละลายสร้างภาพ (developer) สารละลายน้ำยาล้างสภาพ (fixer) (Kodak) ในเวลาที่เหมาะสม ตรวจสอบภาพที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์มเปรียบเทียบกับภาพที่ถ่ายเก็บไว้

3.2 RNA Dot Blot Hybridization

3.2.1 การเตรียมตัวอย่างอาร์เอ็นเอ

ทำการสกัดอาร์เอ็นเอของกล้วยไม้จากราก ใบ ดอกตูมและดอกบาน โดยใช้ LiCl (Lievens *et al.*, 1997) ในข้อ 1.2

3.2.2 การถ่ายดีเอ็นเอลงแผ่นไนลอนเมมเบรน

ตัดแผ่นไนลอนเมมเบรนเท่าขนาดเครื่อง dot blot ทำให้เปียกโดยจุ่มลงในสารละลาย 6X SSC วางแผ่นเมมเบรนในเครื่อง dot blot Bio-Dot® (Bio Rad, สหรัฐอเมริกา) ประกอบเครื่อง dot blot เข้ากับเครื่องดูดอากาศ ละลายอาร์เอ็นเอที่สกัดจากส่วนต่างๆของพืช 0.2 กรัม หลังตกจะกอนด้วยเอธานอลด้วยสารละลายต่าง (10 mM NaOH, 1 mM EDTA) ที่เย็นจัด 500 ไมโครลิตร ทำการหยดสารละลายอาร์เอ็นเอลงในหลุม เปิดเครื่องดูดอากาศจนสารละลายถูกดูดหมด เติมสารละลายต่าง (10 mM NaOH, 1 mM EDTA) ที่เย็นจัด 500 ไมโครลิตรลงไป ในหลุม เปิดเครื่องดูดอากาศ อีกครั้ง รอนกระทั่งอาร์เอ็นเอแห้ง นำแผ่นเมมเบรนออกจากเครื่อง ล้างเมมเบรนด้วยสารละลาย washing buffer (2X SSC, 0.1% SDS) ที่ไว้พอแห้งหมาด ก่อนนำไปทำ UV crosslink 1 นาที อบเมมเบรนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

3.2.3 การเตรียมดีเอ็นเอตัวตรวจสอบ

ใช้วิธีการเตรียมเช่นเดียวกับในข้อ 3.1.3

3.2.4 การ hybridization

ใช้วิธีการ hybridization เช่นเดียวกับในข้อ 3.1.4

3.2.5 การตรวจสอบสัญญาณบนแผ่นไนลอน

ใช้วิธีการตรวจสอบสัญญาณเช่นเดียวกับในข้อ 3.1.5

4. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *ans* ในดอกกล้วยไม้ด้วยวิธี Relative Quantification PCR (qPCR)

4.1 การเตรียมตัวอย่างอาร์เอ็นเอ

ทำการสกัดอาร์เอ็นเอรวมของกล้วยไม้จากราก, ใบ, ดอกตูมและดอกบาน โดยใช้ LiCl (Lievens *et al.*, 1997) ในข้อ 1.2

ทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายแรก ด้วยไพรเมอร์ *ans/fls_RT844R* (5 ACATCCTCGTCTTCTCCTTGTTCA-3) และไพรเมอร์ *Actin 3* (5 AGGATCTTCATGAGGTAGT-3) โดยใช้ชุด Ready-To-Go You-Prime first strand kit (GE Healthcare Biosciences, สหรัฐอเมริกา) โดยละลายอาร์เอ็นเอปริมาณ 5 ไมโครกรัม ที่ได้จากการแยกจากดอกกล้วยไม้ ด้วยน้ำกลั่นหรือ TE buffer (DEPC) 30 ไมโครลิตร นำไปอุ่นที่ 65 องศาเซลเซียส 15 นาที จากนั้นนำไปแช่น้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที เติมอาร์เอ็นเอ 30 ไมโครลิตร และไพรเมอร์ *ans/fls_RT844R* สำหรับยีน *ans* และไพรเมอร์ *Actin 3* อย่างละ 1 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด first strand kit ผสมให้เข้ากัน หมุนเหวี่ยงอย่างรวดเร็วเพื่อให้สารอยู่ที่ก้นหลอด แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 60 นาที

4.2 การศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน *ans* โดยใช้เทคนิค qPCR

นำดีเอ็นเอสายแรกที่ได้จากการสังเคราะห์จากข้อ 4.1 มาใช้เป็น templates และใช้ specific primers ของยีน *ans/fls* คือ *ans/fls_RT607F* และ *ans/fls_RT844R* แล้วทำการเปรียบเทียบกับยีน *actin-1* ซึ่งทำให้เป็น normalizer มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ specific primers คือ *Actin 5* และ *Actin 3* โดยมีส่วนผสมของสารละลายที่ใช้ทำปฏิกิริยา ดังนี้ First strand DNA 5 ไมโครลิตร 10 M forward primer 1 ไมโครลิตร 10 M reverse primer 1 ไมโครลิตร SuperScriptTM III Platinum® Taq Mix (Invitrogen, สหรัฐอเมริกา) 0.4 ไมโครลิตร 2X SYBR® Green Reaction Mix 10 ไมโครลิตร และ distilled water 7.6 ไมโครลิตร ให้ได้ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร

ใส่สารละลายที่เตรียมไว้ลงในหลอด qPCR ขนาด 200 ไมโครลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาใน Mastercycler Realplex (Eppendorf, สหรัฐอเมริกา) ที่กำหนดให้มีสภาวะการทำงานโดยโปรแกรมที่ 1 ที่ 50 องศาเซลเซียส 30 นาที 95 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ โปรแกรมที่ 2 ที่ 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที 68 องศาเซลเซียส 30 วินาที 2 จำนวน 40 รอบ และโปรแกรมที่ 3 ที่ 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที 60

องศาเซลเซียส 15 วินาที จำนวน 1 รอบ บันทึกผลค่า threshold cycle หรือ C_T ที่ได้เพื่อใช้ในการวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของยีน *ans* ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆของกล้วยไม้

4.3 การวิเคราะห์ผลที่ได้จาก qPCR

นำค่า C_T ที่ได้ของทุก ๆ ตัวอย่าง มาทำการคำนวณเพื่อหาค่า relative expression ratio ตามวิธีการของ Livak and Schmittgen (2001) ซึ่งค่า relative expression ratio จะมีสูตรในการคำนวณ ดังนี้

$$\text{Relative expression ratio} = 2^{-C_T}$$

นำค่า C_T ของรากกล้วยไม้ขาวสนาน ($C_{T_{\text{rootwhite}}}$) มาใช้เป็น calibrator สำหรับคำนวณค่า relative expression ratio เพื่อปรับค่า C_T ของแต่ละส่วนของกล้วยไม้ ($C_{T_{\text{orchid X, tissue Y}}}$) ให้ได้ค่าที่มีฐานเดียวกัน โดยค่าที่ได้จากการคำนวณดังกล่าว เรียกว่า C_T

$$C_T = (C_{T_{\text{orchid X, tissue Y}}} - (C_{T_{\text{rootwhite}}})$$

นำค่า C_T ที่ได้มาคำนวณหาค่า relative expression ratio ตามสูตรการคำนวณข้างต้น โดยใช้โปรแกรม microsoft excel (Microsoft, สหรัฐอเมริกา)

5. การตรวจสอบจำนวนซ้ำของยีน *ans* ในดอกกล้วยไม้ด้วยวิธี Southern blot hybridization

5.1 การเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอจากกล้วยไม้

บดตัวอย่างกล้วยไม้ 150 มิลลิกรัม ในไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดเป็นผง ตักใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ประมาณ 1 ใน 3 ของหลอด (ประมาณ 100 มิลลิกรัมของตัวอย่าง) สกัดดีเอ็นเอด้วยชุด Sabai Kit (Plant Molecular Biology Laboratory ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล) โดยเติมบัฟเฟอร์ DA ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 500 ไมโครลิตร และบัฟเฟอร์ DB ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 40 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารนาน 10 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำมาตั้งที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที เติมคลอโรฟอร์มที่ผสมไอโซเอมิลแอลกอฮอล์อัตราส่วน 24 ต่อ 1 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารนาน 10 วินาที หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000g ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที ดูดสารละลายใส่ส่วนบน 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดไม

โครเซนตริฟิวจ์ใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยไอโซโพรพานอลที่แช่เย็น ปริมาณ 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบา ๆ 30 วินาที หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ดูดสารละลายทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 80 เปอร์เซ็นต์ เอทานอลที่เย็น ปริมาณ 500 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ดูดสารละลายทิ้งให้หมด ทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งด้วยเครื่องดูดอากาศ นาน 8-10 นาที แล้วละลาย ตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำ 100 ไมโครลิตร ดูดแบ่งดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร ไปตรวจสอบผลที่ได้ด้วยการ ทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

5.2 การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำดีเอ็นเอกล้วยไม้ ปริมาณ 10 ไมโครกรัม มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*, *HindIII* และ *HincII* (Promega, สหรัฐอเมริกา) ความเข้มข้น 0.5 ยูนิตต่อไมโครลิตร 1 ไมโครลิตร ใช้บัฟเฟอร์ตามที่บริษัทแนะนำ ปรับปริมาณน้ำกลั่นให้ได้ปฏิกิริยารวม 50 ไมโครลิตร บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน เพื่อให้เกิดการตัด ดีเอ็นเออย่างสมบูรณ์ จากนั้นแบ่งดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร มาตรวจสอบการตัดของเอนไซม์ด้วยวิธี อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ นำดีเอ็นเอที่ตัดสมบูรณ์แล้วมาทำการกำจัดโปรตีนออก โดยการเติม สารละลายฟีนอล: คลอโรฟอร์ม: ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (phenol: chloroform: isoamyl alcohol) ใน อัตราส่วน 25: 24: 1 ปริมาตร 1 เท่าโดยปริมาตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex นาน 1 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดส่วนใสปริมาณ 30 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม สารละลายคลอโรฟอร์ม: ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (chloroform: isoamyl alcohol) ในอัตราส่วน 24: 1 ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 g นาน 1 นาที ที่ อุณหภูมิห้อง ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ ตกตะกอนด้วย 0.1 เท่า โดยปริมาตรของ 3 M NaOAc pH 5.2 และ 2 เท่าโดยปริมาตรของเอทานอลที่เย็นจัด ทิ้งไว้นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หมุนเหวี่ยงนาน 15 นาที ล้างตะกอนด้วย 70% เอทานอล ทำให้ตะกอนแห้งภายใต้สูญญากาศ ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่น 15 ไมโครลิตร แยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอจากกล้วยไม้หวายไซเนเชียสกล กล้วยไม้มีกาชาสีน้ำเงิน กล้วยไม้มีกาชาสีชมพู และดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดพลาสมิด pANS219 ของยีน *ans* ที่ได้จากโคลนยีนในกล้วยไม้มีกาชาสีน้ำเงิน ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* ความเข้มข้น 0.5 ยูนิตต่อไมโครลิตร 1 ไมโครลิตร บนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ใน 1X TAE โดยแต่ละ โคลน เปรียบเทียบขนาดกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb ladder (Fermentas, แคนาดา) จากนั้นบันทึกภาพ พร้อมกับวางไม้บรรทัดเพื่อใช้เปรียบเทียบกำลังขยายของภาพ ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

5.3 การถ่ายดีเอ็นเอจากเจลอะกาโรสสู่แผ่นไนลอนเมมเบรน

ถ่ายดีเอ็นเอที่จะตรวจสอบจากเจลอะกาโรสไปสู่แผ่นไนลอนเมมเบรน โดยนำแผ่นเจลอะกาโรสที่ได้จากข้อ 3.1 แช่ลงในสารละลาย depurination (0.25M HCl) เขย่าเบา ๆ ด้วย rocking platform ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที หรือจนกว่าสีของ bromphenol blue จะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง เพื่อให้เกิดการ depurination ซึ่งจะช่วยให้การถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่ไนลอนเมมเบรนสมบูรณ์ เทสารละลายทิ้ง ล้างด้วยน้ำกลั่นที่หนึ่งฆ่าเชื้อ เขย่าเบา ๆ 1 ครั้ง เทน้ำทิ้งแล้วเติมสารละลาย denaturation (1.5M NaCl และ 0.5M NaOH) เขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอเสียสภาพจากดีเอ็นเอสายคู่เป็นสายเดี่ยว เทสารละลายทิ้ง ล้างด้วยน้ำกลั่นที่หนึ่งฆ่าเชื้อ เขย่าเบา ๆ 1 ครั้ง เทน้ำทิ้งแล้วเติมสารละลาย neutralizing (1.5M NaCl และ 0.5M Tris-HCl) จนท่วมเจล เขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที เพื่อปรับเจลให้เป็นกลาง เทสารละลายทิ้ง ล้างด้วยน้ำกลั่นที่หนึ่งฆ่าเชื้อ เขย่าเบา ๆ 1 ครั้ง นำเจลแช่ลงใน 10X SSC นาน 5 นาที จากนั้นย้ายดีเอ็นเอจากเจลลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรน Hybond™ N+ hybridization transfer membrane RPN 303B (GE Healthcare Biosciences, สหรัฐอเมริกา) โดยตัดแผ่นไนลอนเมมเบรนให้มีขนาดเท่ากับเจล จุ่มแผ่นไนลอนเมมเบรนใน 5X SSC ให้เปียกจนทั่วแผ่น ย้ายแผ่นเจลวางคว่ำหน้าลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรน วางทับบนเจลด้วยกระดาษกรองที่มีขนาดเท่ากับขนาดเจล ย้ายดีเอ็นเอไปสู่แผ่นไนลอน โดยใช้หลักการ upward capillary transfer โดยใช้สารละลาย 10X SSC ช่วยในการพาขึ้นดีเอ็นเอจากแผ่นเจลไปสู่แผ่นไนลอน นาน 8-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นใช้ปากคีบดึงแผ่นไนลอนเมมเบรนออกจากเจล โดยดึงจากด้านใดด้านหนึ่ง ทำเครื่องหมายด้านที่สัมผัสกับเจลไว้ นำแผ่นเจลที่เหลือไปตรวจสอบประสิทธิภาพการถ่ายดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต และจุ่มแผ่นไนลอนเมมเบรนใน 5X SSC นาน 5 วินาที เพื่อล้างเศษเจลออกให้หมด แล้วนำไปฝังบนกระดาษกรองให้พอดำที่อุณหภูมิห้อง ทำการยึดดีเอ็นเอกับแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต (UV-crosslinking) นาน 1 นาที เพื่อนำไปทำไฮบริไดเซชัน จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง

5.4 การเตรียมดีเอ็นเอตรวจสอบหรือโพรบ

เตรียมดีเอ็นเอตรวจสอบหรือโพรบ โดยด้วยชุดน้ำยา Gene Images Random Prime Labeling Kit (RPN 3520) วิธีทำตามคำแนะนำของ GE Healthcare Biosciences, สหรัฐอเมริกา เตรียมโพรบสำหรับยีน *ans* โดยการนำชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 900 คู่เบส ที่อยู่บนพลาสมิด pANS219 ทำพีซีอาร์ด้วยคู่ไพรเมอร์ ANS(S)390 และ (T₁₂)BamHI ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร จำนวน 21 ไมโครลิตร เจือจางด้วยน้ำ 13 ไมโครลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วแช่แข็งทันที นาน 5 นาที นำดีเอ็นเอมาติดฉลากดีเอ็นเอ โดยเติม nucleotide mix ที่มี dUTP ที่

ติดฉลากด้วยสารฟลูออเรสซิน 10 ไมโครลิตร โพรเมอร์ขนาด 6 เบส (random primer) 5 ไมโครลิตร เอนไซม์ Klenow DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร ซึ่งได้ ปริมาตรรวมเท่ากับ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเบา ๆ ห่อฟอยล์แล้ว นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ถ้าเก็บโพรบนานควรเติม EDTA ให้ได้ความเข้มข้น 20 mM ห่อฟอยล์แบ่งเก็บที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส ใช้นาน 6 เดือน

5.5 การไฮบริไดเซชันโดยใช้ Hybridization Kit RPN3680 (GE Healthcare Biosciences, สหรัฐอเมริกา)

อุ่นไฮบริไดเซชันบัฟเฟอร์ (5X SSC, liquid block เจือจาง 20 เท่า, 0.1% SDS, 5% dextran sulphate) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ใช้ปริมาตร 0.125 มิลลิลิตร ต่อตาราง เซนติเมตร จากนั้นนำแผ่นไนลอนเมมเบรนจากข้อ 5.3 แช่ในสารละลาย 5X SSC ให้เปียกทั่วก่อน นำมาใส่หลอดไฮบริไดเซชัน บ่มไนลอนเมมเบรนในไฮบริไดเซชันบัฟเฟอร์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เขย่าเบา ๆ 60 stokes ต่อนาที นาน 60 นาที ด้วยตู้อบสำหรับไฮบริไดเซชัน (hybridization oven) เตรียมดีเอ็นเอโพรบจากข้อ 5.4 ปริมาณ 15 ไมโครลิตร ผสมน้ำให้มีปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วนำมาแช่ในน้ำแข็งทันที นำหลอดดีเอ็นเอโพรบบวมานวน เหยี่ยวอย่างรวดเร็ว ใช้ปิเปตดูดดีเอ็นเอโพรบปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไฮบริไดเซชัน บัฟเฟอร์อย่างรวดเร็ว เขย่าผสมให้เข้ากัน เบา ๆ แล้วรีบนำหลอดไฮบริไดเซชันใส่ตู้อบ เขย่าเบา ๆ ที่ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที แล้วเขย่าเบา ๆ ต่อที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน ชั่วโมง

5.6 การตรวจสอบผลการไฮบริไดเซชัน

ล้างแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วย primary wash buffer (1X SSC, 0.1% SDS) โดยล้าง เขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที โดยใช้ปริมาตร 2-5 มิลลิลิตรต่อตารางเซนติเมตร เท primary wash buffer ที่เต็ม secondary wash buffer (0.5X SSC, 0.1% SDS) เขย่าเบา ๆ ที่ อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที เทบัฟเฟอร์ที่ใช้ล้างทิ้งค่อย ๆ ใช้ปากคีบคีบแผ่นไนลอนเมมเบรนออก จากหลอดอย่างระมัดระวัง ใสลงในสารละลาย liquid blocking agent เจือจาง 1 ใน 10 ด้วยบัฟเฟอร์ A (100mM Tris-HCl, 300mM NaCl, pH 9.5) ใช้สารละลายอย่างน้อย 0.75-1 มิลลิลิตรต่อตาราง เซนติเมตร ของแผ่นไนลอนเมมเบรน เขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมงหรือจนแน่ใจว่าไม่มี ฟอง เจือจาง anti-fluorescein-AP conjugate 1: 5,000 ด้วย 0.5% bovine serum albumin ในบัฟเฟอร์ A เทสารละลาย liquid blocking agent ที่เต็มสารละลาย antibody conjugate ด้วยปริมาตร 0.3

มิลลิลิตรต่อตารางเซนติเมตร ของแผ่นไนลอนเมมเบรน เขย่าเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง ล้างแผ่นเมมเบรนด้วย 0.3 เปอร์เซ็นต์ Tween 20 ในบัฟเฟอร์ A ปริมาตรมากเกินพอ ประมาณ 2-5 มิลลิลิตรต่อตารางเซนติเมตร เขย่าที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที จำนวน 3 ครั้ง ดึงแผ่นเมมเบรนผ่าน ขอบกล่องพลาสติกเพื่อกำจัดน้ำส่วนเกินออก วางแผ่นเมมเบรนให้หงายขึ้นบนแผ่นพลาสติก (saran wrap) ห้ามให้เมมเบรนแห้ง รีบหยด CDP™ Star (GE Healthcare Biosciences, สหรัฐอเมริกา) 30-40 ไมโครลิตรต่อตารางเซนติเมตรของแผ่นไนลอนเมมเบรน ลงบนผิวหน้าของแผ่นไนลอนเมมเบรน ที่ไว้ 5 นาที ในที่มืด ดึงแผ่นไนลอนเมมเบรนขึ้นเพื่อเทให้สารละลายไหลออก โดยตะขอบ ไนลอนเมมเบรนกับ saran wrap ห่อไนลอนเมมเบรนด้วย saran wrap รีดสารละลายออกให้หมด เพื่อป้องกันไม่ให้สารละลายหรือความชื้นออกมานอกห่อ วางกระดาษกรองในฟิล์มคาสเซ็ท วางแผ่นไนลอนเมมเบรนที่ห่อด้วย saran wrap แล้วหงายขึ้น นำคาสเซ็ทเข้าห้องมืด แล้วประกบแผ่น ไนลอนเมมเบรน ด้วยแผ่นฟิล์ม X-omat™ X (Kodak) ในที่มืดทั้งข้างขึ้น ที่อุณหภูมิห้อง นำฟิล์ม ออก ล้างแผ่นฟิล์มด้วยสารละลายสร้างภาพ (developer) สารละลายน้ำยาคงสภาพ (fixer) (Kodak) ในเวลาที่เหมาะสม ตรวจสอบภาพที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์มเปรียบเทียบกับภาพที่ถ่ายเก็บไว้

6. การตรวจสอบองค์ประกอบของสารสีด้วยวิธี Thin-layer chromatography

6.1 การสกัดสารสีจากดอก

ทำการบดตัวอย่างดอกกล้วยไม้ 100 มิลลิกรัม ในไนโตรเจนด้วยโกร่งบดยา ตักได้ หลอดขนาด 15 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ (เมธานอล : กรดเกลือเข้มข้น ในอัตราส่วน 99 : 1) ที่แช่เย็น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็ง 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 9,000 g 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส คูส่วนใสปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ขวดปริมาตรก้นกลม (Round Bottom Flask) ขนาด 10 มิลลิลิตรใหม่ นำไปทำ evaporation ด้วยเครื่อง Büchi® Rotavapor® R-210 evaporator เพื่อเพิ่มความเข้มข้น ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ประมาณ 15 นาที หรือจนเหลือปริมาตรของสาร 100 ไมโครลิตร

6.2 การเตรียมตัวอย่างลงบนแผ่นซิลิกา

คูตัวอย่างจากสารละลายในส่วนใสที่ได้จากข้อ 6.1 ประมาณ 5 ไมโครลิตร และ สาร แอนโทไซยานินมาตรฐาน 3 ชนิด คือ cyanidin chloride (79457-1MG-F), delphinidin chloride (43725-1MG-F) และ pelargonidin chloride (P1659-5MG) (Sigma, สหรัฐอเมริกา) ผสมน้ำกลั่นให้

ได้ความเข้มข้น 0.1% โดยผสมสารแอนโทไซยานินมาตรฐานทั้ง 3 ชนิดเข้าด้วยกันชนิดละ 1 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นซิลิกา F254 (Merck, เยอรมนี) จำนวน 3 ไมโครลิตร และสารสีที่สกัดได้ก่อบดกกล้วยไม้ทั้ง 4 ชนิด คือ ดอกกล้วยไม้มีกาชาสีน้ำเงิน ดอกกล้วยไม้มีกาชาสีชมพู ดอกกล้วยไม้หวายโขเนียงเสียด และดอกกล้วยไม้สกุลหวายสีม่วงที่ได้จากการเตรียมในข้อ 6.1 ด้วยหลอดแก้ว capillary ชนิดละ 5 ไมโครลิตร โดยให้สูงจากขอบด้านล่าง 1 เซนติเมตร และให้มีระยะเคลื่อนที่ของสารละลายสูงจากขอบ 10 เซนติเมตร ทำให้แห้งด้วยความร้อนจากเครื่องเป่าผม

6.3 การเปรียบเทียบชนิดของสารละลายตัวพา

เปรียบเทียบชนิดของสารละลายตัวพาโดยเตรียมสารละลายตัวพา 5 ชนิด ได้แก่ ชนิดที่ 1 บิวทานอล : กรดอะซิติก : น้ำกลั่น (4 : 1 : 2) ชนิดที่ 2 กรดเกลือ : เมทานอล (0.1 : 99.9) ชนิดที่ 3 ไดคลอโรมีเทน : เมทานอล : น้ำกลั่น (6 : 4 : 1) ชนิดที่ 4 ไดคลอโรมีเทน : เมทานอล : น้ำกลั่น (10 : 3 : 1) และ ชนิดที่ 5 กรดฟอร์มิก : น้ำกลั่น (5 : 95) เติลงใน developing chamber ที่มีกระดาษกรองให้สูงประมาณ 0.5 – 1 เซนติเมตร ปิดฝาให้สนิท ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อให้สารละลายอิมตัว ย้ายแผ่นซิลิกาที่ได้จากข้อ 6.2 ใส่งไปใน developing chamber ทำ TLC โดยเปรียบเทียบ developing solvent ต่าง ๆ รวม 5 ชนิด คือ บิวทานอล : กรดอะซิติก : น้ำกลั่น (4 : 1 : 2) กรดเกลือ : เมทานอล (0.1 : 99.9) ไดคลอโรมีเทน : เมทานอล : น้ำกลั่น (6 : 4 : 1) ไดคลอโรมีเทน : เมทานอล : น้ำกลั่น (10 : 3 : 1) และ กรดฟอร์มิก : น้ำกลั่น (5 : 95) และตรวจสอบการแยกและการเคลื่อนที่ของสารสีโดยใช้ระยะทางในการเคลื่อนที่ 10 เซนติเมตร บันทึกผลการทดลองภายใต้แสงปกติ

6.4 การตรวจสอบชนิดของสารสีในพืชด้วยสารละลายตัวพาที่เหมาะสม

นำสารที่สกัดได้จากข้อ 6.1 โดยสกัดจากดอกไม้ตัวอย่างจำนวน 7 ชนิด ได้แก่ ดอกกล้วยไม้แอสโคเซ็นด้าพันปีดีสีส้ม ดอกกล้วยไม้เข็มสีเสด ดอกคอร์เดียสีส้ม ดอกกล้วยไม้หวายโขเนียงเสียดสีม่วงแดง ดอกเฟื่องฟ้าสีชมพู ดอกกล้วยไม้แอสโคเซ็นด้าพริ้นเซตมีกาชาสีน้ำเงิน และดอกอัญชันสีน้ำเงิน นำสารสกัดปริมาณ 5 ไมโครลิตร และ สารแอนโทไซยานินมาตรฐาน 3 ชนิด คือ ไซยานิดินคลอไรด์ เดลฟินิดินคลอไรด์ และ ฟิลาโกนินคลอไรด์ (Sigma, สหรัฐอเมริกา) ใช้ความเข้มข้น 0.1% ปริมาณ 1 ไมโครลิตร หยดลงบนหยดลงบนแผ่นซิลิกา F254 (Merck, เยอรมนี) โดยให้สูงจากขอบด้านล่าง 1 เซนติเมตร และให้มีระยะเคลื่อนที่ของสารละลายสูงจากขอบ 10 เซนติเมตร ทำให้แห้งด้วยความร้อนจากเครื่องเป่าผม โดยใช้สารละลายตัวพาที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อ 6.3 ตรวจสอบการแยกและการเคลื่อนที่ของสารสี บันทึกผลการทดลองภายใต้แสงปกติ

ผลและวิจารณ์

1. ศึกษาและเปรียบเทียบวิธีการแยกอาร์เอ็นเอในแต่ละวิธี

การแยกอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างพืชเริ่มต้นจากการทำลายโครงสร้างของผนังเซลล์หรือเนื้อเยื่อพืช โดยการบดตัวอย่างในไนโตรเจนเหลว เพื่อให้ผนังเซลล์แตก โดยขั้นตอนนี้ต้องระมัดระวังให้ตัวอย่างที่บดแห้งอยู่เสมอ ขั้นตอนต่อมาคือการทำลายสารประกอบนิวคลีโอโปรตีน (nucleoprotein complex) และการกำจัดโปรตีนที่ปนเปื้อนออกมาจากเซลล์ โดยใช้สารที่มีคุณสมบัติในการทำให้โปรตีนเสื่อมสภาพ เช่น guanidium hydrochloride, guanidium isothiocyanate, คลอโรฟอร์ม และฟีนอล เป็นส่วนผสมในบัฟเฟอร์ ขั้นตอนต่อมาเป็นการตกตะกอนแยกเฉพาะส่วนที่เป็นอาร์เอ็นเอออกจากดีเอ็นเอ และโปรตีน ด้วยไอโซโพรพานอล หรือเกลือที่มีความเข้มข้นสูง เช่น NaOAc หรือ LiCl หลังจากนั้นจะเป็นขั้นตอนการทำความสะอาดอาร์เอ็นเอ เพื่อให้ได้อาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพดี นอกจากนี้ขั้นตอนการแยกอาร์เอ็นเอจำเป็นต้องระมัดระวังการปนเปื้อนของเอนไซม์ RNase ทุกขั้นตอน รวมทั้งอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ บัฟเฟอร์และน้ำกลั่นที่ใช้ต้องเตรียมจากน้ำกลั่นที่เติมสาร DEPC (Diethyl pyrocarbonate) 0.1% เนื่องจากสาร DEPC มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ RNase โดยการทำลายโปรตีนให้เสื่อมสภาพ (Surzycki, 2000)

1.1 การแยกอาร์เอ็นเอรวมด้วย Trizol reagent

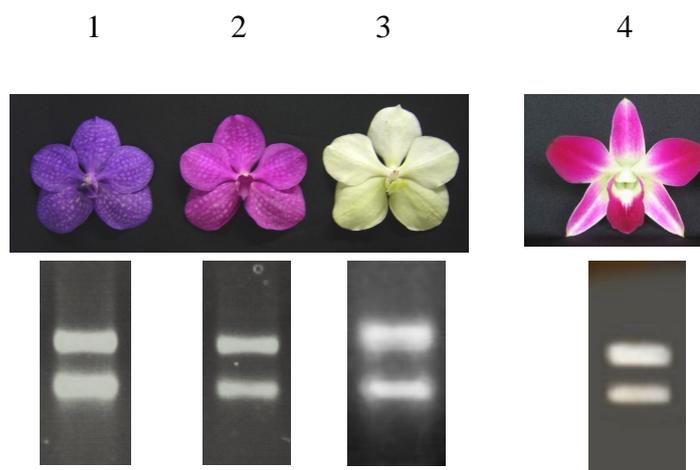
จากการนำดอกกล้วยไม้มีกาชา จำนวน 0.2 กรัม มาเติม Trizol reagent และคลอโรฟอร์ม หลังจากนั้นไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง สารละลายส่วนบนที่ได้มีลักษณะหนืดเล็กน้อย ตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยไอโซโพรพานอล ละลายตะกอนในน้ำกลั่น (DEPC-treated water) นำไปตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 1% สามารถแยกอาร์เอ็นเอจากดอกกล้วยไม้มีกาชา ปริมาณ 10 ไมโครกรัม แต่ยังมีส่วนที่เป็นเมือกอยู่ ส่วนการแยกอาร์เอ็นเอจากดอกกล้วยไม้สกุลหวาย หลังจากเติม Trizol reagent และสกัดโปรตีนออกด้วยคลอโรฟอร์ม สารละลายส่วนบนที่ได้มีลักษณะเป็นเมือกและหนืด เมื่อตกตะกอนด้วยไอโซโพรพานอล และละลายตะกอนในน้ำกลั่น นำไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 1% ตรวจไม่พบอาร์เอ็นเอจากดอกกล้วยไม้สกุลหวาย

Trizol Reagent ประกอบด้วย guanidium isothiocyanate และฟีนอล สาร guanidium isothiocyanate ที่ความเข้มข้น 4 M มีคุณสมบัติเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ RNase และทำลายสารประกอบนิวคลีโอโปรตีน (Surzycki, 2000) สามารถสกัดอาร์เอ็นเอจากดอกกล้วยไม้ มิกานาได้ แต่ไม่สามารถแยกอาร์เอ็นเอจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายไม้ได้ อาจเนื่องมาจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายเป็นพืชที่มีสารประกอบฟีนอลิกและสารโพลีแซคคาไรด์มาก โดยสารประกอบฟีนอลิกมีคุณสมบัติในการออกซิไดซ์ได้ง่ายและเข้าร่วมตัวกับสารควินิน (quinine) จับตัวกับกรดนิวคลีอิก สารละลายที่แยกมีลักษณะเป็นเมือก การตกตะกอนด้วยไอโซโพรพานอลยังไม่สามารถแยกอาร์เอ็นเอออกจากสารโพลีแซคคาไรด์ได้ วิธีการแยกอาร์เอ็นเอรวมด้วย Trizol reagent จึงเหมาะสำหรับพืชที่มีสารโพลีแซคคาไรด์ในปริมาณน้อย หรือพืชที่ไม่มีการสะสมสารโพลีแซคคาไรด์

1.2 การแยกอาร์เอ็นเอรวมด้วย LiCl

ในการสกัดอาร์เอ็นเอจากดอกกล้วยไม้มิกานาและดอกกล้วยไม้หวายน้ำหนัก 0.2 กรัม หลังจากเติมบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย Tris-HCl, LiCl, EDTA, SDS และ สกัด โปรตีนออกด้วยฟีนอล คลอโรฟอร์ม สารละลายที่ได้มีลักษณะใส ตกตะกอนที่ 3 M LiCl นาน 4 ชั่วโมง เพื่อตกตะกอน เฉพาะอาร์เอ็นเอ เติม NaOAc และเอธานอล ตกตะกอนข้ามคืน ละลายตะกอนด้วยน้ำ และนำไปตรวจสอบปริมาณอาร์เอ็นเอด้วยวิธีอิลคโตรโฟรีซีสบนอะกาโรสเจล 1% สามารถแยกอาร์เอ็นเอได้ ปริมาณ 30 ไมโครกรัม โดยประมาณและมีคุณภาพดี (ภาพที่ 1)

จากการเปรียบเทียบวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอจากดอกกล้วยไม้ด้วยวิธีต่างๆ 2 วิธี ได้แก่ Trizol reagent และ LiCl พบว่าวิธี Trizol reagent ไม่สามารถแยกอาร์เอ็นเอจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายซึ่งมีปริมาณของโพลีแซคคาไรด์สูง ในขณะที่การแยกอาร์เอ็นเอทำได้ดีโดยวิธี LiCl จะใช้การตกตะกอนด้วย LiCl เอธานอล และ โซเดียมอะซิเตต ในการกำจัดสารโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งในขณะที่การสกัดอาร์เอ็นเอด้วย Trizol reagent จะไม่ใช้สารทั้ง 3 ชนิดในการตกตะกอน



ภาพที่ 1 เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของการสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธี LiCl (1) กล้วยไม่มีกาชาสีน้ำเงิน (2) กล้วยไม่มีกาชาสีชมพู (3) กล้วยไม่มีกาชาสีขาว (4) กล้วยไม่มีหวายโซเนียเอียสกุล

สิ่งสำคัญในการแยกอาร์เอ็นเอ คือการป้องกันการสลายตัวของอาร์เอ็นเอในระหว่างขั้นตอนการสกัด วิธีการแยกอาร์เอ็นเอในพืชเริ่มต้นจากการทำลายโครงสร้างของผนังเซลล์พืช ซึ่งประกอบด้วย cellulose, pectin และ xyloglucans การใช้วิธีกลเป็นวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการทำลายโครงสร้างผนังเซลล์ โดยการบดชิ้นส่วนพืชที่ต้องการแยกอาร์เอ็นเอด้วยไนโตรเจนเหลว ในสภาพอุณหภูมิต่ำเอนไซม์ *ribonuclease* ไม่สามารถทำงานได้ การสกัดจะทำงานร่วมกับ buffer ที่ประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิดที่มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของ *nuclease*, รักษาสภาพของอาร์เอ็นเอ, ทำลายโครงสร้างของเซลล์เมมเบรน ที่ประกอบด้วยโปรตีน และไขมัน เพื่อให้เซลล์แตกออก และปลดปล่อยอาร์เอ็นเอออกสู่ภายนอกเซลล์ ซึ่งการทำลายเซลล์เมมเบรนนี้มีผลต่อปริมาณของอาร์เอ็นเอที่แยกได้ (อัญชรีย์, 2549)

Extraction buffer ประกอบด้วยสารเคมี ที่มีคุณสมบัติแตกต่างกัน ดังนี้ คือ 1. Tris-HCl และ NaCl ช่วยในการรักษาสภาพเซลล์และระดับ pH เมื่อเซลล์แตกออกให้เหมาะสมต่ออาร์เอ็นเอ 2. EDTA (ethylenediamine tetraacetate) เป็น chelating agent ของ co-factor ที่ช่วยในการยับยั้งการทำงานของ *ribonuclease* 3. Mercaptoethanol เป็น reducing agent ทำลายพันธะไดซัลไฟด์ของเอนไซม์ *ribonuclease* โดยการกำจัดอนุมูลอิสระที่เข้าไปจับกับสาร phenolics และเข้าจับกับกรดนิวคลีอิก และป้องกันการ oxidized สารในกลุ่ม phenolic compound เนื่องจากการจับกันระหว่าง phenolic compound กับกรดนิวคลีอิกในสภาพ oxidized ทำให้คุณสมบัติทางเคมีของกรดนิวคลีอิกเปลี่ยนไป 4.- PVP (polyvinylpyrrolidone) เข้าไปจับกับสาร phenolic compound และ

terpene ซึ่งเป็นสารที่สะสมในพืช ด้วยพันธะไฮโดรเจน มีผลทำให้สารเหล่านี้ตกตะกอน เพื่อสารเหล่านี้จับกับอาร์เอ็นเอ ทำให้อาร์เอ็นเอเสถียรคุณสมบัติทางเคมี นอกจากนี้ยังพบว่า SDS (Sodium dodecyl sulfate) ทำลายโครงสร้างที่เป็น โปรตีนของเซลล์พืช LiCl เป็นสารที่เลือกตกตะกอนเฉพาะ นิวคลีอิก โดยความเข้มข้นที่สูงกว่า 2M อาร์เอ็นเอสามารถตกตะกอนได้ สำหรับสาร Trizol reagent ประกอบด้วย guanidine isothiocyanate และ phenol มีผลทำให้โปรตีน เสื่อมสภาพ และยับยั้ง กิจกรรมของ เอนไซม์ ribonuclease

การสกัดอาร์เอ็นเอจากดอกกล้วยไม้สกุลต่างๆ ได้แก่ สกุลหวาย และ แอสโคเซินด้า หลังการสกัดโปรตีนด้วยฟีนอลคลอโรฟอร์ม พบว่าสารละลายที่ได้จากดอกกล้วยไม้สกุลหวายมีลักษณะเหนียวเป็นเมือก ส่วนสารสกัดจากดอกกล้วยไม้สกุลแอสโคเซินด้า มีลักษณะใส ตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย LiCl จะเห็นตะกอนสีขาว ละลายตะกอนด้วยน้ำ เมื่อนำไปตรวจสอบปริมาณด้วยวิธีอิลคโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 1% สามารถแยกอาร์เอ็นเอจากดอกกล้วยไม้ได้ทุกสกุล ยกเว้นอาร์เอ็นเอจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายมีปริมาณน้อยกว่าอาร์เอ็นเอจากกล้วยไม้สกุลอื่นๆ จากภาพที่ 1 แถบอาร์เอ็นเอที่แยกได้มีความคมชัด เมื่อดูจากแถบอาร์เอ็นเอของไรโบโซมที่แยกจากกันอย่างเห็นได้อย่างชัดเจน และไม่มีแถบของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสในระหว่างขั้นตอนการแยกอาร์เอ็นเอ แต่จะต้องใช้การวัดค่าดูดกลืนแสงที่ OD_{260}/OD_{280} เพื่อตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอด้วย ซึ่งสอดคล้องกับวิธีการของ Manickavelu *et al.* (2007) ที่ใช้การตกตะกอนด้วย LiCl ในการแยกอาร์เอ็นเอออกจากเธรตัมเมียของข้าวสาลีซึ่งมีปริมาณของโพลีแซคคาไรด์สูง

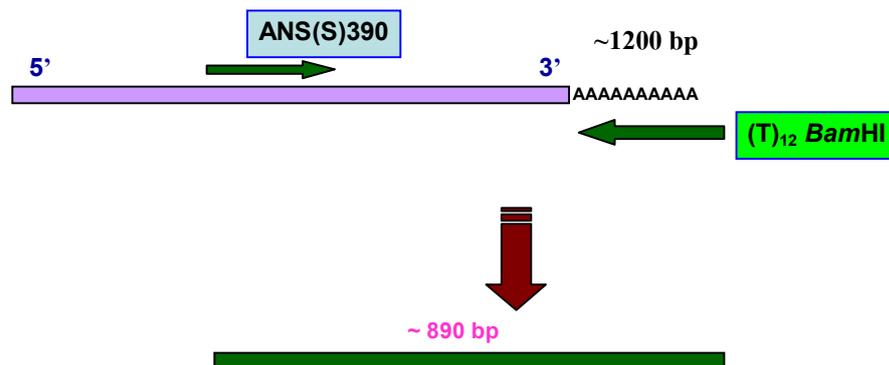
การแยกอาร์เอ็นเอด้วย LiCl ตามวิธีของ Lievens *et al.* (1997) บัฟเฟอร์จะประกอบด้วย Tris-HCl ทำหน้าที่รักษาสภาพของอาร์เอ็นเอ SDS ทำหน้าที่ทำลายโครงสร้างของเซลล์ EDTA ทำหน้าที่เป็น chelator ช่วยยับยั้งการทำงานของไรโบนิวคลีเอส ร่วมกับฟีนอลที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ การตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 3 M LiCl สามารถแยกอาร์เอ็นเอจากดอกกล้วยไม้ทั้งชนิดที่มีเมือกไม่มากคือ แอสโคเซินด้า และดอกกล้วยไม้สกุลหวายที่มีเมือกมาก ในขณะที่การตกตะกอนด้วย NaOAc และเอธานอลจะสามารถช่วยลดปริมาณของสารโพลีแซคคาไรด์ได้ดี การเติมเอนไซม์ Dnase I จะสามารถกำจัดจีโนมิกดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนซึ่งอาจมีผลต่อการทดลองต่างๆ (Manickavelu *et al.*, 2007) แต่อาร์เอ็นเอจากดอกกล้วยไม้สกุลหวายที่แยกได้มีปริมาณน้อยสอดคล้องวิธีการแยกอาร์เอ็นเอของ Salzman *et al.* (1999) ตกตะกอนอาร์เอ็นเอโดยใช้ 2.6 M LiCl ที่ความเข้มข้นสุดท้าย จะช่วยกำจัดสิ่งปนเปื้อนทำให้ได้อาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพดี ถ้าต้องการอาร์เอ็นเอในปริมาณมากต้องเพิ่มปริมาณพืชและเพิ่มปริมาณบัฟเฟอร์ การเพิ่มปริมาณบัฟเฟอร์จะช่วยลดความเหนียวของสารละลายในขั้นตอนการแยกอาร์เอ็นเอได้ ซึ่งในขณะที่การสกัดอาร์เอ็นเอด้วย CsCl₂ (Tesniere and Vayda, 1999) และ CTAB/NaCl (Chang *et al.*, 1993) ไม่เหมาะสมกับการสกัดอาร์เอ็นเอจาก

พืชที่มีปริมาณของโพลีแซคคาไรด์สูง การสกัดอาร์เอ็นเอจากพืชวิธีนี้เหมาะสมในการนำอาร์เอ็นเอไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

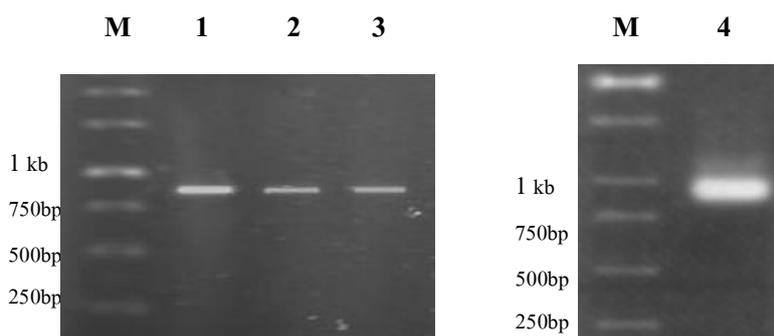
2. การโคลนยีน *ans* จากดอกกล้วยไม้หวายไซเนียเยิสกุลและดอกกล้วยไม้สกุลแอสโคเซนด้ามิกซา

2.1 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้านปลาย 3 ของยีน *ans*

นำดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ด้วยวิธีพีซีอาร์ไปตรวจสอบขนาดด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 1% พบว่าในกล้วยไม้มิกซาทั้ง 3 ชนิด และกล้วยไม้หวายไซเนียเยิสกุลหลังจากทำพีซีอาร์โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ANS(S)390 และ (T)₁₂BamHI สามารถสังเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 900 คู่เบส ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่คาดหวังประมาณ 890 คู่เบส (ภาพที่ 2 และ 3)



ภาพที่ 2 ภาพแสดงการสังเคราะห์ยีน *ans/fls* โดยวิธีพีซีอาร์ด้วยคู่ไพรเมอร์ ANS(S)390 และ (T)₁₂BamHI



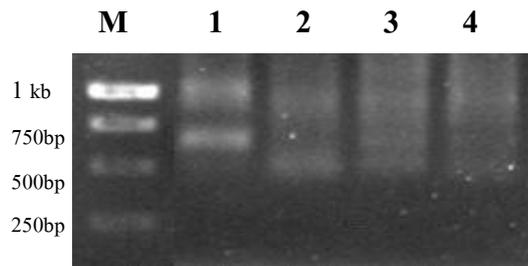
ภาพที่ 3 เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของชิ้นดีเอ็นเอ *ans* ด้านปลาย 3 ที่สังเคราะห์ได้จากอาร์เอ็นเอของกล้วยไม้หวายไซเนียเอียสกุล และ กล้วยไม้มีกาชา (M) คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (1) ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ *ans* ที่สังเคราะห์ได้จากอาร์เอ็นเอกล้วยไม้มีกาชาสีน้ำเงิน (2) กล้วยไม้มีกาชาสีชมพู (3) กล้วยไม้มีกาชาสีขาว (4) กล้วยไม้หวายไซเนียเอียสกุล ด้วยคู่ไพรเมอร์ ANS(S)390 และ (T₁₂)BamHI ขนาด 900 คู่เบส

2.2 การสังเคราะห์ชิ้น *ans* ด้านปลาย 5 ด้วย FirstChoice[®] RLM-RACE Kit (Ambion, สหรัฐอเมริกา)

ผลจากการโคลนยีนด้านปลาย 5 โดยใช้ FirstChoice[®] RLM-RACE Kit จากดอกกล้วยไม้หวายไซเนียเอียสกุล แอสโคเซินด้ามมีกาชาสีน้ำเงิน สีชมพู และสีขาว พบว่าเมื่อสังเคราะห์ชิ้น *ans* โดยใช้คู่ไพรเมอร์ 5 RACE inner primer และ ANS94(R) ซึ่งมีขนาดที่คาดหวังประมาณ 100 คู่เบส และตรวจสอบผลที่โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 1% เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ 1 kb DNA ladder marker ผลการทำที่ซีอาร์ที่ได้ พบแถบดีเอ็นเอขนาดใหญ่กว่าแถบดีเอ็นเอ 100 คู่เบสตามที่คาดหวังไว้ จึงไม่ได้ดำเนินการวิจัยต่อ

การโคลนยีน *ans/fls* ปลาย 5' จากดอกกล้วยไม้หวายและแอสโคเซินด้ามด้วย FirstChoice[®] RLM-RACE Kit ไม่ประสบความสำเร็จในการโคลนยีน *ans/fls* จากด้านปลาย 5' เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณปลายด้านนี้มีหลากหลายสูง รวมทั้งยีน *ans* เป็นยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ ANS ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม FeII_Oxy, 2OG-Fe(II) oxygenase ซึ่งเป็น superfamily ที่หน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมกระบวนการเมตาบอลิซึมโดยทั่วไป เอนไซม์ใน family นี้มีจำนวนมาก มีบริเวณอนุรักษ์ของลำดับกรดอะมิโนหลายตำแหน่งบนสายโพลีเปปไทด์ แต่บริเวณดังกล่าวมีความแตกต่างกันในลำดับนิวคลีโอไทด์ การโคลนยีนด้วยวิธีนี้จึงอาจไม่เหมาะสม ซึ่งสอดคล้องกับการโคลนยีน *ans* ในดอก *Forsythia intermedia* ของ Rosati *et al.*

(1999) สามารถโคลนยีนด้านปลาย 3' โดยใช้ degenerate primer ANS1 5'-AGC-AAG-TTH-GCM-AAY-ART-GC-3' และ ANS2 5'-CCB-CTA-TGR-AGD-ATR-CTB-TT-3' ร่วมกับวิธี inverse PCR เพื่อให้ได้ครบยีน หรืออาจเนื่องมาจากในขั้นตอนของการเชื่อมต่อดำเนินการ adaptor เข้ากับชิ้นอาร์เอ็นเอ ไม่ได้ผล ทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ 5' RACE inner primer และ ANS94(R) ที่มีขนาดที่คาดหวัง 100 คู่เบสได้

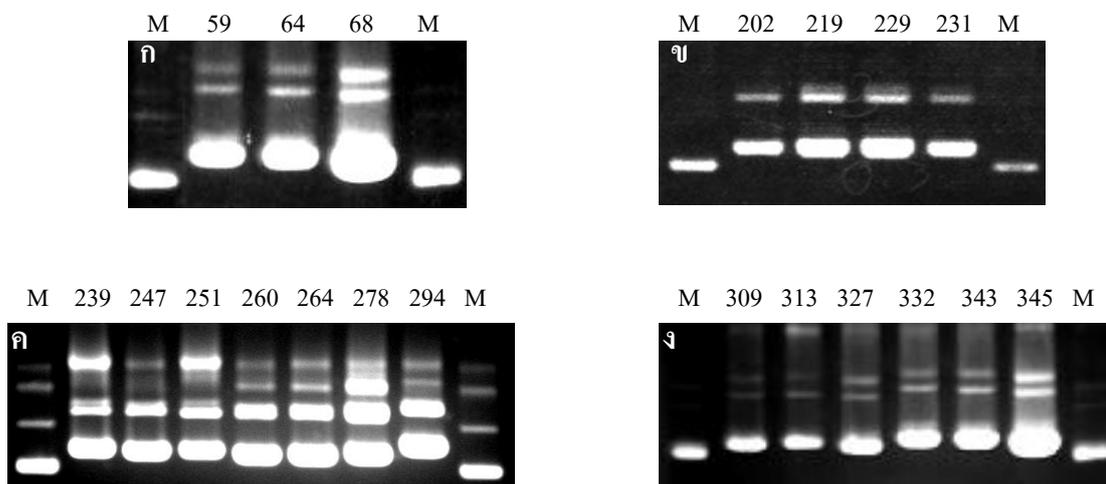


ภาพที่ 4 เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของชิ้นดีเอ็นเอยีน *ans* ด้านปลาย 5' ที่สังเคราะห์ได้จากอาร์เอ็นเอของกล้วยไม้หวายโขเนียงเย็บสกุล และ กล้วยไม้มิกาซา (M) แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (1) ขนาดชิ้นดีเอ็นเอยีน *ans* ที่สังเคราะห์ได้จากอาร์เอ็นเอของกล้วยไม้หวายโขเนียงเย็บสกุล (2) กล้วยไม้มิกาสาน้ำเงิน (3) กล้วยไม้มิกาสาสีมชมพู (4) กล้วยไม้มิกาสาสีขาว ด้วยไพรเมอร์ 5' RACE inner primer และ NS94(R)

2.3 การเชื่อมต่อยีน cDNA เข้ากับเวกเตอร์

นำดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากปลาย 3' ของยีน *ans* จากกล้วยไม้หวายโขเนียงเย็บสกุล และกล้วยไม้มิกาซาที่ได้จากการทำ PCR พบว่าทั้งในกล้วยไม้หวายโขเนียงเย็บสกุลและในกล้วยไม้มิกาซา ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 900 และ 100 คู่เบส นำชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้มาแยกขนาดโดยอิเล็กโทรโฟรีซิส บน 0.8% agarose gel และสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, เยอรมนี) นำชิ้นดีเอ็นเอขนาด 900 คู่เบส มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM-Teasy เพื่อถ่ายเข้าไปในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ XL-1 Blue เลือกโคโลนีที่มีสีเขียวมาตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอสายผสมที่มียีนด้วย phenol-chloroform โดยในกล้วยไม้หวายโขเนียงเย็บสกุล ได้โคโลนีสีเขียวจำนวน 72 โคโลนี กล้วยไม้มิกาสาน้ำเงินได้โคโลนีสีเขียวจำนวน 82 โคโลนี กล้วยไม้มิกาสาสีขาวได้โคโลนีสีเขียวจำนวน 61 โคโลนี และกล้วยไม้มิกาสาสีมชมพูได้โคโลนีสีเขียวจำนวน 93 โคโลนี ทำการคัดเลือกโคลนดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่มากกว่าพลาสมิด pGEM-T ที่ไม่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอ ซึ่งคาดว่าโคลนที่ได้น่าจะมีชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ โดยในกล้วยไม้หวายโขเนียงเย็บสกุลทำการเลือกโคลนที่ 59, 64 และ 68 กล้วยไม้มิกาสาน้ำเงินคัดเลือกโคลนที่ 202, 219, 229

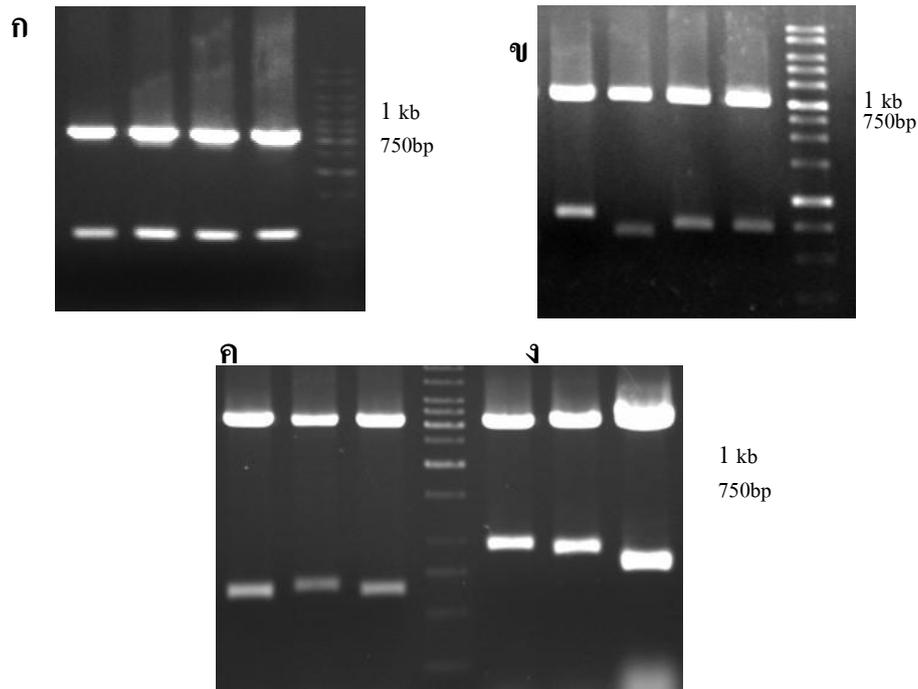
และ 231 กล้วยไม้มีกาชาสีขาวยัดเลือกโคลนที่ 247, 251, 264 และ 294 และกล้วยไม้มีกาชาสีชมพู ยัดเลือกโคลนที่ 313, 332, 343 และ 345 นำมาเลี้ยงในอาหาร LB นำมาแยกพลาสมิดด้วยวิธี alkali lysis (ภาพที่ 5) ซึ่งได้ปริมาณของพลาสมิด 30 - 40 ไมโครกรัม ต่อการเลี้ยงเชื้อในอาหาร 3 มิลลิลิตร



ภาพที่ 5 พลาสมิดที่ได้รับยีนที่สังเคราะห์ได้จากการทำการสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkali lysis

- (ก) กล้วยไม้หวายโซเนียเยียสกูล (ข) กล้วยไม้มีกาชาสีน้ำเงิน (ค) กล้วยไม้มีกาชาสีชมพู
(ง) กล้วยไม้มีกาชาสีขาวย

นำพลาสมิดสายผสมที่ทำการสุ่มเลือกชนิดละ 3 -4 โคลน มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* เพื่อตรวจสอบขนาดของยีน ที่แทรกใน cloning vector พบว่าในกล้วยไม้หวายโซเนียเยียสกูล มีการแทรกของดีเอ็นเอขนาด 900 คู่เบส กล้วยไม้มีกาชาสีน้ำเงินมีการแทรกของดีเอ็นเอขนาด 750 คู่เบส และ 900 คู่เบส 1 กิโลเบส กล้วยไม้มีกาชาสีขาวยมีการแทรกของดีเอ็นเอขนาด 900 คู่เบส กล้วยไม้มีกาชาสีชมพูมีการแทรกของดีเอ็นเอขนาด 900 คู่เบส และ 1 กิโลเบส (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 พลาสมิด p-GEMT easy ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*

(ก) กล้วยไม้หวายโซเนียเยสกูล (ข) กล้วยไม้มีกาชาสีน้ำเงิน (ค) กล้วยไม้มีกาชาสีชมพู
(ง) กล้วยไม้มีกาชาสีขาว

2.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ ANS

นำโคลนที่คาดว่าเป็นยีน *ans* บริเวณกลางยีนคือ ANS64, ANS219, ANS251 และ ANS313 มาศึกษาการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ ABI Prism™ dye terminator cycle sequencing ready reaction kit ด้วยไพรเมอร์ T7 (forward) 5'-ACGTTGTAACGACGG-3' และไพรเมอร์ SP6 (reverse) 5'-GATAAGAATTCACACA-3' นำดีเอ็นเอในส่วนที่ซ้อนทับกันมาต่อกันโดยใช้โปรแกรม BLAST2SEQUENCES จากฐานข้อมูล NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>)

ผลการศึกษาพบลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน ANS64 จากกล้วยไม้หวายโซเนียเยสกูล ANS219 จากกล้วยไม้มีกาชาสีน้ำเงิน ANS251 จากกล้วยไม้มีกาชาสีขาว และ ANS313 จากกล้วยไม้มีกาชาสีชมพู มีขนาด 901, 835, 836 และ 832 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ เพื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลที่อยู่ใน GenBank ที่เว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/> พบว่าดีเอ็นเอทั้ง

4 โคลน มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ anthocyanidin synthase-like ของ *Oncidium Gower Ramsey* (accession : EF570114) (Chiou and Yeh, 2008) ซึ่งมีขนาด 968 คู่เบสมากที่สุด โดยมีความคล้ายคลึงกับยีนที่โคลนได้กับกล้วยไม้ทั้ง 4 ชนิด คือโคลน ANS64, 219, 251 และ 313 ที่ 84%, 85%, 84% และ 83% ตามลำดับ เมื่อแปลรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นลำดับกรดอะมิโนได้โพลีเปปไทด์ขนาด 300, 278, 278 และ 277 เรสซิดิว ตามลำดับ ที่มี 1 open reading frame ขนาด 236 เรสซิดิว (ภาพที่ 7, 8, 9 และ 10) โดยยีนเหล่านี้ที่โคลนได้ขาดลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณปลายด้าน 5' อีกประมาณ 100 คู่เบส การโคลนยีนส่วนที่ขาดหายไปได้ออกแบบไพรเมอร์ชื่อ ANS94(R) ที่อยู่ในส่วนที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ ผลของการทำ multiple alignment เปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่น ๆ

DNA: GAGGAGAAGGAGAAGTATGCGATGAAGGAAGGGAAGTTTGAGGGATATGGG
+1: E E K E K Y A M K E G K F E G Y G
DNA: ACTAAGCTTCAGAAGGAGTTGCGGGGAAGAAGGCTTGGTTGATTTCTTG
+1: T K L Q K E V A G K K A W V D F L
DNA: TTTTCATAATGTCTGGCCACCTGCAAGTATTAATTATGGGGTCTGGCCCCGAA
+1: F H N V W P P A S I N Y G V W P E
DNA: AACCCGCCCGATTACAGGAAGGTGAATGAGGAATATGCGCAATACCTTCTG
+1: N P P D Y R K V N E E Y A Q Y L L
DNA: ACTGTGGTGGAAAAATTTGTTGAAGTGGCTATCAAAGGGGTTAGGGCTCGAA
+1: T V V E N L L K W L S K G L G L E
DNA: GATCATGCCTTGAAGGTGGCTTTGGGTGGAGACGATATGGAATATTTGCTC
+1: D H A L K V A L G G D D M E Y L L
DNA: AAAATCAATTATTACCCCTCCATGCCCTCGGCCAGATCTAGCATTGGGGGTG
+1: K I N Y Y P P C P R P D L A L G V
DNA: GCGGCCACACTGATTTGTCTGCAATTACCATTTTGGTGCCCAATGCAGTG
+1: A A H T D L S A I T I L V P N A V
DNA: CCCGGATTGCAAGTTTCAAAGATGATCATTGGTTTGGTAAATATATC
+1: P G L Q V F K D D H W F D A K Y I
DNA: CCTAATGCTCTTATTATTCACATTGGAGATCAAATTGAGATCTTAAGCAAC
+1: P N A L I I H I G D Q I E I L S N
DNA: GGGAAATACAAAAGTGTGTCATAGAACAACCTGTGAACAAGGAGAAGACA
+1: G K Y K S V L H R T T V N K E K T
DNA: AGAATGTCATGGCCTGTTTTTCGTTTTCCCCCCCACCGGAGAAGGTCATCGGG
+1: R M S W P V F V S P P P E K V I G
DNA: CCACTGCCACAGCTGCTCAGTGATGAGAATCCGGCCAAGTTTAAGTACAAG
+1: P L P Q L L S D E N P A K F K Y K
DNA: AAATTTAAGGAATATCAGTATTGCAAAAATCAACAAGCTGCCACAGTGATTT
+1: K F K E Y Q Y C K I N K L P Q * F
DNA: ATGAGAGCAAAAATTTGGCCTAGAAAATAATATTTTTTTTAAGAATAACTAAAT
+1: M R A K F G L E I I F F * E * L N
DNA: TGAGTTATACAATGTTCTTAACATCTGAATGGTGCTCAGATCTATGACGAT
+1: * V I Q C S * H L N G A Q I Y D D
DNA: GGTACCTATAAATGTAGTATGTATGGTGCAATGTTTTCTTATTTATTCGAT
+1: G T Y K C S M Y G A M F S Y L F D
DNA: GCAGTTTTATTTTGATTTTAAAAAAAAAAAAAAAAA
+1: A V L F * F * K K K K

>ANS64 frame+1, 300 residues

EEKEKYAMKEGKFEYGTKLQKEVAGKKAWVDFLFHNVWPPASINYGVWP
ENPPDYRKVNEEYAYLLTVVENLLKWLKGLGLEDHALKVALGGDDMEY
LLKINYYPPCPRPDLALGVAHDTLSAITILVNPNAVPGLOVFKDDHWFDA
KYIPNALIIHIGDQIEILSNGKYKSVLHRTTVNKEKTRMSWPVFSPPPE
KVIGPLPQLLSDENPAKFKYKFFKEYQYCKINKLPQ*FMRAKFGL E I I F F
*E*LN*VIQCS*HLNGAQIYDDGTYKCSMYGAMFSYLFDAVLF*F*KKKK

ภาพที่ 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน ANS64 ที่แยกมาได้จากดอกกล้วยไม้หายากชนิดชุก
Dendrobium Sonia Earsakul ความยาว 901 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโน
300 เรสซิดิว ชีคเส้นใต้แสดง open reading frame

DNA: GAGGAGAAGGAGAAGTATGCGATGAAGGAAGGGAAGATGGAGGGTTATGGG
+1: E E K E K Y A M K E G K M E G Y G
DNA: ACTAAGCTTCAGAAGGAGCTCGCGGGGAAGAAGGCTTGGGTTGACTTTTTG
+1: T K L Q K E L A G K K A W V D F L
DNA: TTCCATAACATTTGGCCGCCGGCGAGTATTGATTTTTCCGTCTGGCCCCGAA
+1: F H N I W P P A S I D F S V W P E
DNA: AACCCGCCCGATTACAGGAAAGTAGATGAGGAATATGCTCAACACCTTCTC
+1: N P P D Y R K V D E E Y A Q H L L
DNA: ACTTTGGTTGAAAACCTTGTGAAGTGCCTCTCTAAGGGATTAGGGCTTGAA
+1: T L V E N L L K C L S K G L G L E
DNA: GGCATATATTAAGATGGCATTGGGTGGTATGAAATGGAATATTTACTG
+1: G H I L K M A L G G D E M E Y L L
DNA: AAAATAAATTATTACCCTCCATGCCCAAGACCAGATCTAGCATTGGGAGTG
+1: K I N Y Y P P C P R P D L A L G V
DNA: GTGGCCACACTGACCTATCTGCAATTACCATTTGGTCCCTAATGAAGTC
+1: V A H T D L S A I T I L V P N E V
DNA: CCTGGGTTGCAAGTTTTTCAGAGATGATCCTGGTTTTGATGCTAAGTATATT
+1: P G L Q V F R D D P G F D A K Y I
DNA: CCTAATGCTCTCATTATTCACATTGGAGATCAACTTGAGATCTTAAGCAAT
+1: P N A L I I H I G D Q L E I L S N
DNA: GGAAAATACAAAAGTGTGTGCACAGAACAACAGTGAACAAGGAGAAGACG
+1: G K Y K S V L H R T T V N K E K T
DNA: AGGATGTCATGGCCGATTTTTATTTTCGCCGCCGCCGAGAAGATCGTCGGC
+1: R M S W P I F I S P P P E K I V G
DNA: CCACTGCCGGAGCTGCTTAGTGATGAGAATCAGGCCAAGTTTAAGTCTAAG
+1: P L P E L L S D E N Q A K F K S K
DNA: AAATTTAAGGATTATAAGTACTGTAAAATCAACAAGCTACCACAGTGATTT
+1: K F K D Y K Y C K I N K L P Q * F
DNA: ATCAGAATAATTCGGCTATGTAATAATAAGTTCAACAGATTTGAGTTTTGT
+1: I R I I R L C N N K F N R F E F C
DNA: TGTGTTCTCAACAGAACAATGCTCTATTTCAGATCGATAATAATATTATCTT
+1: C V L N R T M L Y S D R * * Y Y L
DNA: ATTTATCAAAAAAAAAAAAA
+1: I Y Q K K K

>ANS219, frame+1, 278 residues

**EEKEYAMKEGKMEGYGTKLQKELAGKKAWVDFLHNIWPPASIDFSVWP
ENPPDYRKVDEEYAQHLLTLVENLLKCLSKGLGLEGHILKMALGGDEMEY
LLKINYPPCPRPDLALGVVAHTDLSAITILVPNEVPGLQVFRDDPGFDA
KYIPNALIIHIGDQLEILSNGKYKSVLHRTTVNKEKTRMSWPIFISPPPE
KIVGPLPELLSDENQAKFKSKKFKDYKYCKINKLPQ*FIRIIRLCNNKFN
RFEFCCVLNRTMLYSDR**YYLIYQKKK**

ภาพที่ 8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน ANS219 ที่แยกมาได้จากดอกกล้วยไม้แอสโคเซินด้ามิกษา
สีน้ำเงิน ความยาว 835 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโน 278 เรสซิดิว ปิด
เส้นใต้แสดง open reading frame

DNA: GAGGAGAAGGAGAAGTATGCGATGAAGGAAGGGAAGATGGAGGGTTATGGG
 +1: E E K E K Y A M K E G K M E G Y G
 DNA: ACTAAGCTTCAGAAGGAGCTCGCGGGGAAGAAGGCTTGGGTTGACTTTTTG
 +1: T K L Q K E L A G K K A W V D F L
 DNA: TTCCATAATATTTGGCCGCCGCGAGTATTGATTTTGCCGTCTGGCCGAA
 +1: F H N I W P P A S I D F A V W P E
 DNA: AACCCGCCCGATTACAGGAAAGTAAATGAGGAATATGCTCAACACCTCCTC
 +1: N P P D Y R K V N E E Y A Q H L L
 DNA: ACTTTGGTTGAAAATTTGTTGAAGTGGCTCTCTAAGGGGTTAGGGCTTGAA
 +1: T L V E N L L K W L S K G L G L E
 DNA: GGCATACATTAAGATGGCATTGGGTGGGGATGAAATAGAATATTTATTG
 +1: G H T L K M A L G G D E I E Y L L
 DNA: AAAATAAATTATTACCCTCCATGCCCAAGACCAGATCTAGCATTGGGAGTG
 +1: K I N Y Y P P C P R P D L A L G V
 DNA: GTGGCCACACTGACCTAACTGCAATTACCATTTTGGTCCCTAATGAAGTC
 +1: V A H T D L T A I T I L V P N E V
 DNA: CCTGGTTGCAAGTTTTTCAGAGATGATCCTGGTTTTGATGCTAAGTATATT
 +1: P G L Q V F R D D P G F D A K Y I
 DNA: CCTAATGCTCTCATTATACACATTTGGAGATCAACTTGAGATCTTAAGCAAT
 +1: P N A L I I H I G D Q L E I L S N
 DNA: GGAAAATACAAAAGTGTGTTGCACAGAACAACAGTGAACAAGGAGAAGACG
 +1: G K Y K S V L H R T T V N K E K T
 DNA: AGGATGTCATGGCCGATTTTTATTTTCGCCGCCGTCGGAGAAGATCATCGGC
 +1: R M S W P I F I S P P S E K I I G
 DNA: CCACTGCCGGAGCTGCTTAGTGATGAGAATCAGGCCAAGTTTAAGTCCAG
 +1: P L P E L L S D E N Q A K F K S K
 DNA: AAATTTAAGGATTATAAGTACTGTAAAATCAACAAGCTACCACAGTGATTT
 +1: K F K D Y K Y C K I N K L P Q * F
 DNA: ATCAGAATAATTCGGCTATGTAATAATAAGTTTAACTAATTTGAGTTTTAC
 +1: I R I I R L C N N K F N * F E F Y
 DNA: TGTGTTCTCAACAAAACAATGCTCTATTTCAGATCGGTAATAATATTATCTT
 +1: C V L N K T M L Y S D R * * Y Y L
 DNA: ATTTATCAAAAAAAAAAAAAA
 +1: I Y Q K K K

>ANS251, frame+1, 278 residues

EEKEYAMKEGKMEGYGTKLQKELAGKKAWVDFLFHNIWPPASIDFAVWP
ENPPDYRKVNEEYAQHLLTLVENLLKWLKGLGLEHTLKMALGGDEIEY
LLKINYPPCPRPDLALGVVAHTDLTAITILVPNEVPGLQVFRDDPGFDA
KYIPNALIIHIGDQLEILSNGKYKSVLHRTTVNKEKTRMSWPIFISPPSE
KIIGPLPELLSDENQAKFKSKFKDYKYCKINKLPQ*FIRIIRLCNNKFN
 *FEFYCVLNKTMLYSDR**YYLIYQKKK

ภาพที่ 9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน ANS251 ที่แยกมาได้จากดอกกล้วยไม้แอสโคเซ็นด้ามิกานา
 สีขาว ความยาว 836 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโน 278 เรสซิดิว จัดสั้น
 ได้แสดง open reading frame

```

DNA: GAGGAGAAGGAGAAGTATGCGATGAAGGAAGGGAAGATGGAGGGTTATGGG
+1: E E K E K Y A M K E G K M E G Y G
DNA: ACTCCGCTTCAGAAGGAGCTCGCGGGGAAGAAGGCTTGGGTTGACTTTTTTG
+1: T P L Q K E L A G K K A W V D F L
DNA: TTCCATAATATTTGGCCGCCGGCGAGTATTGATTTTGCCGTCTGGCCCCGAA
+1: F H N I W P P A S I D F A V W P E
DNA: AACCCGCCCGATTACAGGAAAGTAAATGAGGAATATGCTCAACACCTCCTC
+1: N P P D Y R K V N E E Y A Q H L L
DNA: ACTTTGGTTGAAAATTTGTTGAAGTGGCTCTCTAAGGGGTTAGGGCTTGAA
+1: T L V E N L L K W L S K G L G L E
DNA: GGCATACATTAAAGATGGCATTGGGTGGGGATGAAATAGAATATTTATTG
+1: G H T L K M A L G G D E I E Y L L
DNA: AAAATAAATTATTACCCTCCATGCCCAAGACCAGATCTAGCATTGGGAGTG
+1: K I N Y Y P P C P R P D L A L G V
DNA: GTGGCCACACTGACCTATCTGCAATTACCATTTTGGTCCCTAATGAAGTC
+1: V A H T D L S A I T I L V P N E V
DNA: CCTGGTTTGAAGTTTTCAGAGATGATCCTGGTTTTGATCTAAGTATATT
+1: P G L Q V F R D D P G F D A K Y I
DNA: CCTAATGCTCTCATTATTCACATTGGAGATCAACTGGGATCCTAAGCAAT
+1: P N A L I I H I G D Q L G I L S N
DNA: GGAAAATACAAAGGTGTGCACAGAACAACAGTGAACAAGGAGAAGACGAGG
+1: G K Y K G V H R T T V N K E K T R
DNA: ATGTCATGGCCGATTTTTATTTCGCCGCCGTCCGAGAAGATCATCGGCCCA
+1: M S W P I F I S P P S E K I I G P
DNA: CTACCGGAGCTGCTTAGTGATGAGAATCAGGCCAAGTTTAAGTCCAAGAAA
+1: L P E L L S D E N Q A K F K S K K
DNA: TTTAAGGATTATAAGTACTGTAAAATCAGCAAGCTACCACAGTGATTTATC
+1: F K D Y K Y C K I S K L P Q * F I
DNA: AGAATAATTCGGCTATGTAATAATAAGTTTAACTAATTTGAGTTTTACTGT
+1: R I I R L C N N K F N * F E F Y C
DNA: GTTCTCAACAAAACAATGCTCTATTCAGATCGATAATAATGGGATCTTATT
+1: V L N K T M L Y S D R * * W D L I
DNA: TATCAAAAAAAAAAAAA
+1: Y Q K K K

```

>ANS313, frame+1, 277 residues

```

EEKEYAMKEGKMEGYGTPLQKELAGKKAWVDFLHNIWPPASIDFAVWP
ENPPDYRKVNEEY AQHLLTLVENLLKWL SKGIGLEGHTLKMALGGDEIEY
LLKINYYPPCPRPD LALGVVAHTDLSAITILVPNEVPGLQVFRDDPGFDA
KYIPNALIIHIGDQLGILSNGKYKGVHRTTVNKEKTRMSWPIFISPPSEK
IIGPLPELLSDENQAKFKSKKFKDYKYCKISKLPQ*FIRIIRLCNNKFN*
FEFYCVLNKTM LYS DR**WDLIYQKKK

```

ภาพที่ 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ โคลน 313 ที่แยกมาได้จากดอกกล้วยแอสโคเซียมค้ำมิกาซาสีชมพู ความยาว 832 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโน 277 เรสซิดิว จัดเส้นได้ แสดง open reading frame

เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนที่โคลนได้จากกล้วยไม้ทั้ง 4 ชนิด โดยใช้โปรแกรม ClustralW จาก www.ebi.ac.uk ดังแสดงในภาพที่ 11 จะเห็นได้ว่าลำดับของกรดอะมิโนในกล้วยไม้หวายไซเนียเฮียสกูลมีความแตกต่างจากกล้วยไม้มิกาซาทั้ง 3 ชนิด จำนวน 26 ตำแหน่ง พบในบริเวณปลาย C-terminal มากกว่าปลาย N-terminal ได้แก่ตำแหน่ง M13, L24, I38, D45,

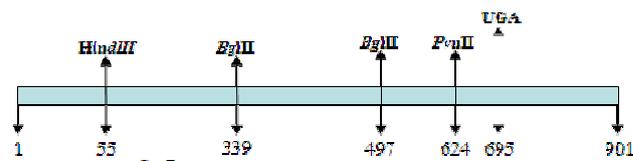
ans/fls ของกล้วยไม้มีกษาศิชมพูนีร์หัสคือ UGA อยู่ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 691 ปลาย 3' non coding region ขนาด 141 คู่เบส เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ans/fls* ของกล้วยไม้แต่ละชนิด วิเคราะห์ตำแหน่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ด้วยโปรแกรม Webcutter ที่เว็บไซต์ <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/seq-util.html> (ตารางที่ 1) เขียนแผนที่ตำแหน่งตัดของ ยีนได้ดังภาพที่ 12 แสดงให้เห็นว่ายีน *ans/fls* ในกล้วยไม้หวายโซเนียเยี่ยสกุลและกล้วยไม้มีกษาศิ ทั้ง 3 สปีชีส์ มีจุดตัดเหมือนกันคือ *Bgl*III และมีความแตกต่างกันคือ *Sac*I และ *Sca*I ในระหว่างยีนของ กล้วยไม้หวายโซเนียเยี่ยสกุลและกล้วยไม้มีกษาศิทั้ง 3 สปีชีส์ และพบเฉพาะจุดตัด *Pvu*II ในกล้วยไม้ หวายโซเนียเยี่ยสกุลเท่านั้นสามารถแปลรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นลำดับกรดอะมิโนได้จำนวน 291 เรสซิดิว และพบว่าลำดับการจัดเรียงตัวของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน ANS/FLS ดอก กล้วยไม้ทั้ง 4 ชนิด ตรงกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ FLS ของหอม *Allium cepa* (accession : AAO63023) ดังตารางที่ 2

จากผลการทำ alignment เพื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนระหว่างดอกกล้วยไม้ที่โคลน ได้กับพืช 21 ชนิด (ภาพที่ 13) พบว่าในลำดับของกรดอะมิโนของเอนไซม์ FLS ในกล้วยไม้ทั้ง 4 ชนิด กับพืชชนิดอื่น 10 ชนิด มีส่วนอนุรักษ์ 19 ตำแหน่ง ในขณะที่ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ ANS ในกล้วยไม้ทั้ง 4 ชนิด กับพืชชนิดอื่น 11 ชนิด มีส่วนอนุรักษ์ 15 ตำแหน่ง ที่แตกต่างกัน โดย ลำดับกรดอะมิโน ANS/FLS ที่แปลรหัสได้นั้น มีตำแหน่งอนุรักษ์เหมือนกันกับตำแหน่งอนุรักษ์ ของยีน FLS มากกว่า ANS ซึ่งผลจากการมีส่วนอนุรักษ์ที่ต่างกันนี้อาจมีผลต่อการเกิดการขด ตัวทำให้น้ำที่ต่าง ๆ ของโปรตีนที่เกิดขึ้นแตกต่างกัน (Anfinsen, 1972) จึงเป็นผลทำให้เอนไซม์ ทั้งสองชนิดนี้มีความแตกต่างกัน ซึ่งเอนไซม์ในกลุ่ม 2-oxoglutarate dependent dioxygenase (2-ODD) ได้แก่ ANS และ FLS จะมีตำแหน่งที่ทำให้เกิดรูปแบบการเกิด โครงสร้างทุติยภูมิแบบ alpha-helic และ beta-sheet ซึ่งการมีตำแหน่งการเกิด โครงสร้างทุติยภูมิทั้ง 2 แบบนี้จะก่อให้เกิด โครงสร้างลูกผสมที่เรียกว่า double-stranded beta helix ขึ้น โดยมีตำแหน่งการเกิดแบบ beta-sheet 4 ตำแหน่ง จำนวน 2 กลุ่ม เกาะกันเป็นแบบ anti-parallel คล้ายกับแซนวิช ที่ประกอบด้วยตำแหน่ง อนุรักษ์ 2 สำหรับจับกับ Fe^{3+} และ 2-OG คือ ลำดับ Hx(D/E)xnH และ RxS ตามลำดับ (Clifton *et al.*, 2006; Chua *et al.*, 2008)

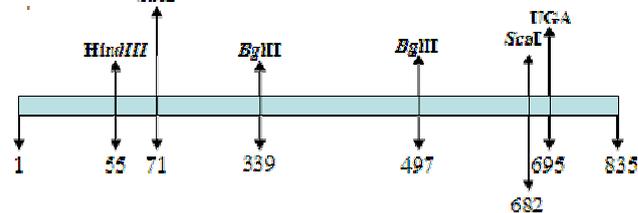
ตารางที่ 1 ตำแหน่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สำคัญบนยีน *ans/fls* ของกล้วยไม้หวายโชเนียงเอียสกุลและกล้วยไม้แอสโคเซ็นด้า มิกาช

เอนไซม์	เอียสกุล	มิกาชสีน้ำเงิน	มิกาชสีขาว	มิกาชสีชมพู	จำนวน/ตำแหน่งจุดตัด
<i>HindIII</i>	1/55	1/55	1/55	-	
<i>BglII</i>	2/339, 497	2/339, 497	2/339, 497	1/339	
<i>PvuII</i>	1/624	-	-	-	
<i>SacI</i>	-	1/71	1/71	1/71	
<i>ScaI</i>	-	1/682	1/679	1/679	
<i>BamHI</i>	-	-	-	1/497	

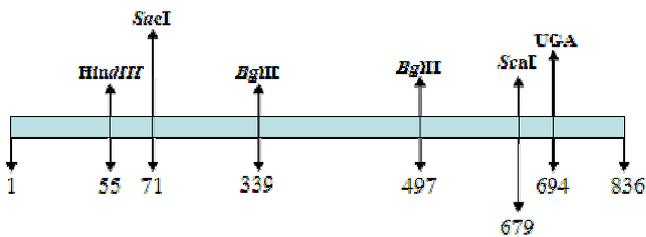
ก.



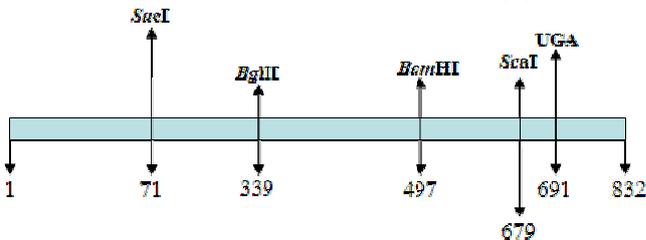
ข.



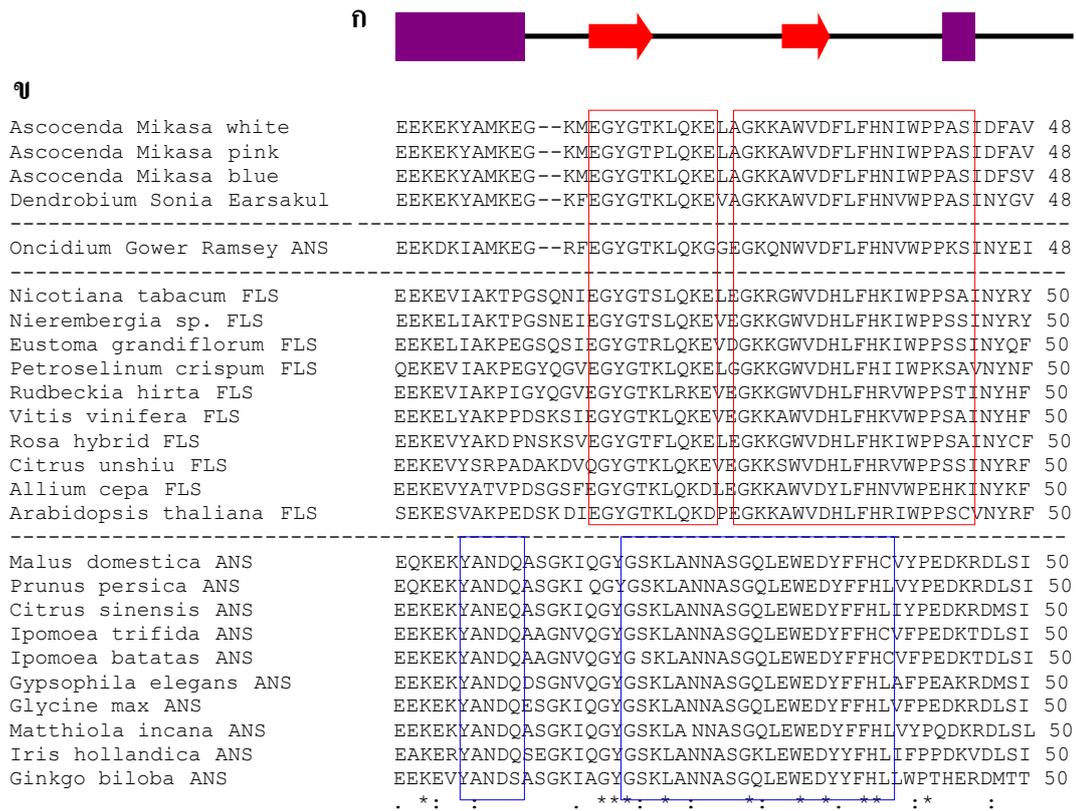
ค.



ง.



ภาพที่ 12 ตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะของยีน *ans/fls* ที่แยกจาก (ก.) กล้วยไม้หวายโชเนียงเอียสกุล (ข.) กล้วยไม้มิกาชสีน้ำเงิน (ค.) กล้วยไม้มิกาชสีขาว (ง.) กล้วยไม้มิกาชสีชมพู



ภาพที่ 13 ก. ตำแหน่งการเกิดโครงสร้างทุติยภูมิแสดงด้านบนลำดับโปรตีน รูปแบบ beta-sheets

(ลูกศรสีแดง) และรูปแบบการเกิด alpha-helices (สีม่วง)

ข. การวิเคราะห์ multiple alignment ระหว่างโปรตีนของยีน *ans/fls* ในดอกกล้วยไม้ หวายและแอสโคเซินด้ากับโปรตีน FLS และ ANS ในพืชอื่น โดยกรอบสีน้ำเงินแทน ตำแหน่งอนุรักษ์ของโปรตีน ANS และกรอบสีแดงแทนตำแหน่งอนุรักษ์ของโปรตีน FLS ซึ่งมีส่วนอนุรักษ์ที่ตำแหน่ง 2OG-FeII_Oxy, 2OG-Fe(II) oxygenase (กรอบสีดำ) และ dioxygenase domain B (ขีดเส้นใต้) โดยมีตำแหน่ง iron binding (ตัวอักษรสีเหลือง)และ ตำแหน่ง 2-oxoglutarate binding (ตัวอักษรสีเขียว)

ก



ข

Ascocenda Mikasa white	WPENPPDYRKVNEEYAQHLLTLVENLLKWLKGLGLEGHTLKMALGG -DE	97
Ascocenda Mikasa pink	WPENPPDYRKVNEEYAQHLLTLVENLLKWLKGLGLEGHTLKMALGG -DE	97
Ascocenda Mikasa blue	WPENPPDYRKVDEEYAQHLLTLVENLLKCLSKGLGLEGHILKMALGG -DE	97
Dendrobium Sonia Earsakul	WPENPPDYRKVNEEYAQYLLTVVENLLKWLKGLGLEDHALKVALGG -DD	97

Oncidium Gower Ramsey ANS	WPQNPPDYRKVNEEYAQYLHNVENLLKWLKGLGLEEHVMKALGG -DD	97

Nicotiana tabacum FLS	WPKNPPSYREANEYAKRLREVAEKIFKSLSLGLGLEAHEMMEAAGG -EE	99
Nierembergia sp. FLS	WPKNPPSYREANEVYGKLRVVDKIFKSLSLGLGLEAHEMKEAAGG -DD	99
Eustoma grandiflorum FLS	WPKNPPAYREANEYAKRLQLVVDNLFKYLSLGLDLEPNSFKDGAGG -DD	99
Petroselinum crispum FLS	WPNNPPLYREANEYAVALRGVVDKLFALSIGIGLEKHELKASGG -DD	99
Rudbeckia hirta FLS	WPKNPPSYREINEQYQSMIPVADKLLGSLGGLGHEGDMKQGLGG -ED	99
Vitis vinifera FLS	WPKTPPSYRDANEYTKCLRGVADRLFSRSLGLGLDEDELKKSVDG -DE	99
Rosa hybrid FLS	WPKNPASYSREANEYAKNLHKVVEKLFKLSLGLGLEAQELKKAAGG -DD	99
Citrus unshiu FLS	WPKNPPSYRANVEEYAKYMRVVDKLFYLSLGLGVEGGVLEKAAAGG -DD	99
Allium cepa FLS	WPKNPPAYRKANEYTKHLQVVVDKMSYLSLGLGLESHVLEKAAAGG -DD	99
Arabidopsis thaliana FLS	WPKNPPEYREVNEEYAVHVKKLSETLLGLISDGLGLKRDALKEGLGG -EM	99

Malus domestica ANS	WPQTPADYIEATAEYAKQLRELATKVLKVLISLGLGLEDEGRLEKEVGGLEE	100
Prunus persica ANS	WPQTPADYIEATAEYAKELRALATKVLRVLSLGLGLEEGRLEKEVGGLEE	100
Citrus sinensis ANS	WPKTPSDYIEATSEYARQLRSLATKILAVLSLGLGLEEGRLEKEVGGLEE	100
Ipomoea trifida ANS	WPKTPSDYIDATREYAKHLRALTTTVLAVLSLGLGLEEGRLEKEVGGMEE	100
Ipomoea batatas ANS	WPKTPSDYIDATREYAKLRLALTTTVLAVLSLGLGLEEGRLEKEVGGMEE	100
Gypsophila elegans ANS	WPKAPADYIPAVSDYSKELRGLRGLATRILSALSGLGLEEGRLEKEVGGLED	100
Glycine max ANS	WPKKPPDYIEVTSEYAKRLRGLATKMLEALSIGLGLGGRLEKEVGGMEE	100
Matthiola incana ANS	WPKTPTDYIEATSEYAKQLRSLATKVFKAALSIGLGLGPHRLEKCVGGFED	100
Iris hollandica ANS	WPKEPADYIEVMMFEAKQLRVVTKMLSILSGLGFEEKLEKLLGGMEE	100
Ginkgo biloba ANS	WPKYPSDYIEATDEYGRFIRKLVSRILGLTSMELGLEEPRMETLGG -QD	99

** . * * : : : : * * : . . . : * * :

ก



ข

Ascocenda Mikasa white	IEYLLKINYYPPCPRPDLALGVVAHDTLTAITILVPNEVPGLQVFRDDPG	147
Ascocenda Mikasa pink	IEYLLKINYYPPCPRPDLALGVVAHDTLSAITILVPNEVPGLQVFRDDPG	147
Ascocenda Mikasa blue	MEYLLKINYYPPCPRPDLALGVVAHDTLSAITILVPNEVPGLQVFRDDPG	147
Dendrobium Sonia Earsakul	MEYLLKINYYPPCPRPDLALGVAAHDTLSAITILVPNAVPGQVFKDDHW	147

Oncidium Gower Ramsey ANS	MEYLLKINYYPPCPRPDLALGVASHTDLSAITILVPNEVPGLQVFRNDYW	147

Nicotiana tabacum FLS	IVYLLKINYYPPCPRPDLALGVVAHDTMSHITILVPNEVQGLQVFKDDHW	149
Nierembergia sp. FLS	IVYLLKINYYPPCPRPDLALGVVAHDTMSYITILVPNEVQGLQVFKDGHW	149
Eustoma grandiflorum FLS	LVYLMKINYYPPCPRPDLALGVVAHDTMSAITILVPNEVQGLQVFKDGHW	149
Petroselinum crispum FLS	LIYMLKINYYPPCPRPDLALGVVAHDTMSAITILVPNEVQGLQVFKDDHW	149
Rudbeckia hirta FLS	LTYMLKINYYPPCPCPELALGVVAPHTDMSSITILVPNEVQGLQVFKDDHW	149
Vitis vinifera FLS	LTYLLKINYYPPCPRPDLALGVVAHDTMSSITMLVPNEVQGLQVFRDDHW	149
Rosa hybrid FLS	LVYLLKINYYPPCPRPDLALGVVAHDTMSALTILVPNDVQGLQACRDGQW	149
Citrus unshiu FLS	IEYMLKINYYPPCPRPDLALGVVAHDTLSALTILVPNEVPGLQVFKDDRW	149
Allium cepa FLS	IEYLLKINYYPPCPRPDLALGVVAHDTMSSLTILVPNEVPGLQVFKDDHW	149
Arabidopsis thaliana FLS	AEYMMKINYYPPCPRPDLALGVVPAHDTLSGITLILVPNEVPGLQVFKDDHW	149

Malus domestica ANS	LLLQMKINYYPKCPQPELALGVEAHDTVSALTFILHNMVPGQLQFYEGKW	150
Prunus persica ANS	LLLQMKINYYPLCPQPELALGVEAHDTVSALTFILHNMVPGQLQFYEGKW	150
Citrus sinensis ANS	LLLQMKINYYPKCPQPELALGVEAHDTVSALTFILHNMVPGQLQFYKDKW	150
Ipomoea trifida ANS	LLLQMKINYYPKCPQPELALGVEAHDTVSALTFILHNMVPGQLQFYEGKW	150
Ipomoea batatas ANS	LLLQMKINYYPKCPQPELALGVEAHDTVSALTFILHNMVPGQLQFYEGKW	150
Gypsophila elegans ANS	LNLQMKINYYPKCPQPELALGVEAHDTVSALTFILHNMVPGQLQFYEGKW	150
Glycine max ANS	LLLQMKINYYPICPQPELALGVEAHDTVSALTFLHNMVPGQLQFYQGW	150
Matthiola incana ANS	LLLQMKINYYPKCPQPELALGVEAHDTVSALTFILHNMVPGQLQFYEGKW	150
Iris hollandica ANS	LLMQMKINYYPRCPQPELALGVEAHDTVSLSFILHNDVPGQLQFYGGRW	150
Ginkgo biloba ANS	LEMQLKINYYPRCPQPELALGVEAHDTISALTFLLHNMVPGQLQFYKDGKW	149

:***** ** *:***** .***: : . . . : * * * * *

ภาพที่ 13 (ต่อ)



๗

Ascocenda Mikasa white	FD	AKYIPNALIIHIGDQ	LEILSNGKYKSVL	ERTTVNKEKT	RM	SWP	IFISP	197
Ascocenda Mikasa pink	FD	AKYIPNALIIHIGDQ	LGILSNGKYKSG-V	ERTTVNKEKT	RM	SWP	IFISP	196
Ascocenda Mikasa blue	FD	AKYIPNALIIHIGDQ	LEILSNGKYKSVL	ERTTVNKEKT	RM	SWP	IFISP	197
Dendrobium Sonia Earsakul	FD	AKYIPNALIIHIGDQ	LEILSNGKYKSVL	ERTTVNKEKT	RM	SWP	VFVSP	197

Oncidium Gower Ramsey ANS	LD	AKYIPNALIIHIGDQ	EILSNGIYKSVL	ERTTLNKEKT	RM	SWP	VFVSP	197

Nicotiana tabacum FLS	YD	VKIIPNALIIHIGDQ	VEILSNGKYKSVY	ERTTVTKDKT	RM	SWP	VFLEP	199
Nierembergia sp. FLS	YD	VKIIPNALIVHIGDQ	VEILSNGKYKSVY	ERTTVTKDKT	RM	SWP	VFLEP	199
Eustoma grandiflorum FLS	YD	CKYIPNALIVHIGDQ	VEIMSNGKYKSVY	ERTTVNKEKT	RM	SWP	VFLEP	199
Petroselinum crispum FLS	YD	VKIIPNALIIHIGDQ	EILSNGKYKSVY	ERTTVNKDKT	RM	SWP	VFLEP	199
Rudbeckia hirta FLS	YD	AYIPNALIIHIGDQ	EILSNGKYKSVY	ERTTVNKEKT	RM	SWP	MFLEP	199
Vitis vinifera FLS	FD	VKIIPNALVIHIGDQ	LEILSNGKYKSVL	ERTTVNKEMT	RM	SWP	VFLEP	199
Rosa hybrid FLS	YD	VKIIPNALVIHIGDQ	MEVMSNGKFKAVL	ERTTVSKDKT	RI	SWP	VFLEP	199
Citrus unshiu FLS	ID	AKYIPNALVIHIGDQ	EILSNGKYKAVL	ERTTVNKDKT	RM	SWP	VFLEP	199
Allium cepa FLS	FD	AKYIPNALICHIGDQ	LEILSNGKYKSVL	ERTTVNKEKS	RM	SWP	VFCSP	199
Arabidopsis thaliana FLS	FD	AEYIPSAVIVHIGDQ	ILRLSNGRYKNVL	ERTVDKEKT	RM	SWP	VFLEP	199

Malus domestica ANS	VT	AKCVPNSIVMHIGDT	LEILSNGKYKSVL	IRGMVNKEKV	RI	SWAV	FCEP	200
Prunus persica ANS	VT	AKCVPNSIIMHIGDT	LEILSNGKYKSVL	IRGMVNKEKV	RI	SWAV	FCEP	200
Citrus sinensis ANS	VT	AKCVPNSIILHIGDT	LEILSNGEYKSVL	IRGLVNKEKV	RI	SWAV	FCEP	200
Ipomoea trifida ANS	VT	AKCVPNSIIMHIGDT	VEILSNGKYKSVL	IRGVVNREKV	RV	SWAV	FCEP	200
Ipomoea batatas ANS	VT	AKCVPNSIIMHIGDT	VEILSNGKYKSVL	IRGVVNREKV	RV	SWAV	FCEP	200
Gypsophila elegans ANS	VT	AKCVPNSIIMHIGDT	LEILSNGKYKSVL	IRGLVNKEKV	RI	SWAV	FCEP	200
Glycine max ANS	FT	AKCVPNSILMHIGDT	LEILSNGKYKSVL	IRGLVNKEKV	RI	SWAM	FCEP	200
Matthiola incana ANS	VT	AKCVPNSIIMHIGDT	LEILSNGKFKSVL	IRGLVNKEKV	RV	SWAV	FCEP	200
Iris hollandica ANS	VN	ARLVPSLIVHIGDT	LEILSNGRYKSVL	IRGLVNKEKV	RI	SWAV	FCEP	200
Ginkgo biloba ANS	VT	AKCIPGALIVHIGDQ	VEILSNGKYKSVL	IRGLVNKEKV	RI	SWAV	FCDP	199
		:	:::*	::**	::**	::**	::**	::**



๗

Ascocenda Mikasa white	PSE-KI	IGPLPELLSD	-ENQAKFKSKKFKDYKYCKINKLPQ	-----	236			
Ascocenda Mikasa pink	PSE-KI	IGPLPELLSD	-ENQAKFKSKKFKDYKYCKISKLPQ	-----	235			
Ascocenda Mikasa blue	PPE-KI	VGPLPELLSD	-ENQAKFKSKKFKDYKYCKINKLPQ	-----	236			
Dendrobium Sonia Earsakul	PPE-KI	VGPLPELLSD	-ENPAKFYKFKKEYQYCKINKLPQ	-----	236			

Oncidium Gower Ramsey ANS	PPE-KI	IGPLPELVSD	-ENPAKFKSKKFKDYQYCKINRLPQ	-----	236			

Nicotiana tabacum FLS	PSE-HEV	GPIPKLVNE	-ANPPKFKTKKYKDYVYCKLNKLPQ	-----	238			
Nierembergia sp. FLS	PSE-QEV	GPIPKLVNE	-ANPPKFKTKKYKDYVYCKLNKLPQ	-----	238			
Eustoma grandiflorum FLS	PPD-HEV	GPIPKLVNE	-ENPAKFKTKKYKDYAYCKLFLPQ	-----	238			
Petroselinum crispum FLS	PPE-LLT	GPIPKLITD	-ENPAKFKTKKYKDYVYCKLNKLPQ	-----	238			
Rudbeckia hirta FLS	PPE-FEV	GPIPKLITQ	-ENPAKYTKKFKDYVYCKLNKLPQ	-----	238			
Vitis vinifera FLS	PPE-LAI	GPLSKLINE	-ENPPKYKEKKYCDYVYCKLNKLPQ	-----	238			
Rosa hybrid FLS	PPD-HI	IGPHEPKLVNDK	-ENPPKYTKKYSEYVYNKLNKLPQ	-----	239			
Citrus unshiu FLS	PAD-TVV	GPLPQLVDD	-ENPPKYKAKKFKDYCYCKLNKLPQ	-----	238			
Allium cepa FLS	PGD-TMI	GPLPQLVND	-ENPPKFKTKKYKDYAYCKINKLPQ	-----	238			
Arabidopsis thaliana FLS	PRE-KIV	GPLPELTGD	-DNP	PKFKPF	FAFKDY	SYRKLNLPLD	-----	239

Malus domestica ANS	PKEKI	IILKPLPETVSE	-DEPAMFP	PRTFAE	HIQHLFRKS	-QE-ALLPK-	246	
Prunus persica ANS	PKEKI	IILKPLPETVSE	-TEPPIFP	PRTFAE	HIQHLFRKS	-QE-ALLNK-	246	
Citrus sinensis ANS	PKDKI	IILKPLPETVSE	-QKPAMFP	PRTFQ	HIHKLFRRT	-QD-ALLSDE	247	
Ipomoea trifida ANS	PKEKI	IILQPLPETVSE	-ADPPRFP	PRTFA	HIKHLFR	LDQEGADTPKP	249	
Ipomoea batatas ANS	PKEKI	IILQPLPETVSE	-ADPPRFP	PRTFA	HIKHLFR	QTDQEGADTPKP	249	
Gypsophila elegans ANS	PKEKI	IILKPLPDLVSD	-SDPARYP	PRTFA	HIQHLFR	KAQDVQSPVTN	248	
Glycine max ANS	PKEKI	IILQPLPELVTE	-TEPARFP	PRTFA	HIHHLFR	KDQEG ---LPN-	245	
Matthiola incana ANS	PKDKI	VLKPLPEMVS	-ESPAKFP	PRTFA	HIHKLFR	KEQEELVSEKKA	249	
Iris hollandica ANS	PKEKI	VLEPLAELVGE	-GSPAKY	PRTFA	HVQHLFR	KKAQAQVQDQAGV	249	
Ginkgo biloba ANS	PKD-AMIG	PMKELINE	-KNPPLFA	AKT	FKDHTD	HKLFRKKGQSKKN	-----	242
		:	:::*	::**	::**	::**		

ภาพที่ 13 (ต่อ)

2.5 ความสัมพันธ์ของโปรตีน ANS/FLS

การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน ANS/FLS จากดอกกล้วยไม้หวายและแอสโคเซินด้าจำนวน 4 โคลน ได้แก่ ANS64 จากกล้วยไม้หวายไซเนียเอียสกูล ANS219 จากกล้วยไม้มีกาชาสีน้ำเงิน ANS251 จากกล้วยไม้มีกาชาสีขาวย และ ANS313 จากกล้วยไม้มีกาชาสีชมพู กับโปรตีน FLS ในพืช 10 ชนิด แบ่งเป็นเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว 1 ชนิด พืชใบเลี้ยงคู่ 9 ชนิดจากข้อมูล ประกอบด้วย หอม (*Allium cepa*) accession# AAO63023 ขนาด 238 เรสตีคิว, ส้ม (*Citrus unshiu*) accession# Q9ZWQ9 ขนาด 238 เรสตีคิว, ไลซีแอนทัส (*Eustoma grandiflorum*) accession# BAD34463 ขนาด 238 เรสตีคิว, ผักชีฝรั่ง (*Petroselinum crispum*) accession# AAP57395 ขนาด 238 เรสตีคิว, องุ่น (*Vitis vinifera*) accession# BAE75809 ขนาด 238 เรสตีคิว, ยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) accession# ABE28017 ขนาด 238 เรสตีคิว, cupflower (*Nierembergia* sp.) accession# BAC10995 ขนาด 238 เรสตีคิว, อะราบิดีปซิส (*Arabidopsis thaliana*) accession# NP196481 ขนาด 239 เรสตีคิว, Coneflower (*Rudbeckia hirta*) accession# ABN79672 ขนาด 238 เรสตีคิว, กุหลาบ (*Rosa hybrid cultivar*) accession# BAC66468 ขนาด 239 เรสตีคิว, โปรตีน ANS ในพืช 11 ชนิด แบ่งเป็นเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว 1 ชนิด พืชใบเลี้ยงคู่ 10 จากข้อมูล ประกอบด้วย แปะก๊วย (*Ginkgo biloba*) accession# ACC66092 ขนาด 242 เรสตีคิว, ถั่วเหลือง (*Glycine max*) accession# AAR26525 ขนาด 245 เรสตีคิว, ส้ม (*Citrus sinensis*) accession# AAT02642 ขนาด 248 เรสตีคิว, common stock (*Matthiola incana*) accession# AAB82287 ขนาด 249 เรสตีคิว, Dutch Iris (*Iris hollandica*) accession# BAF62629 ขนาด 251 เรสตีคิว, แอปเปิ้ล (*Malus domestica*) accession# BAB92998 ขนาด 245 เรสตีคิว, ผักบุ้ง (*Ipomoea trifida*) accession# ACF59718 ขนาด 251 เรสตีคิว, ยิปโซ (*Gypsophila elegans*) accession# AAP13054 ขนาด 248 เรสตีคิว, ผักบุ้ง (*Ipomoea batatas*) accession# BAA75305 ขนาด 251 เรสตีคิว และ พีช (*Prunus persica*) accession# ABX89941 ขนาด 245 เรสตีคิว พบว่าโปรตีน ANS/FLS ของดอกกล้วยไม้หวายและแอสโคเซินด้า จัดอยู่กลุ่ม 2OG-Fe(II) oxygenase superfamily มีบริเวณอนุรักษ์ในลำดับกรดอะมิโน 2 บริเวณ (Holton *et al.*, 1993) ได้แก่ ลำดับกรดอะมิโน WGMFQTVNHDT ที่เป็นส่วนอนุรักษ์ที่เรียกว่า dioxygenase domains A ซึ่งอยู่บริเวณ C-terminal และ ลำดับกรดอะมิโน NYPPCPRPDL ALGVVAHTD เป็นส่วนอนุรักษ์ที่เรียกว่า dioxygenase domains B ซึ่งอยู่บริเวณ N-terminal ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการนำออกซิเจนไปยังตำแหน่งที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา

เมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับของกรดอะมิโนในกล้วยไม้ทั้ง 4 ชนิด ที่มีขนาด 236 เรสตีคิว พบว่า โปรตีน ANS/FLS ของกล้วยไม้หวายไซเนียเอียสกูล (ANS64) มีความคล้ายกับโปรตีน ANS/FLS จากกล้วยไม้มีกาชาสีน้ำเงิน (ANS219) 87.7%, กล้วยไม้มีกาชาสีขาวย (ANS251) 87.4%

และกล้วยไม้มีกาชาสีชมพู (ANS313) 86% และเมื่อเปรียบเทียบกันในกลุ่มของกล้วยไม้มีกาชาพบว่า ลำดับกรดอะมิโนของกล้วยไม้มีกาชาสีน้ำเงิน มีความคล้ายกับกล้วยไม้มีกาชาสีขาว 96.6% และ คล้ายกับกล้วยไม้มีกาชาสีชมพู 94.4% ส่วนกล้วยไม้มีกาชาสีขาวมีความคล้ายคลึงกับกล้วยไม้มีกาชาสีชมพู 97.5% เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของกล้วยไม้กับพืชอื่น 21 ชนิด ที่มีขนาด 236-251 เรสสิคิว พบว่า โปรตีน ANS/FLS ที่ได้ทั้ง 4 โคลน มีลำดับของกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับโปรตีน anthocyanidin synthase จากพืชในฐานข้อมูลซึ่งมีความยาว 242-251 เรสสิคิว 45-86% โดยมีความคล้ายคลึงกับกล้วยไม้ออนซิเดียมซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวมากที่สุด คือ 86%, 82%, 82% และ 80% ในขณะที่คล้ายคลึงกับโปรตีน flavonol synthase จากพืชในฐานข้อมูลซึ่งมีความยาว 238-239 เรสสิคิว 63-76% มีความคล้ายคลึงกับหอมซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวเช่นเดียวกันมากที่สุด คือ 76%, 72%, 73% และ 71% ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ผลการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของกรดอะมิโนองค์ประกอบของยีน *ans/fls* ของดอกกล้วยไม้หวายและแอสโคเซินด้ากับพืชชนิดอื่น

Accession #	Plant species	Gene	aa size	%Amino acid identities			
				Dendrobium 'Earsakul'	'Mikasa' blue	'Mikasa' white	'Mikasa' pink
	<i>Dendrobium</i> Sonia 'Earsakul'		236	100	87.7	87.4	86
	Princess 'Mikasa' blue		236		100	96.6	94.9
	Princess 'Mikasa' white		236			100	97.5
	Princess 'Mikasa' pink		236				100
EF570114	<i>Oncidium</i> Gower Ramsey	<i>ans</i>	236	86	82	82	80
AAO63023	<i>Allium cepa</i>	<i>fls</i>	238	76	72	73	71
Q9ZWQ9	<i>Citrus unshiu</i>	<i>fls</i>	238	73	69	69	68
AAP57395	<i>Petroselinum crispum</i>	<i>fls</i>	238	71	68	68	67
BAD34463	<i>Eustoma grandiflorum</i>	<i>fls</i>	238	70	68	67	66
ABN79672	<i>Rudbeckia hirta</i>	<i>fls</i>	238	70	66	65	64
BAC10995	<i>Nierembergia</i> sp.	<i>fls</i>	238	69	67	67	66
BAE75809	<i>Vitis vinifera</i>	<i>fls</i>	238	69	67	67	65
ABE28017	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>fls</i>	238	68	68	68	67
NP196481	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>fls</i>	239	68	67	67	66
BAC66468	<i>Rosa hybrid</i>	<i>fls</i>	239	66	64	64	63
ACC66092	<i>Ginkgo biloba</i>	<i>ans</i>	242	51	50	50	49
AAB82287	<i>Matthiola incana</i>	<i>ans</i>	249	50	50	49	48
AAR26525	<i>Glycine max</i>	<i>ans</i>	245	49	50	50	48
BAA75305	<i>Ipomoea batatas</i>	<i>ans</i>	251	49	48	48	46
BAF62629	<i>Iris hollandica</i>	<i>ans</i>	251	49	49	47	46
BAB92998	<i>Malus domestica</i>	<i>ans</i>	245	48	49	48	47
ABX89941	<i>Prunus persica</i>	<i>ans</i>	245	48	48	47	46
AAT02642	<i>Citrus sinensis</i>	<i>ans</i>	248	48	49	48	47
ACF59718	<i>Ipomoea trifida</i>	<i>ans</i>	251	48	48	47	46
AAP13054	<i>Gypsophila elegans</i>	<i>ans</i>	248	48	47	46	45

2.6 ความสัมพันธ์ของโปรตีนจากการสร้าง phylogenetic tree

จากการสร้าง phylogenetic tree ของโปรตีน ANS และ FLS ที่แยกจากพืช 24 ชนิด ที่มีรายงานในฐานข้อมูล NCBI (ตารางที่ 2) พบว่า ความเหมือนและความแตกต่างของยีนจัดออกเป็น 3 กลุ่ม (ภาพที่ 14) คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยโปรตีน FLS ของ หอม ส้ม ไลซีแอนทัส ยาสูบ cupflower ผักชีฝรั่ง coneflower องุ่น และ กุหลาบ กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยโปรตีน ANS ของ เปะก๊วย, Dutch Iris, common stock, ถั่วเหลือง ส้ม แอปเปิ้ล พืช ยิปโซ และ ผักบุ้ง 2 ชนิดกลุ่มที่ 3 ประกอบด้วย โปรตีน ANS/FLS ของกล้วยไม้ ทั้ง 4 ชนิด คือ กล้วยไม้หวายไซเนียเอียสกูล กล้วยไม้แอส-โคเซินด้ามิกาชาสีน้ำเงิน สีชมพู และสีขาว และ โปรตีน ANS ของกล้วยไม้ออน-ซิเดียม

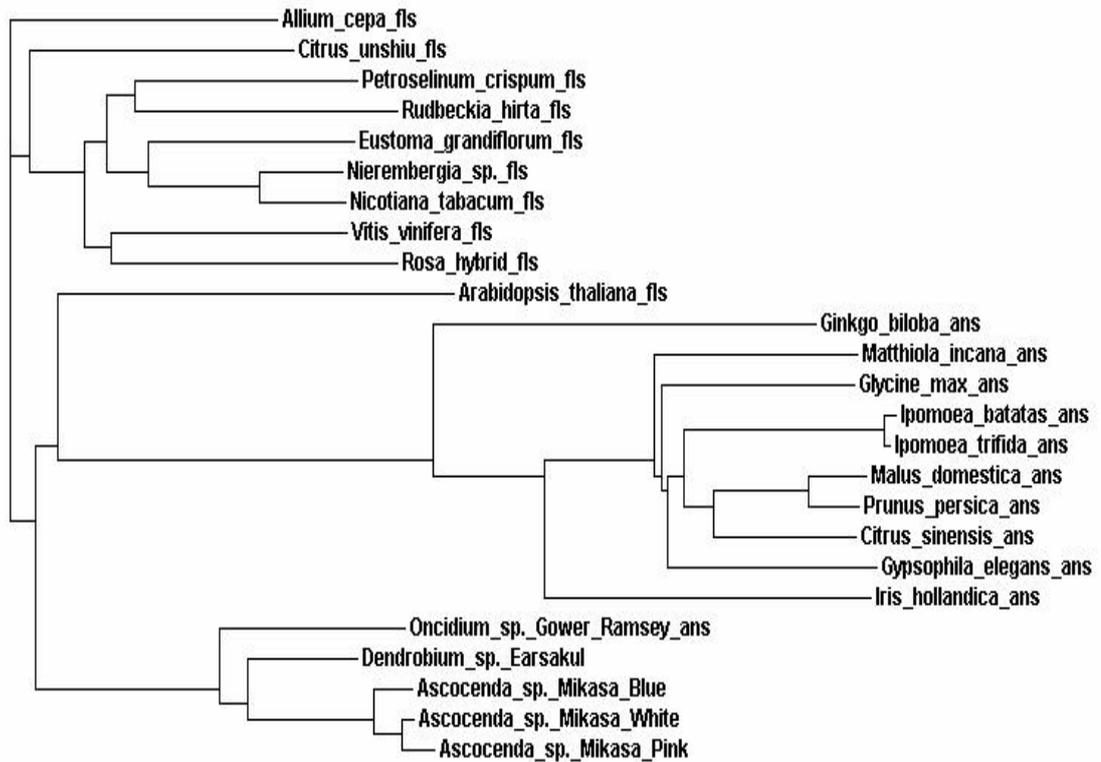
เมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนในแต่ละกลุ่ม ทั้งสามกลุ่ม มีลักษณะคล้ายกันคือ โปรตีนส่วนใหญ่คล้ายคลึงกัน มีเพียงโปรตีน 1 ชนิดในแต่ละกลุ่มที่แตกต่างจากโปรตีนในกลุ่มเดียวกัน ได้แก่ โปรตีนกลุ่มที่ 1 พบว่าโปรตีน ANS/FLS ของกล้วยไม้หวายและแอสโคเซินด้ามิกาชามีความใกล้เคียงกับองค์ประกอบโปรตีน ANS ของกล้วยไม้ออนซิเดียม (*Oncidium Gower Ramsey*) accession# EF570114 มากที่สุด สมาชิกในกลุ่มนี้จัดเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวทั้งหมด

สมาชิกที่จัดอยู่ในกลุ่มที่หนึ่งทั้งหมดเป็นเอนไซม์ FLS ของ หอม ส้ม ไลซีแอนทัส ยาสูบ cupflower ผักชีฝรั่ง coneflower องุ่น และ กุหลาบ ส่วน โปรตีนในกลุ่มสองเป็นเอนไซม์ ANS ของ เปะก๊วย, Dutch Iris, common stock, ถั่วเหลือง ส้ม แอปเปิ้ล พืช ยิปโซ และ ผักบุ้ง 2 ชนิด ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองกลุ่มอยู่ใน 2OG-Fe(II) oxygenase superfamily ผลจากการศึกษา phylogenetic ของโปรตีน ANS/FLS จากกล้วยไม้หวายและแอสโคเซินด้ามิกาชากับพืชอื่น เห็นได้ชัดว่า ANS จากกล้วยไม้ทั้งสองชนิด แตกต่างจากกลุ่มโปรตีน FLS และ ANS ของพืชชนิดอื่น ยกเว้น ANS ของกล้วยไม้ออนซิเดียม ที่แตกต่างจาก ANS ของพืชชนิดอื่นที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่สอง อย่างไรก็ตาม ผลจากการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงในตารางที่ 2 โปรตีน ANS/FLS ของกล้วยไม้ทั้ง 4 ชนิด กลับมีความคล้ายคลึงกับโปรตีน FLS มากกว่าโปรตีน ANS ดังนั้นจึงยังไม่อาจสรุปได้ว่า โปรตีนที่แยกจากกล้วยไม้ทั้งสองชนิด จึงเป็นโปรตีน FLS หรือ ANS

อย่างไรก็ตาม องค์ประกอบของกรดอะมิโนของโปรตีน FLS และ ANS/FLS มีความใกล้เคียงกันมาก ซึ่งจากรายงานของ Nakatsuka *et al.* (2008) ได้ทำการหาลำดับของกรดอะมิโนของโปรตีน ANS และ FLS ในต้น azalea และสร้าง phylogenetic tree ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกันกับ phylogenetic tree ที่ได้จากการทดลองนี้ กล่าวคือ ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนทั้งสองชนิดมี

ความใกล้เคียงกันมาก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการโคลนยีนให้ครบสมบูรณ์ทั้งยีน เพื่อนำมาวิเคราะห์ และจัดกลุ่มโปรตีนที่แน่นอน แต่จากรายงานของ Chiou and Yeh (2008) ซึ่งได้ทำการหาลำดับ นิวคลีโอไทด์ของยีน *ans* จากกล้วยไม้ออนซิเดียม พบว่าเมื่อทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีนที่โคลนได้ในการศึกษาครั้งนี้ มีความใกล้เคียงกันมากกว่ายีน *fls* ในพืชชนิดอื่นที่นำมาเปรียบเทียบ และจากรายงานของ Lukacin *et al.* (2003) และ Turnbull *et al.* (2003) ได้ทำการทดลองใช้เอนไซม์ ANS และ เอนไซม์ FLS เปลี่ยนรูปของสาร dihydroflavonol ในหลอดทดลอง พบว่าเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดมีความสามารถในการเปลี่ยนสาร dihydroflavonol ให้ได้สาร flavonol โดยการออกซิไดซ์ได้เหมือนกัน (ภาคผนวกที่ 12) จึงถือได้ว่าเอนไซม์ทั้งสองนี้จะทำการเปลี่ยนสารทั้งสาร substrate และ ผลิตภัณฑ์ เป็น stereospecificities กัน (Welford *et al.*, 2001) เช่นเดียวกันกับการทดลองของ Preub *et al.* (2009) พบว่าเอนไซม์ FLS นี้มีได้หลาย isoform มีเพียงเอนไซม์ FLSI เท่านั้นที่สามารถเปลี่ยนสาร dihydroflavonol ไปเป็นสาร flavonol สำหรับเอนไซม์ ANS ก็ สามารถเปลี่ยนสาร dihydroflavonol ไปเป็นสาร flavonol ได้เช่นเดียวกัน แต่มีประสิทธิภาพต่ำกว่า FLSI

โดยจากผลการศึกษาของ Takahashi *et al.* (2007) พบว่าผลของการขาดหายไปของเบส guanidine ที่ตำแหน่ง +47 เพียง 1 ตำแหน่งในยีน *fls* จากต้นกล้วยไม้ ทำให้สีของดอกจะเปลี่ยนจากสีม่วงที่เป็นลักษณะเด่นเป็นลักษณะด้อยเป็นสีชมพู แต่อย่างไรก็ดี Kim *et al.* (2004) ได้ใช้เทคนิค RNAi ยับยั้งการแสดงออกของยีน *ans* พบว่าการขาดยับยั้งการแสดงออกของยีน *ans* ก็ส่งผลต่อการเกิดลักษณะสีชมพูในต้นหอมเช่นเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะของสีดอกกล้วยไม้ มิกาสีชมพูและมิกาสีขาวที่เกิดการกลายพันธุ์จากกล้วยไม้มิกาสีน้ำเงินที่นำมาปั่นดาเพื่อนำมาขยายพันธุ์ แต่ก็เป็นที่น่าสังเกตว่าการกลายพันธุ์นี้ สีของดอกที่เกิดขึ้นจะมีสีอ่อนลง (ม่วง – ชมพู – ขาว) จึงน่าจะเกิดการกลายพันธุ์ทำให้ยีน *fls* หรือ *ans* หรือทั้ง 2 ยีน หรืออาจเป็นผลจากการขาดหายไปของเบส guanidine ที่ตำแหน่ง +47 เพียง 1 ตำแหน่งในยีน *fls* ของดอกกล้วยไม้มิกาสี โดยจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของกล้วยไม้มิกาสีนี้ ยังไม่ครอบคลุมถึงบริเวณตำแหน่ง +47 ซึ่งจะต้องทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ให้ครบทั้งยีน เพื่อตรวจสอบดูในตำแหน่งที่ +47 ว่ามีการขาดหายไปของเบส guanidine หรือไม่ อย่างไรก็ดีในรายงานของ Mato *et al.* (2000) ที่ได้ทำการศึกษากการแสดงออกของยีน *ans* โดยใช้เทคนิค Northern blot hybridization พบว่าในดอกคาร์เนชันขาวจะไม่พบการแสดงออกของยีน *ans* ขึ้น แต่พบว่าในดอกคาร์เนชันสีแดง กลับมีการแสดงออกของยีน *ans* แสดงให้เห็นว่า ทั้งยีน *ans* และ *fls* นี้มีผลต่อสีของดอก ซึ่งต้องทำการศึกษาเพื่อทดสอบข้อสมมติฐานต่อไป



ภาพที่ 14 Phylogenetic tree แสดงระดับความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนองค์ประกอบระหว่างโปรตีน ANS และ FLS ในดอกกล้วยไม้หวายและแอสโคเซินด้ากับโปรตีนในกลุ่มเดียวกันของพืชชนิดอื่น

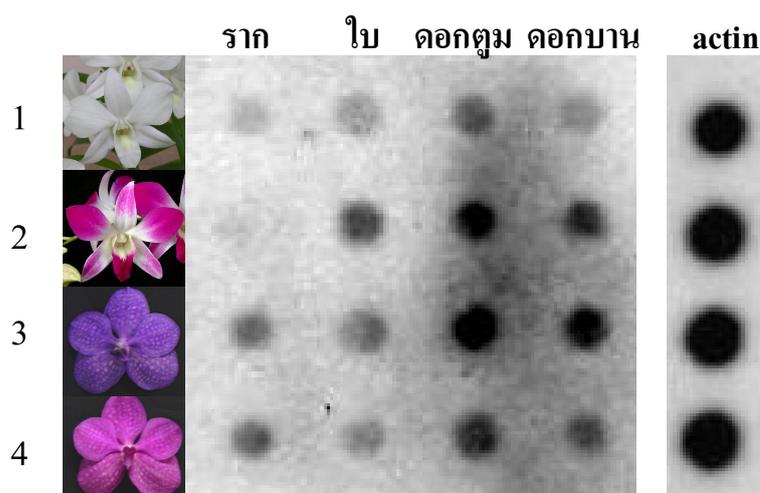
3. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *ans/fls* ด้วยวิธี Northern blot hybridization และ RNA dot blot hybridization

3.1 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *ans/fls* ด้วยวิธี Northern blot hybridization

นำอาร์เอ็นเอรวมที่แยกได้จากส่วน ราก ใบ ดอกตูม และดอกบาน ของดอกกล้วยไม้ 4 ชนิด ได้แก่ หวายไซเนียเอียสกุล หวายขาวสนาน แอสโคเซินด้ามิกาสาน้ำเงิน และ แอสโคเซินด้ามิกาสาน้ำเงิน มาแยกขนาดบนและถ่ายลงบนเมมเบรนเพื่อทำ Northern blot hybridization โดยพบว่าผลการทดลองนี้ยังไม่ประสบความสำเร็จ

3.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *ans/fls* ด้วยวิธี RNA dot blot hybridization

นำอาร์เอ็นเอรวมที่แยกได้จากส่วน ราก ใบ ดอกตูม และดอกบาน ของกล้วยไม้ 4 ชนิด ได้แก่ หวายโซเนียเอียสกุล หวายขาวสนาน แอสโคเซ็นด้ามิกาสาลีน้ำเงิน และ แอสโคเซ็นด้ามิกาสาลีชมพู มาแยกขนาดด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส นำไปศึกษาการแสดงออกของยีน *ans/fls* และ ไฮบริไดเซชันด้วยโพรบขนาด 900 คู่เบส ที่ได้จากโคลน ANS219 ของกล้วยไม้มิกาสาลีน้ำเงิน และ ขนาด 250 คู่เบส จากยีน *actin* ของ กล้วยไม้หวายโซเนียเอียสกุล เป็นตัวเปรียบเทียบ ผลจากการไฮบริไดเซชันพบว่าเนื้อเยื่อกล้วยไม้แต่ละส่วนมีการแสดงออกของยีน *ans/fls* ที่ต่างกัน โดยในส่วนของเนื้อเยื่อดอกตูมของกล้วยไม้มิกาสาลีน้ำเงิน มีการแสดงออกของยีน *ans/fls* มากที่สุด รองลงมาคือ ดอกบาน ใบ และ ราก มีการแสดงออกของยีนเรียงลำดับจากมากไปถึ้น้อย ดังแสดงในภาพที่ 15 อย่างไรก็ตาม กล้วยไม้หวายดอกสีขาวมีการแสดงออกของยีน *ans/fls* น้อยที่สุดในขณะที่ดอกกล้วยไม้ที่เหลือมีการแสดงออกของยีน *ans/fls* ใกล้เคียงกัน



ภาพที่ 15 Dot blot hybridization ของยีน *ans/fls* ในส่วนต่างๆ ของเนื้อเยื่อกล้วยไม้ (1) กล้วยไม้ หวายขาวสนาน (2) กล้วยไม้หวายโซเนียเอียสกุล (3) กล้วยไม้มิกาสาลีน้ำเงิน (4) กล้วยไม้มิกาสาลีชมพู

เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *ans/fls* ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของกล้วยไม้ พบว่าในเนื้อเยื่อส่วนรากมีการแสดงออกของยีน *ans/fls* น้อยที่สุด รองลงมาคือ ใบ ดอกบาน และ ดอกตูม เนื่องจากในบริเวณของรากและใบ มีส่วนที่เป็นสีเขียวของคลอโรพลาสต์ เพื่อใช้ในการหายใจและสังเคราะห์แสง ซึ่งเป็นกระบวนการเมตาบอลิซึมหลัก ทำให้การสังเคราะห์สารสี่แอนโทไซยานินที่เป็นกระบวนการเมตาบอลิซึมรองมีการแสดงออกน้อย (Saito *et al.*, 2006) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบใน

กล้วยไม้ขาวสวนาน มีการแสดงออกของยีน ในเนื้อเยื่อทั้ง 4 ประเภท คือ ราก ใบ ดอกตูม และดอกบาน น้อยที่สุดเนื่องจาก ในดอกไม้ที่มีสีขาว ไม่พบการแสดงออกของยีน *ans* จึงขาดโปรตีน ANS ที่มีความจำเป็นในการใช้เปลี่ยนสาร leucoanthocyanidin ไปเป็นสารสี anthocyanidin ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Nakatsuka *et al.* (2005) ซึ่งพบว่าไม่มีการแสดงออกของยีน *ans* ในดอกเจนเทียนสีขาว แต่พบว่า การแสดงออกของยีน *ans* สูงในดอกเจนเทียนสีม่วง และสีชมพู และจากการการศึกษาของ Cheng *et al.* (2007) ที่ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน *ans* ในต้นบัวหิมะ (*Saussurea medusa*) ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่ายีน *ans* ที่โคลนได้จากต้นบัวหิมะ มีการแสดงออกสูงในส่วนของต้นอ่อนที่มีสีแดง และไม่พบการแสดงออกในส่วนของราก แต่จากการศึกษาของ Nakasuka *et al.* (2008) ที่ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน *ans* และ *fls* ในต้น azalea สีชมพู โดยใช้วิธี qRT-PCR พบว่ายีนทั้งสองนี้มีการแสดงออกที่สูงมากที่บริเวณใบมากที่สุด รองลงมาคือกลีบดอก ซึ่งไม่สอดคล้องกันกับผลที่ได้นี้ อาจเนื่องมาจากมีการปนเปื้อนของสารโพลีแซคคาไรด์ซึ่งพบมากที่ส่วนของใบทำให้ไปรบกวนการเกิดปฏิกิริยาในขั้นตอนการไฮบริไดซ์

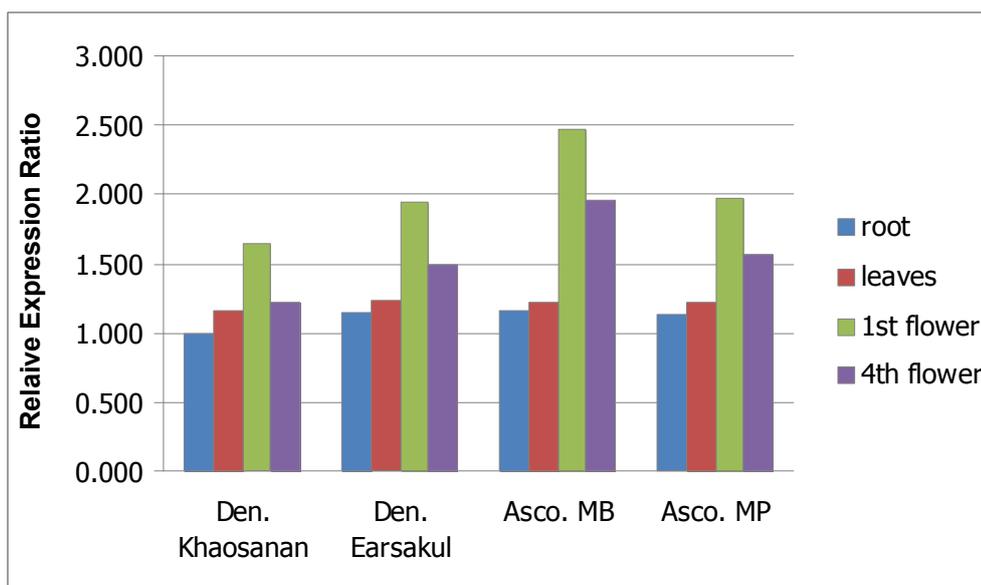
4. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *ans/fls* ในดอกกล้วยไม้ด้วยวิธี qPCR

4.1 การศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน *ans/fls* โดยใช้เทคนิค qPCR

ผลจากการทำ qPCR ที่ ระดับอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน *ans/fls* ที่แสดงออกในเนื้อเยื่อราก ใบ ดอกตูม และ ดอกบาน ของกล้วยไม้หวายขาวสวนาน กล้วยไม้หวายไซเนียเอียสกุล กล้วยไม้มีกาชาสีน้ำเงิน และกล้วยไม้มีกาชาสีชมพู ดังแสดงเป็นกราฟของจุดเริ่มต้นของการสังเคราะห์ยีนและปริมาณของสารติดฉลาก SYBR green ที่ใช้ไปด้วยจำนวนที่แตกต่างกันในแต่ละเนื้อเยื่อ ทั้งนี้ขึ้นกับปริมาณของยีน *ans/fls* (ภาพผนวกที่ 13) และการคำนวณระดับการแสดงออกของยีน *ans/fls* ที่เป็นค่า relative relation ratio (ตารางผนวกที่ 3) โดยการใช้ระดับการแสดงออกของยีน *ans/fls* ในส่วนรากของกล้วยไม้หวายขาวสวนานที่คาดว่ามีการแสดงออกของยีนต่ำที่สุด ในการปรับระดับการแสดงออกของยีนให้อยู่ในมาตรฐานเดียวกัน (calibrator)

เมื่อนำค่า relative expression ratio มาแสดงเป็นกราฟแท่ง (ภาพที่ 16) ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel (Microsoft, สหรัฐอเมริกา) พบว่ากล้วยไม้แต่ละชนิดมีรูปแบบการแสดงออกของยีน *ans/fls* ในเนื้อเยื่อทั้ง 4 ชนิดเหมือนกัน แต่ระดับการแสดงออกของยีนแตกต่างกันในแต่ละชนิดของกล้วยไม้ คือ ในกล้วยไม้ขาวสวนานที่มีดอกสีขาว มีการแสดงออกของยีน *ans/fls* ต่ำที่สุด

กล้วยไม้หวายไซเนียบเยี่ยสกุลซึ่งมีสีม่วงแดง และกล้วยไม้มีกาชาสีชมพู มีการแสดงออกของยีนใกล้เคียงกัน และกล้วยไม้มีกาชาสีน้ำเงินมีค่าการแสดงออกของยีนสูงที่สุด สำหรับระดับการแสดงออกของยีน *ans/fls* ในเนื้อเยื่อแต่ละชนิด พบว่าดอกตูมของกล้วยไม้มีการแสดงออกของยีน *ans/fls* สูงที่สุด สำหรับ ราก ใบและดอกบาน มีระดับการแสดงออกของยีนที่ไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามในดอกตูมของกล้วยไม้มีกาชาสีน้ำเงินมีการแสดงออกของยีนสูงที่สุด



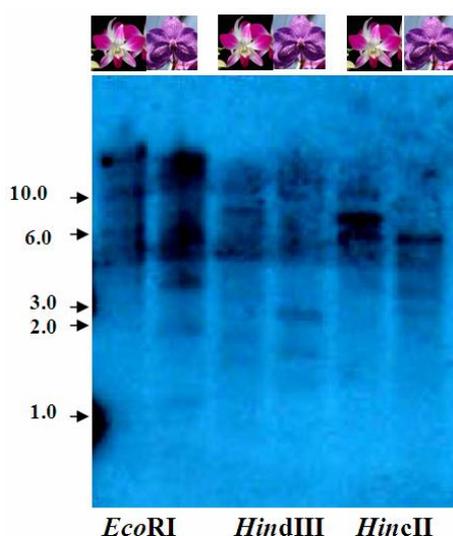
ภาพที่ 16 ระดับการแสดงออกของยีน *ans/fls* ในเนื้อเยื่อ ราก ใบ ดอกตูมและดอกบาน ของกล้วยไม้หวายขาวสนาน กล้วยไม้หวายไซเนียบเยี่ยสกุล กล้วยไม้มีกาชาสีน้ำเงิน และกล้วยไม้มีกาชาสีชมพู

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *ans/fls* ด้วยวิธี RNA dot blot hybridization ที่กล่าวมาแล้วข้างต้น โดยพบว่ายีน *ans/fls* มีการแสดงออกสูงสุดที่ดอกตูม และแสดงออกน้อยที่สุดที่ส่วนของราก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Nakasuka *et al.* (2008) ที่พบว่าในเนื้อเยื่อของกลีบดอกของต้น azalea ที่ระยะตูมจะมีการแสดงออกของยีน *ans* สูงที่สุด และจะลดปริมาณต่ำลงมาเมื่อดอกเริ่มบาน สำหรับปริมาณยีน *fls* ก่อนข้างคงที่ เนื่องจากสารฟลาโวนอลเป็นรงควัตถุร่วมกับสารแอนโทไซยานินหลัก โดยส่วนใหญ่การเกิดสีเป็นผลมาจากการจับของรงควัตถุร่วม จึงพบว่ายีน *fls* มีการแสดงออกคงที่แม้แต่ในดอกสีอ่อนก็ตาม

5. การตรวจสอบจำนวนซ้ำของยีน *fls* ในจีโนมของกล้วยไม้ด้วยวิธี Southern blot hybridization

5.1 การตรวจสอบจำนวนซ้ำของยีน *fls* ด้วยวิธี Southern blot hybridization

นำตัวอย่างดอกกล้วยไม้หวายโซเนียเอียสกุล และ มิกาสาน้ำเงิน มาทำการแยกดีเอ็นเอ แล้วทำการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด คือ *EcoRI*, *HindIII* และ *HincII* แล้วใช้ยีน *fls* ที่ทำการโคลนเป็นตัวตรวจสอบ ผลจากการตรวจสอบจำนวนซ้ำของยีน *fls* บนกล้วยไม้หวายโซเนียเอียสกุล เปรียบเทียบกับกล้วยไม้มิกาสาน้ำเงิน พบว่ากล้วยไม้หวายโซเนียเอียสกุลมีจำนวนซ้ำยีน *ans/fls* ใกล้เคียงกับกล้วยไม้มิกาสาน้ำเงิน โดยพบเกิดขนาดแถบดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* 5-6 แถบ ส่วนในกล้วยไม้มิกาสาน้ำเงินมีจำนวน 6 แถบ โดยคาดว่า กล้วยไม้ทั้งสองชนิด ยีนมีอย่างน้อย 4-5 ซ้ำ ใน เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *HincII* พบ 3 แถบบนฟิล์ม หรือ ประมาณ 3 ซ้ำ ของยีนกับกล้วยไม้หวายโซเนียเอียสกุล ในขณะที่กล้วยไม้มิกาสาน้ำเงิน มียีนเพียง 2 ซ้ำ (พบดีเอ็นเอ 2 แถบบนฟิล์ม) ในขณะที่เมื่อตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *HindIII* พบแถบที่เกิดขึ้นประมาณ 3 แถบในพืชทั้งสองตัวอย่าง ให้ผลใกล้เคียงกับรายงานของ Kim *et al.* (2004) พบว่ายีน *ans* ในหัวหอมมี 4 อัลลีล และผลการทดลองของ Nielsen *et al.* (2002) ที่พบว่ายีน *ans* ใน *Lisianthus* มีแถบเกิดขึ้นหลายแถบ ทำให้สรุปว่ายีน *ans* นี้เป็น multigene family เช่นเดียวกับยีน *fls* ในต้นกล้วยไม้ที่มีจำนวน 3-4 ซ้ำ (Takahashi *et al.*, 2007) ต่างจากผลการทดลองของ Rosati *et al.* (1999) ที่หาจำนวนซ้ำของยีนจากดอกของต้น *Forsythia intermedia* และพบว่ายีน *ans* นี้ เป็น single copy gene

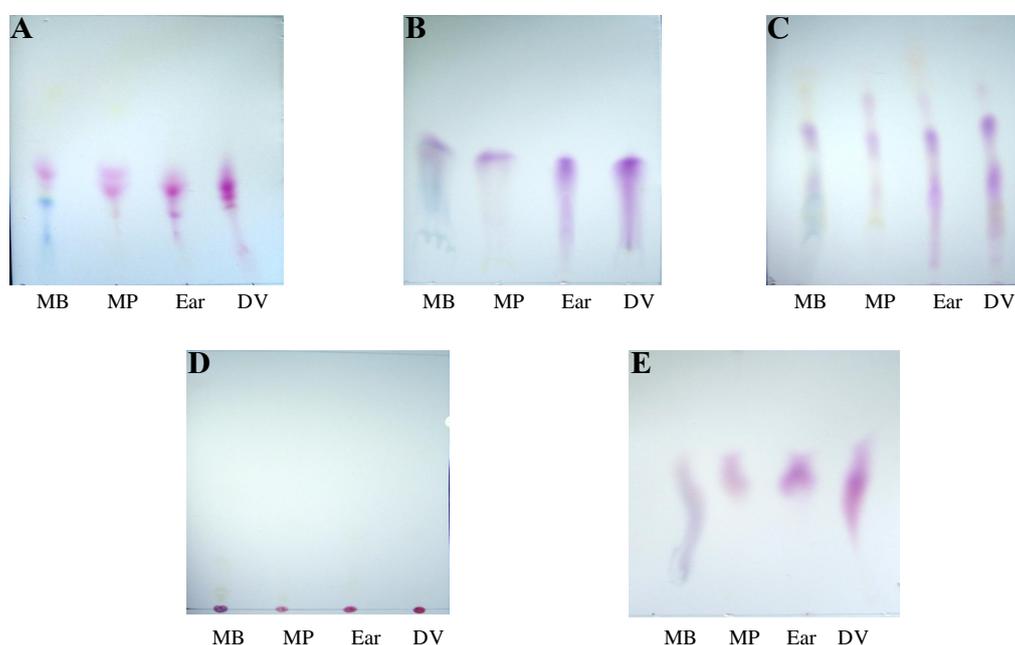


ภาพที่ 17 Southern blot hybridization ของกล้วยไม้หวายโซเนียเอียสกุลและแอสโคเซ็นด้ามิกาสาน้ำเงิน ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*, *HindIII* และ *HincII* โพรบด้วยยีน *ans/fls* จากโคลน ANS219 ที่ได้จากกล้วยไม้มิกาสาน้ำเงิน

6. การตรวจสอบองค์ประกอบของสารสีด้วยวิธี Thin-layer chromatography

6.1 การเปรียบเทียบชนิดของสารละลายตัวพา

จากการแยกสีที่แยกจากดอกกล้วยไม้ที่มีสีแตกต่างกัน 4 ชนิด คือ ดอกกล้วยไม้สีม่วงน้ำเงิน ดอกกล้วยไม้สีชมพู ดอกกล้วยไม้สีม่วงขาว (กล้วยไม้หวายโซเนียเอียสกุล) และกล้วยไม้สีขาว (กล้วยไม้หวายขาวสนาน) ที่แยกสกัดสีด้วยสาร เมธานอล : กรดเกลือเข้มข้น ในอัตราส่วน 99 : 1 พบว่าสารละลายตัวพาที่มีส่วนผสมของ บิวทานอล : กรดอะซิติก : น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 4 : 5 : 1 สามารถแยกสารสีจากดอกกล้วยไม้ได้ดีที่สุดด้วยระยะเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง เมื่อสารละลายเคลื่อนที่เป็นระยะทาง 10 เซนติเมตร โดยพบว่าการใช้ บิวทานอล : กรดอะซิติก : น้ำกลั่น (4 : 1 : 2) สามารถแยกแถบของสีออกจากกันได้อย่างชัดเจน ส่วนการใช้ กรดเกลือ : เมธานอล (0.1 : 99.9) และ ไคคลอโรมีเทน : เมธานอล : น้ำกลั่น (6 : 4 : 1) สามารถแยกสารสีได้แต่ได้ผลไม่ชัดเจน เนื่องจากการเกิดเป็นแถบยาว สำหรับการใช้ กรดฟอร์มิก : น้ำกลั่น (5 : 95) และ ไคคลอโรมีเทน : เมธานอล : น้ำกลั่น (10 : 3 : 1) ไม่สามารถแยกแถบสีได้ ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 3 และ ภาพที่ 18



ภาพที่ 18 โครมาโตแกรมของการตรวจสอบสารสีจากดอกกล้วยไม้มีกชาสีน้ำเงิน (MB), มีกชาสีชมพู (MP), หวายโซเนียเอียสกุล (Ear) และ กล้วยไม้สกุลหวายสีม่วง (DV) ตามลำดับด้วย TLC (A) บิวทานอล : กรดอะซิติก : น้ำกลั่น, (B) กรดเกลือ : เมธานอล, (C) ไคคลอโรมีเทน : เมธานอล : น้ำกลั่น, (D) ไคคลอโรมีเทน : เมธานอล : น้ำกลั่น และ (E) กรดฟอร์มิก : น้ำกลั่น

ตารางที่ 3 ผลของสารละลายตัวพาต่อการแยกสารสีดอกกล้วยไม้โดยใช้วิธี TLC

developing solvent	อัตราส่วนโดยปริมาตร	ผลที่ได้
บิวทานอล : กรดอะซิติก : น้ำกลั่น	4 : 1 : 2	สามารถแยกสารสีออกจากตัวอย่างของกลีบดอกกล้วยไม้ได้อย่างชัดเจนเป็น 3 ตำแหน่ง คือสีน้ำเงิน 2 จุดและสีแดง 1 จุด
กรดเกลือ : เมทานอล	0.1 : 99.9	สามารถแยกสารสีออกจากตัวอย่างของกลีบดอกกล้วยไม้ได้ไม่ชัดเจน เพราะเกิดเป็นแถบยาว
ไดคลอโรมีเทน : เมทานอล : น้ำกลั่น	6 : 4 : 1	สามารถแยกสารสีออกจากตัวอย่างของกลีบดอกกล้วยไม้ได้อย่างชัดเจน ใน 3 ตำแหน่ง คือสีน้ำเงิน, สีแดง 3 จุดและสีส้ม ลักษณะเป็นแถบยาว
ไดคลอโรมีเทน : เมทานอล : น้ำกลั่น	10 : 3 : 1	ไม่สามารถแยกสารสีออกจากตัวอย่างของกลีบดอกกล้วยไม้ได้
กรดฟอร์มิก : น้ำกลั่น	5 : 95	ไม่สามารถแยกสารสีจากกลีบดอกกล้วยไม้ได้เนื่องจากเป็นแถบและสารสียังผสมกันอยู่

หมายเหตุ TLC บนแผ่นซิลิกาผลึกละเอียด F 254 (ระยะทางการ develop 10 เซ็นติเมตร)

6.2 การแยกสารสีของดอกกล้วยไม้เปรียบเทียบกับสารสีที่แยกได้จากดอกไม้ชนิดอื่นๆ

เมื่อทำการเปรียบเทียบสารสีแอนโทไซยานินหลัก 3 ชนิด คือ ไซยานิดิน ฟิลาโกนิน และเคลฟิโนน ซึ่งมีสีม่วงแดง สีส้มเหลือง และ สีน้ำเงิน ตามลำดับ โดยใช้สารสีจากดอกไม้ดอก ตัวอย่าง 7 ชนิด คือ กล้วยไม้แอสโคเซ็นด้า ชูฟันบิวตี้ กล้วยไม้เข็มแสด คอร์เดีย กล้วยไม้หวาย

โซเนียเอียสกุล เฟื่องฟ้า กล้วยไม่มีกาชาสีน้ำเงิน และ อัญชัน ทำการสกัดสารสีด้วยเมธานอล : กรดเกลือเข้มข้น ในอัตราส่วน 99 : 1 และแยกสารสีองค์ประกอบของสีดอกบนแผ่นซิลิกากระดาษ 10 เซนติเมตร โดยใช้ บิวทานอล : กรดอะซิติก : น้ำกลั่น (4 : 1 : 2) เป็นสารละลายตัวพา ซึ่งได้ผลดังภาพที่ 19 โดยพบว่าแถบของสารแอนโทไซยานินมาตรฐานทั้ง 3 สีที่เกิดขึ้น คือ pelargonidin สีแดง cyanidin สีม่วง และ delphinidin สีน้ำเงิน ซึ่งสารแอนโทไซยานินมาตรฐานมีความบริสุทธิ์สูง จึงถูกตัวทำละลายชะขึ้นไปได้ในระยะทางที่สูงกว่าสารสีที่สกัดจากดอกไม้ตัวอย่าง จากในรายงานของ Kahkonen *et al.* (2001) พบว่าสารในกลุ่มแอนโทไซยานินเป็นสารที่มีขั้ว ดังนั้นในการสกัดสารแอนโทไซยานินออกจากกลีบดอกจึงต้องใช้ เอทานอล เมธานอล และอะซิโตน ที่มีส่วนผสมของกรดเกลือหรือกรดฟอริกเล็กน้อย ตัวทำละลายนี้ยังสกัดสารชนิดอื่นๆ ออกมาด้วย ได้แก่ น้ำตาล กรดอินทรีย์ และ โปรตีนบางชนิด สารเมธานอล มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการสกัดสารสี (Kapasakalidis *et al.*, 2006) การสกัดสารสีออกจากกลีบดอกด้วยเมธานอลที่มีกรดเกลือ 1% เป็นส่วนผสมสามารถสกัดสารได้ในปริมาณมาก

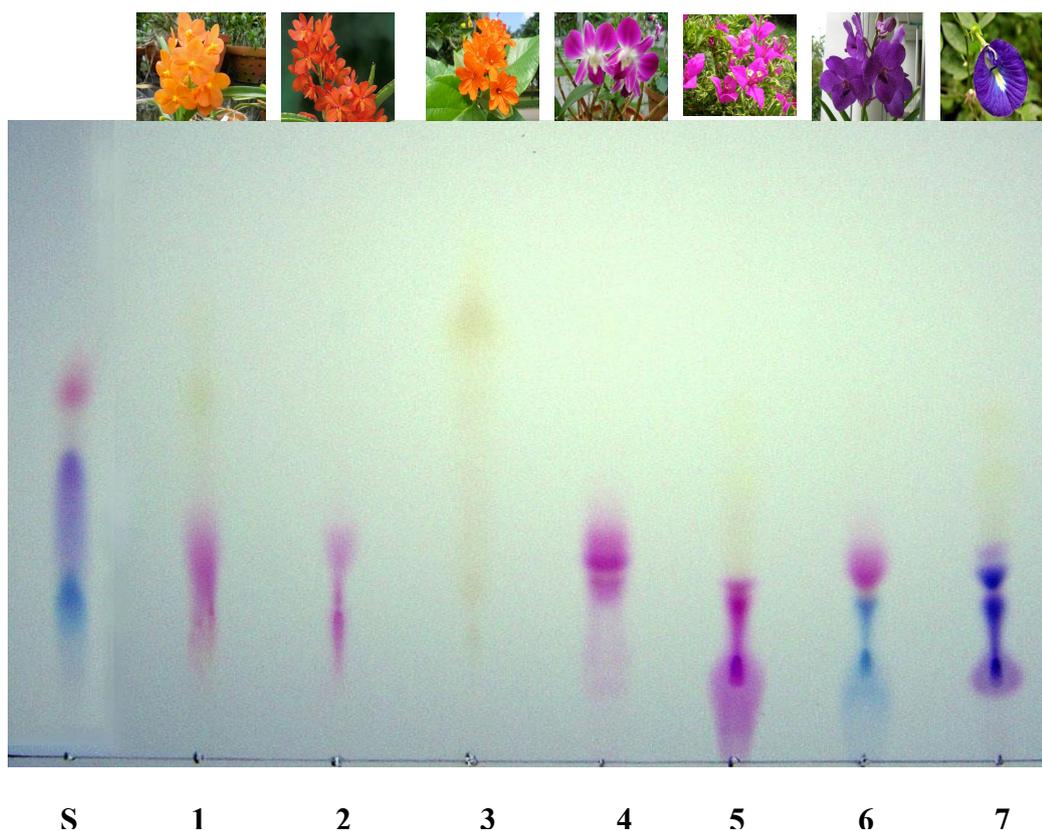
พืชที่นำมาใช้ศึกษาสามารถแบ่งตามสีออกได้ 3 กลุ่ม คือ กลุ่มดอกไม้สีส้ม กลุ่มดอกไม้สีแดง และ กลุ่มดอกไม้สีม่วงน้ำเงิน

ผลการทดลองพบว่า กลุ่มดอกไม้สีส้ม ได้แก่ กล้วยไม่มีแอสโคเซินด้า ฟินบิวตี้ กล้วยไม้เข็มแสด และคอรีเดีย มีการแยกจุดสีออกเป็นสองจุด ได้แก่ จุดสีแดง และจุดสีเหลือง (ด้านบน) ยกเว้น ดอกคอรีเดียที่พบแต่จุดสารสีส้มไม่พบจุดสารสีแดง

กลุ่มดอกไม้สีแดง ได้แก่ กล้วยไม้หาวย โซเนียเอียสกุล และเฟื่องฟ้า สามารถแยกสารสีออกได้เป็นจุดสีแดงหลายตำแหน่ง ในระยะการเคลื่อนที่ที่แตกต่างกัน

ส่วนกลุ่มดอกไม้สีม่วงน้ำเงิน ได้แก่ กล้วยไม่มีกาชาสีน้ำเงิน และอัญชัน พบสารสีของดอกกล้วยไม่มีกาชาสีน้ำเงิน แยกเป็น จุดสีชมพู และจุดสีน้ำเงิน 2 จุด สำหรับสารสีที่แยกจากดอกอัญชันนั้นพบเฉพาะจุดสีน้ำเงิน 3 จุด ที่ระยะการเคลื่อนที่เท่ากันสารสีแดงในดอกกล้วยไม่มีกาชาสีน้ำเงิน

อย่างไรก็ตาม ค่าที่ได้จากระยะทางการเคลื่อนที่ของสารในการทำ TLC ครั้งนี้ ยังไม่สามารถนำไปคำนวณเทียบเป็นค่า retention factor ได้ เนื่องจากในขั้นตอนการสกัดสารสีออกจากตัวอย่างพืช ยังขาดกระบวนการที่ทำให้สารสีบริสุทธิ์ สารปนเปื้อนจำนวนมากโดยเฉพาะสารโพลีแซคคาไรด์ของกล้วยไม่มีผลอย่างต่ออัตราการเคลื่อนที่ของสาร เมื่อเปรียบเทียบระยะการเคลื่อนที่ของสารสีมาตรฐานทั้งสามชนิดที่เป็นสารบริสุทธิ์ผ่านการแยกด้วยวิธี HPLC



ภาพที่ 19 โครมาโตแกรมของการตรวจแยกสารสีของดอกไม้ 7 ชนิด ที่สกัดด้วยเมธานอล : กรดเกลือ (99 : 1) และใช้บิวทานอล : กรดอะซิติก : น้ำกลั่น (4 : 1 : 2) เป็นสารละลายตัวพา โดยที่สารแอนโทไซยานินมาตรฐาน (Delphinidin, Cyanidin และPelargonidin) ละลายในน้ำ (S) ตัวอย่างพืช ประกอบด้วย 1. กล้วยไม้แอสโคเซนด้า ฟินบิวตี้ สีส้ม 2. กล้วยไม้เข็มแสด 3. คอร์เดียสีส้ม 4. กล้วยไม้หวายโซเนียเยิสกุล 5. เฟื่องฟ้าสีชมพู 6. กล้วยไม้มีกาชาสีน้ำเงิน และ 7. อัญชัน

จากผลการทดลองพบว่าดอกไม้ตัวอย่างที่มีสีส้ม จะพบว่ามีองค์ประกอบของสารอย่างน้อย 2 ชนิดคือ สารที่ให้สีส้มของ pelargonidin และแดงของ cyanidin ซึ่งเป็นรงควัตถุที่ให้สีในระดับสีเหลืองส้ม แต่ pelargonidin เป็นสารแอนโทไซยานินที่พบน้อยที่สุด (Harborne, 1984) ดังนั้นในการเกิดสีส้มของดอกไม้จึงมีรงควัตถุชนิดอื่นเข้ามาช่วยทำให้เกิดสี เช่น สารในกลุ่ม carotenoid ซึ่งมีสีส้มเช่นเดียวกัน ซึ่งจากรายงานของ Hosiki and Seo (1991) ได้ทำการทดลองแยกสารสีด้วยวิธี TLC ในดอก peony พบว่าในดอก peony สีเหลืองส้ม จะไม่พบสารสีในกลุ่มของแอนโทไซยานิน สำหรับดอก peony สีแดง สีชมพู และสีม่วง พบสารสีในกลุ่มแอนโทไซยานินคือ cyanidin, pelargonidin และ peonidin จากผลการทดลองพบว่าสารสีแดงที่แยกจากดอกกล้วยไม้หวายโซเนียเยิสกุลและเฟื่องฟ้าคาดว่าน่าจะมีองค์ประกอบหลักคือสาร cyanidin ซึ่งเป็นสาร

แอนโทไซยานินที่พบมากที่สุดคือ ถึงร้อยละ 50 (Kong *et al.*, 2003) โดยเฉพาะต้นอ่อนของบัวหิมะ พบ cyanidin เป็นสารสีแอนโทไซยานินหลัก (Cheng *et al.*, 2007)

การแยกสารสีในดอกกล้วยไม้มีกานาสน้ำเงิน พบว่า สารสี 2 ชนิด คือ delphinidin และ cyanidin สาร delphinidin จัดเป็นสารแอนโทไซยานิน ที่เป็นรงควัตถุที่ให้สีในระดับสีน้ำเงิน delphinidin สามารถเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำเงินเมื่อ pH มากกว่า 7 และจะเปลี่ยนเป็นสีแดงเมื่อ pH น้อยกว่า 7 โดยในดอกไม้ที่เป็นสีม่วงน้ำเงิน ได้แก่ อัญชัน โดย Aree *et al.* (2006) ได้ทำการสกัดแยกสารแอนโทไซยานิน พบว่าในอัญชันจะมี delphinidin เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับตำแหน่งในโครมาโตแกรม จะพบว่าตำแหน่งของจุดของสารในกล้วยไม้มีกานาสน้ำเงินจะตรงกับตำแหน่งจุดของอัญชัน แต่จะแตกต่างกันที่สีซึ่งในอัญชันจะเป็นสีน้ำเงินเข้มทุกจุด แต่ในกล้วยไม้มีกานาสน้ำเงินจะเป็นสีแดงม่วง ซึ่งคาดว่าเป็นสาร cyaniding ที่แตกต่างจากสารสีของดอกอัญชัน อย่างไรก็ตาม สีของดอกไม้ที่เกิดขึ้นไม่ได้เกิดจากสารสีแอนโทไซยานินเพียงอย่างเดียว โดยจากรายงานของ Wollenweber *et al.* (2003) ซึ่งได้ทำการแยกสารในต้น *Nothofagus* sp. พบว่า สารในกลุ่ม flavonoid และ flavonone ก็มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของสีในดอกไม้ เช่นเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Takahashi *et al.* (2007) ที่ได้ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ผลิตสาร flavonoid โดยเมื่อสารมี flavonoid สีของดอกกล้วยไม้จะมีสีเข้ม แต่เมื่อยีน *flavonol synthase* ซึ่งควบคุมการสร้างแอนไซม์ flavonol synthase มีลักษณะเปลี่ยนแปลงไป ทำให้ไม่สามารถสร้างสาร flavonoid ได้ จึงทำให้สีของดอกอ่อนลง ซึ่งคล้ายกับดอกกล้วยไม้มีกานาสน้ำเงิน และ มีกานาสีชมพู ที่น่าจะเกิดจากการขาดหายไปของสาร flavonoid หรือสารแอนโทไซยานินบางชนิด อันเนื่องมาจากการเกิดการกลายของยีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสร้างสี ทำให้ไม่มีการสร้างหรือสร้างแอนไซม์ที่มีลักษณะผิดปกติไปจากเดิม จึงไม่สามารถเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เกิดขึ้นสีได้ สำหรับผลจากการแยกสารสีดังกล่าวที่ 19 พบว่าสารสีที่แยกได้นี้ มีการเคลื่อนที่ในระดับเดียวกับสารแอนโทไซยานินมาตรฐานเพียงชนิดเดียวคือ เดลฟินิดิน สีน้ำเงิน ซึ่งมีการเคลื่อนที่ไปได้น้อยที่สุดในขณะที่ตำแหน่งอื่นๆ ที่เกิดขึ้นจะไม่ตรงกับตำแหน่งของสารแอนโทไซยานินมาตรฐาน โดยนอกจากจะเป็นผลมาจากการแยกสารแอนโทไซยานินมาตรฐานที่ยังไม่มีความบริสุทธิ์มากพอแล้ว การมีรงควัตถุร่วม (co-pigment) ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่ง ซึ่งการมีรงควัตถุร่วมนี้เป็นปรากฏการณ์ที่ทำให้เกิดการแสดงออกของสีที่สูงขึ้นและมีความหลากหลายของสีมากขึ้น ทั้งในพืช ผลไม้ เบอร์รี่ และ อาหาร ซึ่งจะการเพิ่มความเสถียรให้แก่โครงสร้างของสารแอนโทไซยานิน และเพิ่มความเข้มของสี (Brouillard *et al.*, 1982; Liao *et al.*, 1992; Mazzaracchio *et al.*, 2004) โดยเฉพาะตัวอย่างดอกไม้ที่มีสีชมพู - ม่วง จะพบว่ามีรงควัตถุร่วมเป็นสารในกลุ่มของฟลาโวนอล (Harborne, 1993) ที่อยู่รวมกันกับสารแอนโทไซยานิน เป็นผลทำให้สีเปลี่ยนแปลงไป การมีรงควัตถุจะทำให้สีของพืชมีความสีที่เข้มขึ้น โดย Takemura *et al.* (2005) พบว่าเมื่อทำการแยกสารสีใน

ดอก *Gladiolus* ที่มีสีม่วง โดยใช้เทคนิค HPLC พบรงควัตถุร่วมเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอล มากกว่าดอก *Gladiolus* ที่มีสีชมพูและแดง เช่นเดียวกับดอกอิมมาลันปีโอปี ที่มีสีน้ำเงินก็พบสาร kaempferol 3- gentiobioside และ kaempferol 3-xylosylgentiobioside ซึ่งเป็นสารในกลุ่มของฟลาโวนอล ผสมอยู่กับสารแอนโทไซยานินในสัดส่วน 6.5 : 1 (Takeda *et al.*, 1996) ซึ่งสอดคล้องกันกับพืชที่ใช้ในการศึกษาเป็นพืชที่มีสีชมพู - ม่วง ทำให้ผลจากการแยกสารสีของดอกทั้ง 4 ชนิดในการศึกษานี้ ได้แก่ กล้วยไม้หวายไซเนียเอียสกุล เฟื่องฟ้าสีชมพู กล้วยไม้มีกาชาสีน้ำเงิน และ อัญชัน ซึ่งน่าจะมียารงควัตถุร่วมในกลุ่ม ฟลาโวนอล ทำให้จุดที่เกิดขึ้นจากการแยกสารสีใกล้เคียงกับจุดของเคลฟิโนดินมาตรฐาน แต่ไม่ตรงกับสารไซยานิดินมาตรฐานและ ฟิลาโกนินดินมาตรฐาน ซึ่งเป็นผลมาจากการมีรงควัตถุร่วมทำปฏิกิริยากันกับสารแอนโทไซยานิน (anthocyanin interaction) ได้แก่ การเกาะกันเองของสารแอนโทไซยานินเอง (self association) การเกาะกันของสารสีแอนโทไซยานินกับรงควัตถุร่วมภายในโมเลกุล (intermolecular copigmentation) การเกาะกันของสารสีแอนโทไซยานินกับรงควัตถุร่วมภายนอกโมเลกุล (intramolecular copigmentation) และการเกาะกันของสารสีแอนโทไซยานินกับโลหะ (metal complexation) (ภาคผนวกที่ 6) (Forkmann, 1993) ทำให้สารมีขนาดใหญ่ การเคลื่อนที่จึงช้ากว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารแอนโทไซยานินมาตรฐาน ประกอบกับการที่พืชมีสารในกลุ่มของโพลีแซคคาไรด์ จึงยังทำให้การเคลื่อนที่ช้าลงและไม่สามารถแยกสารออกจากกันได้อย่างชัดเจนอีกด้วย

สรุปและข้อเสนอแนะ

1. การแยกอาร์เอ็นเอรวมในกล้วยไม้โดยการตกตะกอนด้วย LiCl ให้ผลดีกว่าการใช้ trizol reagent ที่มีสาร guanidine isothiocyanate และ phenol เป็นองค์ประกอบ

2. ยีนที่โคลนได้จากกล้วยไม้หวาย โชนิเยียสกุล และกล้วยไม้แอสโคเซ็นด้ามิกาซา มีการกำ การสร้างสายโพลีเปปไทด์ที่มีการจัดเรียงตัวของอะมิโนแอซิดความใกล้เคียงกับ *anthocyanidin synthase (ans)* ของกล้วยไม้ออนซิเดียม (*Oncidium Gower Ramsey*) รั้อยละ 86 และ *flavonol synthase (fls)* ในหอม (*Allium cepa*) รั้อยละ 76

3. ยีน *ans/fls* ที่โคลนได้พบการแสดงออกสูงที่สุดในดอกตูม เมื่อเทียบกับการแสดงออก ของยีนใน ดอกบาน ใบ และราก และยีนมีจำนวนซ้ำในจีโนมแบบ multigene family

4. กล้วยไม้หวาย โชนิเยียสกุล และกล้วยไม้แอสโคเซ็นด้ามิกาซา มี องค์ประกอบของสารสีแอนโทไซยานินที่สำคัญคือ ไซยานิดิน ส่วนในดอกกล้วยไม้แอสโคเซ็นด้ามิกาซาสีน้ำเงิน มีไซยานิดิน และเคลฟิโนดินเป็นองค์ประกอบของสารสีแอนโทไซยานิน

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- จิตรภาพรรณ พิธิกุล. 2546. การปลูกเลี้ยงกล้วยไม้. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- มาลินี อนุพันธ์สกุล. 2542. กล้วยไม้. สำนักพิมพ์เกษตรบุ๊ค. พิมพ์ครั้งที่ 3, กรุงเทพฯ.
- ระพี สาคริก. 2530. กล้วยไม้. สำนักพิมพ์ช่องนนทรี. พิมพ์ครั้งที่ 1, กรุงเทพฯ.
- วิทย์ เทียงบุญธรรม. 2540. พจนานุกรมไม้ดอกไม้ประดับเมืองไทย. สุริยะบรรณ. กรุงเทพฯ.
- สมชาย สุกนธสิงห์. 2535. คู่มือการผลิตไม้ดอก. กรมส่งเสริมการเกษตร. กรุงเทพฯ.
- อัญชรีย์ ตั้งจิตมั่นธรรม. 2548. การเปรียบเทียบวิธีการสกัด RNA และการแสดงออกของยีน *ACC Synthase*, *ACC Oxidase* และ *Ethylene Receptor* ในส่วนต่างๆ ของกล้วยไม้สกุลหวาย BOM 17. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Ambavaram, M.R., V.S. Reddy, B.E. Scheffler, U. Wienand and A.R. Reddy. 2007. Novel transgenic rice overexpressing anthocyanidin synthase accumulates a mixture of flavonoids leading to an increased antioxidant potential metabolic. **Engineering** 9: 95 - 111.
- Anfinsen, C. 1972. The formation and stabilization of protein structure. *Biochem. J.* 128 (4): 737 - 749.
- Anderson, O. M. and G.W. Francis. 1985. Simultaneous analysis of anthocyanins and anthocyanidins on cellulose thin layers. **J. Chromatogr.** 318: 450-454.
- Bartley, G.E. and P.A. Scolnik. 1995. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. **Plant Cell** 7: 1027-1038.

- Brown, T.A. 1998. **Molecular Biology, LABfax 1. Recombinant DNA**. Academic Press. California.
- Brouillard, R. 1982. **Anthocyanins as Food Colors**. Academic Press, London.
- Brouillard, R. and O. Dangles. 1994. Genetic of Flavonoids, pp. 589-618. *In* J.B. Horborne (ed.). **The Flavonoids**. Chapman and Hall, London.
- Chang, S., J. Puryear and J. Cairney. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Mol. Biol. Rep.** 11 (2): 113 - 116.
- Cheng, L., Y. Xu, E.Grotewold, Z. Jin, F. Wu, C. Fu and D. Zhao. 2007. Characterization of Anthocyanidin Synthase (ANS) Gene and anthocyanidin in rare medicinal plant- *Saussurea medusa*. **Plant Cell** 89: 63-73.
- Chiriboga, C. and F. J. Francis. 1970. An anthocyanin recovery system from cranberry pomace. **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 95: 233 - 236.
- Chiou, C.Y. and K.W. Yeh. 2008. Differential expression of MYB gene (OgmYB1) determines color patterning in floral tissue of *Oncidium Gower Ramsey*. **Plant Mol. Biol.** 66: 379 - 388.
- Chua, C.S., D. Biermann, K.S. Goo and T.S. Sim. 2008. Elucidation of active site residues of *Arabidopsis thaliana* flavonol synthase provides a molecular platform for engineering flavonols. **Phytochemistry** 69: 66–75.
- Clifton, I.J., M.A. McDonough, D. Ehrismann, N.J. Kershaw, N. Granatino and C.J. Schofield. 2006. Structural studies on 2-oxoglutarate oxygenases and related double-stranded b-helix fold proteins. **J. Inorg. Biochem.** 100: 644–669.
- Dixon, R.A. and C.L. Steele. 1999. Flavonoids and isoflavonoids - a gold mine for metabolic engineering. **Trends Plant Sci.** 4: 394 - 400.

- Dressler, R.L. 1993. **Phylogeny and Classification of the Orchid Family**. Cambridge University Press. Cambridge.
- Fodor, F. K., Z. Végh and B. Renger. 2006. Thin-layer chromatography in testing the purity of pharmaceuticals. **Anal. Chem.** 25: 778 - 789.
- Forkmann, G. 1991. Flavonoid as flower pigment: The formation of natural spectrum and its extension by genetic engineering. **Plant Breed.** 106: 1 - 26.
- Forkmann, G. 1993. Genetic of flavonoids, pp. 538-564. . In J.B. Harborne (ed.). **The Flavonoids**. Chapman and Hall, London.
- Fried, B. and J. Sherma. 1999. **Thin – Layer Chromatography**. Cherry Hill, New Jersey.
- Fuleki, T. and F. J. Francis. 1968. Quantitative methods for anthocyanins. I. Extraction and determination of total anthocyanin in cranberry. **J. Food Sci.** 33: 72 - 77.
- Gebhardt, Y., S. Witte, G. Forkmann, R. Lukacin, U. Martern and S. Martens. 2005. Molecular evolution of flavonoid dioxygenases in the family apiaceae. **Phytochemistry** 66: 1273 - 1284.
- Harborne, J.B. 1984. **Phytochemical Method**. The Chaucer Press, London.
- Harborne, J.B. 1993. **The Flavonoids: Advances in Research Since 1986**. Chapman and Hall, London.
- Holton, T.A., F. Brugliera and Y. Tanaka. 1993. Cloning and expression of flavonol synthase from *Petunia hybrida*. **Plant J.** 4: 1003 - 1010.
- Holton, T.A. and E.C. Cornish. 1995. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. **Plant Cell** 7: 1071 - 1083.

- Hosiki, T. and M. Seo. 1991. Flower anthocyanins of herbaceous peony. **Bull. Fac. Agr. Shimane Univ.** 25: 11 - 14.
- Johnson, L.M.V., M.E.G. Aarsman, J.van Dlepen, P. van Vlaming, N. Smit and A.W. Schram. 1984. Properties and genetic control of anthocyanin 5-O-glucosyltransferase in flowers of *Petunia hybrida*. **Planta** 160: 341-347.
- Jones, C.M., P. Mes and J. R. Myers. 2003. Characterization and inheritance of the anthocyanin fruit (*Afi*) tomato. **Amer. Gen. Asso.** 94: 449 - 456.
- Kahkonen, M.P., A.I. Hopia and M. Heinonen. 2001. Berry phenolics and their antioxidant activity, **J. of Agri. and Food Chem.** 49: 4076–4082.
- P.G. Kapsakalidis, P.G., R.A. Rastall and M.H. Gordon. 2006. Extraction of polyphenols from processed black currant (*Ribes nigrum* L.) residues. **J. of Agri. and Food Chem.** 54: 4016–4021.
- Kato, N., T. Kojima, S. Yoshiyagawa, H. Ohta, A. Toriba, H. Nishimura and K. Hayakawa. 2007. Rapid and sensitive determination of tryptophan, serotonin and psychoactive tryptamines by thin-layer chromatography fluorescence detection. **J. Chromatogr.** 1145: 229 - 233.
- Kim, S., M. L. Binzel , K. S. Yoo, S. Park L. and M. Pike. 2004. Pink (P), a new locus responsible for a pink trait in onions (*Allium cepa*) resulting from natural mutations of anthocyanidin synthase. **Mol. Gen. Genomics** 272: 18 – 27.
- Kong, J. M., L.S. Chia, N.K. Goh, T.F. Chia and R. Brouillard. 2003. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry** 64: 923 - 933.
- Lewinsohn, E., C. Steele and R. Croteau. 1994. Simple isolation of functional RNA from woody stems of gymnosperms. **Plant Mol. Biol. Rep.** 12: 20 – 25.
- Liao, H., Y. Cai and E. Haslam. 1992. Polyphenol interactions anthocyanins: co-pigmentation and colour changes in red wines. **J. Sci. Food Agric.** 59: 299 - 305.

- Lievens, S., S. Goormachtig and M. Holsters. 1997. Identification of differentially expressed mRNAs using the differential display technique, pp. 1-17. *In* **Workshop on Genome Diversity and Genome Expression in Plants EMBO-Course**. Ledeganckstraat, Netherlands.
- Livak, K.J. and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-CT} method. **Methods** 25: 402 - 408.
- Lukacin, R., F. Wellmann, L. Britsch, S. Martens and U. Materna. 2003. Flavonol synthase from *Citrus unshiu* is a bifunctional dioxygenase. **Phytochemistry** 62: 287–292.
- Madhuri, G. and R. Reddy. 1999. Plant biotechnology of flavonoid. **Plant Biotechnol.** 16: 179-199.
- Manickavelu, A., K. Kamarab, K. Mishina and T. Koba. 2007. An efficient method for purifying high quality RNA from wheat pistils colloids and surfaces. **Bull. Biointerfaces** 54: 254 - 258.
- Markham, K.R. 1982. **Techniques of Flavonoid Identification**. Academic Press, London.
- Mato, M., T. Onozaki, Y. Ozeki, D. Higeta, Y. Itoh, Y. Yoshimoto, H. Ikeda, H. Yoshida and M. Shibata. 2000. Flavonoid biosynthesis in white-flowered sim carnations (*Dianthus caryophyllus*). **Scientia Horticulturae** 84: 333 - 347.
- Matysik, G. 1992. Thin - layer chromatography of anthocyanins with stepwise gradient elution. **J. Planar Chromatogr. Mod. TLC.** 9: 435 - 438.
- Mazzaracchio, P., P. Pifferi, M. Kindt, A. Munyaneza and G. Barbiroli. 2004. Interactions between anthocyanins and organic foodmolecules in model systems. **Int. J. Food Sci. Technol.** 39: 53-59.

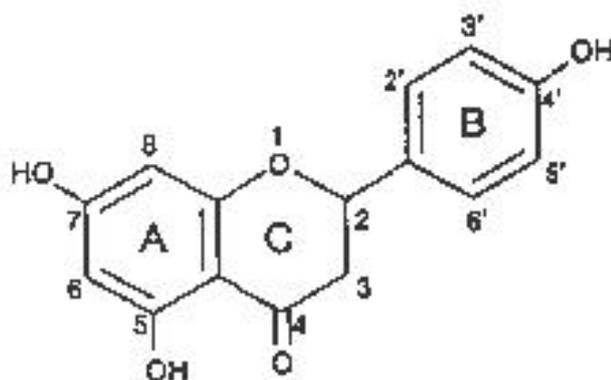
- Mol, J., E. Grotewold and R. Koes. 1998. How genes paint flowers and seeds. **Trends Plant Sci.** 3: 212-217.
- Nakatsuka, A., D. Mizuta, Y. Kii, I. Miyajima and N. Kobayashi. 2008. Isolation and expression analysis of flavonoid biosynthesis genes in evergreen azalea. **Scientia Horticulturae** 118: 314-320.
- Nakatsuka, T., M. Nishihara, K. Mishiba and S. Yamamura. 2005. Two different mutations are involved in the formation of white-flowered gentian plants. **Plant Sci.** 169: 949 - 958.
- Nielsen, K., S.C. Derolles, K.R. Markham, M.J. Bradley, E. Podivinsky and D. Manson. 2002. Antisense flavonol synthase alters copigmentation and flower color in lisianthus. **Mol. Breed.** 9: 217–229.
- Pietta, P.G. 2000. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.** 63: 1035 - 1042.
- Potapovich, A.I. and V.A. Kostyuk. 2003. Comparative study of antioxidant properties and cytoprotective activity of flavonoids. **Biochem** 68: 514 - 519.
- Rein, M. J. 2005. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins (dissertation). **EKT.** 1331.
- Rosati, C., A. Cadic, M. Duron, M. Ingouff and P. Simoneau. 1999. Molecular characterization of the anthocyanidin synthase gene in *Forsythia intermedia* reveals organ-specific expression during flower development. **Plant Sci.** 149: 73 – 79.
- Preub, A., R. Stracke, B. Weisshaar, A. Hillebrecht, U. Matern and S. Martens. 2009. *Arabidopsis thaliana* expresses a second functional flavonol synthase. **FEBS Letters** 583: 1981–1986

- Saito, R., N. Fukuta, A. Ohmiya, Y. Itoh, Y. Ozeki, K. Kuchitsu and M. Nakayama. 2006. Regulation of anthocyanin biosynthesis involved in the formation of marginal picotee petals in petunia. **Plant Sci.** 170: 828 - 834.
- Salzman, R.A., T. Fujita, K. Zhu-Salzman, P.M. Hasegawa and R.A. Bressan. 1999. An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. **Plant Mol. Biol. Rep.** 17: 11 - 17.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. **Molecular Cloning, A laboratory Manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 2001. **Molecular Cloning, A Laboratory Manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Seitz, C., M. Vitten, P. Steinbach, S. Hartl, J. Hirsche, W. Rathje, D. Treutter and G. Forkmann. 2007. Redirection of anthocyanin synthesis in *Osteospermum hybrida* by a two-enzyme manipulation strategy. **Phytochemistry** 68: 824 - 833.
- Stevenson, T. W. 1991. Molecular biology of flavonoid pigment biosynthesis in flower. pp 122-148. In E. S. Dennis and D. J. Lewwlyn (eds.). **Molecular Approaches to Crop Improvement.** Springer Verlag, Wein.
- Stotz, G. and G. Forkmann. 1982. Hydroxylation of the B-ring of flavonoid in the 3'- and 5'-positive with enzyme extracts from flowers of *Verbena hybrida*. **Z. Naturforsch.** 37c: 19-23.
- Surzycki, S. 2000. **Basic Techniques in Molecular Biology.** Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany.

- Takahashi, R., S.M. Githiri, K. Hatayama, E.G. Dubouzet, N. Shimada, T. Aoki, S. Ayabe, T. Iwashina, K. Toda and H. Matsumura. 2007. A single-base deletion in soybean flavonol synthase gene is associated with magenta flower color. **Plant Mol.** 63: 125 - 135.
- Takeda, K., S. Yamaguchi, K. Iwata, Y. Tsujino, T. Fujomori and S. Z. Husain. 1996. A malonylated anthocyanin and flavonols in the blue flower of *Meconopsis*. **Phytochemistry** 42: 863-865.
- Takemura, T., Y. Takatsu, M. Kasumi, W. Marubashi and T. Iwashina. 2005. Flavonoids and their distribution patterns in the flowers of *Gladiolus* cultivars. **Acta Hort.** 673: 487 – 493.
- Tanaka, Y., S. Thuda, K. Suzuki, H. Zue, Y. Fukui, M. Fukchi-Mizutani, K. Ohhira, Y. Katsumoto, K. Yunekura-Sakakibara and T. Kusumi. 1998. Flower colour modification with genetic engineering, pp. 115. *In* P. S. Larkin eds. **Agricultural Biotechnology Laboratory, Field and Market Proceeding of the 4th Asia-Pacific Conference on Agriculture Biotechnology**. Darwom, Australia.
- Tatsuzawa, F., N. Saito, H. Seki, M. Yokoi, T. Yukawa, K. Shinoda and T. Honda. 2004. **Biochemical Systematics and Ecology** 32: 651 - 664.
- Tesniere, C. and M.E. Vayda. 1999. Method for the isolation of high-quality RNA from grape berry tissues without contaminating tannins or carbohydrates. **Plant Mol. Biol. Rep.** 9: 242 - 251.
- Turnbull, J., J. Nakajima, R. Welford, M. Yamazaki, K. Saito and C. Schofield. 2003. Mechanistic studies on three 2-oxoglutarate dependent oxygenases of flavonoid biosynthesis: anthocyanidin synthase, flavonol synthase and flavanone 3 -hydroxylase. **J. Biol. Chem.** 279: 1206 - 1216.

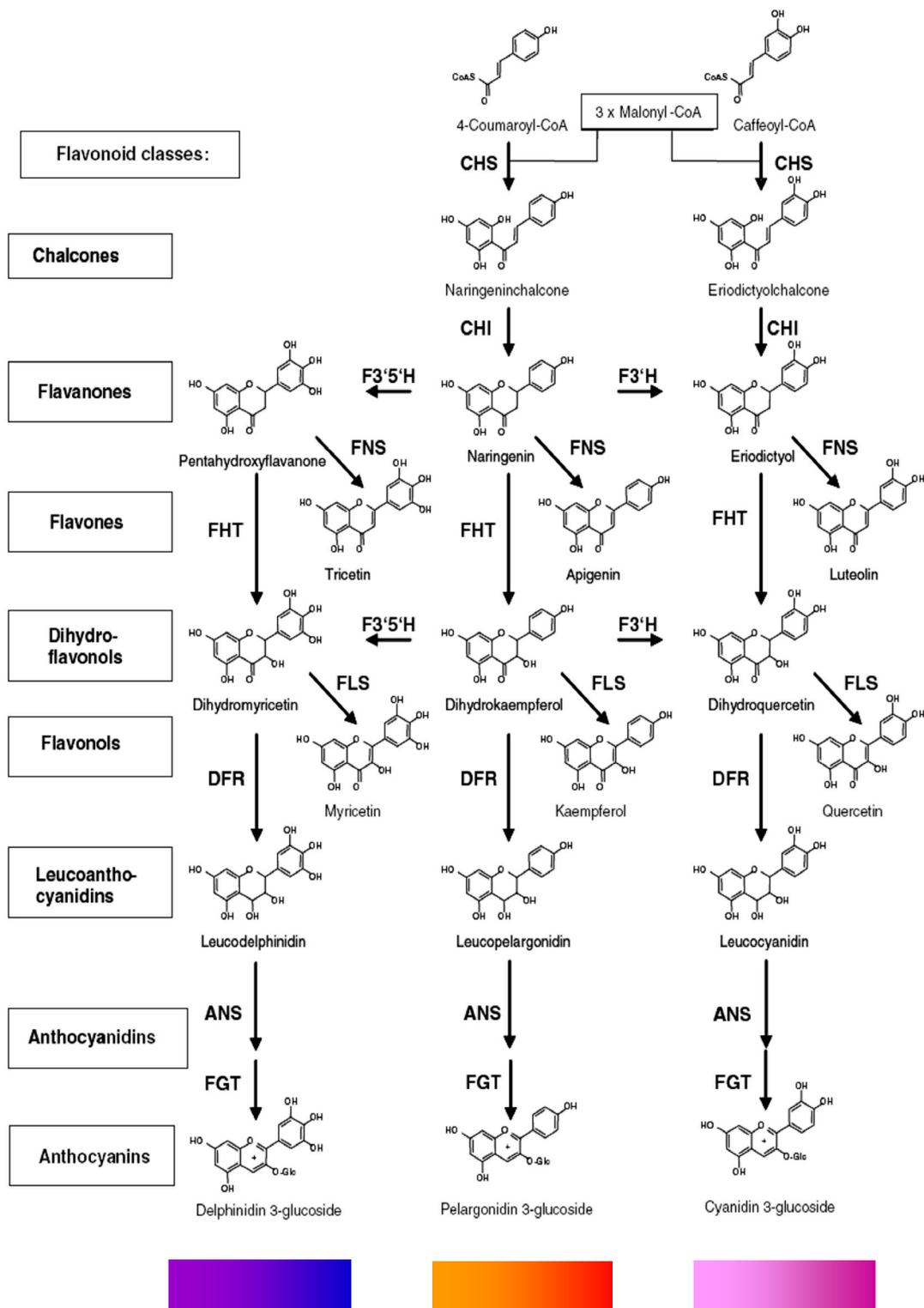
- Van Tunen, A.J., L.A. Mur, K. Recourt, G. M. Greats and J. N. M. Mol. 1991. Regulation and manipulation of flavonoid gene expression in anthers of petunia: The molecular basis of the *Po* mutation. **Plant Cell** 3: 39 - 48.
- Weiss, D. and A. H. Halevy. 1989. Stamens and gibberellin in the regulation of corolla pigmentation and growth in petunia hybrida. **Planta** 179: 89-96.
- Welford, R.W.D., J.J. Turnbull, T.M.W. Claridge, A.G. Prescott and C.J. Schofield. 2001. Evidence for oxidation at C-3 of the flavonoid C-ring during anthocyanin biosynthesis. **Chem. Communications** 1828–1829.
- Winkel-Shirley, B. 1996. Flavonoid biosynthesis. New functions for an old pathway. **Trends Plant Sci.** 1: 377–382.
- Winkel-Shirley, B. 2001. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. **Plant Physiol.** 126: 485 – 493.

ภาคผนวก



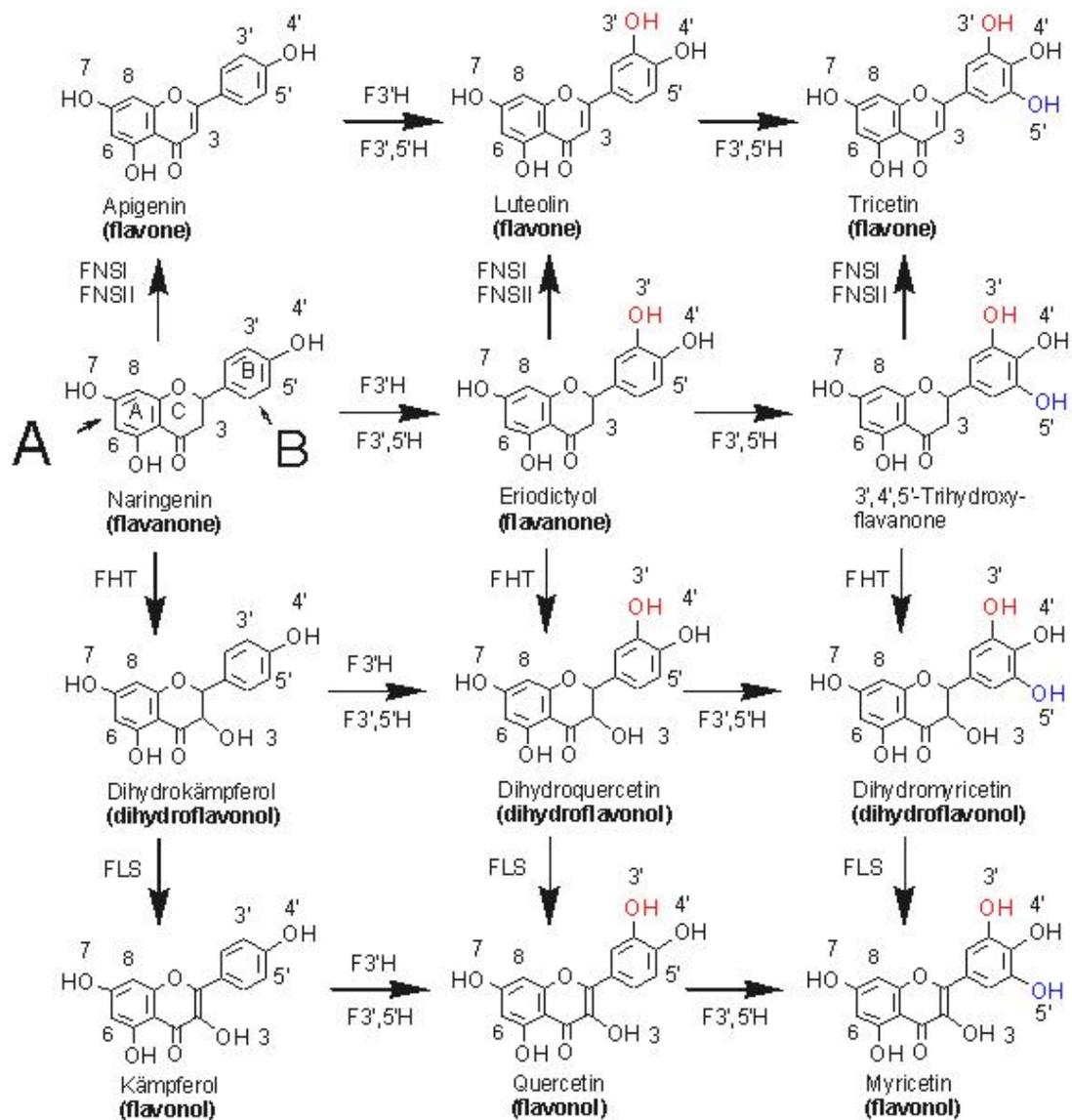
ภาพผนวกที่ 1 ลักษณะวง A และ B ซึ่งเป็นโครงสร้างของฟลาโวนอยด์

ที่มา: Madhuri and Reddy (1999)



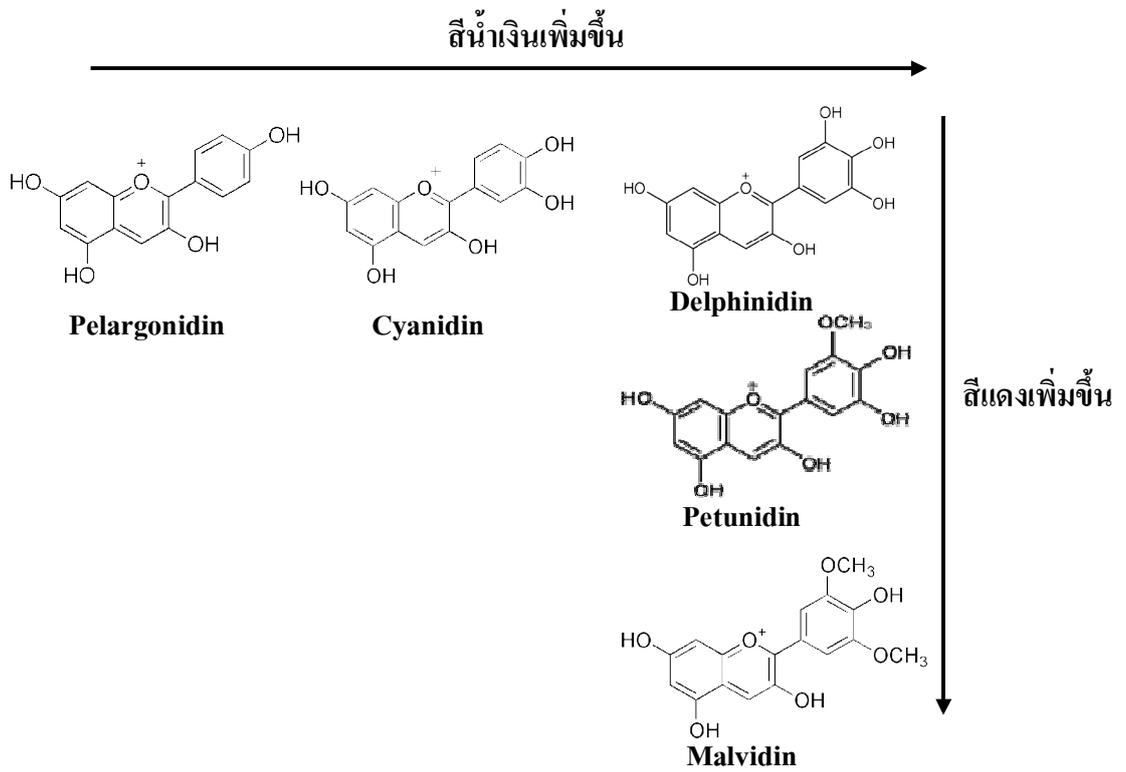
ภาพผนวกที่ 2 กระบวนการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานิน

ที่มา: Seitz *et al.* (2007)



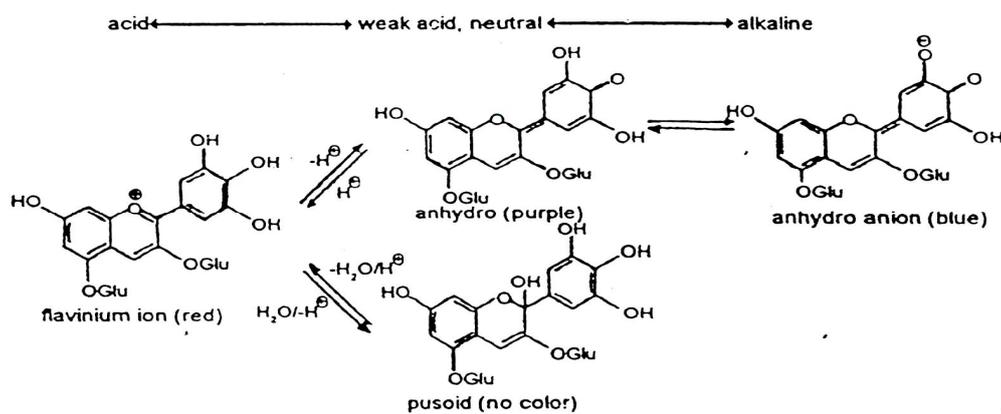
ภาพผนวกที่ 3 กระบวนการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์ซึ่งให้สาร kampfrol, quercetin และ myricetin ที่เป็นสาร substrate ที่จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารแอนโไซยานินสีต่างๆ กัน เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องได้แก่ flavanone-3- hydroxylase (F3H, FHT), flavonoid -3'-hydroxylase (F3'H), flavonoid 3', 5'-hydroxylase (F3'5'H) flavone synthase I (FNSI), flavone synthase II (FNSII), flavonol synthase (FLS)

ที่มา: Forkmann (1993)



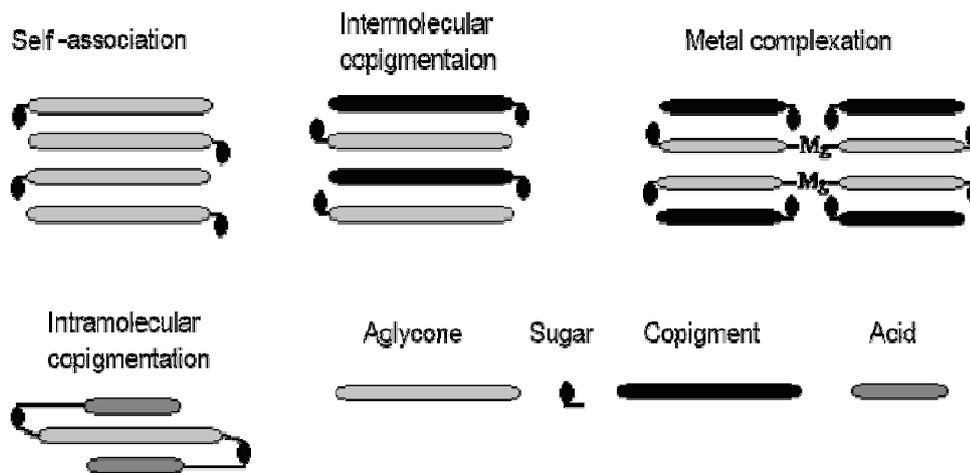
ภาพผนวกที่ 4 ผลของหมู่ไฮดรอกซิล หรือหมู่เมทอกซิล ต่อการเกิดการเปลี่ยนแปลงของสี

ที่มา: Rein (2005)



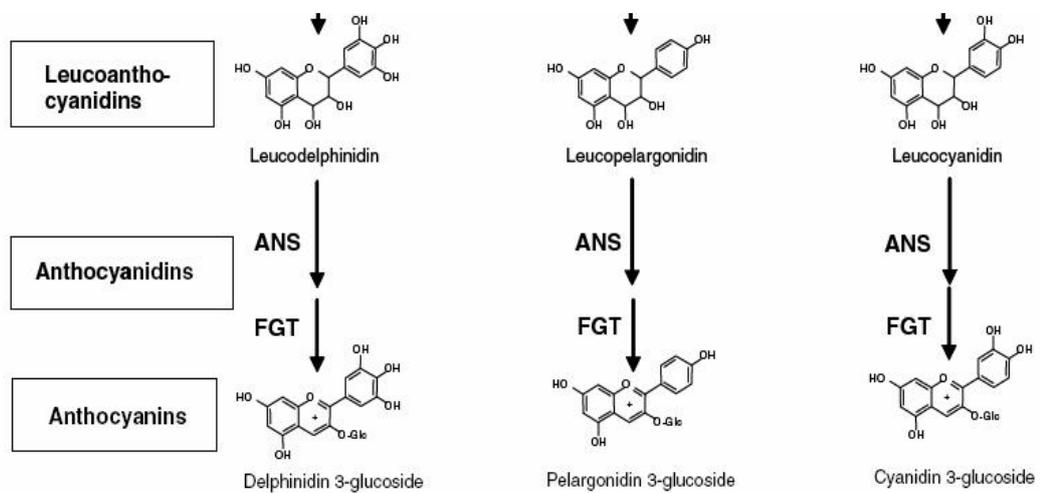
ภาพผนวกที่ 5 ผลของ pH ต่อการเปลี่ยนแปลงสีรงควัตถุ

ที่มา: Forkmann (1993)



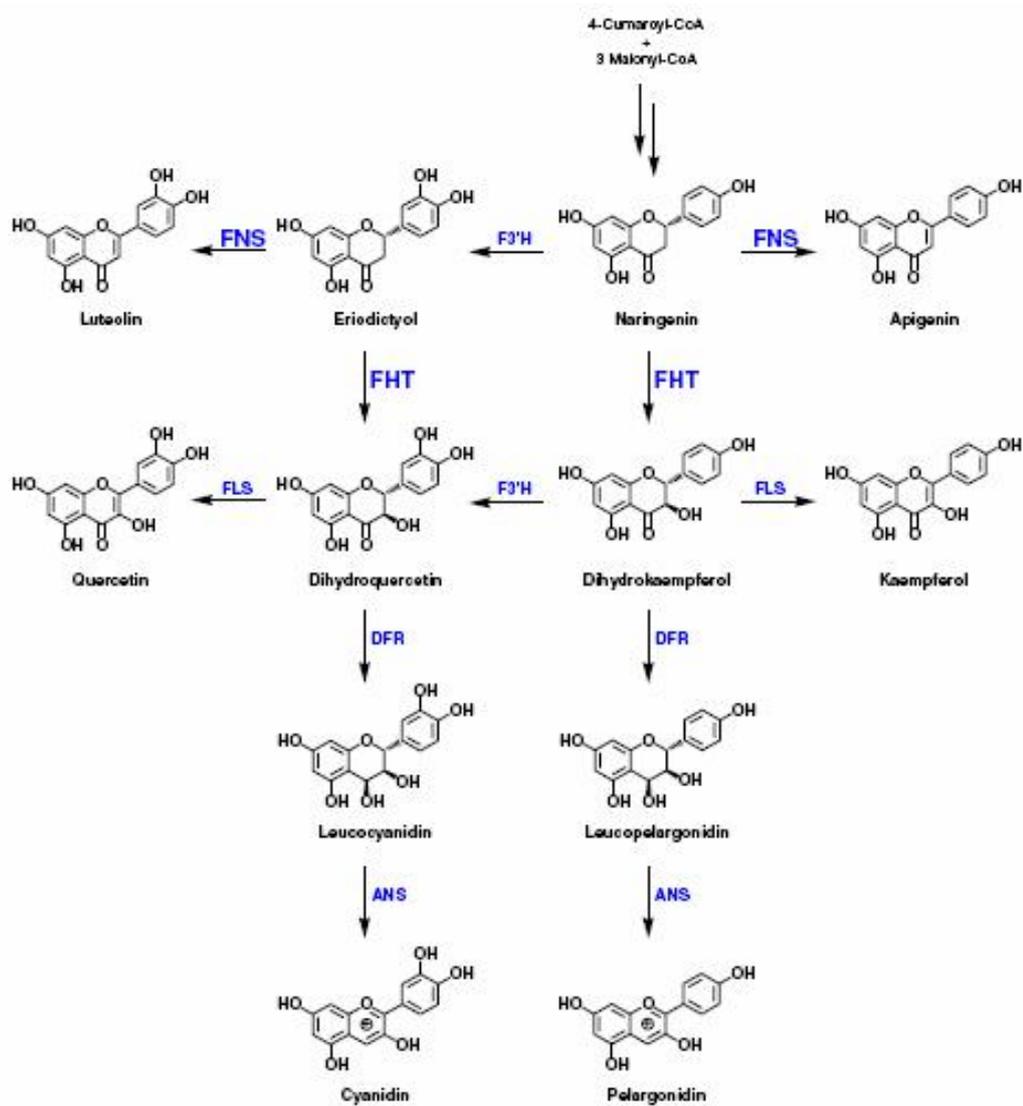
ภาพผนวกที่ 6 การเกิด anthocyanin interactions

ที่มา: Forkmann (1993)



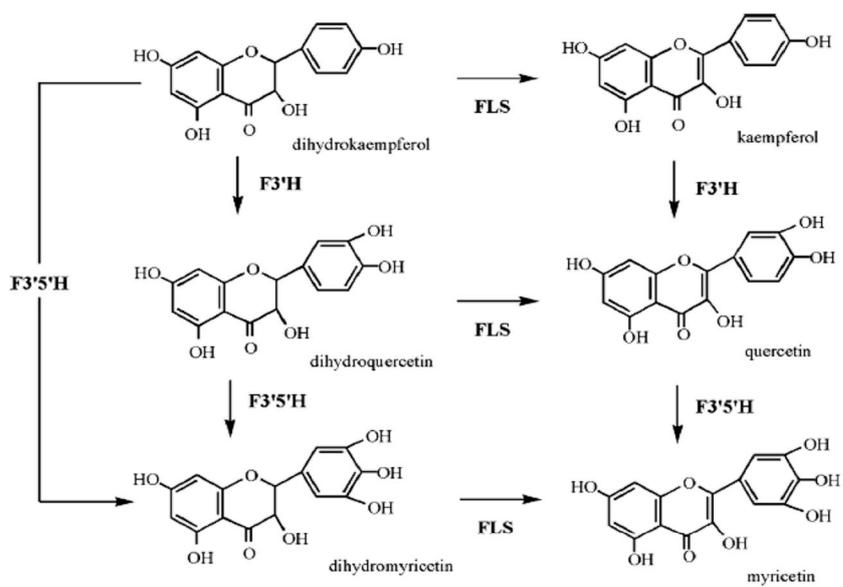
ภาพผนวกที่ 7 กระบวนการสร้างสาร anthocyanidin โดยเอนไซม์ anthocyanidin synthase (ANS) ในขั้นตอนสุดท้ายของการสร้างแอนโทไซยานินก่อนการเติมน้ำตาลด้วยเอนไซม์ flavonoid 3-glucosyl transferase (FGT)

ที่มา: Seitz *et al.* (2007)



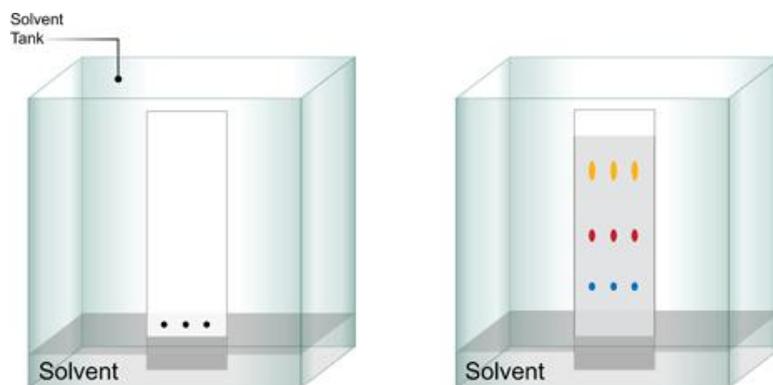
ภาพผนวกที่ 8 กระบวนการสร้างสารฟลาโวนอยด์ FNS I: flavone synthase I (Apiaceae), FHT: flavanone 3b-hydroxylase, FLS: flavonol synthase, ANS: anthocyanidin synthase, DFR: dihydroflavonol 4-reductase, F3 H: flavonoid 3o-hydroxylase, FNS II: flavone synthase II.

ที่มา: Gebhardt *et al*, (2005)

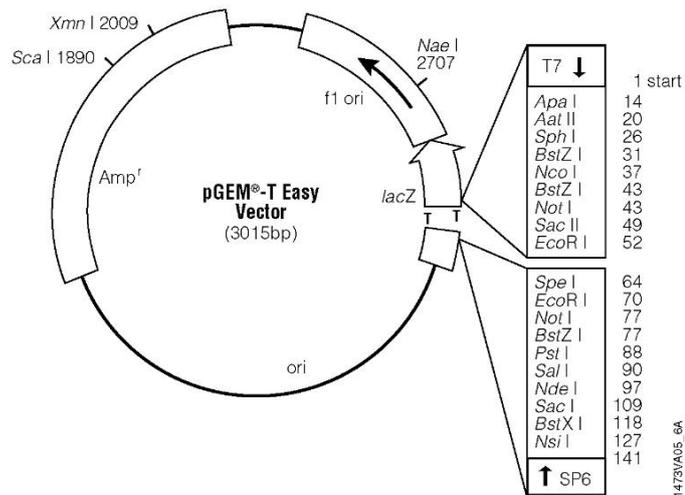


ภาพผนวกที่ 9 กระบวนการสร้างสาร flavonol โดยเอนไซม์ flavonol synthase

ที่มา: Takahashi *et al.* (2007)

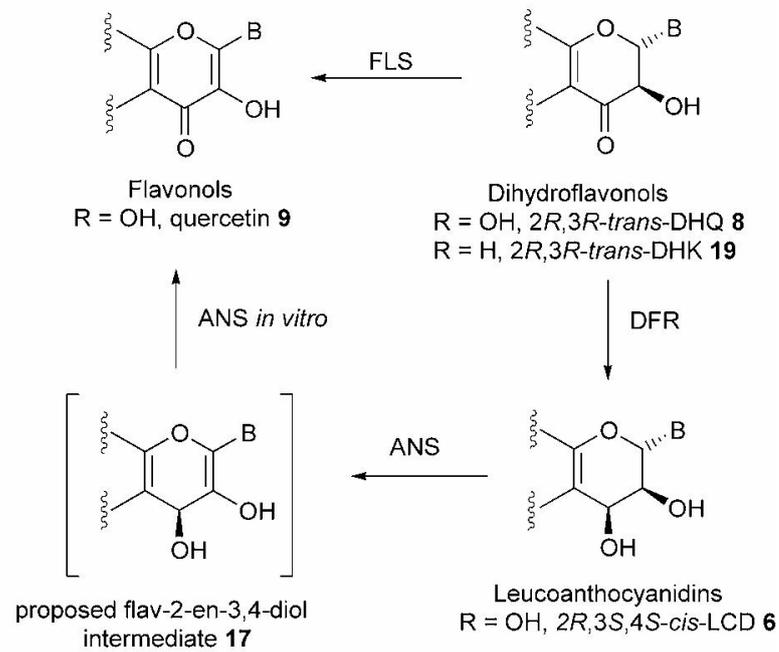


ภาพผนวกที่ 10 การทำ thin-layer chromatography



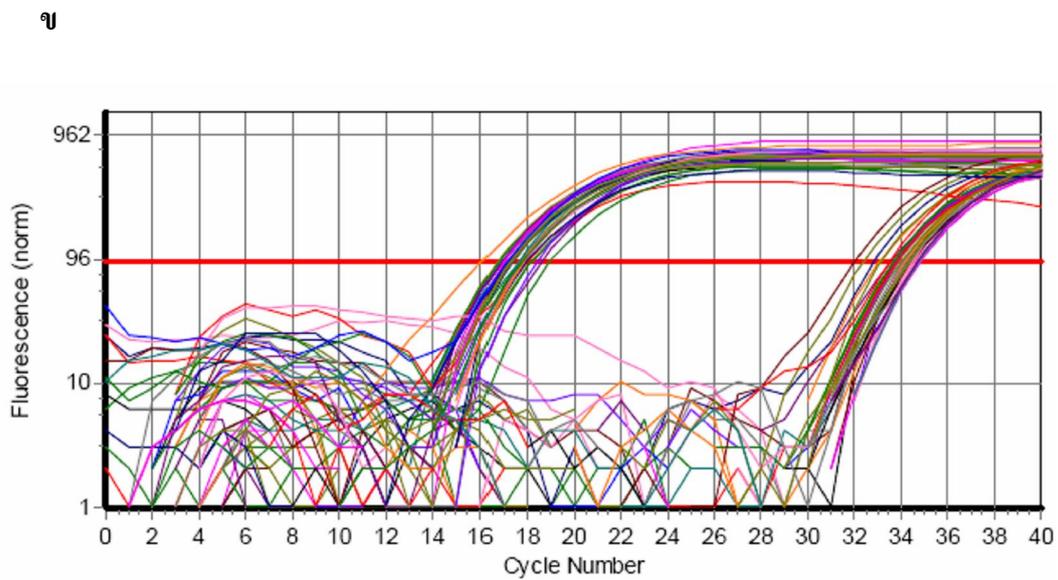
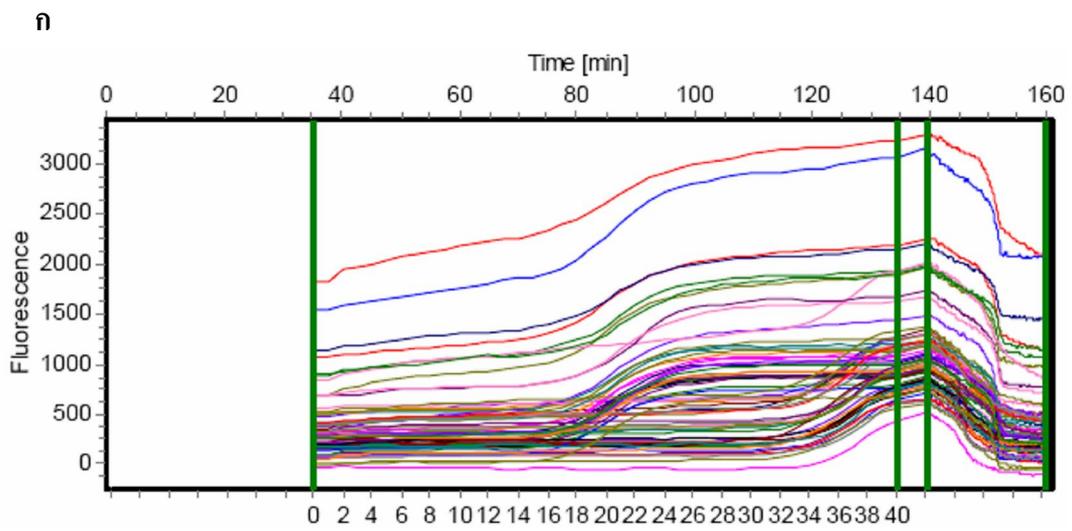
ภาพผนวกที่ 11 แผนที่ยีนของพลาสมิด pGEM-T easy

ที่มา: Brown, (1998)



ภาพผนวกที่ 12 ความแตกต่างของการทำหน้าที่ของเอนไซม์ ANS และ FLS โดย FLS ทำหน้าที่เปลี่ยน dihydroflavonols ไปเป็น flavonols และ ANS เปลี่ยน leucoanthocyanidins (สารไม่มีสี) ไปเป็น flavonols

ที่มา: Turnbull *et al.* (2003)



ภาคผนวกที่ 13 ข้อมูลดิบที่ได้จากการทำ qPCR

ก. Fluorescent profile

ข. Amplification plot

ตารางผนวกที่ 1 โครงสร้างของสารแอนโทไซยานิน

Anthocyanidin	Basic structure	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
Aurantininidin		-H	-OH	-H	-OH	-OH	-OH	-OH
Cyanidin		-OH	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Delphinidin		-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-H	-OH
Europinidin		-OCH ₃	-OH	-OH	-OH	-OCH ₃	-H	-OH
Luteolinidin		-OH	-OH	-H	-H	-OH	-H	-OH
Pelargonidin		-H	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Malvidin		-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	-OH	-OH	-H	-OH
Peonidin		-OCH ₃	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Petunidin		-OH	-OH	-OCH ₃	-OH	-OH	-H	-OH
Rosinidin		-OCH ₃	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OCH ₃

ที่มา Kong *et al.* (2003)

ตารางผนวกที่ 2 การเกิดสีของฟลาโวนอยด์เมื่อทำปฏิกิริยากับสารต่างๆ

Visible color	Color in UV light		Indication
	alone	with ammonia	
Orange	dull orange, red or mauve fluorescent yellow or cerise pink	blue	anthocyanidin 3-glycosides
Red		blue	most anthocyanidin 3,5- diglycosides
Mauve			
bright yellow	dark brown or black	bark brown or black	6 hydroxylated flavonols and flavones : some chalcone glycosides
		dark red or bright orange	most chalcones
	bright yellow or yellow-green	bright orange or red	aurones
very pale	dark brown	bright yellow or	most flavonol glycosides
yellow	dark mauve	yellow brown	
none	dark mauve	dark brown	biflavonyls
		faint brown	most isoflavones and flavanonols
	faint blue	pale yellow or yellow-green	flavanones and flavanonol 7- glycosides
		intense blue	5-deoxyisoflavones and 7,8 dihydroxyflavanones

ที่มา: Harborne (1984)

ตารางผนวกที่ 3 ค่า expression ratio ที่ได้จากการทำ qPCR โดยคำนวณค่าตามวิธีการของ Livak and Schmittgen (2001)

tissue	<i>ans/fls</i> mean CT	<i>actin</i> mean CT	deltaCT	deltadeltaCT	expression ratio
<i>Den. Khaosanan</i>					
ราก	24.53	24.93	-0.4	0	1
ใบ	24.61	25.23	-0.62	-0.22	1.17
ดอกตูม	30.54	31.65	-1.11	-0.71	1.64
ดอกบาน	29.57	30.26	-0.69	-0.29	1.22
<i>Den. Earsakul</i>					
ราก	28.77	29.37	-0.6	-0.2	1.15
ใบ	29.24	29.95	-0.71	-0.31	1.24
ดอกตูม	26.57	27.93	-1.36	-0.96	1.95
ดอกบาน	25.97	26.95	-0.98	-0.58	1.50
<i>Asco. Mikasa Blue</i>					
ราก	29.99	30.57	-0.58	-0.18	1.13
ใบ	27.96	28.64	-0.68	-0.28	1.21
ดอกตูม	29.16	30.54	-1.38	-0.98	1.97
ดอกบาน	27.63	28.68	-1.05	-0.65	1.57
<i>Asco. Mikasa Pink</i>					
ราก	31.21	31.82	-0.61	-0.21	1.16
ใบ	28.47	29.16	-0.69	-0.29	1.22
ดอกตูม	28.04	29.75	-1.71	-1.31	2.48
ดอกบาน	27.86	29.23	-1.37	-0.97	1.96

โดยกำหนดให้

$$\text{deltaCT} = \text{ans/fls mean CT} - \text{actin mean CT}$$

$$\text{deltadeltaCT} = \text{deltaCT} - \text{deltaCT}_{\text{ราก Den. Khaosanan}}$$

$$\text{expression ratio} = 2^{-\text{deltadeltaCT}}$$

ตารางผนวกที่ 4 ค่า expression ratio ที่ได้จากการทำ qPCR จากเครื่อง Realplex

Pos	Name	Ct SYBR	Ct mean SYBR	Expr. Level SYBR	Range SYBR
A1	root white_1/1	24.75	24.53		
A2	root white_1/2	23.00	24.53		
A3	root white_1/3	25.84	24.53		
A4	leaves white_1/1	25.31	24.61	1.17	0.624-1.47
A5	leaves white_1/2	23.77	24.61	1.17	0.624-1.47
A6	leaves white_1/3	24.75	24.61	1.17	0.624-1.47
A7	1st white_1/1	30.67	30.54	1.64	0.767-1.73
A8	1st white_1/2	30.89	30.54	1.64	0.767-1.73
A9	1st white_1/3	30.06	30.54	1.64	0.767-1.73
A10	4th white_1/1	28.99	29.57	1.22	0.537-1.61
A11	4th white_1/2	29.74	29.57	1.22	0.537-1.61
A12	4th white_1/3	29.98	29.57	1.22	0.537-1.61
B1	root white_1/1	24.96	24.93		
B2	root white_1/2	25.79	24.93		
B3	root white_1/3	24.04	24.93		
B4	leaves white_1/1	25.93	25.23		
B5	leaves white_1/2	24.56	25.23		
B6	leaves white_1/3	25.20	25.23		
B7	1st white_1/1	32.58	31.65		
B8	1st white_1/2	31.26	31.65		
B9	1st white_1/3	31.11	31.65		
B10	4th white_1/1	30.26	30.26		
B11	4th white_1/2	30.96	30.26		
B12	4th white_1/3	29.56	30.26		
C1	root ear_1/1	28.88	28.77	1.15	0.638-1.44
C2	root ear_1/2	28.50	28.77	1.15	0.638-1.44
C3	root ear_1/3	28.93	28.77	1.15	0.638-1.44
C4	leaves ear_1/1	28.18	29.24	1.24	0.841-1.58
C5	leaves ear_1/2	30.58	29.24	1.24	0.841-1.58
C6	leaves ear_1/3	28.96	29.24	1.24	0.841-1.58
C7	1st ear_1/1	26.79	26.57	1.95	0.717-2.03
C8	1st ear_1/2	26.38	26.57	1.95	0.717-2.03
C9	1st ear_1/3	26.54	26.57	1.95	0.717-2.03
C10	4th ear_1/1	28.58	25.97	1.50	0.559-1.62
C11	4th ear_1/2	25.14	25.97	1.50	0.559-1.62
C12	4th ear_1/3	24.19	25.97	1.50	0.559-1.62

ตารางผนวกที่ 4 (ต่อ)

Pos	Name	Ct SYBR	Ct mean SYBR	Expr. Level SYBR	Range SYBR
D1	root ear_1/1	29.75	29.37		
D2	root ear_1/2	29.15	29.37		
D3	root ear_1/3	29.21	29.37		
D4	leaves ear_1/1	33.12	29.95		
D5	leaves ear_1/2	28.25	29.95		
D6	leaves ear_1/3	28.47	29.95		
D7	1st ear_1/1	27.49	27.93		
D8	1st ear_1/2	2.96	27.93		
D9	1st ear_1/3	28.35	27.93		
D10	4th ear_1/1	26.22	26.95		
D11	4th ear_1/2	26.82	26.95		
D12	4th ear_1/3	27.82	26.95		
E1	root MP_1/1	30.88	31.21	1.16	0.391-1.47
E2	root MP_1/2	31.24	31.21	1.16	0.391-1.47
E3	root MP_1/3	31.51	31.21	1.16	0.391-1.47
E4	leaves MP_1/1	30.19	28.47	1.22	0.846-1.65
E5	leaves MP_1/2	29.07	28.47	1.22	0.846-1.65
E6	leaves MP_1/3	26.15	28.47	1.22	0.846-1.65
E7	1st MP_1/1	27.83	28.04	2.45	1.73-3.47
E8	1st MP_1/2	28.02	28.04	2.45	1.73-3.47
E9	1st MP_1/3	28.27	28.04	2.45	1.73-3.47
E10	4th MP_1/1	27.99	27.86	1.96	1.02-2.10
E11	4th MP_1/2	28.41	27.86	1.96	1.02-2.10
E12	4th MP_1/3	27.18	27.86	1.96	1.02-2.10
F1	root MP_1/1	30.09	31.82		
F2	root MP_1/2	30.74	31.82		
F3	root MP_1/3	34.63	31.82		
F4	leaves MP_1/1	31.22	29.16		
F5	leaves MP_1/2	28.73	29.16		
F6	leaves MP_1/3	27.53	29.16		
F7	1st MP_1/1	29.95	29.75		
F8	1st MP_1/2	29.21	29.75		
F9	1st MP_1/3	30.09	29.75		
F10	4th MP_1/1	29.59	29.23		
F11	4th MP_1/2	28.19	29.23		
F12	4th MP_1/3	29.91	29.23		

ตารางผนวกที่ 4 (ต่อ)

Pos	Name	Ct SYBR	Ct mean SYBR	Expr. Level SYBR	Range SYBR
G1	root MP_1/1	30.66	29.99	1.13	0.583-1.41
G2	root MP_1/2	28.85	29.99	1.13	0.583-1.41
G3	root MP_1/3	30.46	29.99	1.13	0.583-1.41
G4	leaves MP_1/1	26.64	27.96	1.21	0.716-1.59
G5	leaves MP_1/2	29.97	27.96	1.21	0.716-1.59
G6	leaves MP_1/3	27.27	27.96	1.21	0.716-1.59
G7	1st MP_1/1	27.59	29.16	1.97	1.13-1.97
G8	1st MP_1/2	28.82	29.16	1.97	1.13-1.97
G9	1st MP_1/3	31.07	29.16	1.97	1.13-1.97
G10	4th MP_1/1	29.13	27.63	1.57	0.641-1.54
G11	4th MP_1/2	27.14	27.63	1.57	0.641-1.54
G12	4th MP_1/3	26.62	27.63	1.57	0.641-1.54
H1	root MP_1/1	33.02	30.57		
H2	root MP_1/2	31.92	30.57		
H3	root MP_1/3	26.77	30.57		
H4	leaves MP_1/1	29.71	28.64		
H5	leaves MP_1/2	27.52	28.64		
H6	leaves MP_1/3	28.69	28.64		
H7	1st MP_1/1	33.02	30.54		
H8	1st MP_1/2	32.12	30.54		
H9	1st MP_1/3	26.48	30.54		
H10	4th MP_1/1	28.43	28.68		
H11	4th MP_1/2	28.52	28.68		
H12	4th MP_1/3	29.09	28.68		

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นายประดิพันธ์ ทองแถม ณ อยุธยา
วัน เดือน ปี ที่เกิด	12 มกราคม พ.ศ. 2526
สถานที่เกิด	อำเภอปากเกร็ด จังหวัดนนทบุรี
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. ประจำปี 2549