



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุ์วิศวกรรม)

ปริญญา

พันธุ์วิศวกรรม

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง

การโคลนและศึกษาการแสดงออกของยีนเลคตินจากกล้วยไม้สกุลสิงโต

Molecular Cloning and Expression of *Lectin* Genes from *Bulbophyllum* Orchids

นามผู้วิจัย นางสาวศิริกาญจน์ กอบเกียรติกุล

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์พัฒนา ศรีฟ้า สุนเนอร์, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริวรรณ พราพงษ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่

เดือน

พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การโคลนและศึกษาการแสดงออกของยีนเลคตินจากกล้วยไม้สกุลสิงโต

Molecular Cloning and Expression of *Lectin* Genes from *Bulbophyllum* Orchids

โดย

นางสาวศิริกาญจน์ กอบเกียรติถวิล

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุ์วิศวกรรม)

พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ศิริกาญจน์ กอบเกียรติกุล 2554: การโคลนและศึกษาการแสดงออกของยีนเลคตินจาก
กล้วยไม้สกุลสิงโต ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม) สาขาวิชา
พันธุวิศวกรรม โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
หลัก: รองศาสตราจารย์พัฒนา ศรีฟ้า สุนเนอร์, Ph.D. 79 หน้า

สารโพลีแซคคาไรด์ในกล้วยไม้เป็นปัญหาหลักต่อการสกัดกรดนิวคลีอิก การศึกษาในครั้งนี้
ได้พัฒนาเทคนิคการสกัดอาร์เอ็นเอจากกล้วยไม้ได้ง่ายและมีประสิทธิภาพ โดยใช้โซเดียมเพ
อรอร์ไอเดต (NaIO_4) ในการกำจัดสารโพลีแซคคาไรด์ อาร์เอ็นเอที่แยกได้มีคุณภาพดีพอที่จะนำไป
โคลนยีนได้ ดังนั้นการโคลนยีนเลคตินแบบครบสมบูรณ์จากกล้วยไม้สิงโตรวงข้าวจึงประสบ
ความสำเร็จ ยีนที่โคลนได้มีขนาดความยาว 806 คู่เบส กำหนดลำดับกรดอะมิโนของสายโพลีเปป
ไทด์ที่มี 1 open reading frame (ORF) ขนาด 176 เรสซิดิวส์ นอกจากนี้ยังได้โคลนยีนเลคตินบางส่วน
จากปลาย 5' ในกล้วยไม้สิงโตรวงทอง และปลาย 3' จากกล้วยไม้สิงโตสมอหิน ขนาด 245 และ 363
คู่เบส ตามลำดับ เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนเลคตินที่ได้จากกล้วยไม้สิงโตรวงข้าว
กล้วยไม้สิงโตรวงทอง และกล้วยไม้สิงโตสมอหิน มีความใกล้เคียงกับโปรตีนเลคตินของกล้วยไม้
ลูกผสมชิมบิเดียม ร้อยละ 62, 73 และ 74 ตามลำดับ จากการทำนายโครงสร้างตติยภูมิของโปรตีนเล
คตินในกล้วยไม้สิงโตรวงข้าวประกอบด้วย 3 domain ซึ่งมีโครงสร้างของโปรตีนเป็นแผ่นซ้อนกัน
แบบ β -sheets ในแต่ละ domain เป็นบริเวณ mannose-binding site และจากการศึกษาการแสดงออก
ของยีนเลคตินในกล้วยไม้สิงโตรวงข้าว พบมากที่สุดในส่วนใบ เมื่อเปรียบเทียบกับอาร์เอ็นเอที่แยก
จากลำลูกกล้วย และราก ด้วยวิธี Real-Time Quantitative PCR

Sirikan Kobkeattawin 2011: Molecular Cloning and Expression of *Lectin* Genes from *Bulbophyllum* Orchids. Master of Science (Genetic Engineering), Major Field: Genetic Engineering, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Associate Professor Pattana Srifah Huehne, Ph.D. 79 pages.

High concentration of polysaccharide in orchid was the main problem of nucleic acid extraction from orchid. In this study, a simple and efficiency protocol for high quality RNA extraction from orchid by adding sodium periodate (NaIO_4) to eliminate polysaccharides was developed. Therefore, the full-length of *lectin* gene cloning from *Bulbophyllum morphologorum* Kraenzl. orchid was achieved. The obtained *lectin* gene isolated from *B. morphologorum* Kraenzl. was 806 base pair (bp) in length which encoded for 176 residues polypeptide of one open reading frame (ORF). In addition, the partial *lectin* genes of *B. orientale* Seidenf. and *B. blepharisters* Rchb.f. orchids were 245 bp at 5'-end and 363 bp at 3'-end were also cloned, respectively. However, the derived amino acids from *B. morphologorum* Kraenzl., *B. orientale* Seidenf. and *B. blepharisters* Rchb.f orchids showed 62%, 73% and 74% identity with *Cymbidium* hybrid, respectively. Furthermore, analysis of tertiary protein structure prediction demonstrated *B. morphologorum* lectin consisted of three β -sheets domains containing mannose-binding site. The expression of *lectin* gene was the most abundant in leaf when compared with psuedobulb and root of *B. morphologorum* Kraenzl. orchid determined by Real-Time Quantitative PCR.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์พัฒนา ศรีฟ้า สุนเนอร์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้ช่วยในการวางแผนการวิจัย ให้คำปรึกษาแนะนำและชี้แนะทางการแก้ปัญหา ตลอดจนตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ และโครงการสหวิทยาการ สาขาวิชาพันธุวิศวกรรม และนักวิจัยของสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้จนสำเร็จ

ขอขอบคุณสำนักงานโครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต (สกว.) ที่ให้ทุนการศึกษานับสนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบคุณเพื่อน พี่ น้อง ในภาควิชาพันธุศาสตร์และสาขาวิชาพันธุวิศวกรรม ที่คอยให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้มาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงสำหรับคุณพ่อ คุณแม่ และน้องสาว ทุกคนในครอบครัวที่ให้ความรัก ความเข้าใจและกำลังใจ ให้การสนับสนุนในการศึกษาตลอดมา

ศิริกาญจน์ กอบเกียรติฉวิล

พฤษภาคม 2554

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	14
ผลและวิจารณ์	25
สรุป	59
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	60
ภาคผนวก	69
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	79

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ไพรเมอร์ตำแหน่งกลางยีน, ปลาย 5' และไพรเมอร์เพื่อใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน <i>lectin</i>	26
2 คุณภาพอาร์เอ็นเอ, ตัวอย่างพืชในแต่ละส่วนและวิธีสกัดอาร์เอ็นเอ	29
3 ตำแหน่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สำคัญบนยีน <i>lectin</i> ของกล้วยไม้สังโตสมอหิน สิงโตรวงทอง และสิงโตรวงข้าว	43
4 ผลการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของกรดอะมิโนองค์ประกอบของยีน <i>lectin</i> ของกล้วยไม้สังโตสมอหิน (<i>Bulbophyllum blepharistors</i> Rchb.f.) กับพืชชนิดอื่น	45
5 ผลการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของกรดอะมิโนองค์ประกอบของยีน <i>lectin</i> ของกล้วยไม้สังโตรวงทอง (<i>Bulbophyllum orientale</i> Seidenf.) กับพืชชนิดอื่น	46
6 ผลการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของกรดอะมิโนองค์ประกอบของยีน <i>lectin</i> ของกล้วยไม้สังโตรวงข้าว (<i>Bulbophyllum morphologorum</i> Kraenzl.) กับพืชชนิดอื่น	48
7 เปรียบเทียบความเหมือนและแตกต่างของลำดับอะมิโนในกล้วยไม้ทั้ง 3 ชนิด	56

ตารางผนวกที่

1 ค่า expression ratio ที่ได้จากการทำ qPCR โดยคำนวณค่าตามวิธีการของ Livak and Schmittgen (2001)	77
2 ค่า expression ratio ที่ได้จากการทำ qPCR	78

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของการสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธี LiCl ที่เติม Sodium periodate และวิธี Hot phenol ในส่วนล้าลูกกล้วย	29
2 การสังเคราะห์ส่วนของยีน <i>lectin</i> ปลาย 3' ของกล้วยไม้สังโตสมอหินด้วยวิธีพีซีอาร์	31
3 การสังเคราะห์ส่วนของยีน <i>lectin</i> ปลาย 3' ของกล้วยไม้สังโตรวงข้าว ด้วยวิธีพีซีอาร์	31
4 การสังเคราะห์ส่วนของยีน <i>lectin</i> ปลาย 5' ของกล้วยไม้สังโตรวงทอง ด้วยวิธีพีซีอาร์	33
5 การสังเคราะห์ส่วนของยีน <i>lectin</i> ปลาย 5' ของกล้วยไม้สังโตรวงข้าว ด้วยวิธีพีซีอาร์	33
6 การสังเคราะห์ส่วนของยีน <i>lectin</i> เต็มยีน ของกล้วยไม้สังโตรวงข้าว ด้วยวิธีพีซีอาร์	34
7 การตรวจสอบพลาสมิดที่ได้รับขึ้นดีเอ็นเอปลาย 3' ยีน <i>lectin</i> ของสังโตสมอหิน	36
8 การตรวจสอบพลาสมิดที่ได้รับขึ้นดีเอ็นเอปลาย 5' ยีน <i>lectin</i> ของสังโตรวงทอง	37
9 การตรวจสอบพลาสมิดที่ได้รับขึ้นดีเอ็นเอปลาย 3' และปลาย 5' ยีน <i>lectin</i> ของสังโตรวงข้าว	38
10 การตรวจสอบพลาสมิดที่ได้รับขึ้นดีเอ็นเอยีน <i>lectin</i> เต็มยีนของกล้วยไม้สังโตรวงข้าว	39
11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>lectin</i> ที่ได้จากกล้วยไม้สังโตสมอหิน	40
12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>lectin</i> ที่ได้จากกล้วยไม้สังโตรวงทอง	41
13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>lectin</i> ที่ได้จากกล้วยไม้สังโตรวงข้าว	42
14 แผนภาพตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะของยีน <i>lectin</i> จากกล้วยไม้สังโตสมอหิน กล้วยไม้สังโตรวงทอง และกล้วยไม้สังโตรวงข้าว	44
15 Phylogenetic tree แสดงระดับความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนองค์ประกอบระหว่างโปรตีน Lectin ในกล้วยไม้สังโตรวงข้าวกับพืชชนิดอื่น	49
16 การวิเคราะห์ตำแหน่ง mannose binding lectin domain ในกล้วยไม้สังโตรวงข้าว	50
17 แสดงโครงสร้างตติยภูมิของโปรตีน lectin จากกล้วยไม้สังโตรวงข้าว ซึ่งประกอบไปด้วย 3 domain	52
18 แสดงโครงสร้างแบบ β -sheet ในแต่ละ domain	53
19 โครงสร้างตติยภูมิของโปรตีน mannose-binding lectin จากกล้วยไม้ <i>Gastrodia elata</i> เปรียบเทียบโครงสร้างของโปรตีน lectin จากกล้วยไม้สังโตรวงข้าว	53

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
20 การเปรียบเทียบโปรตีน lectin จากกล้วยไม้สิงโตรวงข้าว กับรายงานโครงสร้าง ตติยภูมิในฐานข้อมูล ด้วยโปรแกรม SWISS-MODEL	54
21 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ Lectin ที่แยกจากกล้วยไม้สกุลสิงโต 3 ชนิด	55
22 ระดับการแสดงออกของยีน <i>lectin</i> ในเนื้อเยื่อ ใบ ลำลูกกล้วย และราก ของกล้วยไม้ สิงโตรวงข้าว ตรวจสอบด้วยวิธี qPCR	57
23 ปริมาณดีเอ็นเอของยีน <i>lectin</i> ที่สังเคราะห์ จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของกล้วยไม้ สิงโตรวงข้าว ด้วยวิธี qPCR ได้แก่ ใบ ลำลูกกล้วย และราก และใช้ <i>5.8S rRNA</i> เป็นมาตรฐาน (control) เปรียบเทียบ	57
ภาพผนวกที่	
1 การแสดงโครงสร้างของเลคตินตามโครงสร้างในธรรมชาติ	70
2 สิงโตสมอหิน (<i>Bulbophyllum blepharistes</i> Rchb.f.)	71
3 สิงโตรวงข้าว (<i>Bulbophyllum morphologorum</i> Kraenzl.)	71
4 สิงโตรวงทอง (<i>Bulbophyllum orientale</i> Seidenf.)	72
5 แผนที่ยีนของพลาสมิด pGEM [®] -T Easy	73
6 multiple alignment ของยีน <i>lectin</i> แสดงส่วนอนุรักษ์ในการออกแบบไพรเมอร์ ปลาย 3'	74
7 multiple alignment ของยีน <i>lectin</i> แสดงส่วนอนุรักษ์ในการออกแบบไพรเมอร์ ปลาย 5' และไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการแสดงออก	75
8 ข้อมูลดิบที่ได้จากการทำ qPCR	76

การโคลนและศึกษาการแสดงออกของยีนเลคตินจากกล้วยไม้สกุลสิงโต

Molecular Cloning and Expression of *Lectin* Genes from *Bulbophyllum* Orchids

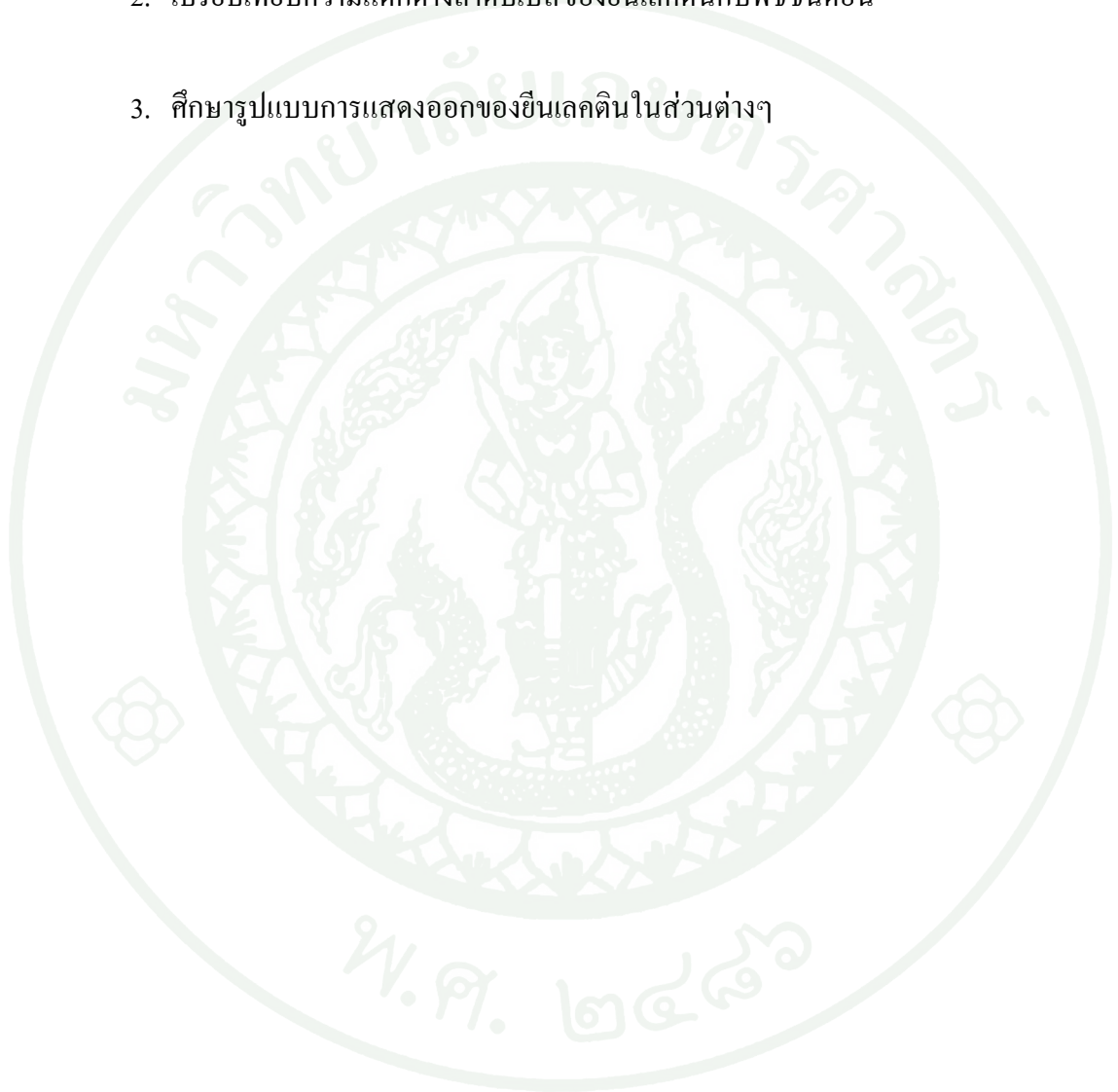
คำนำ

เลคติน (lectin) เป็นกลุ่มโปรตีนหรือไกลโคโปรตีน ที่มีความสามารถในการจับกับคาร์โบไฮเดรตได้อย่างจำเพาะ ไม่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน, เอนไซม์ และฮอร์โมน มีผลทำให้เซลล์เกาะกลุ่ม หรือทำให้โมเลกุลที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบตกตะกอนได้ โดยเลคตินจับกับคาร์โบไฮเดรตบริเวณผิวหน้าของเซลล์ ซึ่งพบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิต เช่น ไวรัส, ผนังเซลล์และไซโตพลาสซึมของแบคทีเรีย, เชื้อรา, ยีสต์, โปรโตซัว, สัตว์และพืช เลคตินที่แยกจากพืชมีบทบาทสำคัญหลายประการ ได้แก่ เป็นโปรตีนสะสมในเมล็ด ช่วยในการขนส่งน้ำตาล การมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ และควบคุมการแบ่งเซลล์ นอกจากนี้เลคตินยังทำหน้าที่เป็นโมเลกุลป้องกันการเข้าทำลายของจุลินทรีย์ และไวรัสได้ เช่น เลคตินที่จับกับน้ำตาลแมนโนสแยกได้จากพืชใบเลี้ยงเดี่ยวพวกลิลลี่และกล้วยไม้ ทำหน้าที่ต้านทาน retrovirus ของมนุษย์ได้ (Wood *et al.*, 1999) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเลคตินในพืชเกี่ยวกับการจับกับคาร์โบไฮเดรตบริเวณผิวเซลล์ที่เจริญผิดปกติและนำเข้าสู่กระบวนการ apoptosis ของเซลล์ ซึ่งอาจจะเป็นวิธีหนึ่งที่จะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งต่อไปในอนาคตได้ (Liu *et al.*, 2010)

เนื่องจากในประเทศไทยยังไม่มีข้อมูลในการศึกษาโปรตีนเลคตินในกล้วยไม้สกุลสิงโต (*Bulbophyllum* sp.) ซึ่งกล้วยไม้สกุลสิงโตบางชนิดจัดเป็นพืชสมุนไพร การทดลองในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นการโคลนยีนเลคตินจากกล้วยไม้สกุลสิงโต ข้อมูลและยีนที่โคลนได้จากการทดลองครั้งนี้จะเป็นข้อมูลทางพันธุกรรมเบื้องต้น เพื่อนำไปสร้างโปรตีนเลคตินและศึกษาคุณสมบัติในการต้านทานโรคของเลคติน และการนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีการสร้างเลคตินที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์ในที่สุด

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาและ โคลนยีนเลคตินจากกล้วยไม้ที่ใช้เป็นสมุนไพรในสกุลสิงโต
2. เปรียบเทียบความแตกต่างลำดับเบสของยีนเลคตินกับพืชชนิดอื่น
3. ศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนเลคตินในส่วนต่างๆ



การตรวจเอกสาร

1. เลคติน

1.1 การศึกษาเลคติน

เลคตินมีการศึกษาครั้งแรกโดย Peter Hermann Stillmark ในปี ค.ศ. 1888 ซึ่งในขณะนั้นกำลังศึกษาระดับปริญญาเอก ที่มหาวิทยาลัย Dorpat ซึ่งเป็นมหาวิทยาลัยเก่าแก่แห่งหนึ่งในเมือง czarist ประเทศ รัสเซีย จากการแยกสารพิษจากเมล็ดคละหุ่ง (*Ricinus communis*) ซึ่งเป็นพืชในตระกูล Euphorbiaceae จึงได้ตั้งชื่อว่า ริซิน (Ricin) (Sharon and Lis, 2004) Stillmark พบว่าเลคตินที่สกัดจากเมล็ดคละหุ่งสามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงของ กระต่าย, ม้า, สุนัข และแมว เกาะกลุ่มกันได้ (Rüdiger and Gabius, 2001) ต่อมา H. Hellin ซึ่งศึกษาอยู่มหาวิทยาลัยแห่งเดียวกันได้ทดลองให้เห็นว่า เลคตินที่ศึกษาจากอะบริน (Abrin) ซึ่งแยกได้จาก Jequirity bean (*Abrus precatorius*) สามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงเกาะกลุ่มได้เช่นเดียวกัน (Sharon and Lis, 2004) นอกจากนี้ยังพบว่าเลคตินสามารถทำให้เซลล์ชนิดอื่นๆ จับกลุ่มกันได้อีกด้วย เช่น เซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast), เซลล์ลิมโฟไซต์ (lymphocyte), เซลล์เนื้องอก (tumor cell) และจุลินทรีย์ต่างๆ เป็นต้น ลักษณะการจับของเลคตินกับน้ำตาลเกิดขึ้นแบบหลวมๆ (glycoconjugate) โมเลกุลของเลคตินสามารถแยกออกจากกันได้ (Sharon, 1977; Barondes, 1988)

เลคติน เป็นคำที่มาจากภาษาละติน คือ “Legere” หมายถึง เลือก (to select) (Peumans and Van Damme, 1995) ซึ่งจากการศึกษาเลคตินครั้งแรกในพืช จึงเรียกโปรตีนดังกล่าวว่า “ไฟโตฮีแมกกลูตินิน” (phytohemagglutinin) หรือ “ฮีแมกกลูตินิน” (hemagglutinin) ต่อมาได้มีการพบเลคตินทั้งใน สัตว์, แบคทีเรีย, ไวรัส และรา จึงเรียกโปรตีนดังกล่าวนี้ว่า “Agglutinin” (Kocourek, 1986) ความหมายของเลคติน จึงถูกขยายเป็นโปรตีนที่ได้จากพืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ อาจอยู่ในรูปของสารละลาย หรือส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane) มีความสามารถจับจำเพาะกับน้ำตาลและทำให้เซลล์เกาะกลุ่มได้ (Sharon and Lis, 1972) ซึ่ง Peumans and Van Damme (1995) ได้นิยามความหมายของเลคติน ไว้ว่าคือ โปรตีนที่จับกับคาร์โบไฮเดรตได้อย่างจำเพาะและสามารถทำให้เซลล์เกาะกลุ่ม (agglutinate) ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน และไม่ได้เป็นเอนไซม์ หรือฮอร์โมน เนื่องจากการศึกษาเลคตินมีมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1888 จนถึงปัจจุบัน ความรู้เกี่ยวกับเลคตินเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นคณะกรรมการตั้งชื่อของ International Union of Biochemistry ยอมรับคำจำกัด

ความของเลคตินซึ่งเสนอโดย Goldstien *et al.* (1980) ว่า เลคติน หมายถึงโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนที่ไม่ได้มาจากระบบภูมิคุ้มกันซึ่งจับกับคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate binding protein) และสามารถทำให้เซลล์เกาะกลุ่มหรือทำให้สารประกอบคาร์โบไฮเดรตตกตะกอนได้

เลคตินที่พบในธรรมชาติประกอบด้วย โปรตีนหนึ่งหน่วย หรือมากกว่าหนึ่งหน่วย Peumans and Van Damme (1995) ได้จัดแบ่งชนิดเลคตินออกเป็น 3 กลุ่ม (ภาพผนวกที่ 1) คือ Merolectins, Hololectin และ Chimerolectins ซึ่ง Merolectins เป็นโปรตีนที่จับกับคาร์โบไฮเดรต 1 ตำแหน่ง ซึ่งไม่สามารถทำให้เกิดการตกตะกอนของเซลล์ได้ เช่น ในพืช hevein และในกล้วยไม้บางชนิด Hololectins เป็นโปรตีนที่จับกับคาร์โบไฮเดรต 2 ตำแหน่งหรือมากกว่า 2 ตำแหน่ง สามารถทำให้เกิดการตกตะกอนของเซลล์ได้ ซึ่งในพืชส่วนใหญ่จะเป็นชนิด Hololectins และชนิด Chimerolectins จะมีส่วน fusion proteins ซึ่งเป็นตำแหน่ง domain ของ carbohydrate-binding domain เลคตินชนิดนี้จะคล้ายกับใน Merolectins และ Hololectins ซึ่งขึ้นอยู่กับการจับกับคาร์โบไฮเดรตที่มากับ เช่น Type 2-RIPs ที่มีบริเวณจับกับคาร์โบไฮเดรต 2 ตำแหน่งในบริเวณ B-chain (เช่น ริซิน) สามารถตกตะกอนเซลล์ได้ ในขณะที่ Chimerolectins ชนิด CLASS I-chitinases เป็นโปรตีนที่จับกับคาร์โบไฮเดรต 1 ตำแหน่งและไม่สามารถตกตะกอนเซลล์ได้เช่นเดียวกับใน Merolectins แต่จากการศึกษาของ สุภารัตน์ (2553) ที่กล่าวอ้างการศึกษาชนิดของเลคตินใน Peumans and Van Damme (1995) และ Van Damme *et al.* (1998) ได้แบ่งชนิดเลคติน ออกเป็น 4 กลุ่ม ที่เพิ่มขึ้นมาในกลุ่มที่ 4 คือ Superlectins เป็น Chimerolectins ชนิดพิเศษที่มีการสร้าง fusion proteins ต่อจากบริเวณจับกับคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate-binding domain) ทำให้โครงสร้างโปรตีนเปลี่ยนและจดจำโครงสร้างที่ไม่เกี่ยวกับน้ำตาล เช่น tulip lectin เป็นเลคตินที่พบในหัวทิวลิป

ซึ่งจากการแบ่งชนิดเลคตินเป็นกลุ่มนี้ Peumans และ Van Damme (1995) ได้ให้นิยาม เลคตินไว้ว่า เป็นโปรตีนที่สามารถจับกับคาร์โบไฮเดรต หนึ่งตำแหน่งหรือมากกว่าหนึ่งตำแหน่งอย่างจำเพาะ

1.2 การศึกษาพืชเลคตินในประเทศไทย

มีการศึกษาคุณสมบัติเลคตินมากมาย เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ จันทนา และคณะ (2546) ได้ศึกษาสมบัติของ cDNA ที่เป็นรหัสของ เลคตินในใบหม่อน โดยแยกเลคตินจากใบหม่อนน้อยให้บริสุทธิ์และนำไปหากรดอะมิโนทางปลายเอ็น ลำดับกรดอะมิโนทางปลายเอ็นมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับเลคตินที่มีความจำเพาะกับน้ำตาลกาแลคโทสจาก *Morus*

nigra และเลคตินจาก *Maclura pomifera* สูงถึง 85 และ 80 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ขนาดชั้นดีเอ็นเอของยีนเลคติน MLL1 จากใบหม่อนน้อยที่ได้มีความยาว 353 คู่เบส มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 93 81 และ 64 เมื่อเปรียบเทียบกับ *Morus nigra* galactose-binding lectin jacalin และ *Morus nigra* mannose-binding lectin ตามลำดับ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเลคตินบางส่วนนี้ยังสามารถใช้ประโยชน์ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ตลอดสายของเลคติน MLL1 ต่อไป เช่นเดียวกับการศึกษาของสุภาภรณ์ (2553) ได้ศึกษาการแสดงออกของเลคตินจากใบหม่อนในเซลล์แบคทีเรียและเซลล์แมลง พบว่าเลคตินที่พบในใบหม่อน (*Morus rotundiloba* Koidz.) สามารถจับกับกรดเซียลิกได้ โดยทั่วไปจะพบกรดเซียลิกเป็นน้ำตาลที่อยู่บนผิวเซลล์ของแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดและเซลล์มะเร็ง งานวิจัยนี้สนใจที่จะผลิตโปรตีน MLL1 ในปริมาณมาก และทำให้เลคตินนี้มีความจำเพาะต่อกรดเซียลิกเพิ่มมากขึ้น จึงโคลนยีนของ MLL1 เพื่อให้โปรตีนสามารถแสดงออกปริมาณมากในเซลล์แบคทีเรียและเซลล์แมลง และได้ศึกษาการจับกันระหว่างเลคตินและกรดเซียลิก (Neu5Gc) ด้วยคอมพิวเตอร์ ซึ่งความรู้ที่ได้นี้สามารถนำไปปรับปรุงเลคตินเพื่อให้ได้โปรตีนที่มีประโยชน์ในทางการแพทย์ต่อไป

นอกจากนี้ได้มีการศึกษาเลคตินโดยการทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติโดยทรงศักดิ์ (2546) ได้ศึกษาเลคตินชนิดไม่ละลายน้ำจากถั่วฝักยาว และเรียกชื่อเลคตินชนิดนี้ว่า *Vigna susquipedalis* agglutinin (VSA) โดยได้ทำการสกัดและทำบริสุทธิ์ VSA ด้วยวิธีสกัดโปรตีนโอลิปีดจากถั่วฝักยาวอบแห้ง เมื่อศึกษาสมบัติของ VSA พบว่าสามารถเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของกระต่ายได้ดีเท่ากับหนู แต่ไม่สามารถเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงของคน (A, B, AB, O) และพบว่าแอกติวิตีของ VSA ไม่สามารถยับยั้งด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวได้ นอกจากนี้ VSA สามารถเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของอนุภาคยางจากต้นยางพารา รวมทั้งจากพืชสร้างน้ำยางชนิดอื่นๆ ได้ เช่นเดียวกับปฐม (2543) ได้ศึกษาการประยุกต์ใช้เลคตินจากเมล็ดจำปาอะ (*Artocarpus integer* seeds) นำไปทำบริสุทธิ์ พบว่าเลคตินบริสุทธิ์มีแอกติวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายสูงและยังสามารถทำให้ตัวอสุจิหนูที่ยังไม่เจริญพันธุ์เกิดการเกาะกลุ่มได้ดีกว่าตัวอสุจิหนูที่เจริญพันธุ์และอุบล (2541) ได้ศึกษาการวิเคราะห์สมบัติทางชีวเคมีของเลคตินจากเมล็ดจำปาอะเช่นเดียวกัน สารสกัดเลคตินที่ได้มีแอกติวิตีของการเกาะกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่ายสูงสุด และจากการนำไปทำบริสุทธิ์สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของคนหมู่ A, B, O และ AB เกาะกลุ่มได้ดีเท่ากัน และสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของหนู แกะ และหมูเกิดการเกาะกลุ่ม แต่ไม่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงของแพะเกาะกลุ่ม นอกจากนี้ยังพบว่าเลคตินบริสุทธิ์สามารถทำปฏิกิริยาคตะกอนกับ IgA ของคน แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับ IgG ของคนและโบรินซีรัมอัลบูมินใน gel double diffusion และยังมีการศึกษาของไพฑูรย์ (2536) ที่ศึกษาการทำบริสุทธิ์และคุณสมบัติของเลคตินจากเมล็ดเหียง ผลการทดลอง

พบว่าสารสกัดเลคตินที่ได้จะมีความว่องไว จำเพาะสูงสุดในการจับกลุ่มเม็ดเลือดแดงกระต่าย สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายจับกลุ่มดีที่สุด (251.10 หน่วย/มก. โปรตีน) รองลงมา ได้แก่ เม็ดเลือดแดงของหนูขาว (3.92 หน่วย/มก. โปรตีน) แต่ไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงของคน แกะ หรือห่าน เกิดการจับกลุ่ม เช่นเดียวกับการศึกษาของสุปริดี (2534) ที่ได้ศึกษาเลคตินจากยางพารา โดยการทำบริสุทธิ์เลคตินจากเปลือกไม้ และน้ำยางพารา พบว่า เลคตินจากยางพาราสามารถเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงของหนู, คน, แพะ, แกะ และกระต่าย ความสามารถในการเหนี่ยวนำการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงต้องอาศัย Ca^{2+} , Ba^{2+} หรือ Sr^{2+} และพบว่าเลคตินเสถียรต่ออุณหภูมิสูง น้ำตาลที่จำเพาะต่อเลคตินสูง คือ กรดไซอาลิก และอนุพันธ์ของกรดไซอาลิก คือสามารถยับยั้งการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงได้ 100% ที่ความเข้มข้น 6.25 และ 0.625 mM ตามลำดับ ซึ่งเพ็ญสุข (2538) ศึกษาแตกต่างออกมาโดยศึกษาการกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์ พบว่าเลคตินบริสุทธิ์จากสะตอสามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์จากคนปกติและผู้ป่วยโรคมะเร็งหลอดอาหารได้ ผลการศึกษายังพบว่าสารเลคตินบริสุทธิ์ที่สกัดได้มีความสามารถในการทำให้เม็ดเลือดแดงของหนู (Wistar rat) เกาะกลุ่มได้ 320 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เลคตินบริสุทธิ์จากสะตอที่ความเข้มข้น 10-80 $\mu\text{g/ml}$ สามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์จากคนปกติและผู้ป่วยมะเร็งหลอดอาหาร โดยตรวจวัดอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ (Proliferation index = PI) มีค่า $\text{PI} > 3$ ได้ = 57.1 (8/14 ราย) และ 62.5 (5/8 ราย) เพอร์เซ็นต์มีค่า PI สูงสุดตั้งแต่ 3.0-8.8 เฉลี่ย = 4.6 และ 3.3 -1.52 เฉลี่ย = 33.5 ตามลำดับ

1.3 เลคตินในกล้วยไม้

Van Damme *et al.* (1987) พบว่าเลคตินที่แยกจากใบกล้วยไม้ดิน Twayblade (*Listera ovata*) ประกอบด้วยโปรตีน 2 โมเลกุลที่มีขนาดโมเลกุลละ 12,500 ดาลตัน ซึ่งจับกับน้ำตาลแมนโนส ต่อมา Saito *et al.* (1993) ศึกษาวิเคราะห์คุณสมบัติของเลคตินที่แยกจากใบกล้วยไม้ดิน Twayblade (*Listera ovata*) พบว่าเลคตินที่แยกเป็นประเภท α -D-mannose-lectin ที่มีความจำเพาะกับ α 1-3 mannosidic linkages โดยทำปฏิกิริยากับ α 1-3-mannan (D. P. 15) และ α 1-3-mannoheptasaccharide จากการศึกษาโครงสร้าง พบว่าโครงสร้างของ α -mannosyl ประกอบด้วย polysaccharides และ glycoconjugates และเลคตินของกล้วยไม้ไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงตกตะกอน พืชใบเลี้ยงเดี่ยวหลายชนิด ได้แก่ สโนดรอป (snowdrop : *Galanthus nivalis*), เด็ปโฟดิล (daffodil : *Narcissus pseudonarcissus*), วานลีส (amaryllis : *Hippeastrum hybr.*), กระเทียม (garlic : *Allium sativum*) มีเลคตินที่เป็น α -D-mannosyl-specific lectins เช่นเดียวกับ

การศึกษาของ Van Damme *et al.* (1994) ที่โคลนและศึกษา ยีน mannose-binding lectin ที่แยกจากกล้วยไม้ดิน Twayblade (*Listera ovata*), *Epipactis helleborine* (broad-leaved helleborine) และกล้วยไม้ผสมชนิด *Cymbidium hybrid* โดยพบว่า ยีน lectin มีขนาด 800 คู่เบส ที่กำหนดการสร้างโปรตีนขนาด 12-13 kDa 2 โมเลกุล ที่มีความจำเพาะกับ mannose อย่างไรก็ตาม lectin ของกล้วยไม้ทั้งสามชนิดแตกต่างกันถึงร้อยละ 50 ทั้งในลำดับกรดนิวคลีอิกและลำดับกรดอะมิโน ซึ่งควบคุมด้วยยีนที่เป็น family gene จึงมีผลให้องค์ประกอบของยีนในกล้วยไม้ต่างชนิดมีความแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามใน *L. ovata* มีการแสดงออกของยีนมากที่สุดในรังไข่ ร่องลงมา คือดอกและใบ ส่วนกล้วยไม้ลูกผสม *Cymbidium hybrid* มีการแสดงออกของยีนมากที่สุดในรังไข่ ใบ และลำต้นใต้ดิน (rhizome) ซึ่งต่างจากกล้วยไม้ *E. helleborine* ที่มีการแสดงออกของยีนในลำต้นมากที่สุด นอกจากนี้ Chen *et al.* (2005) โคลนยีน lectin จากกล้วยไม้หวาย (*Dendrobium officinale*) ได้ครบสมบูรณ์ขนาด 777 คู่เบส ที่กำหนดการสร้างสายโพลีเปปไทด์ขนาด 170 เรสซิดิวส์ เรียกยีนที่โคลนได้ว่า *Dendrobium officinale agglutinin2* (DOA2) เมื่อเปรียบองค์ประกอบของโปรตีนเทียบกับโปรตีนที่เกี่ยวข้องมีองค์ประกอบของ mannose-binding lectin superfamily 3 ตำแหน่ง เมื่อตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนจะพบได้ทุกส่วนของพืช ได้แก่ รากและลำต้นมากกว่าใบ โปรตีน lectin ที่สังเคราะห์ในระบบแบคทีเรีย พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Gibberella zeae*

1.4 บทบาท lectin ในพืช

ในเซลล์จะพบ lectin ในส่วนของโปรตีน บอดี (protein bodies) ซึ่งกลุ่มของโปรตีนทั้งหมดจะถูกสังเคราะห์ในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (endoplasmic reticulum : ER) และส่งต่อมายังกอลจิ แอปพาราตัส (Golgi apparatus) ก่อนที่จะถูกแบ่งย่อยในส่วนแวคิวโอล (vacuole) ซึ่งโปรตีนบอดีจะทำหน้าที่ในการเก็บรักษาโปรตีน และจะเกี่ยวข้องกับส่วนไลโซโซม (lysosomes) นอกจากนี้จะพบโปรตีน lectin ในส่วนของโปรตีน บอดีแล้วยังพบ lectin ในส่วนไซโตพลาสซึม (cytoplasm) และพื้นที่ว่างระหว่างเซลล์ (intercellular space) อีกด้วย ซึ่ง lectin จะทำหน้าที่ภายในเซลล์โดยทำปฏิกิริยากับเอนไซม์และ ทำปฏิกิริยากับโปรตีน บอดี นอกจากนี้ยังพบว่า การทำหน้าที่ของ lectin ในแต่ละสิ่งมีชีวิตแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น คาร์โบไฮเดรตเฉพาะที่เข้ามาจับ, ตำแหน่งที่จับ และเวลาจับที่แตกต่างกัน ซึ่ง lectin สามารถจับกับคาร์โบไฮเดรตบริเวณผิวเซลล์ของสิ่งมีชีวิตอื่นได้ เช่น ในไวรัส แบคทีเรีย และรา เป็นต้น จึงทำให้ lectin มีหน้าที่ภายนอกเซลล์ ต่างๆ ดังนี้คือ (Rüdiger and Gabius, 2001)

1.4.1 ด้านทานไวรัส (Antiviral activity) จากการศึกษาของ Peng *et al.* (2009) พบว่าเลคตินที่แยกได้จาก *Clematis montana* ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรจีนมีคุณสมบัติในการต้านทานไวรัสหลายชนิดเมื่อทดลองกับ cell culture เช่นเดียวกับการทดลองของ Ooi *et al.* (2004) ที่ศึกษา mannose-binding lectin ที่แยกจากส่วนหัวใต้ดินของ *Sarsaparilla Smilax glabra* Roxb. ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรจีน สามารถยับยั้งไวรัสได้ 2 ชนิด คือ herpes simplex virus type 1 (HSV-1) และ respiratory syncytial virus (RSV)

1.4.2 ด้านทานแบคทีเรีย (Antibacterial activity) Charungchitrak *et al.* (2011) ศึกษาคุณสมบัติในการต้านทานแบคทีเรียของเลคตินที่แยกได้จากเมล็ด *Archidendron jiringa* Nielsen พบว่าต้านทานต่อ *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* และ *Candida albicans* ที่ความเข้มข้น 0.227, 0.0567 และ 0.0567 mg/ml ตามลำดับและยังต้านทานต่อเห็ดราชนิด *Exserohilum turcicum*, *Fusarium oxysporum* และ *Colletotrichum cassiicola* ได้อีกด้วย

1.4.3 ด้านทานเห็ดรา (Antifungal activity) ในการศึกษา mannose-binding proteins จากกล้วยไม้ *Gastrodia elata* ของ Wang *et al.* (2001) พบว่ามีคุณสมบัติในการต้านทานเห็ดราชนิด *Armillaria mellea* ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Chen *et al.* (2005) ที่โคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของ mannose-binding lectin จากกล้วยไม้หวาย *Dendrobium officinale* ซึ่งพบว่าโปรตีนเลคตินที่สังเคราะห์ในระบบแบคทีเรียมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *Gibberella zeae*

1.4.4 สามารถชักนำเข้าสู่กระบวนการ apoptosis ของเซลล์ เลคตินสามารถจับกับผิวเซลล์ที่มีลักษณะผิดปกติและชักนำเข้าสู่โปรแกรมตายของเซลล์ได้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Peng *et al.* (2009) ที่ศึกษาเลคตินที่แยกได้จาก *Clematis montana* ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรจีนพบว่าเลคตินจากพืชสมุนไพรที่ได้ ไปยับยั้งที่ caspase ซึ่งพบว่า caspase เป็นตัวที่มีบทบาทสำคัญในกลไก apoptotic

1.4.5 สามารถทำให้เซลล์เกาะกลุ่มตกตะกอน เลคตินที่แยกได้จากส่วนหัวใต้ดินของ *Sarsaparilla Smilax glabra* Roxb. ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรจีน สามารถตกตะกอนเซลล์เม็ดเลือดแดงของกระต่ายได้ (Ooi *et al.*, 2004)

2. พืชที่ใช้ในศึกษา

กล้วยไม้เป็นพืชส่งออกที่สำคัญพืชหนึ่งของประเทศไทย กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กำหนดให้กล้วยไม้เป็นหนึ่งในสี่ของพืช Product Champion เนื่องจากเป็นพืชที่ทำรายได้สูงและปริมาณเพิ่มขึ้นทุกปี อุตสาหกรรมกล้วยไม้ของประเทศไทยได้เจริญก้าวหน้าอย่างมาก และทำรายได้เข้าสู่ประเทศเป็นอันดับหนึ่งในจำนวนไม้ดอกไม้ประดับทั้งหมดที่มีการส่งออก ซึ่งการส่งออกดอกกล้วยไม้และต้นกล้วยไม้มีปริมาณและมูลค่าเพิ่มขึ้นโดยตลอด ในระยะแรกเป็นการส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศ โดยส่งขายมากที่สุดที่ประเทศเนเธอร์แลนด์และเยอรมัน ปัจจุบันได้ขยายตลาดออกไปมากกว่า 50 ประเทศ ในปี พ.ศ. 2542 มีการส่งออกดอกกล้วยไม้จากไทยปริมาณ 11,178 ตัน (ประมาณ 317 ล้านช่อ) มูลค่า 1,061.1 ล้านบาท ลูกค้ารายใหญ่ที่สุดคือ ญี่ปุ่น อันดับรองลงมาคืออิตาลี อเมริกา ไต้หวัน และในปี พ.ศ. 2543 ไทยส่งออกปริมาณ 13,124.7 ตัน มูลค่า 1,231.2 ล้านบาท (จิตรพรธณ, 2546) ในปี พ.ศ. 2550-2553 มีมูลค่าการส่งออก 3,670 ล้านบาท, 3,449 ล้านบาท, 378 ล้านบาท, 496 ล้านบาท ตามลำดับ (กรมส่งเสริมการส่งออก, 2553) จากสถิติการส่งออกกล้วยไม้ไทยไปยังตลาดโลกมีมูลค่าลดลงทุกปีเนื่องจากสภาพเศรษฐกิจและสภาพแวดล้อมในธรรมชาติ คณะรัฐมนตรีจึงได้มีมติผลักดันการส่งออกกล้วยไม้ไทยในปีพ.ศ. 2554-2559 ปีละ 10,000 ล้านบาท เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต และเพิ่มขีดความสามารถด้านการตลาด (บ้านเมือง, 2553)

กล้วยไม้ถือเป็นไม้ดอกไม้ประดับที่สวยงาม มีหลากหลายสายพันธุ์ ปลูกเลี้ยงง่าย และยังเป็นไม้ส่งออกสำคัญที่สร้างรายได้ให้กับประเทศปีละมหาศาลอีกด้วย อีกทั้งกล้วยไม้ส่วนใหญ่ไม่เพียงมีประโยชน์ในแง่ของความสวยงามเท่านั้น แต่ก็ยังมีประโยชน์ในด้านอื่นด้วย เช่น ชาวจีนนิยมนำกล้วยไม้สกุลเอื้องลำต่อ (*Pholidota*) มาทำอาหารและรักษาอาการหอบหืด ส่วนชาวอินเดียนำสกุลกะเรกะร่อน (*Cymbidium*) มาปรุงอาหาร ขณะที่ชาวอีสานของไทยนิยมรับประทานเอื้องแปรงสีฟัน (*Dendrobium secundum* Lindl.) และเอื้องครึ่งแสด (*Dendrobium unicum* Scienf.) เป็นผักเคียงน้ำพริก ไม่เพียงเป็นอาหารเท่านั้นกล้วยไม้บางสกุลยังมีสรรพคุณเป็นยาอีกด้วย (ธัญญลักษณ์, 2553)

2.1 กล้วยไม้ที่มีสรรพคุณทางด้านสมุนไพร

ในอดีตชนเผ่าชาวกูนาหัวของเหลียงพิศมร (*Spathoglottis affinis* de Vries) ไปดื่มน้ำดื่มรักษาอาการปวดตามข้อ กล้วยไม้สกุล *Calanthe* สามารถนำลำลูกกล้วยมาต้มน้ำดื่มรักษา

อาการใช้เรื้อรัง ฝักของสิงโตหนวดขาว (*Bulbophyllum vaginatum* (Lindl.) Rchb.f.) นำไปย่ำคั้น นำใช้รักษาอาการปวดหู (สำนักงานอุทยานการเรียนรู้ สังกัดสำนักงานบริหารและพัฒนาองค์ความรู้ (องค์การมหาชน), 2006) ในทางอีสาน มีตำรายาพื้นบ้าน ใช้ทั้งต้นของ เอื้องตะขาบใหญ่ (*Dendrobium leonis* Lindl.) ตำพอกศีรษะแก้ปวดหัว (อรรถคิด-ชูเกียรติ, 2553) นอกจากนี้ ยังมีกล้วยไม้ อีกหลายชนิดที่มีสรรพคุณทางด้านสมุนไพร ได้แก่ เอื้องพวงอุ้งน (*Robiquetia succisa* (Lindl.) Seidenf. & Garay.) รักษาโรคโลหิตจาง โลหิตเป็นพิษ โดยสามารถใช้ต้น ต้มในน้ำเดือดแล้วดื่ม ขณะยังอุ่นแทนน้ำ จะช่วยบำรุงโลหิตให้ดีขึ้น และช่วยให้โลหิตกลับสู่ภาวะปกติได้ (กล้วยไม้ไทย ชุมพร, 2549) เอื้องสายสีดอก (*Dendrobium cumulatum* Lindl.) มีสรรพคุณทางสมุนไพรคือแก้ อาการหืดหอบ โดยใช้ลำต้นครั้งละ 1 ต้น ตัดเป็นท่อน สั้นๆ ต้มกับน้ำจนเดือด ดื่มแทนน้ำชา (ไทยรัฐ, 2552ข) กะระกะร่อน (*Cymbidium aloifolium* (L.) Sw. EO) ช่วยแก้การแก้หูน้ำหนวก ได้ โดยใช้ใบสดไฟให้นุ่ม แล้วบีบเอาน้ำหยอดหู จะช่วยบรรเทาอาการหูน้ำหนวก (สำนักบริหาร จัดการพื้นที่ป่าอนุรักษ์ 6 นครสวรรค์, 2550) จุหลัน (*Cymbidium ensifolium* (L.) SW.) เป็นกล้วยไม้ ดินปลูกง่าย หาง่าย มีดอกสวยงาม มีกลิ่นหอมเป็นเอกลักษณ์เฉพาะตัว และยังมีสรรพคุณเป็น สมุนไพร ใช้รักษาโรค “ไตพิการ” โดยใช้ราก จำนวนมากหรือน้อยตามต้องการ ล้างให้สะอาดแล้ว นำไปต้มน้ำจนเดือด ดื่มขณะอุ่นๆ วันละ 3 เวลา ก่อนหรือหลังอาหารก็ได้ ต้มดื่มไปเรื่อย ๆ จะ ช่วยทำให้อาการดีขึ้น (ไทยรัฐ, 2552ก) และมีกล้วยไม้ที่ใหญ่ที่สุดในโลกจากป่าไทย ซึ่งก็คือ ว่าน เพชรหึง (*Grammatophyllum specinocum* BL.) ก็ยังมีสรรพคุณทางด้านสมุนไพร โดยใช้ส่วนใบ 3 ใบ ปั่นเป็นยาต้ม ใช้เป็นยาระบายอุจจาระและรักษาระดูพิการของผู้หญิงได้ดี ส่วนเหง้าให้ใช้เหง้า แห้งประมาณ 5-10 กรัม นำไปต้มน้ำหรืออบเป็นผงกิน หรือใช้สด โดยการคั้นเอาน้ำสำหรับดื่ม ส่วนที่ใช้เป็นยาภายนอก นำไปบดให้เป็นผง หรือใช้ผสมทา ส่วนของเหง้าจะมีรสขม และเย็นจัด แต่มีฤทธิ์ใช้เป็นยารักษาอาการต่าง ๆ ดังนี้คือ

2.1.1 รักษาโรคทางทวาร โดยใช้เหง้าสดประมาณ 10-15 กรัม นำไปต้มน้ำหลังอาหาร วันละ 2 เวลา

2.1.2 รักษาอาการท้องมาน โดยใช้เหง้าสด นำมาคั้นเอาน้ำ ดื่มบ่อย ๆ

2.1.3 รักษาอาการเจ็บคอ โดยใช้เหง้าสดประมาณ 15 กรัม ผสมกับน้ำส้มสายชู ตำ และคั้นเอาน้ำ อมหรือกลืนเฉพาะน้ำ จิบครั้งละน้อยๆ

2.1.4 รักษาฝีที่เต้านม บวมหรือมีหนองในระยะเริ่มแรก ให้ใช้เหง้าแห้ง 1 เหง้า รากดอกไม้จีนแห้งประมาณ 10 กรัม นำมารวมกันบดให้เป็นผง แล้วผสมน้ำผึ้งกิน

2.1.5 รักษาฝีประจำรอย ให้ใช้เหง้าแห้งเหลียงเคี้ยว แห่โกวเช่าแห้ง อย่างละเท่า ๆ กัน นำไปบดเป็นผง ผสมทำเป็นยาเม็ด กินครั้งละ 6 กรัม หลังอาหาร

2.1.6 รักษาอาการผื่นคันมีน้ำเหลืองที่ขา ใช้เหง้าแห้ง ใส่น้ำแล้วต้มให้เดือดผสมเกลือแกงเล็กน้อย แล้วทาตามบริเวณที่เป็น ทาวันละ 2 เวลา เช้า-เย็น (ฉัณณฤกษ์, 2553)

นอกจากนี้เมื่อ 2,000 กว่าปีมาแล้วในประเทศจีนได้ใช้กล้วยไม้ *Gastrodia elata* ในการรักษาบรรเทาอาการปวดและยังใช้เป็นยาระงับประสาท ใช้รักษาโรคที่เกิดอาการชักกระตุก เช่น โรคลมบ้าหมู โดยใช้ส่วนเหง้า ลำต้น และหัวใต้ดิน (Hsieh *et al.*, 2007)

เนื่องจากในประเทศไทยยังไม่มีข้อมูลและการศึกษาขึ้น *lectin* ในกล้วยไม้ และจากข้อมูลพบว่ากล้วยไม้สกุลต่าง ๆ มีสรรพคุณในการรักษาอาการปวดหู อีกทั้งจากการทดลองในห้องปฏิบัติการสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ในเบื้องต้นพบว่า กล้วยไม้สกุลต่าง ๆ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ งานวิจัยในครั้งนี้จึงเลือกกล้วยไม้สกุลต่าง ๆ เพื่อที่จะโคลนและศึกษาการแสดงออกของยีน

2.2 กล้วยไม้สกุลสิงโต

สกุลบูลโบฟิลลัม หรือ บัลโบฟิลลัม (*Bulbophyllum* = bul - bo - fil - lum) สกุลนี้มีจำนวนชนิดมาก รองจากสกุลเด็นโตรบิอัม ส่วนใหญ่เป็นกล้วยไม้อิงอาศัย ในประเทศไทยพบมากกว่า 130 ชนิด (รวมสกุล *Cirrhopetalum* และอื่นๆ) มักจะเรียกว่า สิงโตกลอกตา หรือใช้ชื่อสิงโตนำหน้าคำอื่นๆ ตามลักษณะดอกหรือช่อดอก เช่น สิงโตรวงข้าว ซึ่งเป็นชื่อเรียกกล้วยไม้หลายชนิดที่ช่อดอกมีลักษณะคล้ายรวงข้าว ต้นของกล้วยไม้สกุลนี้โดยทั่วไปมีขนาดกลางไปจนถึงขนาดค่อนข้างเล็ก หัวเจริญอยู่บนเหง้า แต่ละหัวเปลี่ยนแปลงมาจากการขยายขนาดของปล้องเพียง 1 ปล้อง มีรูปลักษณะและขนาดแตกต่างกันหลากหลายมาก หัวใหม่เกิดจากเหง้า ปลายสุดมีใบ 1-2 ใบ ใบมักจะเป็นรูปแถบ มีทั้งพวกที่ทิ้งใบและพวกที่ใบอายุยืนนาน ช่อดอกเกิดจากเหง้าใกล้หรือไกลจากโคนหัว ลักษณะเฉพาะของดอกกล้วยไม้สกุลนี้ คือ กลีบปากติดกับส่วนปลายคางของเส้าเกสรที่

ยึดตัวออกไปในลักษณะคล้ายบานพับ ทำให้กลีบปากสั้นไหวได้ง่าย กลุ่มอับเรณูมี 2 คู่ แต่ละคู่มีเยื่อบางๆยึดติดกัน เส้าเกสรค่อนข้างสั้น (อบนันท, 2543)

2.2.1 สิงโตสมอหิน (*Bulbophyllum blepharistes* Rchb.f.) (ภาพภาคผนวกที่ 2)
(สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ, 2553)

ชื่อท้องถิ่น : สิงโตสมอหิน, สิงโตกลอกตา

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : ลำลูกกล้วยรูปกลมหรือรูปไข่ ปลายลำมีใบ 2 ใบอยู่ตรงกันข้าม แผ่นใบรูปขอบขนานแกมรูปไข่กลับ ช่อดอกเดี่ยวแบบช่อซี่ร่ม เกิดจากที่ปลายเหง้า ดอก 10-14 ดอก กลีบประดับรูปคล้ายสามเหลี่ยม ดอกสีเหลืองอ่อน กลีบปากสีชมพู กลีบเลี้ยงกลีบบนรูปใบหอกแกมรูปไข่ กลีบคู่ข้างเชื่อมติดกันรูปไข่กว้าง ปลายแยกเป็นแฉกสั้น กลีบดอกรูปเกือบกลม ขอบมีขนสีแดงกระจายเกือบไป กลีบปากเป็นจะงอยรูปไข่

ฤดูกาลออกดอก : ดอกบานเดือนตุลาคมถึงเดือนธันวาคม

การกระจายพันธุ์ : พบตามป่าผลัดใบหรือป่าดิบแล้ง ทางภาคเหนือ ภาคใต้ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

2.2.2 สิงโตรวงข้าว (*Bulbophyllum morphologorum* Kraenzl.) (ภาพภาคผนวกที่ 3)
(สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ, 2553)

ชื่อท้องถิ่น : สิงโตรวงข้าว

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : ลำลูกกล้วยรูปกรวยกลับหรือรูปไข่ กว้างประมาณ 3.5 เซนติเมตร ยาวประมาณ 5.5 เซนติเมตร มีกาบสีน้ำตาลและขนสั้นๆ ที่โคนลำ ปลายลำเป็นใบเดี่ยว ใบรูปรีแคบ ช่อดอก 1 ช่อเกิดจากโคนลำลูกกล้วย ดอกเกิดเป็นกระจุกแน่นที่ปลายช่อ มีดอก 30-50 ดอก ดอกสีเหลืองอมน้ำตาลมีประสีน้ำตาลแดงกระจายเกือบไป กลีบเลี้ยงกลุ่มโค้ง กลีบบนรูปขอบขนาน กลีบคู่ข้างรูปแถบเบี้ยว ขอบกลีบด้านในเชื่อมติดกัน กลีบดอกรูปสามเหลี่ยม กลีบปากเป็นจะงอยสีส้มแดง

ฤดูกาลออกดอก : ดอกบานเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนมีนาคม

การกระจายพันธุ์ : พบตามป่าสนและป่าดิบเขา ทางภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

2.2.3 สิงโตรวงทอง (*Bulbophyllum orientale* Seidenf.) (ภาพภาคผนวกที่ 4) (ฉบับที่, 2543)

ชื่อท้องถิ่น : สิงโตรวงทอง

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ : คล้ายสิงโตรวงขาว แต่ขนาดเล็กกว่า หัวรูปไข่ ขนาด 2.5-3 x 2 เซนติเมตร เรียงตัวห่างกัน 2-6 เซนติเมตร ผิวเขียวคล้ำหรือเขียวอมม่วง ใบรูปรี มี 1 ใบ ขนาด 8-12 x 2.5 เซนติเมตร แผ่นใบหนาและแข็ง ช่อดอกโค้งเล็กน้อย ยาว 10 - 12 เซนติเมตร ดอกในช่อแน่น บานพร้อมกัน มีกลิ่นหอมฉุนเล็กน้อย

ฤดูดอก : เดือนตุลาคมถึงเดือนพฤศจิกายน

การกระจายพันธุ์ : ป่าเบญจพรรณในภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ชนิดพืชและแหล่งที่มา

แหล่งที่มาจากสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ กล้วยไม้สังโตสมอหินและสังโตรวงทอง ใช้ส่วนของใบจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ กล้วยไม้สังโตรวงข้าวใช้ส่วนใบ ลำลูกกล้วย และรากจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ชนิดกล้วยไม้

1. กล้วยไม้สังโตสมอหิน (*Bulbophyllum blepharistes* Rechb.f.)
2. กล้วยไม้สังโตรวงทอง (*Bulbophyllum orientale* Seidenf.)
3. กล้วยไม้สังโตรวงข้าว (*Bulbophyllum morphologorum* Kraenzl.)

ชนิดไพรเมอร์

1. ไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีน *lectin* บริเวณปลาย 5' ได้แก่
LectBul-F(12) 5'-ATGAGTAGCTTCTCCATTAT-3'
LectBul-R(62) 5'-GACATAGCAGCTGAGCCTT-3'
2. ไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีน *lectin* บริเวณปลาย 3' ได้แก่
LectLO165S 5'-GACTGCAACCTCGTCCTCTA-3'
3'RACE(T)233 5'-GACTCGAGTCGACATCGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
(T₁₂)Bam H1 5'-TTGGATCCTTTTTTTTTTTTTT-3'
3. ไพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *lectin* ได้แก่
LectLO165S 5'-GACTGCAACCTCGTCCTCTA-3'
LectBul-R(62) 5'-GACATAGCAGCTGAGCCTT-3'

5.8rRNA(F) 5'-ATGACTCTCGACAATGGATT-3'
 5.8rRNA(R) 5'-GCTTGAAGCCCAGGCAGACG-3'

4. ไพรมเมอร์สำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้แก่

T7 5'-ACGTTGTAAAACGACGG-3'
 SP6 5'-GATAAGAATTCACACA-3'

วิธีการ

1. การออกแบบไพรมเมอร์

หาข้อมูลยีนเลคตินของพืชที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov) นำข้อมูลลำดับของกรดอะมิโนที่ได้มาวิเคราะห์ multiple alignment โดยโปรแกรม ClustalW ที่เว็บไซต์ <http://www.ebi.ac.uk> เลือกส่วนอนุรักษ์เทียบกับลำดับกรดอะมิโนและนิวคลีโอไทด์ จากเว็บไซต์ของ European Bioinformatics Institute (EMBL) (www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html) เลือกส่วนอนุรักษ์เพื่อออกแบบไพรมเมอร์ ทำการตรวจสอบระดับอนุกรมที่เหมาะสมในการแยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวของไพรมเมอร์ ปริมาณของ G/C content ที่เหมาะสม การเกิดโครงสร้างทุติยภูมิ และการจับกันเองของไพรมเมอร์โดยใช้โปรแกรม netprimer ที่เว็บไซต์ <http://www.netprimer.com> แล้วทำการเลือกคู่ไพรมเมอร์ที่เหมาะสม ให้มีความยาวประมาณ 15-25 นิวคลีโอไทด์

2. วิธีการแยกอาร์เอ็นเอจากกล้วยไม้สกุลสิงโต

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

บดตัวอย่างกล้วยไม้ 450 มิลลิกรัม 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 เติมนิโกลลลอโรฟอร์มไอโซเฮกซิล อัตราส่วน 25: 24: 1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 g ที่อุณหภูมิ 4

องศาเซลเซียส นาน 5 นาที คือดสารละลายด้านบนใส่หลอดใหม่ 300 ไมโครลิตร ตกตะกอน อาร์เอ็นเอด้วย 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 ล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทสารละลายทิ้งแล้ว brief spin ให้สารละลายที่เหลือตกลงมาที่ก้นหลอดแล้วใช้ปิเปตดูดออกให้หมด 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

2.2 วิธีการแยกอาร์เอ็นเอรวมด้วยวิธี LiCl ที่เติม Sodium periodate (ดัดแปลงวิธี Lievens *et al.*, 1997)

เตรียมบัฟเฟอร์โดยละลาย Sodium periodate (NaIO_4) 213.89 มิลลิกรัมในน้ำ DNase-RNase free 1000 มิลลิตร นำมาผสมกับบัฟเฟอร์ LiCl (0.2M Tris-HCl, pH7.5, 0.1M LiCl, 5mM EDTA, 1% SDS) ในอัตราส่วน 10 ไมโครลิตรในบัฟเฟอร์ 500 ไมโครลิตร

บดตัวอย่างกล้วยไม้ 450 มิลลิกรัม ในไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดเป็นผง ตักใส่หลอด ไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิตร ประมาณ 1 ใน 3 ของหลอด (ประมาณ 100 มิลลิกรัมของตัวอย่าง) สกัดอาร์เอ็นเอด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ที่เติม 20 mM NaIO_4 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เติมฟีนอลคลอโรฟอร์มไอโซเอมิล อัตราส่วน 25: 24: 1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที คือดสารละลายด้านบนใส่หลอดใหม่ 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 ล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทสารละลายทิ้งแล้ว brief spin ให้สารละลายที่เหลือตกลงมาที่ก้นหลอดแล้วใช้ปิเปตดูดออกให้หมด 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

2.3 วิธีการแยกอาร์เอ็นเอรวมด้วยวิธี Hot Phenol (เป็นวิธีดัดแปลงจากห้องปฏิบัติการของศาสตราจารย์ Shou-Wei Ding; Center for Plant Cell Biology, Department of Plant Pathology and Microbiology, University of California, Riverside, CA 92521.)

บดตัวอย่างกล้วยไม้ 2000 มิลลิกรัมในไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดเป็นผง ตักใส่หลอดขนาด 50 มิลลิลิตร ประมาณ 1 ใน 3 ของหลอด (ประมาณ 500 - 1000 มิลลิกรัมของตัวอย่าง) สกัดอาร์เอ็นเอด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (100mM Tris-HCl, pH8.0, 0.1M LiCl, 10mM EDTA, 1% SDS) ที่เติมสารละลายฟีนอล และสารละลายบัฟเฟอร์ 5 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสก่อนใช้ 30 นาที ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารเป็นเวลา 20 วินาที เติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร 20 วินาที หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 g ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที คัดสารละลายด้านบนใส่หลอดใหม่ 3 มิลลิลิตร ตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 4M LiCl ปริมาตร 3 มิลลิลิตร กลับหลอดไปมาเบา ๆ 30 วินาที บ่มที่ -20 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ล้างตะกอนด้วย DEPC-treated TE buffer 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 3M NaOAc, pH 5.2 ปริมาตร 0.1 เท่า และเอทานอลบริสุทธิ์ปริมาตร 2 เท่า ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ล้างตะกอนด้วย 70 เปอร์เซ็นต์เอทานอล หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทสารละลายทิ้งแล้ว brief spin ให้สารละลายที่เหลือตกลงมาที่ก้นหลอดแล้วใช้ปิเปตดูดออกให้หมด ทำให้ตะกอนอาร์เอ็นเอแห้งด้วยเครื่องดูดอากาศ นาน 5-10 นาที แล้วละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยน้ำ 31 ไมโครลิตร นำ 1 ไมโครลิตร ไปตรวจสอบผลที่ได้ด้วยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และนำสารละลายอาร์เอ็นเอที่เหลือเติม เพื่อเก็บอาร์เอ็นเอ โดยเก็บที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส

3. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากอาร์เอ็นเอด้วยวิธี Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

3.1 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายแรกจากอาร์เอ็นเอของกล้วยไม้

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายแรก (first strand synthesis) โดยใช้ Ready-To-Go You-Prime first strand beads (GE Healthcare Biosciences, สหรัฐอเมริกา) อาร์เอ็นเอที่ได้จากตัวอย่างใบของกล้วยไม้ ในข้อ 2 นำไปอุ่นที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปแช่น้ำแข็ง 2 นาที ดูดอาร์เอ็นเอ 29 ไมโครลิตร ผสมร่วมกับ ไพรมเมอร์ RACE233 (5'- GAC TCG AGT CGA CAT CG(T)₁₇-3') จำนวน 2 ไมโครลิตร และไพรมเมอร์ BamHI(T₁₂) (5'-TTG GAT CCT TTT TTT TTT TT-3') จำนวน 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ใส่ลงในหลอดสำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายแรก บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

3.2 การสังเคราะห์ชิ้นด้านปลาย 5' และ 3' ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

เพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Mastercycler[®] gradient, Eppendorf, สหรัฐอเมริกา) โดยใช้เอนไซม์ i-Taq DNA Polymerase (Intron Biotechnology, เกาหลี) นำดีเอ็นเอสายแรก (cDNA) ที่ได้มาใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ชิ้นเล็กชิ้นน้อย ด้วยไพรมเมอร์ sense และ antisense ที่ได้ออกแบบไว้ โดยผสม PCR reaction mix (น้ำ 16.9 ไมโครลิตร, 10X PCR บัฟเฟอร์ 2.5 ไมโครลิตร, 10mM dNTP 2.5 ไมโครลิตร, i-Taq DNA Polymerase 0.3 ไมโครลิตร, ไพรมเมอร์ sense และ antisense อย่างละ 0.4 ไมโครลิตร และ cDNA 2 ไมโครลิตร) ในหลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร ทำพีซีอาร์ครั้งแรกโดยใช้โปรแกรม step up (โปรแกรมที่ 1 ที่ความร้อน 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ โปรแกรมที่ 2 ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 48 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จำนวน 10 รอบ โปรแกรมที่ 3 ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 53 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จำนวน 20 รอบ และโปรแกรมที่ 4 ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที) นำมาตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส บนเจลอะกาโรส 0.8% เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ 1 Kb DNA ladder marker (Fermentas, แคนาดา) เมื่อได้แถบดีเอ็นเอของชิ้นตามที่ได้ออกแบบไว้ นำมาเพิ่มปริมาณด้วยวิธี พีซีอาร์ด้วยโปรแกรมที่ 1 ที่ความร้อน 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ โปรแกรมที่ 2 ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 50 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จำนวน 30 รอบ และโปรแกรมที่ 3 ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำผล

พีซีอาร์ที่ได้มาตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส บนเจลอะกาโรส 0.8% เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ 1 Kb DNA ladder marker

4. การโคลนยีนที่สังเคราะห์ได้ในเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*

4.1 การเชื่อมต่อชิ้นยีนกับพลาสมิด

นำดีเอ็นเอรวมที่สังเคราะห์ได้จากกระบวนการพีซีอาร์มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อแยกขนาดดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้บนเจลอะกาโรส 1% สกัดแถบดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ชุด HiYield Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit (RBC Bioscience, สหรัฐอเมริกา) ตัดเจลใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมนัฟเฟอร์ DF 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที กลับหลอดทุกๆ 2-3 นาที จนเจลละลายผสมให้เข้ากัน คูลสารละลายใส่คอล์มน์ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 g นาน 30 วินาที เทสารละลายทิ้งล้างด้วย wash buffer 500 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 10,000 g นาน 30 วินาที เทบัฟเฟอร์ทิ้งแล้วหมุนเหวี่ยงอีกครั้งนาน 2 นาที เปลี่ยนคอล์มน์ใส่หลอดใหม่ ละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ elution buffer 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุด นาน 1 นาที นำสารละลายดีเอ็นเอไปตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส บนเจลอะกาโรส 0.8% นำดีเอ็นเอที่ได้หลังจากการสกัดเจลกามาเชื่อมต่อกับโคลนนิ่งเวกเตอร์ พลาสมิด pGEM[®]-T Easy vector (บริษัท Promega, สหรัฐอเมริกา) ที่ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ T7 และ SP6 ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน *LacZ* ยีนต้านทานต่อยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน และมีตำแหน่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ multiple cloning site (ภาพภาคผนวกที่ 5) เชื่อมต่อดีเอ็นเอกับพลาสมิดด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase (2.5 ยูนิต ต่อ 100 ไมโครลิตร) ผสมกับ 2X reaction buffer (Promega, สหรัฐอเมริกา) นำไปบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส

4.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียเจ้าบ้าน (competent cell) สำหรับเพิ่มปริมาณพลาสมิด

การเตรียมแบคทีเรียเจ้าบ้าน โดยดัดแปลงจากวิธีมาตรฐานของ Sambrook *et al.* (1989) เกลี่ยเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ XL1-Blue ให้ได้โคโลนีเดี่ยว บนอาหาร Luria-Bertani agar (LA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง ปลูกเชื้อแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวลงในอาหาร Luria-Bertani broth (LB) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง นำเชื้อ 500 ไมโครลิตร ลงในอาหาร LB 50 มิลลิลิตร

(อัตรา 1:100) และนำเชื้อไปเลี้ยงต่อนาน 3-4 ชั่วโมง จนเซลล์มีความเข้มข้น 1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หรือ มีค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.4-0.6 ย้ายเชื้อใส่หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร แช่น้ำแข็งที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ตกตะกอนเซลล์โดยการหมุนเหวี่ยง 4,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เทอาหารทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยสารละลาย TSS (LB, 10% (w/v) PEG, 5% (v/v) DMSO, 20 mM MgCl₂) ที่เย็นจัด 10 มิลลิลิตร แช่น้ำแข็ง นาน 5 นาที ตกตะกอนเซลล์แบบที่เรียกอีกชื่อหนึ่งโดยนำมาหมุนเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เทอาหารทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วย TSS 1 มิลลิลิตร แช่น้ำแข็งนาน 5 นาที แบ่งเซลล์ที่ได้ 100 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร สำหรับนำไปใช้ต่อไป

4.3 การนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านด้วยวิธี heat shock

นำเซลล์ 100 ไมโครลิตร ที่ผ่านการเตรียม competent cell ผสมกับ ดีเอ็นเอสายผสมที่ได้ในข้อ 4.1 จำนวน 5 ไมโครลิตร แช่น้ำแข็งนาน 30 นาที ทำ heat shock โดยบ่มในน้ำที่มีอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ย้ายเซลล์แช่น้ำแข็งทันที นาน 2 นาที นำเซลล์ที่ผ่านการทำ heat shock เลี้ยงในอาหาร Luria-Bertani Broth (LB broth) จำนวน 800 ไมโครลิตร เช้าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 60-90 นาที นำมาตกตะกอนโดยหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 g นาน 1 นาที เทอาหารส่วนบนทิ้ง ดูดอาหารเลี้ยงแบคทีเรียที่เหลืออยู่รวมทั้งเซลล์แบคทีเรียมาเกลี่ยบนผิวหน้าอาหาร Luria-Bertani Agar (LA) ที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 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

4.4 การตรวจสอบโคโลนีที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิดสายผสม

การตรวจสอบโคโลนีที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิดสายผสมโดยวิธีพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ SP6 และ T7 นำโคโลนีสีขาวที่คาดว่าจะได้รับพลาสมิดสายผสมเพิ่มปริมาณบนอาหาร LA ที่ผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ขูดเซลล์แบคทีเรียต้นแบบละลายในน้ำ 7 ไมโครลิตร ผสมกับ 10X PCR บัฟเฟอร์ 1 ไมโครลิตร, 10mM dNTP 1 ไมโครลิตร, i-Taq DNA Polymerase 0.1 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ SP6 (5'-GAT AAG AAT TTC ACA CA-3') และไพรเมอร์ T7 (5'-ACG TTG TAA AAC GAC GG-3') อย่างละ 0.2 ไมโครลิตร และ DMSO 0.5 ไมโครลิตร ทำพีซีอาร์ โดยใช้โปรแกรม 94 องศา

เซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ ต่อด้วย 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 30 รอบ และที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที นำผลพีซีอาร์มา ตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส บนเจลอะกาโรส 0.8% เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอกับ 1 Kb DNA ladder marker

4.5 สกัดพลาสมิดจากแบคทีเรียด้วยวิธีอัลคาไลน์ไลซิส (alkaline lysis)

เลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร LB 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 เติมน้ำตาลละลาย 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 ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาแช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 11,000 g นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดสารละลายใสหลอดใหม่ เติม DNase-free RNase (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 5 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที สกัดน้ำใสด้วยฟีนอล : คลอโรฟอร์ม (1:1) 400 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 11,000 g เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดน้ำใสส่วนบนมาเติม คลอโรฟอร์ม 400 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 11,000 g เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดน้ำใสส่วนบนมาเติม เอทานอล 95% 1 มิลลิลิตร ที่เย็นจัด ผสมให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างตะกอนด้วย เอทานอล 70% 1 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยง 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดเอทานอลทิ้งไป ทำให้ตะกอนแห้ง ละลายตะกอนในน้ำหรือ TE 50 ไมโครลิตร

4.6 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำแบคทีเรียที่มีพลาสมิดสายผสมที่คาดว่าจะได้รับชิ้นดีเอ็นเอมาแยกสกัดให้ได้ พลาสมิดบริสุทธิ์โดยวิธีอัลคาไลน์ไลซิสด้วย AxyPrep Plasmid Miniprep kit (Axygen Bioscience, สหรัฐอเมริกา) เลี้ยงเชื้อจากโคลนที่ถูกต้องในอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าข้ามคืน นำมาหมุนเหวี่ยงเพื่อ ตกตะกอนเซลล์แบคทีเรีย ละลายเซลล์ 250 ไมโครลิตร ของ บัฟเฟอร์ S1 แล้วเติม 250 ไมโครลิตร ของ S2 ผสมให้เข้ากัน เติม 350 ไมโครลิตร ของ บัฟเฟอร์ S3 ผสมให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยง 11,000 g นาน 10 นาที นำน้ำใสบรรจุลงในคอลัมน์ นำไปหมุนเหวี่ยง 1 นาที ล้างตะกอนด้วย

บัฟเฟอร์ W2 หมุนเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อให้คอลลัมน์แห้ง จากนั้นจึงเติม TE ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นำไปหมุนเหวี่ยงเก็บน้ำใสส่วนที่มีพลาสมิดละลายอยู่ นำมาตรวจสอบความเข้มข้นโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส เพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์และ BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied BioSystems, สหรัฐอเมริกา) ด้วยไพรเมอร์ SP6 (5'-GAT AAG AAT TTC ACA CA-3') และไพรเมอร์ T7 (5'-ACG TTG TAA AAC GAC GG-3') โดยโปรแกรมที่ 1 ที่ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ โปรแกรมที่ 2 ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส 2 วินาที จำนวน 30 รอบ และโปรแกรมที่ 3 ที่ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที จำนวน 1 รอบ นำไปศึกษาการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้เครื่อง ABI 373A Automatic DNA sequencer

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่ได้บางส่วนมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ เปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์กับยีนที่มีรายงานโดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ใช้เป็นข้อมูลในการคัดเลือกโคลนเพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ให้ครบทั้งโคลนต่อไป

5. การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนของยีนที่ได้

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเลคตินที่ได้มาแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนด้วย 6 frame translation (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/seq-util.html>) เปรียบเทียบลำดับเบสกับข้อมูลใน Genbank โดยใช้โปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) หาตำแหน่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของยีนที่ได้ด้วยโปรแกรม webcutter 2.0 (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2>) เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของยีนเลคติน ทั้งในระดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน เปรียบเทียบความเหมือนของโปรตีนเลคตินในกล้วยไม้สกุลสิงโตที่ได้กับโปรตีนที่มีรายงานในฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม ClustalW(2) และสร้างความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนของยีนที่โคลนได้โดยการสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA4.

5.1 การทำนายโครงสร้างตติยภูมิ

นำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนมาทำนายโครงสร้างตติยภูมิด้วยโปรแกรม SWISS-MODEL (http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=modelling_simple1) เมื่อได้

โครงสร้างที่มีนามสกุล .pdb นำมาวิเคราะห์ ตกลงโครงสร้างด้วยโปรแกรม spdbv (DeepView / Swiss-PdbViewer 3.7 (SP5)) ในโปรแกรม spdbv สามารถระบุตำแหน่งชนิดของกรดอะมิโน และปรับเปลี่ยนลักษณะโครงสร้างตามต้องการได้

6. การศึกษาการแสดงออกของยีน *lectin* ในส่วนต่างๆ ของกล้วยไม้ ด้วยวิธี Relative Quantification PCR (qPCR)

6.1 การเตรียมตัวอย่างอาร์เอ็นเอ

ทำการสกัดอาร์เอ็นเอรวมของกล้วยไม้จากใบ, ลำลูกกล้วย และราก โดยใช้วิธี LiCl (Lievens *et al.*, 1997) ในข้อ 2.

ทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายแรก ด้วยไพรเมอร์ LectBul-R(62) (5'GACATAGCAG CTGAGCCTT3') และไพรเมอร์ 5.8rRNA(R) (5'GCTTGAAGCCCAGGCAGACG-3') โดยใช้ชุด Ready-To-Go You-Prime first strand kit (GE Healthcare Biosciences, สหรัฐอเมริกา) โดยละลาย อาร์เอ็นเอปริมาณ 5 ไมโครกรัม ที่ได้จากการแยกจากดอกกล้วยไม้ ด้วยน้ำกลั่นหรือ TE buffer (DEPC) 30 ไมโครลิตร นำไปอุ่นที่ 65 องศาเซลเซียส 15 นาที จากนั้นนำไปแช่น้ำแข็งทันที เป็น เวลา 2 นาที เติมอาร์เอ็นเอ 30 ไมโครลิตร และไพรเมอร์ LectBul-R(62) สำหรับยีน *lectin* และไพรเมอร์ 5.8rRNA(R) อย่างละ 1 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด first strand kit ผสมให้เข้ากัน หมุนเหวี่ยง อย่างรวดเร็วเพื่อให้สารอยู่ที่ก้นหลอด แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 60 นาที

6.2 การศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน *lectin* โดยใช้เทคนิค qPCR

นำดีเอ็นเอสายแรกที่ได้จากการสังเคราะห์จากข้อ 6.1 มาใช้เป็น templates และใช้ specific primers ของยีน *lectin* คือ LectBul-R(62) และ LectLO165S แล้วทำการเปรียบเทียบกับยีน 5.8 rRNA ซึ่งทำให้เป็น normalizer มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ specific primers คือ 5.8 rRNA (F) และ 5.8 rRNA (R) โดยมีส่วนผสมของสารละลายที่ใช้ทำปฏิกิริยา ดังนี้ First strand DNA (conc.) 0.7 ไมโครลิตร forward primer (conc.) 0.25 ไมโครลิตร reverse primer (conc.) 0.25 ไมโครลิตร buffer Quantimix Easy SYG Kit (Biotools B&M Labs.S.A., สเปน) 5 ไมโครลิตร และ distilled water 3.8 ไมโครลิตร ให้ได้ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร

ใส่สารละลายที่เตรียมไว้ลงในหลอด qPCR ขนาด 200 ไมโครลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยาใน Mastercycler Realplex (Eppendorf, สหรัฐอเมริกา) ที่กำหนดให้มีสภาวะการทำงานโดยโปรแกรมที่ 1 ที่ 94 องศาเซลเซียส 4 นาที จำนวน 1 รอบ โปรแกรมที่ 2 ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 51 องศาเซลเซียส 10 วินาที 72 องศาเซลเซียส 20 วินาที จำนวน 40 รอบ และโปรแกรมที่ 3 ที่ 94 องศาเซลเซียส 15 วินาที 60 องศาเซลเซียส 15 วินาที จำนวน 1 รอบ บันทึกผลค่า threshold cycle หรือ C_T ที่ได้เพื่อใช้ในการวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของยีน *lectin* ในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของกล้วยไม้

6.3 การวิเคราะห์ผลที่ได้จาก qPCR

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

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

นำค่า ΔC_T ของรากกล้วยไม้สิงโตรวงข้าว ($(\Delta C_T)_{\text{root}}$) มาใช้เป็น calibrator สำหรับคำนวณค่า relative expression ratio เพื่อปรับค่า ΔC_T ของแต่ละส่วนของกล้วยไม้ ($(\Delta C_T)_{\text{tissue}}$) ให้ได้ค่าที่มีฐานเดียวกัน โดยค่าที่ได้จากการคำนวณดังกล่าว เรียกว่า $\Delta\Delta C_T$

$$(\Delta C_T)_{\text{tissue}} = (C_T)_{\text{tissue}} - (C_T)_{5.8 \text{ rRNA}}$$

$$\Delta\Delta C_T = (\Delta C_T)_{\text{tissue}} - (\Delta C_T)_{\text{root}}$$

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

ผลและวิจารณ์

1. การออกแบบไพรเมอร์

1.1 การออกแบบไพรเมอร์ในตำแหน่งกลางยีน *lectin* โดยการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน *lectin* ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม ClustalW(2) ในพืช 6 ชนิด คือ กล้วยไม้ *Listera ovata* (accession# gi|431097), กล้วยไม้ *Epipactis helleborine* (accession# gi|436825), กล้วยไม้ *Cymbidium hybrid* (accession# gi|436827), ทิวลิป (*Tulipa* sp.) (accession# gi|1141765), *Crinum asiaticum* var. *sinicum* (accession# gi|28932747), *Typhonium divaricatum* (accession# gi|33943121) ผลจากการทำ multiple alignment พบว่ามีส่วนอนุรักษ์ของลำดับอะมิโน ที่จะนำมาออกแบบไพรเมอร์ (ภาพผนวกที่ 6) มีลำดับกรดอะมิโน DCNLVLY ที่ตำแหน่ง 57-63 บริเวณกลางยีน เหมาะสำหรับใช้เป็นตำแหน่งไพรเมอร์บริเวณกลางยีน

1.2 การออกแบบไพรเมอร์ในตำแหน่งปลาย 5' ของยีน *lectin* โดยการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน *lectin* ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม ClustalW(2) ในกล้วยไม้ 3 ชนิด คือ กล้วยไม้ *Listera ovata* (accession# gi|431097), กล้วยไม้ *Epipactis helleborine* (accession# gi|436825), กล้วยไม้ *Cymbidium hybrid* (accession# gi|436827) ผลจากการทำ multiple alignment พบว่ามีส่วนอนุรักษ์ของลำดับอะมิโน ที่จะนำมาออกแบบไพรเมอร์สำหรับปลาย 5' ของยีน (ภาพผนวกที่ 7) มีลำดับกรดอะมิโน TKNQFSI ที่ตำแหน่ง 3-9 บริเวณหัวยีน และ ลำดับกรดอะมิโน QGSGCYVT ที่ตำแหน่ง 77-84 บริเวณกลางยีน เหมาะสำหรับใช้เป็นตำแหน่งไพรเมอร์บริเวณปลาย 5' ของยีน

1.3 การออกแบบไพรเมอร์ในตำแหน่งกลางยีนเพื่อการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *lectin* (ภาพผนวกที่ 7) โดยการนำไพรเมอร์ในข้อ 1.1 คือส่วนอนุรักษ์ของลำดับอะมิโน DCNLVLY ที่ตำแหน่ง 57-63 และออกแบบไพรเมอร์ด้านปลาย 3' ในตำแหน่งอนุรักษ์ที่มีลำดับอะมิโน QGSGCYVT ที่ตำแหน่ง 77-84 สำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 84 คู่เบส เหมาะสำหรับใช้เป็นตัวตรวจสอบการแสดงออกของยีน *lectin*

หลังจากได้ตำแหน่งอนุรักษ์ของลำดับอะมิโนที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ยีนแล้วแปลลำดับกรดอะมิโนให้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ ให้นำไปวิเคราะห์การเลือกใช้นิวคลีโอไทด์ (codon usage) ให้มีความใกล้เคียงกับตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษา แล้วนำไปตรวจสอบค่า T_m

ของไพรเมอร์ควรอยู่ระหว่าง 55-65 องศาเซลเซียส คู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาไม่ควรต่างกันเกิน 5 องศาเซลเซียส ปริมาณของ G/C content ไพรเมอร์ที่มี G/C สูง จะเกาะกับดีเอ็นเอต้นแบบได้อย่างสมบูรณ์ และมีเสถียรภาพ ส่วนไพรเมอร์ที่มี A/T สูง จะให้ค่า T_m ของไพรเมอร์ต่ำ ต้องทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่ำเกินไป ทำให้ตำแหน่งเกาะจะไม่ถูกต้อง G/C content ควรอยู่ที่ประมาณ 40-60 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้นำไปตรวจสอบการเกิดโครงสร้างทุติยภูมิ และการจับกันเองของคู่ไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Net primer ไพรเมอร์ที่ดีต้องไม่เกิดโครงสร้างทุติยภูมิ หรือ ค่า ΔG ไม่ควรต่ำกว่า -3 kcal/mol ถ้าต่ำกว่านี้จะมีโอกาสเกิด hairpin loop ได้ การจับกันเองของไพรเมอร์ไม่ควรเกิน 4 พันธะ และแต่ละช่วงไม่ควรติดกัน ตลอดสายไม่ควรเกิน 8 พันธะ (กิตติยา, 2553)

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ตำแหน่งกลางยีน, ปลาย 5' และไพรเมอร์เพื่อใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *lectin*

	ไพรเมอร์	% G/C content	ΔG	T_m (°C)
LectLO165S	5'-GACTGCAACCTCGTCCTCTA-3'	55.0	-31.92	54.93
LectBul-F(12)	5'-ATGAGTAGCTTCTCCATTAT-3'	35.0	-28.31	45.66
LectBul-R(62)	5'-GACATAGCAGCTGAGCCTT-3'	55.0	-33.78	57.05

2. การแยกอาร์เอ็นเอจากกล้วยไม้สกุลสิงโต

ในการสกัดอาร์เอ็นเอจากกล้วยไม้สกุลสิงโตจากใบ ลำลูกกล้วย และราก น้ำหนัก 0.45 กรัม ด้วย Lithium chloride (Lievens *et al.*, 1997) สารละลายที่ได้มีลักษณะเหนียวหนืด สีเขียวเข้ม ตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 3M LiCl นาน 24 ชั่วโมง ไม่สามารถแยกอาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพได้ จึงได้คิดแปลงวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอของ Lievens *et al.* โดยการเติม 20 mM Sodium periodate (NaIO_4) ลงไปในบัฟเฟอร์ เพื่อช่วยในการกำจัดโพลีแซคคาไรด์ (Janjic *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2001; Nikolic *et al.*, 2010) ซึ่งจากผลการทดลองก็สามารถทำให้ตัวอย่างที่ผสมบัฟเฟอร์มีความหนืดน้อยลง อาร์เอ็นเอที่แยกจากใบของกล้วยไม้สิงโตรวมข้าว มีปริมาณ 47.3 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ลำลูกกล้วย ปริมาณ 38.8 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และราก 45.0 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จำนวนทั้งหมด 30 ไมโครลิตร โดยประมาณ อาร์เอ็นเอที่แยกได้จากใบกล้วยไม้สิงโตสมอหิน ปริมาณ 41.0 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และอาร์เอ็นเอที่แยกได้จากใบกล้วยไม้สิงโตรวมทอง ปริมาณ 49.1 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร อย่างไรก็ตาม อาร์เอ็นเอที่แยกได้ทั้งหมดมีคุณภาพค่อนข้างดี (ภาพที่ 1) มีค่า A_{260}/A_{280} อยู่ในช่วง 1.75-2.1 (ตารางที่ 2)

ด้วยวิธีการตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย Lithium chloride สามารถแยกอาร์เอ็นเอออกจากกล้วยไม้ได้ทุกส่วน ยกเว้นอาร์เอ็นเอจากลำลูกกล้วยมีปริมาณน้อย แก้ไขด้วยการแยกอาร์เอ็นเอออกจากกล้วยไม้ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพราะทุกส่วนของกล้วยไม้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีความอ่อนกว่ากล้วยไม้ในธรรมชาติ และแยกอาร์เอ็นเอด้วยวิธี Hot phenol โดยการผสมฟีนอลในบัฟเฟอร์ในอัตราส่วนเท่ากันและบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสก่อนเติมบัฟเฟอร์ลงในตัวอย่าง ได้ปริมาณอาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพดี 38.8 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ผลการทดลองครั้งนี้พบว่า การแยกอาร์เอ็นเอจากเนื้อเยื่อใบอ่อนได้ปริมาณอาร์เอ็นเอมากกว่าอาร์เอ็นเอใบแก่ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Sharma *et al.* (2003) ที่แยกอาร์เอ็นเอจากพืชที่มีโพลีแซคคาไรด์สูงโดยใช้ส่วนต่างๆ ของพืชที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ นอกจากนี้การวัดค่า Optical Density (O.D.) ก็สามารถบอกคุณภาพของอาร์เอ็นเอที่แยกได้ว่ามีคุณภาพดีหรือไม่ โดยอาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพดี สะอาด ไม่เจือปนโปรตีน และโพลีแซคคาไรด์ต้องมีค่า A_{260} / A_{240} มากกว่า 1 และมีค่า A_{260} / A_{280} อยู่ในช่วง 1.8 - 2.0 (Sharma *et al.*, 2003) ซึ่งจากผลการทดลอง อาร์เอ็นเอจากส่วนใบของกล้วยไม้สิงโต มีคุณภาพค่อนข้างดี มีค่า O.D. อยู่ในช่วง 1.75 - 2.1 แสดงให้เห็นว่า อาร์เอ็นเอยังมีการปนเปื้อนของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตปริมาณเล็กน้อย ในรากมีค่า O.D. อยู่ในช่วง 1.75 - 1.92 อาร์เอ็นเอมีคุณภาพดี มีการปนเปื้อนของโปรตีนเล็กน้อย ส่วนในลำลูกกล้วย มีค่า O.D. อยู่ในช่วง 1.64 - 2.50 อาร์เอ็นเอมีคุณภาพไม่ดี เพราะมีการปนเปื้อนของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตปริมาณมาก อาจเป็นเพราะว่า ในส่วนลำลูกกล้วย (pseudobulb) ของกล้วยไม้นั้นเป็นที่เก็บสะสมสารอาหารและน้ำ (วีระชัย และ สุรางค์รัชต์, 2552) จึงทำให้มีสารอาหารจำพวกโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตอยู่ปริมาณมาก การสกัดอาร์เอ็นเอจากส่วนนี้จึงทำได้ยาก

การแยกอาร์เอ็นเอด้วย LiCl ตามวิธีของ Lievens *et al.* (1997) บัฟเฟอร์จะประกอบด้วย Tris-HCl ทำหน้าที่รักษาสภาพของอาร์เอ็นเอ SDS ทำหน้าที่ทำลายโครงสร้างของเซลล์ EDTA ทำหน้าที่เป็น chelator ช่วยยับยั้งการทำงานของไรโบนิวคลีเอส ร่วมกับฟีนอลที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ 3M LiCl ช่วยในการตกตะกอนอาร์เอ็นเอ ในขณะที่การตกตะกอนด้วย NaOAc และเอธานอลจะสามารถช่วยลดปริมาณของสารโพลีแซคคาไรด์ได้ดี การเติมเอนไซม์ *DnaseI* จะสามารถกำจัดจีโนมิกดีเอ็นเอที่ปนเปื้อน (Manickavelu *et al.*, 2007) ซึ่งการแยกอาร์เอ็นเอจากกล้วยไม้ โดยใช้ LiCl เป็นวิธีที่เหมาะสม เพราะในกล้วยไม้ส่วนใหญ่มีโพลีแซคคาไรด์ปริมาณมาก เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Wanqian *et al.* (2005) ที่แยกอาร์เอ็นเอจากแคลลัสของกล้วยไม้สกุล *Dendrobium candidum* ซึ่งมีปริมาณโพลีแซคคาไรด์สูง ด้วย LiCl อาร์เอ็นเอที่ได้มีคุณภาพดี เพราะมีค่า $A_{260} / A_{230} = 3.98$ และค่า $A_{260} / A_{280} = 1.953$ และถ้าต้องการอาร์เอ็นเอในปริมาณมากต้องเพิ่ม

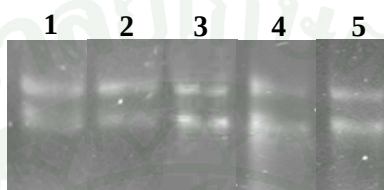
ปริมาณพืชและเพิ่มปริมาณบัฟเฟอร์ การเพิ่มปริมาณบัฟเฟอร์จะช่วยลดความหนืดของสารละลาย ในขั้นตอนการแยกอาร์เอ็นเอได้ (Salzman *et al.*, 1999)

สิ่งสำคัญในการแยกอาร์เอ็นเอ คือการป้องกันการสลายตัวของอาร์เอ็นเอในระหว่าง ขั้นตอนการสกัด วิธีการแยกอาร์เอ็นเอในพืชเริ่มต้นจากการทำลายโครงสร้างของผนังเซลล์พืช ซึ่ง ประกอบด้วย cellulose, pectin และ xyloglucans การใช้วิธีกลเป็นวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการ ทำลายโครงสร้างผนังเซลล์ โดยการบดชิ้นส่วนพืชที่ต้องการแยกอาร์เอ็นเอด้วยไนโตรเจนเหลว ใน สภาพอุณหภูมิต่ำเอนไซม์ ribonuclease ไม่สามารถทำงานได้ การสกัดจะทำการร่วมกับการเติม extraction buffer ที่ประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิดที่มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ย่อย ดีเอ็นเอ (nuclease) รักษาสภาพของอาร์เอ็นเอ ทำลายโครงสร้างของเซลล์เมมเบรน ที่ประกอบด้วย โปรตีน และไขมันเพื่อให้เซลล์แตกออก และปลดปล่อยอาร์เอ็นเอออกสู่ภายนอกเซลล์ ซึ่งการ ทำลายเซลล์เมมเบรนนี้มีผลต่อปริมาณของอาร์เอ็นเอที่แยกได้ (อัญชรัย์, 2548) นอกจากนี้อุปกรณ์ ที่ใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอควรผ่านกระบวนการทำให้ปลอดจากเอนไซม์ RNase รวมทั้งควรใส่ถุง มือทุกครั้งที่ต้องจับอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการสกัดอาร์เอ็นเอ เพื่อลดการปนเปื้อนของเอนไซม์ RNase จากผิวหนัง เพราะเอนไซม์ RNase มีผลทำให้อาร์เอ็นเอสลายตัว มีผลต่อปริมาณอาร์เอ็นเอที่แยกได้ เช่นเดียวกับที่ Surzycki (2000) กล่าวไว้ว่า การกำจัดโปรตีนที่ปนเปื้อนออกมาจากเซลล์ โดยใช้ สารที่มีคุณสมบัติในการทำให้โปรตีนเสื่อมสภาพ เช่น guanidium hydrochloride, guanidium isothiocyanate, คลอโรฟอร์ม และฟีนอล เป็นส่วนผสมในบัฟเฟอร์ ขั้นตอนต่อมาเป็นการ ตกตะกอนแยกเฉพาะส่วนที่เป็นอาร์เอ็นเอออกจากดีเอ็นเอ และโปรตีน ด้วยไอโซโพรพานอล หรือ เกลือที่มีความเข้มข้นสูง เช่น NaOAc หรือ LiCl หลังจากนั้นจะเป็นขั้นตอนการทำความสะอาด อาร์เอ็นเอ เพื่อให้ได้อาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพดี นอกจากนี้ขั้นตอนการแยกอาร์เอ็นเอจำเป็นต้อง ระวังการปนเปื้อนของเอนไซม์ RNase ทุกขั้นตอน รวมทั้งอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ บัฟเฟอร์ และน้ำกลั่นที่ใช้ต้องเตรียมจากน้ำกลั่นที่เติมสาร DEPC (Diethyl pyrocarbonate) 0.1% เนื่องจาก สาร DEPC มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ RNase โดยการทำลายโปรตีนให้เสื่อมสภาพ

ก



ข



ภาพที่ 1 ตัวอย่างกล้วยไม้และเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของการสกัดอาร์เอ็นเอด้วย LiCl ที่เติม Sodium periodate และวิธี Hot phenol ในส่วนลำลูกกล้วย (ก,ข)

- (1) ใบกล้วยไม้สังโตสมอหิน (2) ใบกล้วยไม้สังโตรวงทอง
(3) ใบกล้วยไม้สังโตรวงข้าว (4) ลำลูกกล้วยกล้วยไม้สังโตรวงข้าว
(5) รากกล้วยไม้สังโตรวงข้าว

ตารางที่ 2 คุณภาพอาร์เอ็นเอ, ตัวอย่างพืชในแต่ละส่วนและวิธีสกัดอาร์เอ็นเอ

ตัวอย่าง	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	ng/ μ l	วิธีสกัด
ใบกล้วยไม้สังโตรวงข้าว	1.92	1.49	47.3	LiCl+ NaIO ₄
ใบกล้วยไม้สังโตสมอหิน	2.01	1.78	41.0	LiCl+ NaIO ₄
ใบกล้วยไม้สังโตรวงทอง	2.02	1.85	49.1	LiCl+ NaIO ₄
รากกล้วยไม้สังโตรวงข้าว	1.75	1.78	45.0	LiCl+ NaIO ₄
ลำลูกกล้วยกล้วยไม้สังโตรวงข้าว	1.64	1.33	38.8	Hot Phenol

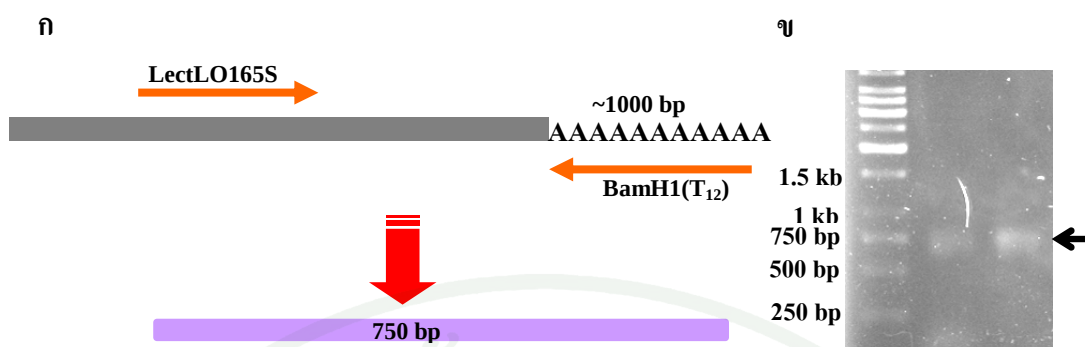
3. การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากอาร์เอ็นเอด้วยวิธี RT-PCR

3.1 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอยีน *lectin* ของปลาย 3' จากอาร์เอ็นเอในกล้วยไม้สังโตสมอหิน และสังโตรวงข้าว

3.1.1 ผลจากการแยกอาร์เอ็นเอรวมจากใบกล้วยไม้สังโตสมอหินและสังโตรวงข้าว ด้วย LiCl+ NaIO₄ นำอาร์เอ็นเอที่ได้ปริมาณ 1 ไมโครกรัม มาสร้างดีเอ็นเอสายแรก (cDNA) ด้วย Ready-To-Go You-Prime first strand kit โดยใช้ไพรเมอร์ RACE(T) 233 และ BamH1(T₁₂) ในสังโตสมอหิน และสังโตรวงข้าว สำหรับสังเคราะห์ยีนปลาย 3' จากนั้นเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ในหลอดทดลองขนาด 200 ไมโครลิตร โดยใช้เอนไซม์ i-Taq DNA Polymerase (Intron Biotechnology, เกาหลี) จะกล่าวต่อไปดังนี้

3.1.1.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *lectin* บริเวณปลาย 3' ของกล้วยไม้สังโตสมอหินและกล้วยไม้สังโตรวงข้าว

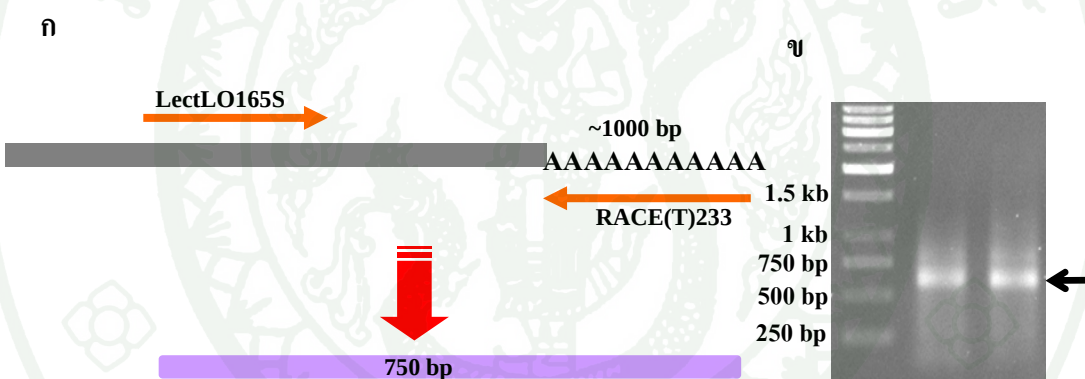
นำดีเอ็นเอสายแรกของใบกล้วยไม้สังโตสมอหินและสังโตรวงข้าว มาเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ยีน *lectin* ด้วยคู่ไพรเมอร์ LectLO165S คู่กับ BamH1(T₁₂) ในสังโตสมอหินและ คู่ไพรเมอร์ LectLO165S คู่กับ RACE(T)233 ในสังโตรวงข้าว ทำพีซีอาร์ด้วยโปรแกรม step up ดังนี้ โปรแกรมที่ 1 ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ โปรแกรมที่ 2 ที่ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที 50 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 10 รอบ โปรแกรมที่ 3 ที่ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที 55 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 20 รอบ และโปรแกรมที่ 4 ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำผลพีซีอาร์ที่ได้มา ตรวจสอบ โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 0.8% พบว่าสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 750 คู่เบส ซึ่งดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่คาดหวัง (ภาพที่ 2 และภาพที่ 3)



ภาพที่ 2 การสังเคราะห์ส่วนของยีน *lectin* ปลาย 3' ของกล้วยไม้สิงโตสมอหิน ด้วยวิธีพีซีอาร์

(ก) แผนภาพการสังเคราะห์ของยีน *lectin* ปลาย 3'

(ข) เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของชิ้นดีเอ็นเอยีน *lectin* ปลาย 3' โดยคู่ไพรเมอร์ LectLO165S - BamHI(T₁₂) ขนาด 750 คู่เบส



ภาพที่ 3 การสังเคราะห์ส่วนของยีน *lectin* ปลาย 3' ของกล้วยไม้สิงโตรวงข้าว ด้วยวิธีพีซีอาร์

(ก) แผนภาพการสังเคราะห์ของยีน *lectin* ปลาย 3'

(ข) เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของชิ้นดีเอ็นเอยีน *lectin* ปลาย 3' โดยคู่ไพรเมอร์ LectLO165S - RACE(T)233 ขนาด 750 คู่เบส

3.2 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอใน *lectin* ของปลาย 5' จากอาร์เอ็นเอในกล้วยไม้สังโครวงทอง และสังโครวงขาว

3.2.1 ผลจากการแยกอาร์เอ็นเอรวมจากใบกล้วยไม้สังโครวงทองและสังโครวงขาว ด้วย $\text{LiCl} + \text{NaIO}_4$ นำอาร์เอ็นเอที่ได้ปริมาณ 1 ไมโครกรัม มาสร้างดีเอ็นเอสายแรก (cDNA) ด้วย Ready-To-Go You-Prime first strand kit โดยใช้ไพรเมอร์ LectBul-R(62) ในสังโครวงทอง และสังโครวงขาว สำหรับสังเคราะห์ยีนปลาย 5' จากนั้นเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ในหลอดทดลองขนาด 200 ไมโครลิตร โดยใช้เอนไซม์ i-Taq DNA Polymerase (Intron Biotechnology, เกาหลี) จะกล่าวต่อไปดังนี้

3.2.1.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *lectin* บริเวณปลาย 5' ของกล้วยไม้สังโครวงทองและกล้วยไม้สังโครวงขาว

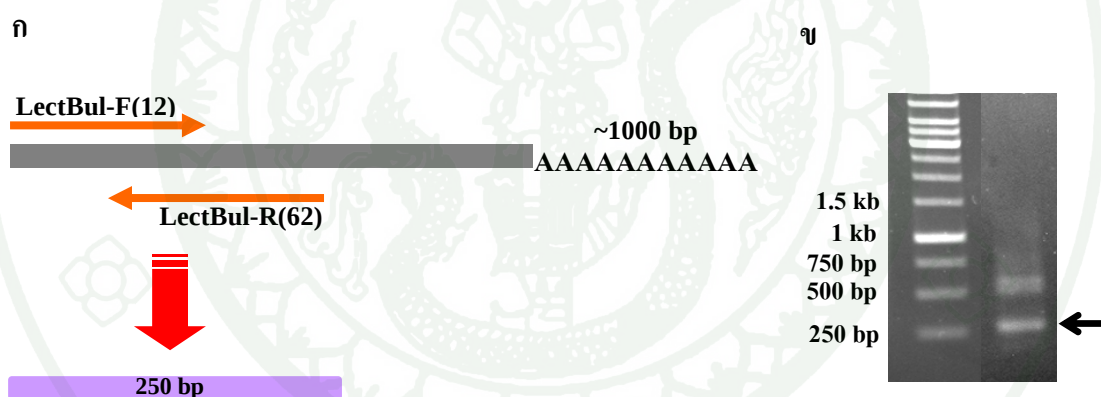
นำดีเอ็นเอสายแรกของใบกล้วยไม้สังโครวงทองและสังโครวงขาวมา เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ยีน *lectin* ด้วยไพรเมอร์ LectBul-F(12) คู่กับ LectBul-R(62) ทำพีซีอาร์ด้วยโปรแกรมที่ 1 ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ โปรแกรมที่ 2 ที่ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที 62 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 30 รอบ และโปรแกรมที่ 3 ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บนเจลอะกาโรส 0.8% พบว่าสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 250 คู่เบส ซึ่งดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่คาดหวัง (ภาพที่ 4 และภาพที่ 5)



ภาพที่ 4 การสังเคราะห์ส่วนของยีน *lectin* ปลาย 5' ของกล้วยไม้สังโตรวงทอง ด้วยวิธีพีซีอาร์

(ก) แผนภาพการสังเคราะห์ส่วนของยีน *lectin* ปลาย 5'

(ข) เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของชิ้นดีเอ็นเอยีน *lectin* ปลาย 5' โดยคู่ไพรเมอร์ LectBul-F(12) - LectBul-R(62) ขนาด 250 คู่เบส



ภาพที่ 5 การสังเคราะห์ส่วนของยีน *lectin* ปลาย 5' ของกล้วยไม้สังโตรวงข้าว ด้วยวิธีพีซีอาร์

(ก) แผนภาพการสังเคราะห์ส่วนของยีน *lectin* ปลาย 5'

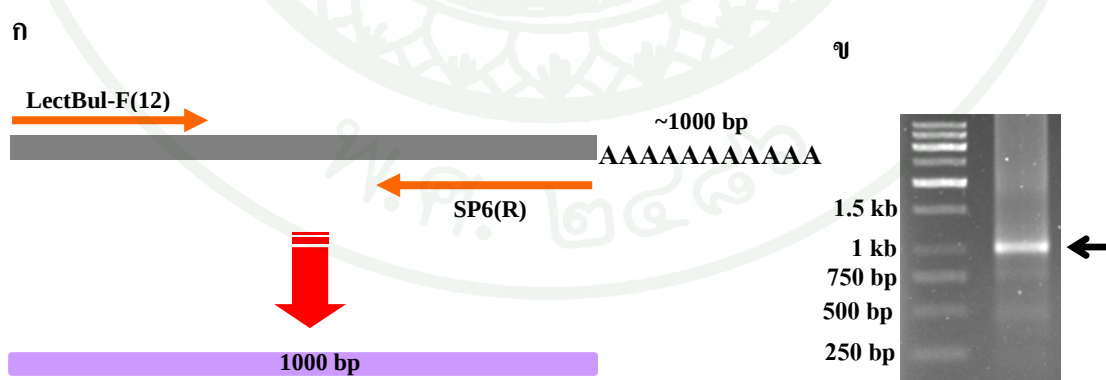
(ข) เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสของชิ้นดีเอ็นเอยีน *lectin* ปลาย 5' โดยคู่ไพรเมอร์ LectBul-F(12) - LectBul-R(62) ขนาด 250 คู่เบส

3.3 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอยีน *lectin* เติมนิ ในกล้วยไม้สังโครวงข้าว

3.3.1 ในสังโครวงข้าวสังเคราะห์ยีนได้จากปลาย 5' และปลาย 3' เมื่อตรวจสอบว่าเป็นยีน *lectin* จากกล้วยไม้สังโครวงข้าวแล้ว จึงสังเคราะห์ยีน *lectin* เติมนิอีกครั้งโดยนำโคลนที่ได้มาต่อกัน คัมที่น้ำเดือดอุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 10 นาทีแล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ในหลอดทดลองขนาด 200 ไมโครลิตร โดยใช้เอนไซม์ i-Taq DNA Polymerase (Intron Biotechnology, เกาหลี) จะกล่าวต่อไปดังนี้

3.3.1.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *lectin* เติมนิของกล้วยไม้สังโครวงข้าว

นำ PCR product จากข้อ 3.3.1 ของสังโครวงข้าวมาเป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ยีน *lectin* ด้วยคู่ไพรเมอร์ LectBul-F(12) คู่กับ SP6 ซึ่งเป็น Universal primer ทำพีซีอาร์ด้วยโปรแกรมที่ 1 ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ โปรแกรมที่ 2 ที่ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที 55 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 90 วินาที จำนวน 30 รอบ และโปรแกรมที่ 3 ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บนเจลอะกาโรส 0.8% พบว่าสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1000 คู่เบส ซึ่งดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่คาดหวัง (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 การสังเคราะห์ส่วนของยีน *lectin* เติมนิ ของกล้วยไม้สังโครวงข้าว ด้วยวิธีพีซีอาร์

(ก) แผนภาพการสังเคราะห์ของยีน *lectin* เติมนิ

(ข) เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของยีนดีเอ็นเอยีน *lectin* เติมนิ โดยคู่ไพรเมอร์ LectBul-F(12)

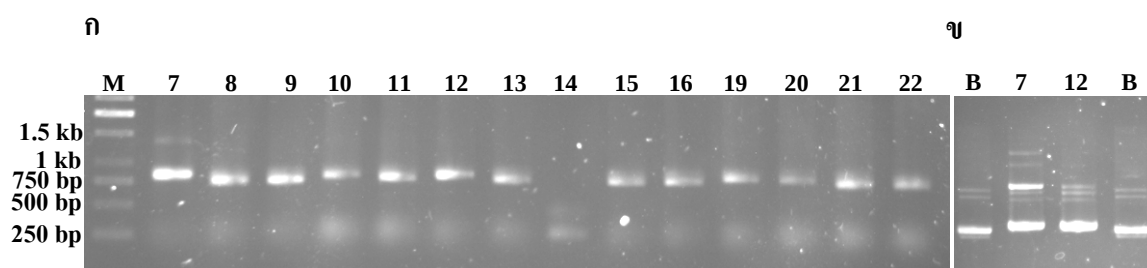
– SP6 ขนาด 1000 คู่เบส

4. การโคลนยีนที่สังเคราะห์ได้จากกล้วยไม้สกุลสิงโตในเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*

4.1 การโคลนยีน *lectin* จากกล้วยไม้สิงโตสมอหิน

นำดีเอ็นเอด้านปลาย 3' ของยีน *lectin* ขนาดประมาณ 750 คู่เบส ที่สังเคราะห์ได้จากอาร์เอ็นเอของกล้วยไม้สิงโตสมอหินด้วยวิธีพีซีอาร์ มาทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 1% สกัดดีเอ็นเอจากเจลโดยใช้ชุด HiYield Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มาเชื่อมต่อกับ พลาสมิด pGEM®-T Easy vector เพื่อถ่ายเข้าไปในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ XL-1 Blue คัดเลือกบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ได้โคลนที่มีโคโลนีสีขาวจำนวน 16 โคลน และโคโลนีสีฟ้าจำนวน 19 โคลน

การตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่โคลนได้ โดยเลือกโคโลนีสีขาวที่คาดว่าจะได้รับชิ้นดีเอ็นเอ จำนวน 14 โคลน คือ โคลนหมายเลข 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 20, 21 และ 22 นำมาตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอสายผสม ด้วยวิธีการทำพีซีอาร์ด้วยคู่ไพรเมอร์ SP6-T7 (Universal primer) จากนั้นนำไปตรวจสอบขนาดโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส บนเจลอะกาโรส 0.8% พบว่าได้โคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 750 คู่เบส นำโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดถูกต้องมาทำให้บริสุทธิ์โดยการแยกพลาสมิดด้วยวิธีอัลคาไลน์ไลซิส ผลการสกัดพลาสมิดด้วยวิธีนี้ได้พลาสมิดประมาณ 1-2 ไมโครกรัม แต่อย่างไรก็ตาม พลาสมิดที่แยกได้มีการปนเปื้อนของจีโนมิกดีเอ็นเอ ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการทำพีซีอาร์ในขั้นตอนวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ จึงเลือกโคลนที่จะนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์มาสกัดด้วยชุดสกัดพลาสมิด AxyPrep Plasmid Miniprep kit (Axygen Bioscience, สหรัฐอเมริกา)

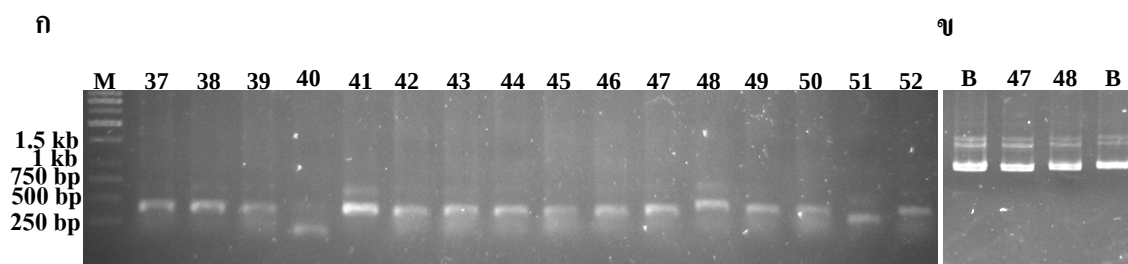


ภาพที่ 7 การตรวจสอบพลาสมิดที่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอปลาย 3' ยีน *lectin* ของกล้วยไม้สังโตสมอหิน
(ก) ขนาดของยีน *lectin* ด้านปลาย 3' ที่สังเคราะห์ได้จาก 14 โคลน
(ข) พลาสมิดสายผสมของยีน *lectin* ด้านปลาย 3' เปรียบเทียบกับ (B) พลาสมิด pGEM®-T Easy ที่ไม่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอ

4.2 การโคลนยีน *lectin* จากกล้วยไม้สังโตรวทอง

นำดีเอ็นเอด้านปลาย 5' ของยีน *lectin* ขนาดประมาณ 250 คู่เบส ที่สังเคราะห์ได้จากอาร์เอ็นเอของกล้วยไม้สังโตรวทองด้วยวิธีพีซีอาร์ มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 1% สกัดดีเอ็นเอจากเจลโดยใช้ชุด HiYield Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มาเชื่อมต่อกับ พลาสมิด pGEM®-T Easy vector เพื่อถ่ายเข้าในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ XL-1 Blue คัดเลือกบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ได้โคลนที่มีโคโลนีสีขาวจำนวน 74 โคลน และโคโลนีสีฟ้าจำนวน 16 โคลน

การตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่โคลนได้ โดยเลือกโคโลนีสีขาวที่คาดว่าจะได้รับชิ้นดีเอ็นเอ จำนวน 16 โคลน คือ โคลนหมายเลข 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 และ 52 นำมาตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอสายผสม ด้วยวิธีการทำพีซีอาร์ด้วยคู่ไพรมเมอร์ SP6-T7 (Universal primer) จากนั้นนำไปตรวจสอบขนาดโดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส บนเจลอะกาโรส 0.8% พบว่าได้โคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 250 คู่เบส นำโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดถูกต้องมาทำให้บริสุทธิ์โดยการแยกพลาสมิดด้วยวิธีอัลคาไลน์ไลซิส ผลการสกัดพลาสมิดด้วยวิธีนี้ได้พลาสมิดประมาณ 1-2 ไมโครกรัม แต่อย่างไรก็ตาม พลาสมิดที่แยกได้มีการปนเปื้อนของจีโนมิก ดีเอ็นเอ ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการทำพีซีอาร์ในขั้นตอนวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ จึงเลือกโคลนที่จะนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์มาสกัดด้วยชุดสกัดพลาสมิด AxyPrep Plasmid Miniprep kit (Axygen Bioscience, สหรัฐอเมริกา)

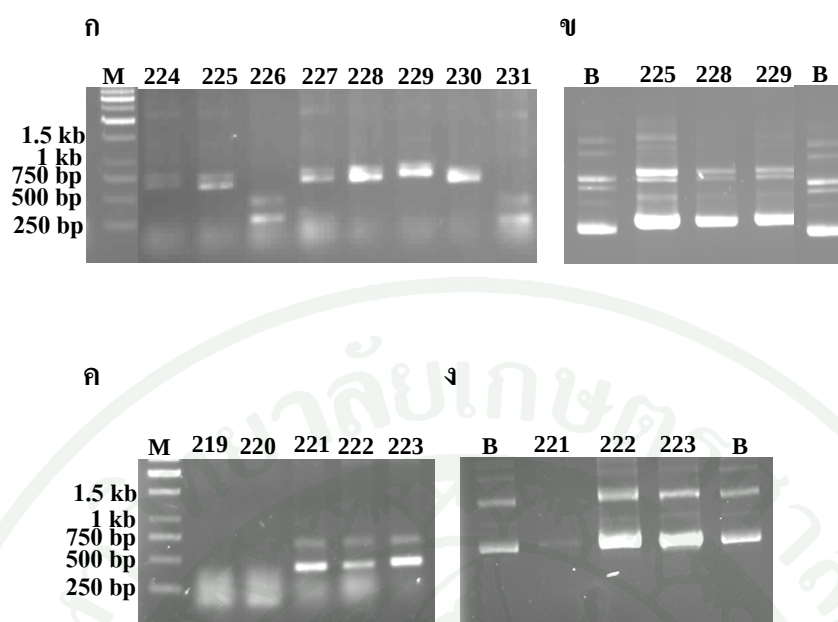


ภาพที่ 8 การตรวจสอบพลาสมิดที่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอปลาย 5' ยีน *lectin* ของกล้วยไม้สังโตรวงทอง
(ก) ขนาดของยีน *lectin* ด้านปลาย 5' ที่สังเคราะห์ได้จาก 16 โคลน
(ข) พลาสมิดสายผสมของยีน *lectin* ด้านปลาย 5' เปรียบเทียบกับ (B) พลาสมิด pGEM®-T Easy ที่ไม่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอ

4.3 การโคลนยีน *lectin* จากกล้วยไม้สังโตรวงข้าว

นำดีเอ็นเอของยีน *lectin* ด้านปลาย 3' และปลาย 5' ที่สังเคราะห์ได้จากอาร์เอ็นเอของกล้วยไม้สังโตรวงข้าวด้วยวิธีพีซีอาร์ ขนาด 750 คู่เบส และ 250 คู่เบส ตามลำดับ นำมาโคลนในพลาสมิด pGEM®-T Easy แล้วคัดเลือกบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ผลการถ่ายพลาสมิดพบว่ายีน *lectin* ด้านปลาย 3' ได้โคลนที่มีโคโลนีสีขาวจำนวน 25 โคลน ด้านปลาย 5' พบว่าได้โคลนที่มีโคโลนีสีขาวจำนวน 5 โคลน และโคโลนีสีฟ้าจำนวน 10 โคลน

การตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่โคลนได้ โดยเลือกโคลนที่มีโคโลนีสีขาว ที่คาดว่าจะได้รับชิ้นดีเอ็นเอของยีน *lectin* ด้านปลาย 3' คือ โคลนหมายเลข 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230 และ 231 จำนวน 8 โคลน และโคลนที่มีโคโลนีสีขาวด้านปลาย 5' จำนวน 5 โคลน คือ โคลนหมายเลข 219, 220, 221, 222 และ 223 นำมาตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอสายผสม ด้วยการทำพีซีอาร์โดยใช้คู่ไพรเมอร์ SP6-T7 (Universal primer) จากนั้นนำไปตรวจสอบขนาดด้วยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 0.8% พบว่าโคลนที่มีชิ้นยีน *lectin* เมื่อทำพีซีอาร์จะได้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 750 และ 250 คู่เบส ตามลำดับ นำโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดถูกต้องมาทำให้บริสุทธิ์โดยการแยกพลาสมิดด้วย วิธีอัลคาไลน์ไลซิส ผลการสกัดพลาสมิด ด้วยวิธี นี้พบว่าได้พลาสมิดประมาณ 1-2 ไมโครกรัม แต่อย่างไรก็ตามพลาสมิดที่แยกได้มีการปนเปื้อนของจีโนมิกดีเอ็นเอ ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อปฏิกิริยาในการทำพีซีอาร์ในขั้นตอนวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ จึงเลือกโคลนที่จะนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์มาสกัดด้วยชุดสกัดพลาสมิด AxyPrep Plasmid Miniprep kit (Axygen Bioscience, สหรัฐอเมริกา)



ภาพที่ 9 การตรวจสอบพลาสมิดที่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอปลาย 3' และปลาย 5' ยีน *lectin* ของกล้วยไม้สิงโตรวงข้าว

(ก) ขนาดของยีน *lectin* ด้านปลาย 3' ที่สังเคราะห์ได้จาก 8 โคลน

(ข) พลาสมิดสายผสมของยีน *lectin* ด้านปลาย 3' เปรียบเทียบกับ (B) พลาสมิด pGEM®-T Easy ที่ไม่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอ

(ค) ขนาดของยีน *lectin* ด้านปลาย 5' ที่สังเคราะห์ได้จาก 5 โคลน

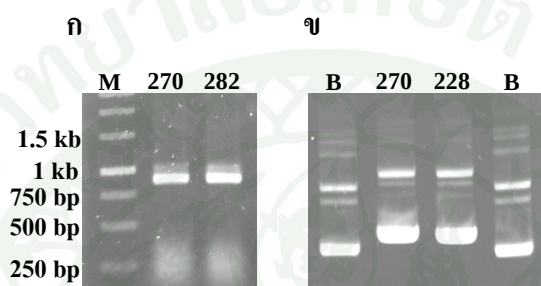
(ง) พลาสมิดสายผสมของยีน *lectin* ด้านปลาย 5' เปรียบเทียบกับ (B) พลาสมิด pGEM®-T Easy ที่ไม่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอ

4.4 การโคลนยีน *lectin* เต็มยีนจากกล้วยไม้สิงโตรวงข้าว

นำดีเอ็นเอของยีน *lectin* เต็มยีนที่สังเคราะห์ได้จากอาร์เอ็นเอของกล้วยไม้สิงโตรวงข้าวด้วยวิธีพีซีอาร์ ขนาด 1000 คู่เบส ตามลำดับ นำมาโคลนในพลาสมิด pGEM®-T Easy แล้วคัดเลือกบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ผลการถ่ายพลาสมิดพบว่ายีน *lectin* เต็มยีนได้โคลนที่มีโคโลนีสีขาวจำนวน 2 โคลน และโคโลนีสีฟ้าจำนวน 1 โคลน

การตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่โคลนได้ โดยเลือกโคลนที่มีโคโลนีสีขาว ที่คาดว่าจะได้รับชิ้นดีเอ็นเอของยีน *lectin* เต็มยีน คือ โคลนหมายเลข 270 และ 282 จำนวน 2 โคลน และนำมาตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอสายผสม ด้วยการทำพีซีอาร์โดยใช้คู่ไพรเมอร์ SP6-T7 (Universal primer) จากนั้นนำไปตรวจสอบขนาดด้วยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 0.8% พบว่า

โคลนที่มีชิ้นยีน *lectin* เมื่อทำพีซีอาร์จะได้ชิ้นยีนขนาดประมาณ 1000 คู่เบส ตามลำดับ นำโคลนที่มีชิ้นยีนเอนเอที่มีขนาดถูกต้องมาทำให้บริสุทธิ์โดยการแยกพลาสมิดด้วย วิธีอัลคาไลน์ไลซิส ผลการสกัดพลาสมิด ด้วยวิธี นี้พบว่าได้พลาสมิดประมาณ 1-2 ไมโครกรัม แต่อย่างไรก็ตามพลาสมิดที่แยกได้มีการปนเปื้อนของจีโนมิกดีเอ็นเอ ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อปฏิกิริยาในการทำพีซีอาร์ในขั้นตอนวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ จึงเลือกโคลนที่จะนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มาสกัดด้วยชุดสกัดพลาสมิด AxyPrep Plasmid Miniprep kit (Axygen Bioscience, สหรัฐอเมริกา)



ภาพที่ 10 การตรวจสอบพลาสมิดที่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอยีน *lectin* เต็มยีนของกล้วยไม้สังโตรงข้าว
(ก) ขนาดของยีน *lectin* เต็มยีนที่สังเคราะห์ได้จาก 2 โคลน
(ข) พลาสมิดสายผสมของยีน *lectin* เต็มยีนเปรียบเทียบกับ (B) พลาสมิด pGEM[®]-T Easy ที่ไม่ได้รับชิ้นดีเอ็นเอ

5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่โคลนได้

5.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ปลาย 3' ของยีน *lectin* จากกล้วยไม้สังโตรงข้าว

ผลจากการศึกษาพบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pBLECT7 พบว่ามีขนาด 363 คู่เบส และเมื่อนำมาวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BLAST เพื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *lectin* ในกล้วยไม้สกุล *Cymbidium hybrid* accession# U02516.1 ขนาด 736 คู่เบส มากที่สุด โดยมีความคล้ายคลึงกันที่ร้อยละ 74 เมื่อแปลรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pBLECT7 เป็นลำดับกรดอะมิโน ได้โพลีเปปไทด์ขนาด 121 เรสซิดิวส์ ที่มี 1 open reading frame (ภาพที่ 11) ยีน *lectin* บางส่วนที่โคลนได้จากกล้วยไม้สังโตรงข้าว ยังขาดลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณปลายด้านปลาย 5' อีกประมาณ 250 คู่เบส การโคลนยีน *lectin* ส่วนที่ขาดหายไปต้องมีการออกแบบไพรเมอร์เพิ่มในส่วนที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ โดยทำ multiple alignment เปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่นๆ ต่อไป

```

DNA: GACTGCAACCTCGTCCTCTACTACTACGGAAGAGCTAGATGGGCTTCCGGC
+1: D C N L V L Y Y Y G R A R W A S G
DNA: AGCGACGGTAAAGGCTCAGGCTGCTATGTCACCATGCAGACTGACGGAAAC
+1: S D G K G S G C Y V T M Q T D G N
DNA: CTCGTAGTCTATGACAATGGAAATAGAGCCATATGGGCGAGCAACACTGGC
+1: L V V Y D N G N R A I W A S N T G
DNA: CGAGAAAACGGAACTATATCCTCATAGTGCAAAAGGATGGTAATGTTGTC
+1: R E N G N Y I L I V Q K D G N V V
DNA: ATATACGGCAACCCTATTTGGGCCACGGGGACTAATTTCTATGGATCGGCT
+1: I Y G N P I W A T G T N F Y G S A
DNA: ACTGTTATCGTCGCCGCTGTGCGTAATGGGACAGTGGGGGTTTCTGGCGCC
+1: T V I V A A V R N G T V G V S G A
DNA: GAGCAAAATAAGGTGAGGGAAATGGGTAAGATTGTGCAAGTTAAGAGTGAT
+1: E Q N K V R E M G K I V Q V K S D
DNA: AAGTAG
+1: K *

```

```

> pBLECT7, frame+1, 121 residues
DCNLVLYYYGRARWASGSDGKSGCYVTMQTDGNLVVYDNGNRAIWASNT
GRENGNYILIVQKDGNNVVIYGNPIWATGTNFGSATVIVAAVRNGTVGVS
GAEQNKVREMKGIVQVKSDK*

```

ภาพที่ 11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *lectin* ที่ได้จากกล้วยไม้สิงโตสมอหิน ความยาว 363 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโน 121 เรสซิดิวส์ จัดเส้นได้แสดง open reading frame

5.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *lectin* จากกล้วยไม้สิงโตรวงทอง

ผลจากการศึกษาพบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pBLECT41 พบว่ามีขนาด 245 คู่เบส และเมื่อนำมาวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BLAST เพื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *lectin* ในกล้วยไม้สกุล *Cymbidium* hybrid accession# U02516.1 ขนาด 736 คู่เบส มากที่สุด โดยมีความคล้ายคลึงกันที่ 73 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแปลรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pBLECT41 เป็นลำดับกรดอะมิโนได้โพลีเปปไทด์ขนาด 81 เรสซิดิวส์ ที่มี 1 open reading frame (ภาพที่ 12) ยีน *lectin* บางส่วนที่โคลนได้จากกล้วยไม้สิงโตรวงทอง ยังขาดลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณปลายด้านปลาย 3' อีกประมาณ 750 คู่เบส การโคลนยีน *lectin* ส่วนที่ขาดหายไปต้องมีการออกแบบไพรเมอร์เพิ่มในส่วนที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ โดยทำ multiple alignment เปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่นๆ ต่อไป


```

DNA: ATGAGTAGCTTCTCCATTATTAGGATCCTTCTCCTCTGCATTGCATCTTTC
+1: M S S F S I I R I L L L C I A S F
DNA: TCACTCCTTGCCTCCCCATCCTTTGGGCAATCATAACCACTTGCTCTCT
+1: S L L A S P S F G Q S Y N H L L S
DNA: GGC GGCGCCTCAATACAGGCCGATCCCTCACTCAAGACAGTTTGCAACTC
+1: G G R L N T G R S L T Q D S L Q L
DNA: ATCATCCAAGATGATTGCAACCTCGTACTCTACTACTACGGAAGAGCTAGA
+1: I I Q D D C N L V L Y Y Y G R A R
DNA: TGGGCTTCGGGCAGCGACGGTAAAGGCTCAGCTGCTATGTC
+1: W A S G S D G K G S A A M

```

```

> pBLECT41, frame+1, 81 residues
MSSFIIIRILLLCIASFSLLASPSFGQSYNHLLSGGRLNTGRSLTQDSLQ
LIIQDDCNLVLYYYGRARWASGSDGKGSAAM

```

ภาพที่ 12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *lectin* ที่ได้จากกล้วยไม้สังโตรวทอง ความยาว 245 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโน 81 เรสซิดิวส์ จัดเส้นได้แสดง open reading frame

5.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *lectin* จากกล้วยไม้สังโตรวขาว

ผลจากการศึกษาพบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pBLECT223 (โคลน *lectin* ด้านปลาย 5') พบว่ามีขนาด 245 คู่เบส และ pBLECT229 (โคลน *lectin* ด้านปลาย 3') มีขนาด 641 คู่เบส เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่าดีเอ็นเอทั้ง 2 โคลน มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *lectin* ในกล้วยไม้สกุล *Cymbidium* hybrid และผลจากการต่อโคลนพบว่าได้ยีน *lectin* ครอบคลุมมีขนาด 806 คู่เบส โดยเรียกชื่อใหม่คือ PSWS 691 และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *lectin* ในกล้วยไม้สกุล *Cymbidium* hybrid accession# U02516.1 ขนาด 736 คู่เบส มากที่สุด โดยมีความคล้ายคลึงกันที่ 62 เปอร์เซ็นต์ เมื่อแปลรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นลำดับกรด อะมิโนได้โพลีเปปไทด์ขนาด 268 เรสซิดิวส์ ที่มี 1 open reading frame ขนาด 176 เรสซิดิวส์ (ภาพที่13) พบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้เป็นรหัสหยุดการสังเคราะห์โปรตีนยีน *lectin* ของกล้วยไม้สังโตรวขาวมีรหัส คือ UAG อยู่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 526-528 และบริเวณปลาย 3' non coding region มีขนาด 227 คู่เบส

DNA: ATGAGTAGCTTCTCCATTATTAGGATCCTTCTCCTCTGCATTGCATCTTTC
 +1: M S S F S I I R I L L L C I A S F
 DNA: TCACTCCTTGCCTCCCCATCCTTTGGGCATCCAGACAACCACTTGCTCTCT
 +1: S L L A S P S F G H P D N H L L S
 DNA: GGGGAGCAGCTCAATACAGGCCAATCCCTCACTGAAGGCACGTCGCAATTC
 +1: G E Q L N T G Q S L T E G T S Q F
 DNA: ATCATCCAAGATGATTGCAACCTCGTCCTCTACAAAATGAACATCGTTAAA
 +1: I I Q D D C N L V L Y K M N I V K
 DNA: TGGCAATCGAACACCACCGGTGAAGGCTCAGGCTGTTATGTCACCTTTAAC
 +1: W Q S N T T G E G S G C Y V T F N
 DNA: AAGCAAGGAAACCTCGTAATCCACAACAATAAAAAACAGAGTCATATGGTGC
 +1: K Q G N L V I H N N K N R V I W S
 DNA: AGCAACAGTAGCAGAAAGCAAGGAACTATATCCTCATACTGCAAAAGGAC
 +1: S N S S R K Q G N Y I L I L Q K D
 DNA: GGTAATCTTGTGCATATACAGCAAACTATTTGGGCTACAGGGACTAATTCC
 +1: G N L V I Y S K P I W A T G T N S
 DNA: TATGGATCGACTGGTGTATCGTCGCCACTGCGCTTAATGGGACAATAGGG
 +1: Y G S T G V I V A T A L N G T I G
 DNA: GTTACTGGTGCAAAGCAGAATAAGGTGAGGGAAATGGGTAAGATTGTCCAG
 +1: V T G A K Q N K V R E M G K I V Q
 DNA: GTTAAGAGTGATAAGTAGGCAAACTTTGTTGCACTATCATGAATAAATAA
 +1: V K S D K * A K L C C T I M N K *
 DNA: GCAAGCATGTGAATGCTACGTAAATGATCAGCTCGTAGTATTATGTCAAGA
 +1: A S M * M L R K * S A R S I M S R
 DNA: TGTCTTTGATGTCCTTACTGTCTGTATGTGTGTTCTTATTCCGTGAAACTA
 +1: C L * C P Y C L Y V C S Y S V K L
 DNA: AGTTCAGTTGTCGTTGGCTTGGAAATTGCCAACGGACTGTTATTTTCATTGC
 +1: S S V V V G L E I A N G L L F H C
 DNA: ACAAATATTTAATTTTTATGCACCATATATGTGTTCTTCTCTAAGATTGTT
 +1: T N I * F L C T I Y V F F S K I V
 DNA: TGAAGTTAAAAACAAAAAACGATGTCGACTCGAGTC
 +1: * S * K Q K K K R C R L E

> PSWS 691, frame+1, 268 residues

MSSFIIIRILLLCIASFSLLASPSFGHPDNHLLSGEQLNTGQSLTEGTSQ
FIIQDDCNLVLYKMNIVKWQSNNTTGEESGCVTFNKGQNLVIHNNKNRVI
WSSNSSRKQGNLYILILQKDGNLVIYSKPIWATGTNSYGSTGVIVATALNG
TIGVTGAKQNKVREMGIKIVQVKSDK*AKLCCTIMNK*ASM*MLRK*SARS
IMSRCL*CPYCLYVCSYSVKLSSVVVGLEIANGLLFHCTNI*FLCTIYVF
FSKIV*S*KQKKKRCRLE

ภาพที่ 13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *lectin* ที่ได้จากกล้วยไม้สิงโตรวงข้าว ความยาว 528

นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นลำดับกรดอะมิโน 176 เรสซิดิวส์ จัดเส้นได้แสดง

open reading frame

6. การศึกษาตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *lectin* ของกล้วยไม้สิงโตสมอหิน สิงโตรวงทอง และสิงโตรวงข้าว มาวิเคราะห์หาตำแหน่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ด้วยโปรแกรม Webcutter (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2>) และโปรแกรม NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) ดังตารางที่ 3 และเขียนแผนที่ตำแหน่งตัดของยีนได้ดังภาพที่ 14 ยีนแต่ละยีนมีรหัสพันธุกรรมที่กำหนดการสร้างโปรตีนแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ 121, 81 และ 176 เรสซิดิวส์ ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ตำแหน่งตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สำคัญบนยีน *lectin* ของกล้วยไม้สิงโตสมอหิน สิงโตรวงทอง และสิงโตรวงข้าว

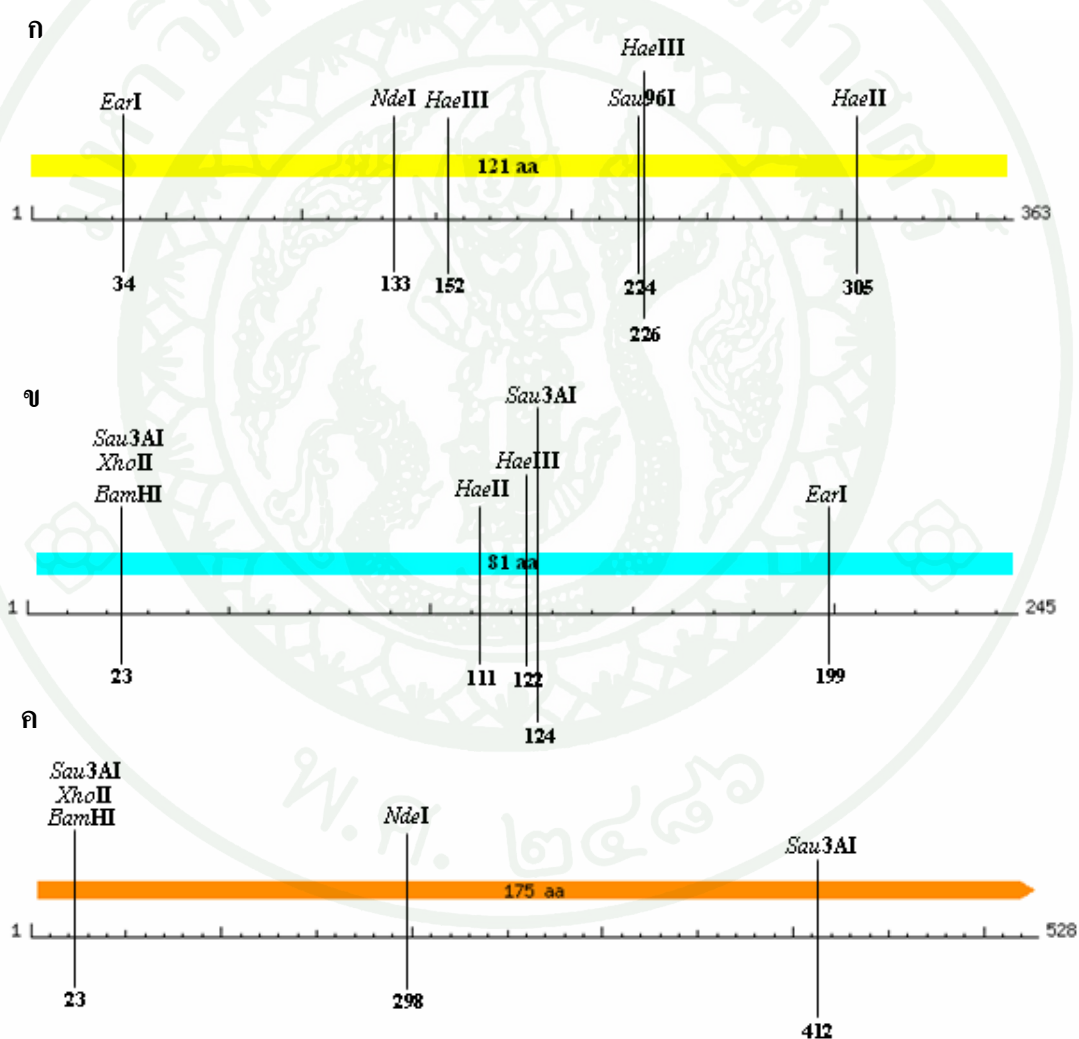
Enzyme		จำนวน/ตำแหน่งจุดตัด		
		ยีน <i>lectin</i> สิงโตสมอหิน	ยีน <i>lectin</i> สิงโตรวงทอง	ยีน <i>lectin</i> สิงโตรวงข้าว
<i>Bam</i> HI	G/GATCC	-	1/23	1/23
<i>Eco</i> RI	CTCTTC	1/34	1/199	-
<i>Hae</i> II	RGCGC/Y	1/305	1/111	-
<i>Nde</i> I	CA/TATG	1/133	-	1/298
<i>Sau</i> 96I	G/GNCC	1/224	-	-
<i>Hae</i> III	GG/CC	2/152, 226	1/122	-
<i>Xho</i> II	R/GATCY	-	1/23	1/23
<i>Sau</i> 3AI	GATC	-	2/23, 124	2/23, 412

หมายเหตุ Y= C หรือ T และ R= G หรือ A

พบว่าดีเอ็นเอยีน *lectin* ที่โคลนจากกล้วยไม้สิงโตสมอหิน สามารถตัดด้วยเอนไซม์ที่มีจุดตัดหนึ่งตำแหน่ง คือ *Eco*RI, *Hae*II, *Nde*I และ *Sau*96I ขณะที่ *Hae*III มี 2 ตำแหน่งตัด ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 0.15, 0.06 และ 0.13 กิโลเบส

ดีเอ็นเอยีน *lectin* ที่โคลนจากกล้วยไม้สิงโตรวงทอง สามารถตัดด้วยเอนไซม์ที่มีจุดตัดหนึ่งตำแหน่ง คือ *Bam*HI, *Eco*RI, *Hae*II, *Hae*III และ *Xho*II ขณะที่ *Sau*3AI มี 2 ตำแหน่งตัด ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 0.02, 0.11 และ 0.11 กิโลเบส

ดีเอ็นเอยีน *lectin* ที่โคลนจากกล้วยไม้สิงโตรวงข้าว สามารถตัดด้วยเอนไซม์ที่มีจุดตัดหนึ่งตำแหน่ง คือ *Bam*HI, *Nde*I และ *Xho*II ขณะที่ *Sau*3AI มี 2 ตำแหน่งตัด ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 0.02, 0.12 และ 0.38 กิโลเบส



ภาพที่ 14 แผนภาพตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะของยีน *lectin* จากกล้วยไม้สิงโตสมอหิน (ก) กล้วยไม้สิงโตรวงทอง (ข) และกล้วยไม้สิงโตรวงข้าว (ค)

7. การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนองค์ประกอบของโปรตีนที่โคลนได้

7.1 การวิเคราะห์กรดอะมิโนของโปรตีน Lectin จากกล้วยไม้สิงโตสมอหิน

7.1.1 BLAST Analysis โปรตีน Lectin ของกล้วยไม้สิงโตสมอหิน

ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโคลน pBLECT7 ที่ได้จากกล้วยไม้สิงโตสมอหิน ด้วยโปรแกรม Blastp พบว่าตรงกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Lectin ในกล้วยไม้ *Cymbidium hybrid cultivar* (accession# AAA19578.1), กล้วยไม้ *Listera ovata* (accession# AAA20899.1), กล้วยไม้ *Epipactis helleborine* (accession# AAA19577.1) ร้อยละ 69, 68 และ 67 และตรงกับลำดับกรดอะมิโนของ mannose-binding lectin ในกล้วยไม้ *Dendrobium officinale* (accession# AAV66418.1) ร้อยละ 53 นอกจากนี้ยังเหมือนกับ mannose-binding lectin ของพืชอื่นๆ อีก 4 ชนิด คือ *Clivia miniata* (accession# AAA19910.1) *Ananas comosus* (accession# AAM28277.1), *Galanthus nivalis* (accession# AAA33345.1) และ *Hippeastrum sp.* (accession# AAA33365.1) ร้อยละ 55, 54, 53 และ 56 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของกรดอะมิโนองค์ประกอบของยีน *lectin* ของกล้วยไม้สิงโตสมอหิน (*Bulbophyllum blepharisters* Rchb.f.) กับพืชชนิดอื่น

Plant species			<i>B. blepharisters</i>		
			aa size*	% Identities	E-value
	<i>B. blepharisters</i>	<i>lectin</i>	121	100	-
AAA19578.1	<i>Cymbidium hybrid</i>	<i>lectin</i>	176	69	5e-36
AAA20899.1	<i>Listera ovata</i>	<i>lectin</i>	175	68	6e-38
AAA19577.1	<i>Epipactis helleborine</i>	<i>lectin</i>	172	67	1e-39
AAA33365.1	<i>Hippeastrum sp.</i>	<i>lectin</i>	116	56	2e-25
AAA19910.1	<i>Clivia miniata</i>	<i>lectin</i>	162	55	6e-26
AAM28277.1	<i>Ananas comosus</i>	mannose-binding lectin	164	54	9e-26
AAA33345.1	<i>Galanthus nivalis</i>	<i>lectin</i>	161	53	2e-25
AAV66418.1	<i>Dendrobium officinale</i>	mannose-binding lectin	165	53	3e-26

* length of polypeptide (amino acid)

7.2 การวิเคราะห์กรดอะมิโนของโปรตีน Lectin จากกล้วยไม้สิงโตรวงทอง

7.2.1 BLAST Analysis โปรตีน Lectin ของกล้วยไม้สิงโตรวงทอง

ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโคลน pBLECT41 ที่ได้จากกล้วยไม้สิงโตรวงทอง ด้วยโปรแกรม Blastp พบว่าตรงกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Lectin ในกล้วยไม้ *Cymbidium* hybrid cultivar (accession# AAA19578.1), mannose-binding lectin ใน *Zingiber officinale* (accession# ACJ66865.1), กล้วยไม้ *Listera ovata* (accession# AAA20899.1), กล้วยไม้ *Epipactis helleborine* (accession# AAA19577.1) และตรงกับ mannose-binding lectin ในกล้วยไม้ *Dendrobium officinale* (accession# AAV66418.1) ร้อยละ 61, 58, 56, 56 และ 47 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของกรดอะมิโนองค์ประกอบของยีน *lectin* ของกล้วยไม้สิงโตรวงทอง (*Bulbophyllum orientale* Seidenf.) กับพืชชนิดอื่น

Plant species			<i>B. orientale</i>		
			aa size*	% Identities	E-value
	<i>B. orientale</i>	<i>lectin</i>	-	100	-
AAA19578.1	<i>Cymbidium</i> hybrid	<i>lectin</i>	176	61	1e-13
ACJ66865.1	<i>Zingiber officinale</i>	mannose-binding lectin	169	58	2e-06
AAA20899.1	<i>Listera ovata</i>	<i>lectin</i>	175	56	8e-11
AAA19577.1	<i>Epipactis helleborine</i>	<i>lectin</i>	172	56	4e-11
AAV66418.1	<i>Dendrobium officinale</i>	mannose-binding lectin	165	47	3e-09

* length of polypeptide (amino acid)

7.3 การวิเคราะห์กรดอะมิโนของโปรตีน Lectin จากกล้วยไม้สิงโตวงข้าว

7.3.1 BLAST Analysis โปรตีน Lectin ของกล้วยไม้สิงโตวงข้าว

ผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโคลน PSWS 691 ที่ได้จากกล้วยไม้สิงโตวงข้าว ด้วยโปรแกรม Blastp พบว่าตรงกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Lectin ในกล้วยไม้ *Cymbidium* hybrid cultivar (accession# AAA19578.1), กล้วยไม้ *Epipactis helleborine* (accession# AAA19577.1), กล้วยไม้ *Listera ovata* (accession# AAA20899.1) และตรงกับลำดับกรดอะมิโนของ mannose-binding lectin ในกล้วยไม้ *Dendrobium officinale* (accession# AAV66418.1) ร้อยละ 61, 57, 56 และ 51 นอกจากนี้ยังเหมือนกับพืชอื่นๆ อีก 4 ชนิด คือ โปรตีน mannose-binding lectin ใน *Tulipa* hybrid cultivar (accession# AAC49386.1), *Clivia miniata* (accession# AAA19911.1), *Galanthus nivalis* (accession# AAA33345.1) และ โปรตีน mannose-binding lectin ใน *Ananas comosus* (accession# AAM28277.1) ร้อยละ 45, 44, 44 และ 42 ดังแสดงในตารางที่ 6 ซึ่งแตกต่างกับโปรตีน mannose-binding lectin ในแบคทีเรีย *Actinomyces odontolyticus* F0309 (accession# ZP_06608163)

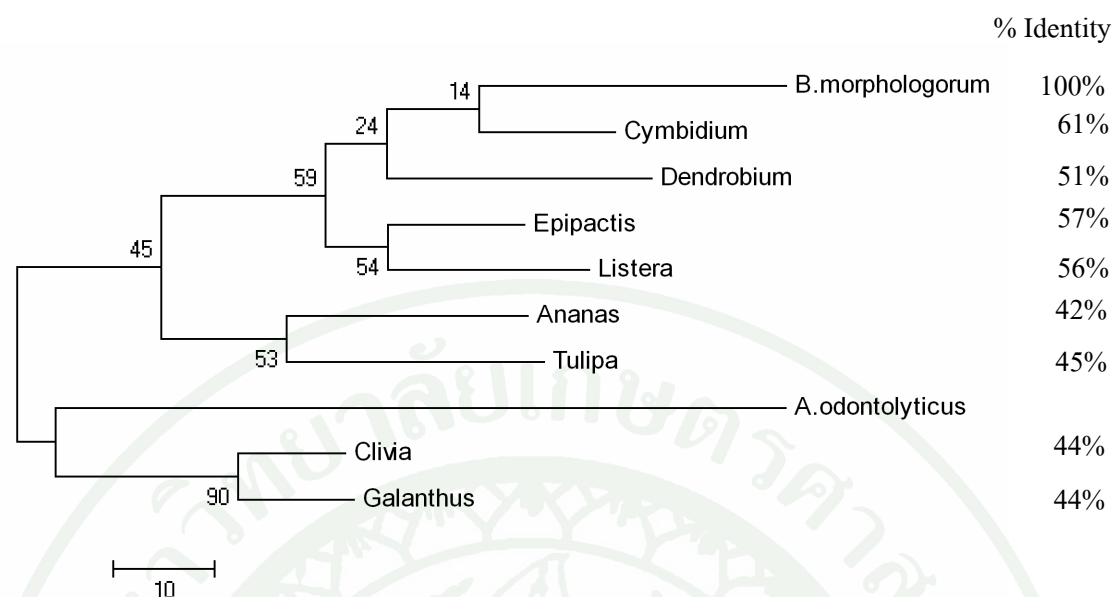
ตารางที่ 6 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของกรดอะมิโนองค์ประกอบของยีน *lectin* ในกล้วยไม้สิงโตรวงข้าว (*Bulbophyllum morphologorum* Kraenzl.) กับพืชชนิดอื่น และในแบคทีเรีย

Plant species			<i>B. morphologorum</i>		
			aa size*	% Identities	E-value
	<i>B. morphologorum</i>	<i>lectin</i>	175	100	-
AAA19578.1	<i>Cymbidium hybrid</i>	<i>lectin</i>	176	61	9e-47
AAA19577.1	<i>Epipactis helleborine</i>	<i>lectin</i>	172	57	1e-48
AAA20899.1	<i>Listera ovata</i>	<i>lectin</i>	175	56	1e-45
AAV66418.1	<i>Dendrobium officinale</i>	mannose-binding lectin	165	51	1e-34
AAC49386.1	<i>Tulipa hybrid</i>	mannose-binding lectin	177	45	1e-26
AAA19911.1	<i>Clivia miniata</i>	<i>lectin</i>	169	44	7e-29
AAA33345.1	<i>Galanthus nivalis</i>	<i>lectin</i>	161	44	1e-28
AAM28277.1	<i>Ananas comosus</i>	mannose-binding lectin	164	42	3e-27
ZP_06608163	<i>A. odontolyticus</i>	mannose-binding lectin	240	-	-

* length of polypeptide (amino acid)

7.3.2 Phylogenetic Tree โปรตีน Lectin ของกล้วยไม้สิงโตรวงข้าว

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของโปรตีนโดยการสร้าง phylogenetic tree ของโปรตีน Lectin ที่ได้จากกล้วยไม้สิงโตรวงข้าว กับกล้วยไม้ชนิดอื่น 4 ชนิด ที่มีรายงานในฐานข้อมูล NCBI คือ กล้วยไม้ *Cymbidium hybrid* cultivar, กล้วยไม้ *Listera*, กล้วยไม้ *Epipactis helleborine* และโปรตีน mannose-binding lectin ในกล้วยไม้ *Dendrobium officinale* ในพืชอื่นๆ อีก 4 ชนิด คือ *Clivia miniata*, *Galanthus nivalis*, mannose-binding lectin ใน *Tulipa hybrid* cultivar และ *Ananas comosus* นอกจากนี้ยังมีโปรตีน mannose-binding lectin ในแบคทีเรีย *Actinomyces odontolyticus* (ตารางที่ 6) ด้วยโปรแกรม MEGA 4.0 พบว่าโปรตีน Lectin ของกล้วยไม้สิงโตรวงข้าว มีความใกล้เคียงกับโปรตีน Lectin ในกลุ่มกล้วยไม้ โดยใกล้ชิดกับกล้วยไม้ *Cymbidium hybrid* cultivar มากที่สุด (ภาพที่ 15)

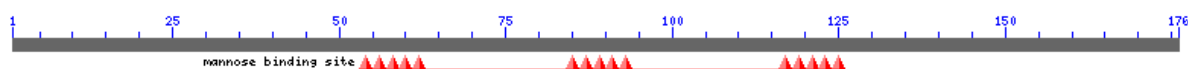


ภาพที่ 15 Phylogenetic tree แสดงระดับความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Lectin ในกล้วยไม้สังโตรวงข้าวกับพืชชนิดอื่นและในแบคทีเรีย

7.3.3 Multiple Alignment Analysis โปรตีน Lectin ของกล้วยไม้สังโตรวงข้าว

จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน Lectin ของกล้วยไม้สังโตรวงข้าว โดยการนำ multiple alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW(2) กับพืชชนิดอื่น 8 ชนิด พบว่า Lectin ของกล้วยไม้สังโตรวงข้าวจัดอยู่ในกลุ่ม B_lectin superfamily มีบริเวณอนุรักษ์ในลำดับกรดอะมิโนคือ mannose binding lectin ถึง 3 ตำแหน่งคือ บริเวณกรดอะมิโนลำดับ 50-130 ซึ่งเป็นตำแหน่ง motif ที่จำกรดอะมิโน QXDXNXVXY (ภาพที่ 16)

ก



ข

<i>B.morphologorum</i>	EGTSQFIIQDDCNLVLYKMNIWKQSNNTGEGSGCYVTFNKQGNLVIHNNK---NRVIWS 102
<i>Cymbidium</i>	SGNVDLAMYDCNLVLYDNGKSIWSSGTYSGSGCYVTLQTDGNLVIYDNT---NNPLWA 103
<i>Listera</i>	DGGNAFIMQEDCNLVLYESSRPTWASGTYHRGSGCYLAMQNDGNLVVYDNR---NRAIWA 101
<i>Epipactis</i>	EGGFTFIMQSDCNLVLYDLNRPIWASGTYKGTGCFLSMQSDGNLVVYDVR---NIAIWA 99
<i>Tulipa</i>	WESYTFIMQTDNLVLYEGNGPIWASGSNDLGSICYVTMQKDGNLVIYSKS---GNSVWA 117
<i>Ananas</i>	NGNFRFTMQTDNLVLYDGGSAIWSSGTYRKGTGCYVKMQSDGNLVVYNGS---NNALWA 97
<i>Clivia</i>	YGRYDFIQQEDCNLVLYDVDKPIWATNTGGVSSGCHLSMQTDGNLVVYSPK---NNPIWA 104
<i>Galanthus</i>	QGNVVFIMQEDCNLVLYDVDKPLWETNTGGLSRRCYLMQTDGNLVVYNPS---NKPIWA 96
<i>Dendrobium</i>	QDRYMLIMQEDCNLVLYNLNKPEWATKTANRGSRCFVTLQSDGNFVIYDDHEERNEAIWA 101
	: : * * * * * . . * : : . * : : : * * * * : . : * :
<i>B.morphologorum</i>	SNSSR-KQGNVILILQKDGNLVIYSKPIWATGTNSYSGTGVIVATALNGTIGVTGAKQNK 161
<i>Cymbidium</i>	SNTSG-ENGNYILILQKDRNLVIYSHPIWATGTNHAGSVAVVVAARNGTVGISGAEQNK 162
<i>Listera</i>	SQTDQRNVGTIVILILQKDHNVVLYTNPIWATGTNRFGSPGVVITAARNGTVGISGAEQNK 161
<i>Epipactis</i>	SNTAR-NNGNYLLILQKDRNVVIYSQPIWATTTNIRGSAGVVIAPALNGTVGVSGAEQNK 158
<i>Tulipa</i>	SQTHQ-AEGNYVLVLQKDRNVVIYGPSLWATNTDQFS-----LTSNST-----TESGSGM 166
<i>Ananas</i>	SNTDR-GRGNYVCILQRDRNVVYVGPALWATGTNRVGTGPVVIISANST-----GTAAPPEE 151
<i>Clivia</i>	SNTEG-ENGNYVCVLQKDRNVVIYGTASWATGTNIHGAGIVGVPGSAP-----QNSTAIEI 158
<i>Galanthus</i>	SNTGG-QNGNYVCILQKDGNIAYIGPAIWATGTNIHGAGIVGVLSGAP-----QNSTAEM 150
<i>Dendrobium</i>	SNTDG-QNGNYVILILQKDGNLVLYSKPIFATGTNRFGSTAVVVAKRNR-----KAH 151
	* : : . . : : * * * * : . : * * * : . : :

ภาพที่ 16 การวิเคราะห์ตำแหน่ง mannose binding lectin domain ของ B_lectin superfamily 3 ตำแหน่ง (ก) multiple alignment ระหว่างโปรตีน Lectin ของกล้วยไม้สังโตรวงข้าว (*Bulbophyllum morphologorum*) (สีเทา) กับพืชชนิดอื่น สีเหลืองคือตำแหน่งของ mannose binding lectin domain (ข)

จากข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของยีน *lectin* ที่โคลนได้จากกล้วยไม้สังโตรวงข้าว เป็นโปรตีน Lectin ที่อยู่ในกลุ่ม B_lectin superfamily ซึ่งบริเวณอนุรักษ์ของยีนนี้คือบริเวณ mannose binding lectin ซึ่งมีตำแหน่งซ้ำกัน 3 ตำแหน่งในยีน และมีกรดอะมิโนจดจำคือ QXDXNXVXY เช่นเดียวกับการศึกษาของ Chen *et al.* (2005) ที่โคลนยีน mannose-binding lectin จากกล้วยไม้ *Dendrobium officinale* มีขนาด 777 คู่เบส แปลเป็นกรดอะมิโนได้ทั้งหมด 513 คู่เบส จาก start codon ถึง stop codon มีทั้งหมด 170 เรสซิดิวส์ พบ domain คือ mannose-binding lectin superfamily ซึ่งเป็นบริเวณ mannose-binding site ซึ่งมีตำแหน่งจดจำ QDNY 3 ซ้ำในยีน เช่นเดียวกับโคลนที่ได้จากกล้วยไม้สังโตรวงข้าว และยังมีการศึกษาของ Smeets *et al.* (1997) ที่พบว่ากรดอะมิโนของโปรตีน Lectin ในกระเทียม (*Allium sativum* L.) มีความเหมือนกับ Lectin ในพืช snowdrop (GNA) มากที่สุด บริเวณอนุรักษ์ในกระเทียม คือ domain ที่เป็นบริเวณ mannose

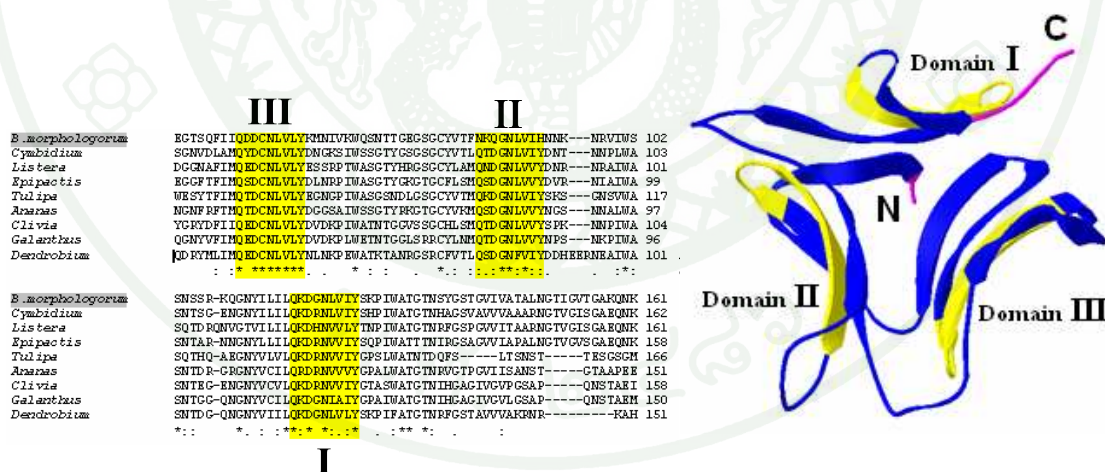
binding site ซึ่งมีตำแหน่งจดจำต่างจากใน snowdrop (QDNY) คือ RDNY, RDSS และ HDLY เช่นเดียวกับ Chai *et al.* (2003) ที่ได้ศึกษาการโคลนยีนและการแสดงออกของยีน mannose binding lectin จากพลับพลึง (*Crinum asiaticum*) ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรดั้งเดิมในประเทศจีน โคลนยีนจาก cDNA ได้ขนาด 820 คู่เบส มี 1 open reading frame ทั้งหมด 528 คู่เบส และสามารถแปลเป็นรหัสกรดอะมิโนได้ 175 เรสซิดิวส์ ซึ่งมี 22 เรสซิดิวส์ที่เป็น signal peptide และมีบริเวณอนุรักษ์ที่เป็น domain ของ mannose binding site 3 ตำแหน่งชื่อว่า B-lectin จดจำกรดอะมิโน QDNY นอกจากนี้ Jiang *et al.* (2006) ได้ศึกษาการโคลนยีนและการแสดงออกของยีน lectin ที่โคลนได้จากข้าว (*Oryza sativa*) โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี RT-PCR ได้โคลน OsJAC1 มีทั้งหมด 1172 คู่เบส ซึ่ง 921 คู่เบสที่แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 306 เรสซิดิวส์ เมื่อนำลำดับเบสจากโคลน OsJAC1 มาเปรียบเทียบกับยีน lectin จากข้าวต่างชนิดกัน, ข้าวสาลี และพืชชนิดอื่นๆ พบว่า ยีน OsJAC1 มีกรดอะมิโน 12 ตำแหน่งที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ใน mannose binding lectin และจากการทำรหัสโปรตีน พบว่าสามารถตกตะกอนเซลล์เม็ดเลือดแดงในกระด่ำยได้

8. การทำนายโครงสร้างตติยภูมิ

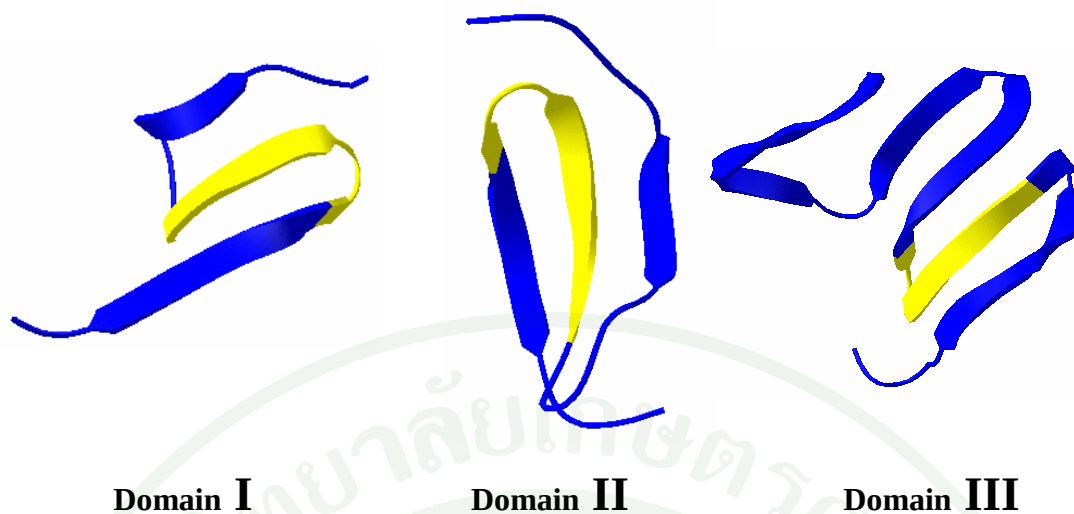
จากการนำลำดับอะมิโนของโปรตีน lectin จากกล้วยไม้สังโตรวงข้าว เปลี่ยนเป็นโครงสร้างตติยภูมิของโปรตีน ด้วยโปรแกรม SWISS-MODEL ที่มีการคำนวณแบบ Homology modeling เปรียบเทียบกับโปรตีนที่มีรายงานโครงสร้างตติยภูมิในฐานข้อมูล พบว่า โปรตีน lectin จากกล้วยไม้สังโตรวงข้าว มีตำแหน่งลำดับอะมิโนที่ 29-136 แบ่งเป็น 3 ส่วน คือส่วน domain I ตำแหน่งอะมิโนที่ 117-125 เรสซิดิวส์ ที่มีลักษณะอนุรักษ์สูง โปรตีนส่วนที่ 2 (domain II) มีตำแหน่งลำดับอะมิโนที่ 85-93 เรสซิดิวส์ โปรตีนส่วนที่ 3 (domain III) มีตำแหน่งลำดับอะมิโนที่ 54-62 เรสซิดิวส์ มีลักษณะอนุรักษ์สูงเช่นกัน ภาพที่ 17 และภาพที่ 20 โปรตีนในส่วนที่ 1 และ 2 มีโครงสร้างของโปรตีนเป็นแผ่นซ้อนกัน 3 แผ่น แบบ β -sheets โปรตีนในส่วนที่ 3 มีโครงสร้างของโปรตีนเป็นแผ่นซ้อนกัน 6 แผ่น แบบ β -sheets ภาพที่ 18 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Liu *et al.* (2005) ที่ศึกษาโครงสร้างตติยภูมิของโปรตีน mannose-binding lectin จากกล้วยไม้ *Gastrodia elata* ซึ่งเป็นกล้วยไม้สมุนไพรในประเทศจีน โครงสร้างที่ Lie และคณะได้ศึกษานั้น ได้นำมาเป็น model ต้นแบบที่ใช้เปรียบเทียบกับโครงสร้างตติยภูมิของโปรตีน lectin จากกล้วยไม้สังโตรวงข้าว ลักษณะโดยทั่วไปของโปรตีน lectin จากกล้วยไม้ *Gastrodia elata* ประกอบกันด้วย 4 monomer ซึ่ง monomer A และ B มีขนาด 112 เรสซิดิวส์ monomer C มีขนาด 111 เรสซิดิวส์ และ monomer D มีขนาด 110 เรสซิดิวส์ ใช้ monomer B ในการนำมาเปรียบเทียบกับโปรตีน lectin จากกล้วยไม้สังโตรวงข้าว ซึ่งพบว่า มีความคล้ายคลึงกันร้อยละ 53.153 แตกต่างกันบริเวณปลาย C-terminal

ตั้งแต่ลำดับอะมิโน 126-136 เรสซิดิวส์ ภาพที่ 19 และสอดคล้องกับการทดลองของ Saito *et al.* (1993) ที่พบว่าเลคตินที่แยกจากกล้วยไม้ *Listera ovata* เป็นประเภท α -D-mannose-lectin จากการทำนายโครงสร้างตติยภูมิ พบว่ามีตำแหน่งลำดับอะมิโนที่ 30-139 แบ่งเป็น 3 ส่วน ประกอบด้วย domain I, II และ III ที่ในแต่ละส่วนมีโปรตีนเป็นแผ่นซ้อนกันแบบ β -sheets เช่นเดียวกับโปรตีน lectin ของกล้วยไม้สิงโตรวงข้าว จากงานวิจัยของ Barre *et al.* (1996) พบว่าจำนวนของ mannose-binding site จะสัมพันธ์กับคาร์โบไฮเดรตที่จะมาจับเพื่อทำหน้าที่ ซึ่งเป็นผลให้โปรตีนเลคตินในแต่ละสิ่งมีชีวิตมีหน้าที่แตกต่างกันไป และจากการทดลองของ Chai *et al.* (2003) ที่ทำนายโครงสร้างตติยภูมิจากโปรตีน CAA (*Crinum asiaticum*) พบว่ามีขนาด 15.79 kDa ประกอบด้วย 3 domain ของ mannose-binding site (QDNY) ซึ่งจากการทำนายพบว่าคล้ายกับโครงสร้างของ GNA (*Galanthus nivalis* agglutinin) และมีความคล้ายคลึงกับโครงสร้างที่สำคัญในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวในกลุ่ม *Amaryllidaceae*, *Orchidaceae*, *Alliaceae* and *Liliaceae*

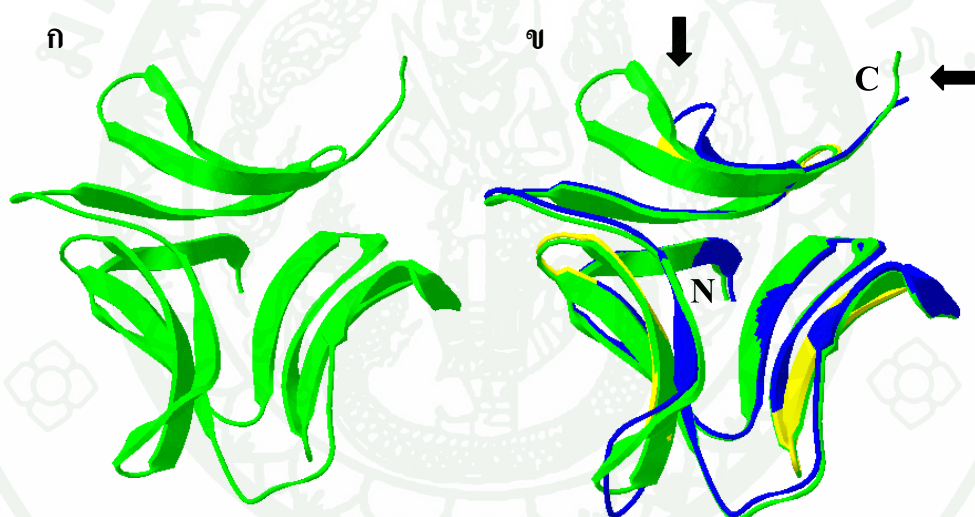
จากการเปรียบเทียบโครงสร้างของโปรตีน lectin จากกล้วยไม้สิงโตรวงข้าว กับโปรตีนเลคตินจากกล้วยไม้ *Gastrodia elata* มีส่วนที่แตกต่างกันมากในบริเวณ domain ที่ 2 และ domain ที่ 1 ปลาย C-terminal ซึ่งอาจจะเกิดจากความแตกต่างของชนิดโปรตีนในแต่ละสิ่งมีชีวิต (Chai *et al.*, 2003)



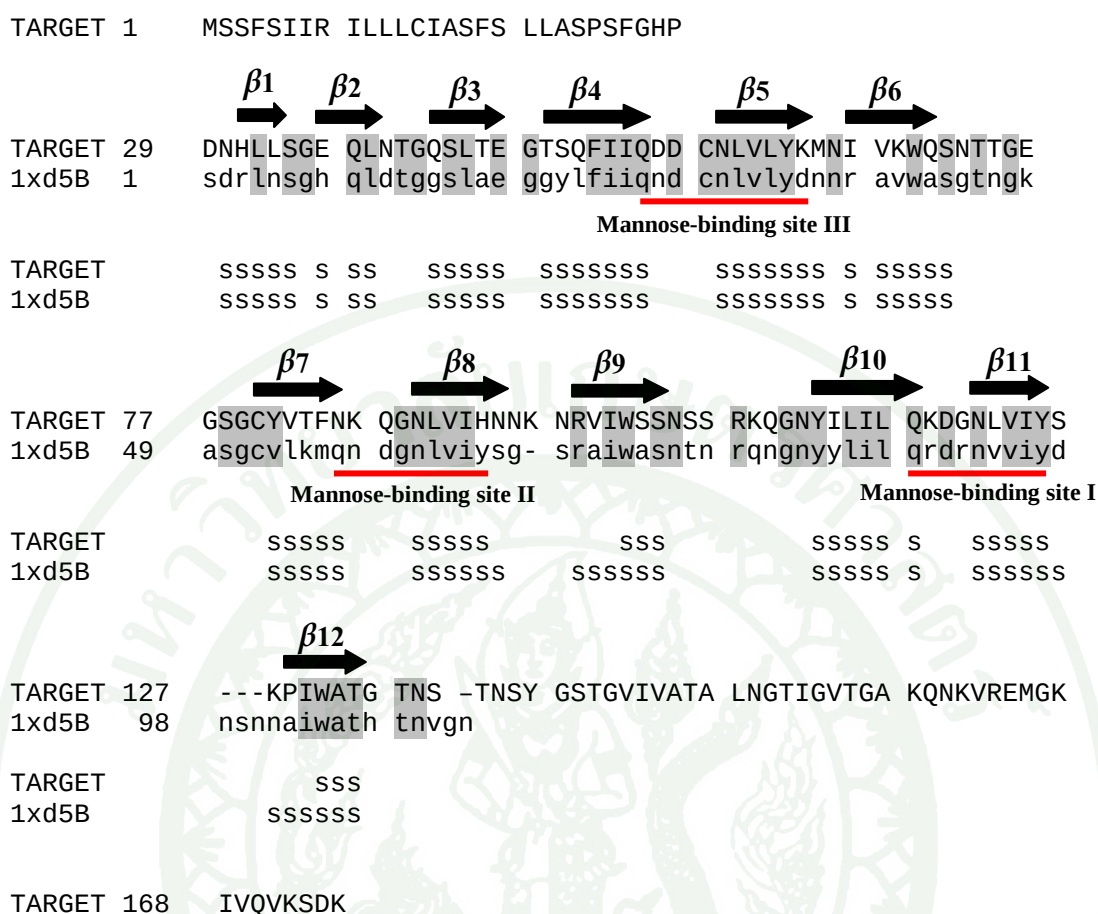
ภาพที่ 17 แสดงโครงสร้างตติยภูมิ ของโปรตีน lectin จากกล้วยไม้สิงโตรวงข้าว ซึ่งประกอบไปด้วย 3 domain (สีเหลือง)



ภาพที่ 18 แสดงโครงสร้างแบบ β -sheet ในแต่ละ domain



ภาพที่ 19 โครงสร้างตติยภูมิของโปรตีน mannose-binding lectin จากกล้วยไม้ *Gastrodia elata* (ก) และการเปรียบเทียบโครงสร้างของโปรตีน lectin จากกล้วยไม้สิงโตรวงข้าว และกล้วยไม้ *Gastrodia elata* (ข) ลูกศรสีดำ คือบริเวณที่แตกต่างกันของโปรตีน lectin จากกล้วยไม้ทั้ง 2 ชนิดอยู่ในตำแหน่งลำดับอะมิโน 126-136



ภาพที่ 20 ผลการเปรียบเทียบโปรตีน lectin จากกล้วยไม้สิงโตรวงข้าว กับรายงานโครงสร้าง คติภูมิในฐานข้อมูล ด้วยโปรแกรม SWISS-MODEL เพื่อสร้างแบบจำลองคติภูมิ ของโปรตีน lectin,  แสดงตำแหน่ง β -sheets และ  แสดงตำแหน่ง mannose-binding site

9. การเปรียบเทียบความเหมือนและแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนจากกล้วยไม้สกุลสิงโตทั้ง 3 ชนิด

จากผลการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนเลคตินที่แยกจากกล้วยไม้สกุลสิงโต ทั้ง 3 ชนิด คือ กล้วยไม้สิงโตสมอหิน กล้วยไม้สิงโตรวงทอง และกล้วยไม้สิงโตรวงข้าว กล้วยไม้ สิงโตรวงข้าวคู่กับกล้วยไม้สิงโตสมอหิน และ กล้วยไม้สิงโตรวงข้าวคู่กับกล้วยไม้สิงโตรวงทอง โดยใช้โปรแกรม ClustalW(2) จากเว็บไซต์ของ European Bioinformatics Institute (EMBL) (www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html) พบว่าส่วนใหญ่มีบริเวณอนุรักษ์ที่เหมือนกัน (ภาพที่ 21) โดยดูจากสัญลักษณ์ดาว (*) มีบางตำแหน่งที่ลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกันในกล้วยไม้แต่ละชนิด

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบความเหมือนและแตกต่างของลำดับอะมิโนในกล้วยไม้ทั้ง 3 ชนิด

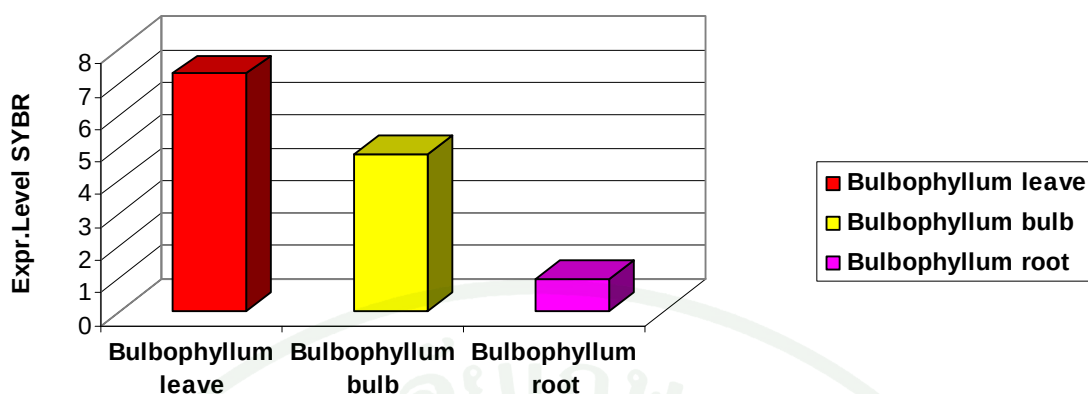
พันธุ์กล้วยไม้ (pairwise)	aa size*	% Similarity
สิงโตสมอหิน/สิงโตรวงข้าว	121/176	68
สิงโตรวงทอง/สิงโตรวงข้าว	81/176	69

* length of polypeptide (amino acid)

10. การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *lectin* ในกล้วยไม้สิงโตรวงข้าว ด้วยวิธี qPCR

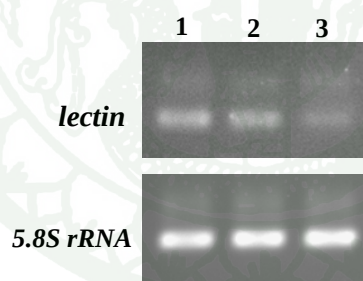
ผลจากการทำ qPCR ที่ ระดับอุณหภูมิ 51 องศาเซลเซียส เพื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีน *lectin* ที่แสดงออกในเนื้อเยื่อราก ใบ และลำลูกกล้วย ของกล้วยไม้สิงโตรวงข้าว ดังแสดงเป็นกราฟของจุดเริ่มต้นของการสังเคราะห์ยีนและปริมาณของสารติดฉลาก SYBR green ที่ใช้ไปด้วยจำนวนที่แตกต่างกันในแต่ละเนื้อเยื่อ ทั้งนี้ขึ้นกับปริมาณของยีน *lectin* (ภาพผนวกที่ 8) และการคำนวณระดับการแสดงออกของยีน *lectin* ที่เป็นค่า relative relation ratio (ตารางผนวกที่ 1) โดยการใช้ระดับการแสดงออกของยีน *lectin* ในส่วนรากของกล้วยไม้สิงโตรวงข้าวที่คาดว่าจะมีการแสดงออกของยีนต่ำที่สุด ในการปรับระดับการแสดงออกของยีนให้อยู่ในมาตรฐานเดียวกัน (calibrator)

เมื่อนำค่า relative expression ratio มาแสดงเป็นกราฟแท่ง (ภาพที่ 22) ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel (Microsoft, สหรัฐอเมริกา) พบว่าในแต่ละเนื้อเยื่อกล้วยไม้มีรูปแบบการแสดงออกของยีน *lectin* แตกต่างกัน คือ ใบมีการแสดงออกของยีนสูงที่สุด รองลงมาคือลำลูกกล้วยและราก ตามลำดับ โดยมีค่า expression ratio ใบ 7.27 เท่า ลำลูกกล้วย 4.80 เท่า



ภาพที่ 22 ระดับการแสดงออกของยีน *lectin* ในเนื้อเยื่อ ใบ ลำลูกกล้วย และราก ของกล้วยไม้สิงโตรวงข้าว ตรวจสอบด้วยวิธี qPCR

ความแตกต่างการแสดงออกของยีน *lectin* ในแต่ละเนื้อเยื่อของกล้วยไม้สิงโตรวงข้าว แสดงด้วยการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ณ รอบที่ 24 ผลการทดลองสอดคล้องกับการตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วย อิเล็กโทรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 0.8% (ภาพที่ 23) เมื่อเปรียบเทียบกับยีน *5.8S rRNA* ในแต่ละส่วนของกล้วยไม้สิงโตรวงข้าว



ภาพที่ 23 ปริมาณดีเอ็นเอของยีน *lectin* ที่สังเคราะห์ จากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของกล้วยไม้สิงโตรวงข้าว ด้วยวิธี qPCR ได้แก่ ใบ ลำลูกกล้วย และราก และใช้ *5.8S rRNA* เป็นมาตรฐาน (control) เปรียบเทียบ

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ การศึกษาการแสดงออกของยีน *lectin* ในข้าว (*Oryza sativa*) จากส่วนลำต้น, ใบ, ยอดอ่อน และราก ซึ่งพบว่าการแสดงออกในใบมากที่สุด รองลงมาคือ ลำต้น และยอดอ่อน ตามลำดับ แต่ไม่มีการแสดงออกในส่วนราก (Jiang *et al.*, 2006) ซึ่งต่างจากการทดลองของ Zhao *et al.* (2003) ที่ศึกษาการแสดงออกของยีน mannose binding lectin จาก

ส่วน ช่อดอก, ใบ และ หัวใต้ดิน ของ *Arisaema heterophyllum* อย่างไรก็ตามการแสดงออกของยีนพบมากที่สุดในส่วนของหัวใต้ดิน

Chen *et al.* (2005) ศึกษาการแสดงออกของยีน *mannose-binding lectin* ในกล้วยไม้ *Dendrobium officinale* ด้วยวิธี Semi-Quantitative RT-PCR จากส่วนราก ลำต้น และใบ โดยใช้ *5.8S rRNA* เป็นมาตรฐาน (control) เปรียบเทียบ ซึ่งพบว่ามีการแสดงออกมากที่สุดในลำต้นและมีการแสดงออกน้อยที่สุดในใบ และยังมีการทดลองของ Van Damme *et al.* (1994) ที่ศึกษาการแสดงออกของยีน *mannose binding lectin* จากกล้วยไม้ 3 ชนิด คือ *Listera ovata*, *Epipactis helleborine* และ *Cymbidium hybrid* ด้วยวิธี Northern-blot โดยในกล้วยไม้ *L. ovata* แยกอาร์เอ็นเอจากส่วนราก ใบ ลำต้น ดอก และรังไข่ (ovaries) ซึ่งมีการแสดงออกของยีนมากที่สุดในส่วนรังไข่ และดอก มีการแสดงออกของยีนน้อยที่สุดในส่วนราก ในกล้วยไม้ *E. helleborine* แยกอาร์เอ็นเอจากส่วนดอก ใบ และลำต้น ซึ่งมีการแสดงออกของยีนมากที่สุดในส่วนดอก และใบ มีการแสดงออกของยีนน้อยที่สุดในส่วนลำต้น ในกล้วยไม้ *Cymbidium hybrid* แยกอาร์เอ็นเอจากส่วนรังไข่ (ovaries) เกสรตัวผู้ (stamens) ดอก ใบ และ ปลายราก (root tips) พบว่ามีการแสดงออกของยีนมากที่สุดในส่วนปลายราก รังไข่ และเกสรตัวผู้ มีการแสดงออกของยีนน้อยที่สุดในส่วนของดอก และใบ

สรุป

1. วิธีการแยกอาร์เอ็นเอของกล้วยไม้สกุลสิงโตโดยประยุกต์วิธี LiCl ซึ่งเติม sodium periodate ลงไปในบัฟเฟอร์ ได้ปริมาณอาร์เอ็นเอรวมที่มีปริมาณมาก มีคุณภาพดีในส่วนของใบและราก และคุณภาพพอใช้ในส่วนของการสกัดด้วยวิธี Hot phenol เหมาะสำหรับการใช้ในงานวิจัยในครั้งนี้
2. ยีนที่โคลนได้จากกล้วยไม้สิงโตสมอหิน คือ บางส่วนของยีน *lectin* ด้านปลาย 3' ขนาด 750 คู่เบส การโคลนยีน *lectin* ส่วนที่ขาดหายไปต้องมีการออกแบบไพรเมอร์ในส่วนที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ เปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่น ๆ ต่อไป
3. ยีนที่โคลนได้จากกล้วยไม้สิงโตรวงทอง คือ บางส่วนของยีน *lectin* บริเวณด้าน 5' ขนาด 250 คู่เบส การโคลนยีน *lectin* ส่วนที่ขาดหายไปต้องมีการออกแบบไพรเมอร์ในส่วนที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ เปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่น ๆ ต่อไป
4. ยีน *lectin* ที่โคลนได้จากกล้วยไม้สิงโตรวงขาว มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 806 คู่เบส จาก start codon atg ถึง stop codon tag ครอบคลุมมี 528 คู่เบส แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 176 เรสซิดิวส์
5. ยีน *lectin* จากกล้วยไม้สิงโตรวงขาว เป็นโปรตีน Lectin ที่อยู่ในกลุ่ม B_lectin superfamily บริเวณอนุรักษ์ของยีนนี้คือบริเวณ mannose binding site QXDXNXVXY ซึ่งมีตำแหน่งซ้ำกัน 3 ตำแหน่งในยีน
6. ยีน *lectin* ในกล้วยไม้สิงโตรวงขาว มีการแสดงออกสูงที่สุดในใบ เมื่อตรวจสอบด้วย Real-Time Quantitative PCR (qRT-PCR)

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กิตติยา แสงสว่าง. 2553. การโคลนยีนเทอร์ปีนซินเทสที่เกี่ยวข้องกับการสร้างกลิ่นของตะไคร้หอม และมะกรูด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กล้วยไม้ไทย ชุมพร. 2549. เอื้องพวงอรุณ. แหล่งที่มา : <http://www.muangsiri.com/relax/data/1056.html>, 16 ธันวาคม 2553.

กรมส่งเสริมการส่งออก. 2553. มูลค่า ปริมาณ และราคาการนำเข้าและส่งออกกล้วยไม้โลก (WTA/GTA). แหล่งที่มา: http://orchidnet.doae.go.th/form/report_importwta.php, 7 พฤษภาคม 2554.

จิตรพรรณ พิสิฐ. 2546. การปลูกเลี้ยงกล้วยไม้. ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จันทนา กาญจน์กมล, อมรรัตน์ พรหมบุญ, พรรณณา ศักดิ์สูง และ สุนันทา รัตนาโก. 2546. การศึกษาสมบัติของ cDNA ที่เป็นรหัสของเอนจินในใบหม่อน, น. 36-43. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41 (สาขาวิทยาศาสตร์ การจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ชรินทร์ เกษตรลักษณ์ และฉัตรชัย เงินแสงสรวย. 2552. อนุกรมวิธานของกล้วยไม้สกุลสิงโต บริเวณโคกนกกระบา ในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าภูหลวง จังหวัดเลย, น. 12-19. ใน เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47: สาขาวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ชยพร แอคะรัตน์. 2551. ตำรากกล้วยไม้ออนไลน์. แหล่งที่มา: <http://gotoknow.org/blog/orchid145/215419>, 5 พฤษภาคม 2554.

เด่น ศรีบุญ. 2551. สิงโตรวงข้าวชมพู. แหล่งที่มา: <http://www.212cafe.com/freewebboard/view.php?user=homeorchid&id=205>, 5 พฤษภาคม 2554.

ทรงศักดิ์ แสงศิริ. 2546. การทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะของเลคตินจากถั่วฝักยาว.
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ไทรรัฐ. 2552ก. จุลินทรีย์ *Cymbidium ensifolium* – กับสรรพคุณทางสมุนไพร. แหล่งที่มา :
<http://www.thairath.co.th/column/edu/paperagriculturist/35153>, 16 ธันวาคม 2553.

ไทรรัฐ. 2552ข. เอื้องสายสีดอก-สวยแก่หีดได้. แหล่งที่มา : <http://www.thairath.co.th/column/edu/paperagriculturist/24654>, 16 ธันวาคม 2553.

ชัยญลักษณ์ เหล็กพิมาย. 2553. คุณค่าทางสมุนไพรของกล้วยไม้บางชนิด ตอนที่ 1. แหล่งที่มา:
http://www.uniserv.buu.ac.th/forum2/topic.asp?TOPIC_ID=4473, 16 ธันวาคม 2553.

บ้านเมือง. 2553. ขออนุมัติดำเนินงานตามยุทธศาสตร์การแข่งขันกล้วยไม้ไทยในตลาดโลก พ.ศ.
2554-2559. แหล่งที่มา: <http://www.ryt9.com/s/cabt/921938>, 7 พฤษภาคม 2554.

ปฐม การัญญมิ. 2543. การประยุกต์ใช้เลคตินจากเมล็ดจำปาตะ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท.
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เพ็ญสุข จรัสชนะเพท. 2538. การกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ลิโปไซต์โดยเลคตินจากสะตอ.
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ไพฑูรย์ อรรถยานนท์. 2536. การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของเลคตินจากเมล็ดเหียง.
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วีระชัย ณ นคร และสุรางค์รัชต์ อินทะมุสิก. 2552. ลักษณะทั่วไปของกล้วยไม้. แหล่งที่มา
<http://www.tjorchid.com/>, 21 มีนาคม 2554.

ศรีประไพ ธรรมแสง, กาญจนา รุ่งรักษานนท์, ทรงสุภา พุ่มชุมพล และมนตรี เป้งชัยโม. 2549.
โครงการรวบรวมข้อมูลพันธุ์กล้วยไม้พื้นเมืองในจังหวัดอุบลราชธานี. คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, อุบลราชธานี.

สารานุกรมไม้ประดับในประเทศไทย เล่ม 1. 2548. รายชื่อกล้วยไม้ในประเทศไทย. สำนักพิมพ์บ้านและสวน, กรุงเทพฯ.

สุภาภรณ์ สีทะหา. 2553. การแสดงออกของเลคตินจากใบหม่อนในเซลล์แบคทีเรียและเซลล์แมลง และศึกษาการจับกันระหว่างเลคตินและน้ำตาลในคอมพิวเตอร์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

สุปรีย์ ไทบุญกุล. 2534. เลคตินจากยางพารา. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ. 2553. บัญชีรายการทรัพยากรชีวภาพ กล้วยไม้ไทย. สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ(องค์การมหาชน), กรุงเทพฯ.

สำนักบริหารจัดการพื้นที่ป่าอนุรักษ์ 6 นครสวรรค์. 2550. พรรณไม้สมุนไพร-กระเจี๋ย. แหล่งที่มา : http://www.takhli.ac.th/thumpet/herbal_29.html, 16 ธันวาคม 2553.

สำนักงานอุทยานการเรียนรู้ สังกัดสำนักงานบริหารและพัฒนาองค์ความรู้ (องค์การมหาชน). 2006. มหัศจรรย์พรรณพฤกษ์ ตอน เสน่ห์กล้วยไม้. แหล่งที่มา: http://www.tkpark.or.th/tk/index.php?option=com_content&view=article&id=428&Itemid=270&lang=th, 16 ธันวาคม 2553.

อุบล ต้นสม. 2541. การวิเคราะห์สมบัติทางชีวเคมีของเลคตินจากเมล็ดจำปาตะ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อัญชรี ตั้งจิตมั่นธรรม. 2548. การเปรียบเทียบวิธีการสกัด RNA และการแสดงออกของยีน *ACC Synthase*, *ACC Oxidase* และ *Ethylene Receptor* ในส่วนต่าง ๆ ของกล้วยไม้สกุลหวาย BOM 17. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อบพันธ์ ไทยทอง. 2543. กล้วยไม้เมืองไทย. พิมพ์ครั้งที่ 3. อมรินทร์ พรินต์ติ้งแอนพับลิชชิ่ง จำกัด, กรุงเทพฯ.

ออริคิด-ซูกิ. 2553. กล้วยไม้ นั้นสำคัญะไหน (ตอนที่1 กล้วยไม้สมุนไพร). แหล่งที่มา :
<http://orchidsuki.blog.com/>, 12 มกราคม 2554.

Arnold, K., L. Bordoli, J. Kopp and T. Schwede. 2006. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics** 22: 195-201.

Barre, A., E. J. M. Van Damme, W. J. Peumans and P. Rougé. 1996. Structure-Function Relationship of Monocot Mannose-Binding Lectins. **Plant Physiol** 112: 1531-1540.

Barondes, S.H. 1988. Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. **Trends Biochem Sci** 12 : 2 - 480.

Brown, T. A. 1998. **Molecular Biology, LAB fax 1. Recombinant DNA**. Academic Press California. USA.

Chai, Yourong, Y. Pang, Z. Liao, L. Zhang, X. Sun, Y. Lu, S. Wang and K. Tang. 2003. Molecular cloning and characterization of a mannose-binding lectin gene from *Crinum asiaticum*. **J. Plant Physiol.** 160: 913–920.

Charungchittrak, S., A. Petsom, P. Sangvanich and A. Karnchanatat. 2011. Antifungal and antibacterial activities of lectin from the seeds of *Archidendron jiringa* Nielsen. **Food Chem** 126: 1025-1032.

Chen, Z., X. Sun and K. Tang. 2005. Cloning and expression of a novel cDNA encoding a mannose-binding lectin from *Dendrobium officinale*. **Toxicon** 45: 535-540.

Goldstein, I.J., R.C. Hughes, M. Monsigny, T. Osawa and N. Sharon. 1980. What should be called a lectin?. **Nature** 285: 66.

- Guex, N. and M. C. Peitsch. 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. **Electrophoresis** 18: 2714-2723.
- Hsieh, C.L., J.J. Lin, S.Y. Chiang, S.Y. Su, N.Y. Tang, G.G. Lin, I.H. Lin, C.H. Liu, C.Y. Hsiang, J.C. Cheng and T.Y. Ho. 2007. *Gastrodia elata* modulated activator protein 1 via c-Jun N-terminal kinase signaling pathway in kainic acid-induced epilepsy in rats. **Ethnopharmacol** 109: 241-247.
- Janjic, S., M. Kostic, V. Vucinic, S. Dimitrijevic, K. Popovic, M. Ristic and P. Skundric. 2009. Biologically active fibers based on chitosan-coated lyocell fibers. **Carbohydrate Polymers** 78: 240-246.
- Jiang, J. F., Y. Han, L. J. Xing, Y. Y. Xu, Z. H. Xu and K. Chong. 2006. Cloning and expression of a novel cDNA encoding a mannose-specific jacalin-related lectin from *Oryza sativa*. **Toxicon** 47: 133-139.
- Kocourek, J. 1986. **Historical background.** In I.E. Liener *et al.* (eds.): **The Lectin**. Academic Press Inc. New York. USA.
- 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 $2^{-\Delta\Delta_{CT}}$ method. **Methods** 25: 402 - 408.
- Liu, B., H.J. Bian and J.K. Bao. 2010. Plant lectins: Potential antineoplastic drugs from bench to clinic. **Cancer Lett.** 287: 1-12.

- Liu, W., N. Yang, J. Ding, R. Huang, Z. Hu and D.C. Wang. 2005. Structural mechanism governing the quaternary organization of monocot mannose-binding lectin revealed by the novel monomeric structure of an orchid lectin. **Biol Chem** 15: 14865–14876.
- Liu, X.D., N. Nishi, S. Tokura and N. Sakairi. 2001. Chitosan coated cotton fiber: preparation and physical properties. **Carbohydrate Polymers** 44: 233-238.
- Manickavelu, A., K. Kambarab, 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.
- Nikolic, T., M. Kostic, J. Praskalo, B. Pejic, Z. Petronijevic and P. Skundric. 2010. Sodium periodate oxidized cotton yarn as carrier for immobilization of trypsin. **Carbohydrate Polymers** 82: 976-981.
- Ooi, L. S. M., S. S. M. SUN, H. Wang and V. E. C. Ooi. 2004. New mannose-binding lectin isolated from the rhizome of Sarsaparilla *Smilax glabra* Roxb. (Liliaceae). **J Agric Food Chem.** 52: 6091-6095.
- Peng, H., H. Lv, Y. Wang, Y. hong Liu, C. yang Li, L. Meng, F. Chen and J. ku Bao. 2009. Clematis montana lectin, a novel mannose-binding lectin from traditional Chinese medicine with antiviral and apoptosis-inducing activities. **Peptides** 30: 1805–1815.
- Peumans, W.J. and E. J. M. Van Damme. 1995. Lectins as plant Defense proteins. **Plant Physiol** 109: 347-352.
- Rüdiger, H. and H. J. Gabius. 2001. Plant lectin: Occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconjugate** 18: 589-613.

- Saito, K., A. Komae, M. Kakuta, E. J. M. Van Damme, W. J. Peumans and I. J. Goldstein and A. Misaki. 1993. The α -mannosyl-binding lectin from leaves of the orchid twayblade (*Listera ovata*) Application to separation of α -D-mannans from α -D-glucans. **Eur J Biochem**. 217: 677-681.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. **Molecular Cloning, A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. USA.
- Schwede, T., J. Kopp, N. Guex and M. C. Peitsch. 2003. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. **Nucl Acids Res** 31: 3381-3385.
- Sharon, N. and H. Lis. 1972. Lectin : cell- agglutinating and sugar- specific protein. **Science** 177: 949-958.
- Sharon, N. 1977. Lectins. **Sci American** 236 : 108-119.
- Sharon, N. and H. Lis. 1995. Lectins-proteins with a sweet tooth : function in cell recognition. **Essays Biochem** 30: 59 – 75.
- Sharon, N. and H. Lis. 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiol** 14: 53-62.
- Sharma, A.D., P. K. Gill and P. Singh. 2003. RNA isolation from plant tissue rich in polysaccharides. **Anal Biochem** 314: 319-321.
- Surzycki, S. 2000. **Basic Techniques in Molecular Biology**. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany.

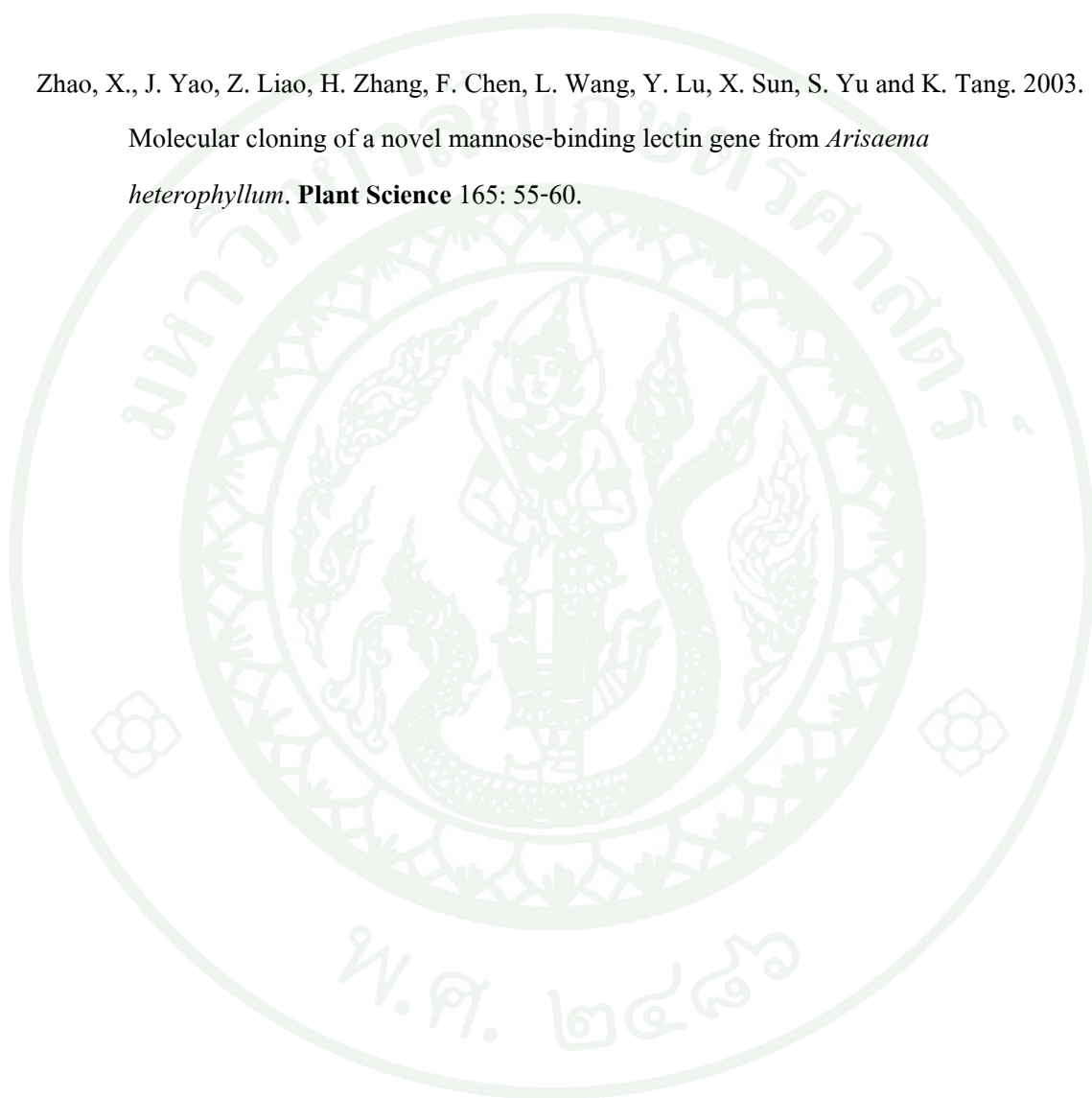
- Salzman, R.A., T. Fujita, K. Zhu-Salzman, P.M. Hasegawa and R.A. Bressan. 1999. An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. **Plant Mol Biol Rep.** 17: 11 - 17.
- Smeets, K., E. J.M. Van Damme, P. Verhaert, A. Barre, P. Roug'e, F. Van Leuven and W. J. Peumans. 1997. Isolation, characterization and molecular cloning of the mannose-binding lectins from leaves and roots of garlic (*Allium sativum* L.). **Plant Molec Biol** 33: 223–234.
- Van Damme, E. J. M., K. Smeets, S. Torrekens, F. Van Leuven and W. J. Peumans. 1994. Characterization and molecular cloning of mannose-binding lectins from the Orchidaceae species *Listera ovata*, *Epipactis helleborine* and *Cymbidium* hybrid. **Eur J Biochem.** 221: 769-777.
- Van Damme, E. J. M., A. K. Allen and W. J. Peumans. 1987. Leaves of the orchid twayblade (*Listera ovata*) contain a mannose-specific lectin. **Plant Physiol.** 85: 566-569.
- Van Damme, E.J.M., A.K. Allen and W.J. Peumans. 1988. Related mannose-specific lectins from different species of the family of Amaryllidaceae. **Plant Physiol.** 73: 52-57.
- Wanqian, L., W. Bochu, D. Chuanren and L. Biao. 2005. A method for isolating functional RNA from callus of *Dendrobium candidum* contented rich polysaccharides. **Colloids Surfaces B: Biointerfaces** 42: 259 - 262.
- Wang, X., G. Bauw1, E. J.M. Van Damme, W. J. Peumans, Z. L. Chen, M. Van Montagu, G. Angenon and W. Dillen. 2001. Gastrodianin-like mannose-binding proteins: a novel class of plant proteins with antifungal properties. **Plant J** 25(6) :651-661.

Wood, D.D., L.M. Wright, C.D. Reynolds, P.J. Rizkallah, A.K. Allen, W.J. Peumans and E.J.M.

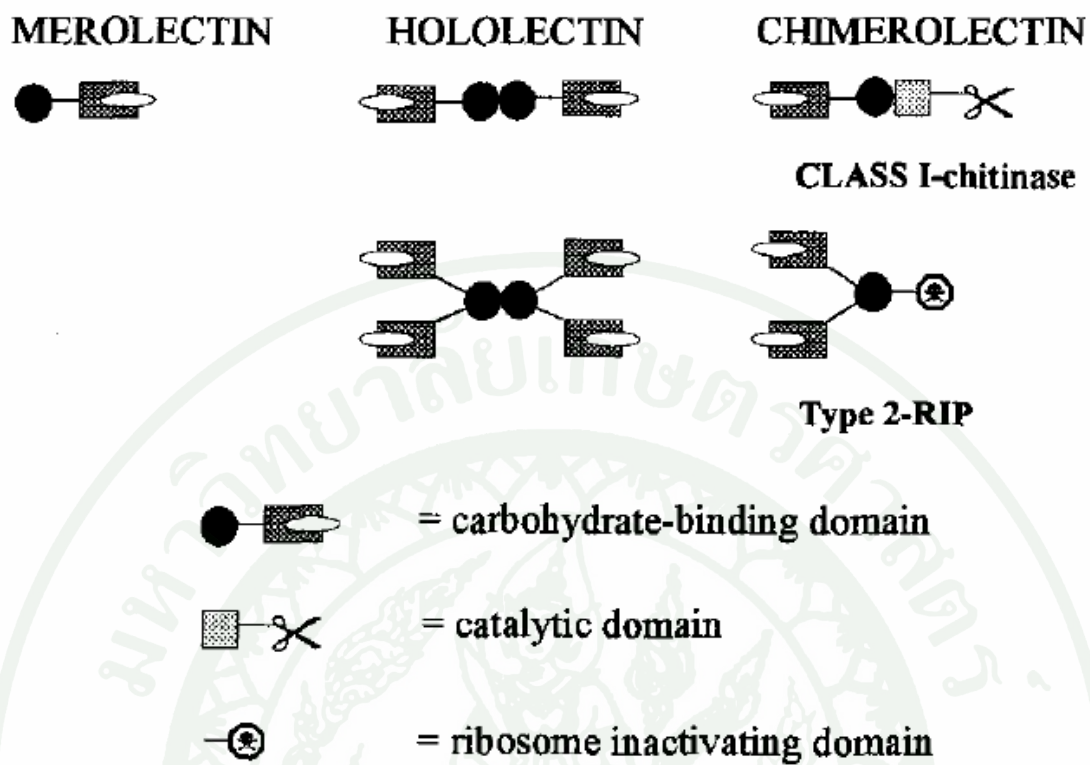
Van Damme. 1999. X-ray structure of the native (unligated) mannose-specific bulb lectin from *Scilla campanulata* (bluebell) at 1.7 Å resolution. **Acta Crystallogr D**55: 1264-1272.

Zhao, X., J. Yao, Z. Liao, H. Zhang, F. Chen, L. Wang, Y. Lu, X. Sun, S. Yu and K. Tang. 2003.

Molecular cloning of a novel mannose-binding lectin gene from *Arisaema heterophyllum*. **Plant Science** 165: 55-60.







ภาพผนวกที่ 1 การแสดงโครงสร้างของเลคตินตามโครงสร้างในธรรมชาติ

ที่มา: Peumans and Van Damme (1995)



ภาพผนวกที่ 2 สิงโตสมอหิน (*Bulbophyllum blepharistes* Rchb.f.)

ที่มา: ศรีประไพ และคณะ (2549); ชยพร (2551)



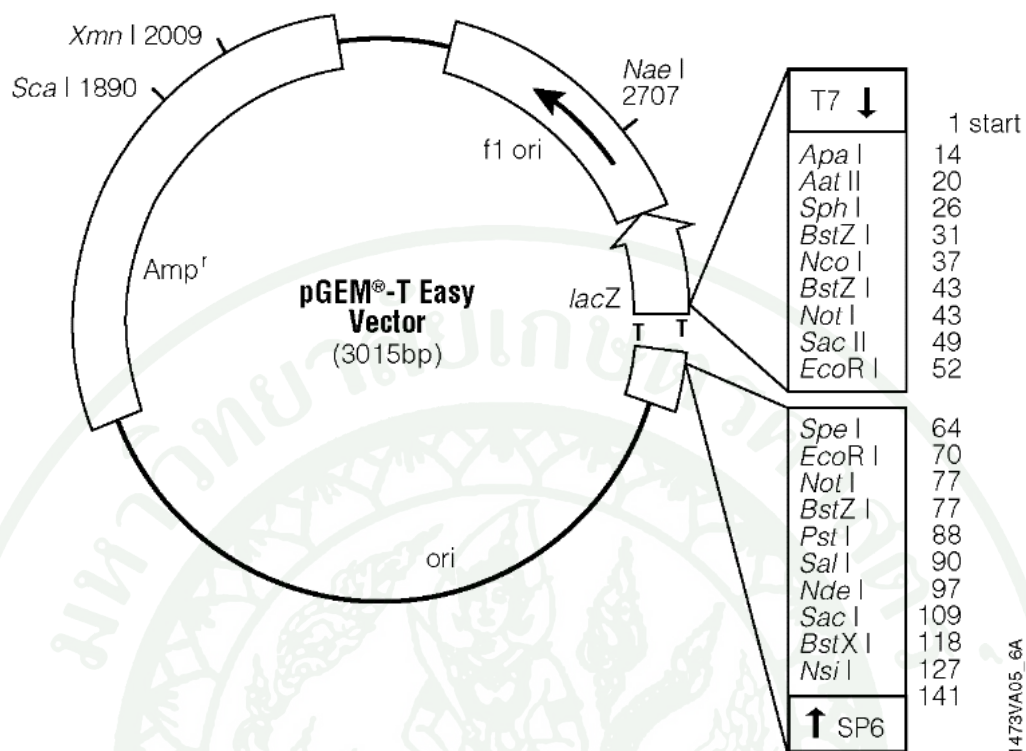
ภาพผนวกที่ 3 สิงโตรวงข้าว (*Bulbophyllum morphologorum* Kraenzl.)

ที่มา: เต๋น (2551); สารานุกรมไม้ประดับในประเทศไทย เล่ม1 (2548)



ภาพผนวกที่ 4 สิงโตรวงทอง (*Bulbophyllum orientale* Seidenf.)

ที่มา: ชรินทร์ และนัทรชัย (2552)



ภาพผนวกที่ 5 แผนที่สั้นของพลาสมิด pGEM®-T Easy

ที่มา: Brown (1998)


```

gi|431097|Listera      VPTKNGFSIMCILLCAASLALLLAIPS--SGSNTLGGGERLNSGESLTEGACVFIMQEDC 58
gi|436825|Epipactis   ---MASSIMTLLLCAASLTLLLAIPS--SGDNHLLTGQRLTTGSFLTEGGFTFIMQSDC 54
gi|436827|Cymbidium   --MGIFSIIIRTLTLLCAASLTILLANPSFCQCNHLLSGERLNPQSLTSGNVDLAMQYDC 58
                        * :*****:*** * . * * * :*.*. * . * * :***

```

```

gi|431097|Listera      NLVLYESSRPTWASGSYHQSGCYVTLQNDGNLVVYNNRRAVWASDTVRENIGNVILIL 118
gi|436825|Epipactis   NLVLYDLNRPIWASGTYGKGTGCFLSMQSDGNLVVYDVRNIAIWASNTARNN-GNYLLIL 113
gi|436827|Cymbidium   NLVLYDNGKSIWSSGTYGSGSGCYVTLQTDGNLVIYDNTNNPLWASNTSGEN-GNYILIL 117
                        ***** . . . *.*.*. *.*.*.:*.*.*.*. * .:*****: * * * :***

```

```

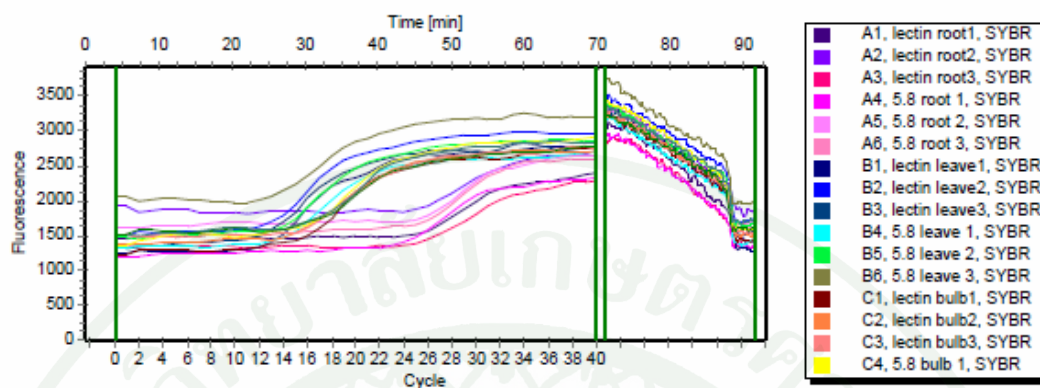
gi|431097|Listera      QKDHNVLVLYSLPIWATGTNRYG-SGVVVSAPRNGTVGISGAEQNKVSEIVRIVDVTGSV 176
gi|436825|Epipactis   QKDRNVVIYSQPIWATTTNIRGSAGVVIAPALNGTVGVSGAEQNKVSEMTNILEVTANV 172
gi|436827|Cymbidium   QKDRNLVIYSHPIWATGTNHAGSVAVVAAARNGTVGISGAEQNKVREIRKILKIMTDE 176
                        ***:*.*.*.***** * * .*:.*.*.*****:***** * .:.*.:

```

ภาพผนวกที่ 7 multiple alignment ของยีน *lectin* แสดงส่วนอนุรักษ์ในการออกแบบไพรเมอร์
 (..... ไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีนปลาย 3', — ไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์
 ยีนปลาย 5' และ คู่ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบการแสดงออก)

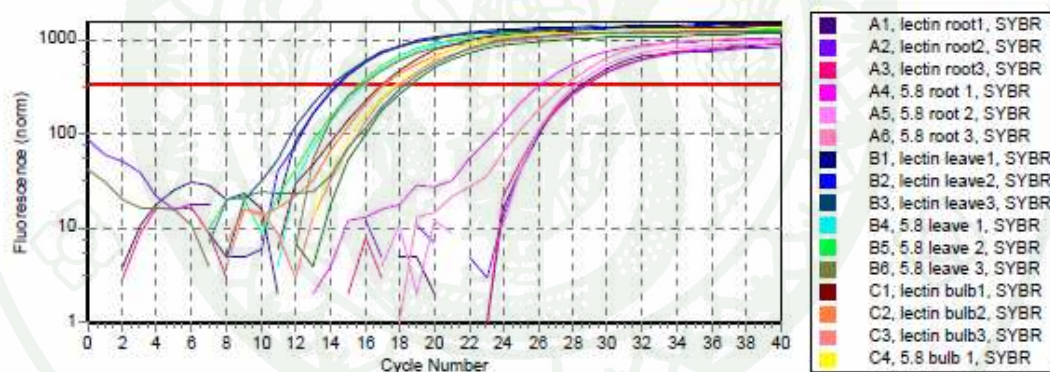
ก

Fluorescence Profile



ข

Amplification Plot



ภาพผนวกที่ 8 ข้อมูลดิบที่ได้จากการทำ qPCR

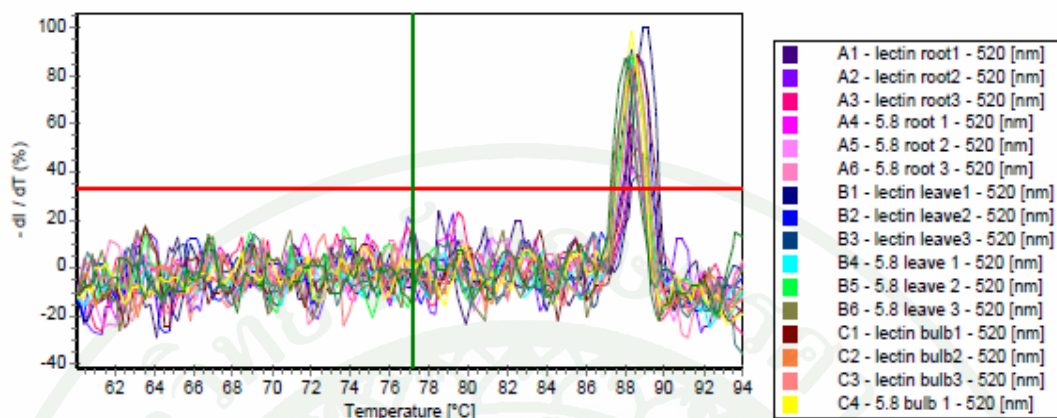
ก. Fluorescent profile

ข. Amplification plot

ค. Melting curve

ก

Melting curve



ภาพผนวกที่ 8 (ต่อ)

ตารางผนวกที่ 1 ค่า expression ratio ที่ได้จากการทำ qPCR โดยคำนวณค่าตามวิธีการของ Livak and Schmittgen (2001)

tissue	lectin mean CT	5.8rRNA mean CT	deltaCT	deltadeltaCT	expression ratio
<i>(B. morphologorum)</i>					
ใบ	14.30	15.78	-1.48	-2.87	7.31
ลำลูกกล้วย	17.40	18.28	-0.88	-0.27	1.21
ราก	28.67	27.28	1.39	0	1

โดยกำหนดให้

$$\text{deltaCT} = \text{lectin mean CT} - 5.8 \text{ rRNA mean CT}$$

$$\text{deltadeltaCT} = \text{deltaCT} - \text{deltaCT}_{\text{ราก}}$$

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

ตารางผนวกที่ 2 ค่า expression ratio ที่ได้จากการทำ qPCR

Pos	Name	Ct SYBR	Ct mean SYBR	Expr. Level SYBR	Range SYBR
A1	lectin root1	28.53	28.67		
A2	lectin root2	28.73	28.67		
A3	lectin root3	28.73	28.67		
A4	5.8 root 1	26.13	27.28		
A5	5.8 root 2	28.13	27.28		
A6	5.8 root 3	27.58	27.28		
B1	lectin leave1	14.36	14.30	7.27	6.10-8.67
B2	lectin leave2	14.49	14.30	7.27	6.10-8.67
B3	lectin leave3	14.06	14.30	7.27	6.10-8.67
B4	5.8 leave 1	15.91	15.78		
B5	5.8 leave 2	15.66	15.78		
B6	5.8 leave 3	15.78	15.78		
C1	lectin bulb1	17.02	17.40	4.80	3.01-7.64
C2	lectin bulb2	17.19	17.40	4.80	3.01-7.64
C3	lectin bulb3	17.98	17.40	4.80	3.01-7.64
C4	5.8 bulb 1	17.81	18.28		
C5	5.8 bulb 3	18.34	18.28		
C6	5.8 bulb 3	18.68	18.28		

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวศิริกาญจน์ กอบเกียรติกุล
วัน เดือน ปี ที่เกิด	21 กรกฎาคม พ.ศ. 2527
สถานที่เกิด	อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยทักษิณ (พ.ศ. 2550)
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. ประจำปี 2552
ผลงานนำเสนอ	เรื่องเต็มและภาคบรรยายเรื่อง การโคลนยีนเลคตินชนิดใหม่จากกล้วยไม้สกุลสิงโต (Molecular Cloning of a Novel <i>Lectin</i> Gene from <i>Bulbophyllum</i> orchid) งานประชุมวิชาการ พฤษศยศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 5