รายงานผลการวิจัย

เรื่อง การใช้ยีนสร้างแอนโทไซยานินเป็นยีนเครื่องหมายสำหรับการถ่ายยีนในพืชและเป็นยีนเป้าหมายเพื่อเพิ่มมูลค่าพืชเศรษฐกิจ

The use of a gene for production of anthocyanin pigment as a marker gene in plant transformation and as a target gene for increased value in crop plants

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2554
จำนวน 333,000 บาท

หัวหน้าโครงการ ผศ.ดร. ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์
ผู้ร่วมโครงการ อ.ดร. ศรีเมฆ ชาวโพงพาง
ผศ.ดร. แสงทอง พงษ์เจริญกิต
ผศ.ดร. วราภรณ์ แสงทอง

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

24 / 12 / 2555

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยแก่คณะผู้วิจัย ในปีงบประมาณ 2554 ขอขอบพระคุณ Professor Dr. Thomas W. Okita จาก Institute of Biological Chemistry, Washington State University ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้ออะโกรแบคทีเรียม และ binary vector และขอขอบพระคุณ ดร.เจษฎาพร พิทักษ์สุธีพงศ์ จากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำหรับการเป็นที่ปรึกษาโครงการวิจัยที่ให้คำแนะนำเป็นอย่างดี

ขอขอบพระคุณสาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้การสนับสนุนด้านสถานที่และเครื่องมือสำหรับการทำวิจัยเป็นอย่างดี และขอขอบพระคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ สำหรับการให้ใช้บริการโรงเรือนกระจกสำหรับปลูกพืช

นอกจากนี้ขอขอบคุณนายธวัชชัย บุญกลาง และนายพงศกร คันธรส นักศึกษาปริญญาตรี สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ นางสาววารุณี เหิมหาญ นักศึกษาปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และนางสาวพูนศรี อินต๊ะ นักศึกษาปริญญาโท สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่มีส่วนสำคัญทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้

คณะผู้วิจัย

ธันวาคม 2555

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ค
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	4
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
ตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	20
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล	39
สรุปผลการวิจัย	65
เอกสารอ้างอิง	67

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	องค์ประกอบของการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	23
ตารางที่ 2	องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มปริมาณชิ้นยีน *pap1*	24
ตารางที่ 3	องค์ประกอบของการตัด PCR product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	25
ตารางที่ 4	องค์ประกอบของปฏิกิริยาการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ (ligation)	26
ตารางที่ 5	องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ สำหรับใช้ตรวจสอบต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน	32
ตารางที่ 6	องค์ประกอบของพีซีอาร์ ในการวิเคราะห์ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *pap1* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1*	35
ตารางที่ 7	การทดสอบ competent cell บนอาหารแข็ง LB ที่เติมแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร	38
ตารางที่ 8	การถ่ายฝากพลาสมิดสายผสม (pKL1) เข้าสู่ competent cell และคัดเลือกโคลนบนอาหารแข็ง LB ที่เติม แอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร	43
ตารางที่ 9	ประสิทธิภาพการถ่ายยีน *pap1* เข้าสู่แคลลัสข้าวพันธุ์ Kitaake แสดงกลุ่มแคลลัสที่รอดบนอาหารคัดเลือก และการเกิดต้น	48
ตารางที่ 10	สรุปผลการทำพีซีอาร์ของต้นข้าวที่ผ่านการถ่ายยีน เพื่อตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมข้าว	52
ตารางที่ 11	ประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่ชิ้นส่วนใบยาสูบด้วยอะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ AGL1 ที่มีพลาสมิด pPAP1	54
ตารางที่ 12	สรุปผลการทำพีซีอาร์ของต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน เพื่อตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมยาสูบ	60-61

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	ลักษณะของต้นและรวง ของข้าวเจ้าหอมนิล (ก.) และลักษณะเมล็ดข้าว (ข.)	7
ภาพที่ 2	กระบวนการสังเคราะห์ฟลาโวลนอยด์	8
ภาพที่ 3	ลักษณะของต้นข้าวเหนียวดำ และเมล็ด	9
ภาพที่ 4	ตัวอย่างโครงสร้างและโมเลกุลของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)	10
ภาพที่ 5	รูปภาพทั่วไปของต้นยาสูบ	16
ภาพที่ 6	วิถีการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานิน	
ภาพที่ 7	แผนที่พลาสมิด pRTL2 แสดง 35S promoter with dual enhancer ต่อกับ TEV Leader coding sequence และ 35S terminator เพื่อใช้สำหรับโคลนยีน *pap1* เข้าที่ *Nco*I/*Sac*I sites โดยแทนที่ coding sequence นอกจากนี้ยังมียีนต้านยาแอมพิซิลิน (Ap^R) เพื่อใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิด	19
ภาพที่ 8	แผนที่พลาสมิด 3PAP-Red	20
ภาพที่ 9	แผนที่พลาสมิด pCAMBIA 1390	27
ภาพที่ 10	แผนที่ T – DNA ของพลาสมิด pCAMBIA 1390	28
ภาพที่ 11	การวิเคราะห์พลาสมิด pRTL2 ที่สกัดด้วยวิธี Alkaline lysis method	38
ภาพที่ 12	การวิเคราะห์พลาสมิด pRTL2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I และ *Sac*I เปรียบเทียบกับพลาสมิด pRTL2 ที่ยังไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (uncut pRTL2) ก) ก่อนตัดเจล และ ข) หลังตัดเจลที่มีแถบดีเอ็นเอ	39
ภาพที่ 13	การวิเคราะห์พลาสมิด pRTL2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I และ *Sac*I แล้วทำการแยกบริสุทธิ์โดยใช้ชุด PCR clean-up Gel extraction	39
ภาพที่ 14	การวิเคราะห์ชิ้นยีน *pap1* ที่ได้จากเทคนิค PCR	40
ภาพที่ 15	การวิเคราะห์ยีน *pap1* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I และ *Sac*I เปรียบเทียบกับยีน *pap1* ที่ยังไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (uncut *pap1*) ก) ก่อนตัดเจล และ ข) หลังตัดเจลที่มีแถบดีเอ็นเอ	41
ภาพที่ 16	การวิเคราะห์ชิ้นยีน *pap1* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I และ *Sac*I แล้วทำการการแยกบริสุทธิ์โดยใช้ชุด PCR clean-up Gel extraction	41
ภาพที่ 17	แผนที่พลาสมิด pKLI	42
ภาพที่ 18	การวิเคราะห์พลาสมิดที่สกัดได้จาก I:5 โคโลนีที่ I, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 1:3	44

หน้า

	โคโลนีที่ 1 โดยเปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb Ladder Plus ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอริซิส	
ภาพที่ 19	การวิเคราะห์โคลนที่มีพลาสมิดสายผสม pKL1 โดยตัดพลาสมิดที่สกัดได้จาก 1:5 โคโลนีที่ 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 1:3 โคโลนีที่ 1 ด้วยเอนไซม์ *Nco*1 และ *Sac*I โดยเปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb Ladder Plus ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอริซิส	44
ภาพที่ 20	การวิเคราะห์พลาสมิด pKL1 ที่ได้จากโคลน A1, A2, B1 และ B2 โดยตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I และ *Sac*I เปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb Ladder Plus ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอริซิส	45
ภาพที่ 21	การวิเคราะห์พลาสมิด pKL1 โคลน A1 Elute 1, A1 Elute 2, B1 Elute 1 และ B1 Elute 2 ที่ได้จากการสกัดด้วยชุดkit โดยเปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb Ladder Plus ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอริซิส	46
ภาพที่ 22	ลักษณะการเกิดแคลลัสของเมล็ดข้าวพันธุ์ Kitaake ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N6D ระยะเวลา 4 สัปดาห์	48
ภาพที่ 23	ลักษณะของแคลลัสภายหลังการปลูกถ่ายเชื้อและเพาะเลี้ยงร่วมเป็นระยะเวลา 3 วัน	48
ภาพที่ 24	ลักษณะแคลลัสที่รอดตายบนอาหารคัดเลือกสูตร N6D ดัดแปลง ครั้งที่ 2 หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์	49
ภาพที่ 25	**25** ลักษณะกลุ่มแคลลัสที่เกิดเป็นตายอดบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นครั้งที่ 2 หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (ก) ลักษณะของแคลลัสที่ต้านทานสารปฏิชีวนะและเกิดการแบ่งตัว (ข) ลักษณะของแคลลัสที่เกิดตายอดสีเขียว (ค) ลักษณะของแคลลัสที่เกิดตายอดสีขาว	49
ภาพที่ 26	ลักษณะของแคลลัสที่เจริญเป็นต้นบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นครั้งที่ 3 หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์	49
ภาพที่ 27	ลักษณะของต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ผ่านการถ่ายยีนและเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ระยะเวลา 3 สัปดาห์ (ก) ต้นข้าวปกติ (ข) ต้นข้าวสีขาว	50
ภาพที่ 28	ลักษณะของต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ผ่านการถ่ายยีน เพาะเลี้ยงในโรงเรือนกระจก (ก) เพาะลงดินอายุ 2 สัปดาห์ (ข) เพาะลงดินอายุ 5 สัปดาห์	50

หน้า

ภาพที่ 29 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ได้รับการถ่ายยีน *pap1* ครั้งที่ 1จำนวน 9 ต้น M คือ Lambda DNA/*Eco*Rl+*Hin*dlll Marker, C คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน (Control) และ 1 – 9 คือต้นข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนและด้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ได้แก่ ต้นที่ 3.1(1.1), 3.1(1.2), 3.1(1.3), 3.1(2.1), 3.1(3.1), 5.1(1.1), 5.1(1.1w), 3.1(1.4) และ 3.1(1.4w) ตามลำดับ 51

ภาพที่ 30 การตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมข้าวด้วยเทคนิคพีซีอาร์ครั้งที่ 1 โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1* โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder, N คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน (Negative control), P คือ พลาสมิด pPAP1 (Positive control), 1 – 9 คือ ต้นข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนและต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ได้แก่ ต้นที่ 3.1(1.1), 3.1(1.2), 3.1(1.3), 3.1(2.1), 3.1(3.1), 5.1(1.1), 5.1(1.1w), 3.1(1.4) และ 3.1(1.4w) ตามลำดับ และ W คือ น้ำกลั่น 52

ภาพที่ 31 ลักษณะของชิ้นส่วนใบยาสูบที่ผ่านการถ่ายยีน แล้วนำไปวางบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ดัดแปลง ที่ประกอบด้วย BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีโฟแทคซิม 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จะสังเกตเห็นว่า ชิ้นส่วนของใบยาสูบมีลักษณะสีเขียว 55

ภาพที่ 32 ลักษณะชิ้นส่วนใบยาสูบบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ดัดแปลง ที่ประกอบด้วย BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีโฟแทกซิม 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซิน 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

(ก) ลักษณะชิ้นส่วนของใบยาสูบที่สามารถด้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินได้ ซึ่งจะมีลักษณะเป็นสีเขียว

(ข) ลักษณะชิ้นส่วนของใบยาสูบที่รอดและตายบนอาหารคัดเลือก 55

ภาพที่ 33 ลักษณะชิ้นส่วนใบยาสูบบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ดัดแปลง ที่ประกอบด้วย BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีโฟแทกซิม 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซิน 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

(ก) ลักษณะการเกิดตายอดจากชิ้นส่วนของใบยาสูบ ซึ่งจะมีลักษณะเป็นตุ่มเล็กๆ สีเขียว ตามขอบของชิ้นส่วนใบยาสูบ

(ข) ลักษณะการเกิดตายอดสีแดงจากชิ้นส่วนของใบยาสูบ ซึ่งจะมีลักษณะเป็นตุ่มเล็กๆ สีแดงตามขอบของชิ้นส่วนใบยาสูบ 56

หน้า

ภาพที่ 34 ลักษณะของต้นยาสูบที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียมที่มีพลาสมิด pPAP1 เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในขวดที่มีอาหารคัดเลือกสูตร MS ดัดแปลง ที่ประกอบด้วย BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีโฟแทคซิม 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซิน 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ 56

(ก) ต้นยาสูบที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน (ต้นควบคุม)

(ข) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน แสดงต้นที่มีสีเขียว

(ค) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน แสดงต้นที่มีสีเขียวปนแดง

(ง) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน แสดงต้นที่มีสีแดง

ภาพที่ 35 ลักษณะของต้นยาสูบที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียมที่มีพลาสมิด pPAP1 แต่ต้นไม่สมบูรณ์ เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในขวดที่มีอาหารคัดเลือกสูตร MS ดัดแปลง ที่ประกอบด้วย ซีโฟแทคซิม 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซิน 30 มิลลิกรัมต่อลิตร 57

(ก) ต้นยาสูบที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน (ต้นควบคุม) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

(ข) ต้นยาสูบสีเขียวที่ได้รับการถ่ายยีน แสดงต้นที่ปกติ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

(ค) ต้นยาสูบสีแดงที่ได้รับการถ่ายยีน แสดงต้นที่ผิดปกติ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

(ง) ต้นยาสูบสีแดงที่ได้รับการถ่ายยีนและพัฒนาเป็นต้นสีเขียว เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 – 12 สัปดาห์ แสดงต้นที่ปกติ

ภาพที่ 36 การเกิดต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *pap1* แสดงการเกิดต้นสีเขียว ต้นสีเขียวปนแดง และต้นสีแดง จากการถ่ายยีน 5 ครั้ง 58

ภาพที่ 37 ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/ *Eco*RI + *Hin*dIII ช่อง C คือ ต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ช่องที่ 1 - 5 คือ ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน ต้น 7.1.11, 7.1.14, 7.2.9, 7.1.3 และ 7.4.5 ตามลำดับ 59

ภาพที่ 38 ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder ช่อง P คือ พลาสมิด pPAP1 (Positive control) ช่อง N คือต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (Negative control) ช่องที่ 1-5 คือ ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *pap1* ต้นที่ 7.1.11, 7.1.14, 7.2.9, 7.1.3 และ 7.4.5ตามลำดับ และช่อง H คือ น้ำกลั่น 59

การใช้ยีนสร้างแอนโทไซยานินเป็นยีนเครื่องหมายสำหรับการถ่ายยีนในพืชและเป็นยีนเป้าหมายเพื่อเพิ่มมูลค่าพืชเศรษฐกิจ

The use of a gene for production of anthocyanin pigment as a marker gene in plant transformation and as a target gene for increased value in crop plants

ช่อทิพา สกุลสิงหาโรจน์[1] ศรีเมฆ ชาวโพงพาง[2] แสงทอง พงษ์เจริญกิต[1]
และ วราภรณ์ แสงทอง แสงทอง[1]

Chotipa Sakulsingharoj[1], Srimek Chowpongpang[2], Saengtong Pongjaroenkit[1]
and Varaporn Sangtong[1]

[1]สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ 50290
[2]ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กทม. 10900

บทคัดย่อ

การถ่ายยีนเข้าสู่พืชส่วนใหญ่มีการใช้ยีนต้านสารปฏิชีวนะเข้ามาช่วยในการคัดเลือกชิ้นส่วนพืชที่ได้รับยีน ซึ่งทำให้เกิดความวิตกกังวลในเรื่องการถ่ายทอดยีนออกสู่สิ่งแวดล้อม งานวิจัยนี้จึงได้ทดลองใช้ยีนสร้างสีมาช่วยคัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายยีน โดยได้ทำการถ่ายยีนควบคุมการสร้างแอนโทไซยานิน ซึ่งคือยีน *pap1* เข้าสู่ข้าวพันธุ์ Kitaake โดยใช้อะโกรแบคทีเรียม จากการทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีน พบว่า กลุ่มแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนสามารถรอดบนอาหารคัดเลือกได้เป็น 98 เปอร์เซ็นต์ หลังเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นกลุ่มแคลลัสสามารถเกิดยอดสูงสุดคิดเป็น 11 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งยอดพัฒนาเกิดต้นสูงสุดคิดเป็น 13 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำต้นที่ได้ 18 ต้นมาทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ และตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1* พบว่า มี 4 ต้นที่เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 400 คู่เบส แสดงว่าเป็นข้าวดัดแปลงพันธุกรรมที่มียีน *pap1* แทรกอยู่ในจีโนม

นอกจากนี้ได้ใช้ยีน *pap1* ถ่ายเข้าสู่ยาสูบพันธุ์เบอร์เลย์ ด้วยอะโกรแบคทีเรียม และมีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินเป็นสารคัดเลือก พบว่าชิ้นส่วนใบยาสูบรอดบนอาหารคัดเลือกหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์สูงสุด คิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ชิ้นส่วนของใบยาสูบที่สามารถต้านทาน

ต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินจะมีลักษณะเป็นสีเขียว และบริเวณขอบของชิ้นส่วนใบมีดายอดเกิดขึ้นสูงสุดคิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ในบางชิ้นส่วนมีดายอดสีแดงเกิดขึ้นสูงสุดคิดเป็น 44.44 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าตายอดที่เกิดตามขอบของชิ้นส่วนใบยาสูบพัฒนาเป็นต้นสมบูรณ์ทั้งหมดจำนวน 53 ต้น โดยแยกเป็นต้นสีเขียวจำนวน 37 ต้น ต้นสีเขียวปนแดงจำนวน 11 ต้น และต้นที่แดงจำนวน 5 ต้น สำหรับต้นที่ผ่านการถ่ายยีนและต้านทานต่อสารปฏิชีวนะทั้งหมดจำนวน 26 ต้น เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมต้นยาสูบ มีจำนวน 12 ต้นที่ให้ผลพีซีอาร์บวก คือต้นสีเขียวจำนวน 7 ต้น ต้นสีเขียวปนแดงจำนวน 2 ต้น และต้นสีแดงจำนวน 3 ต้น คิดเป็น 46.15 เปอร์เซ็นต์ จากงานวิจัยนี้พบว่า สามารถนำยีน *pap1* ซึ่งควบคุมการสร้างแอนโทไซยานินไปใช้คัดเลือกยาสูบที่ได้รับยีนแทนการใช้ยีนต้านสารปฏิชีวนะได้

คำสำคัญ: ข้าว, ยาสูบ, ยีน *pap1*, แอนโทไซยานิน, ยีนเครื่องหมาย, การถ่ายยีน

Abstract

Antibiotic resistant genes were generally used in plant gene transfer system to select transgenic cells or tissues. There are public eoncerns about those genes in human health and environments. In this research, a gene for production of anthoeyanin pigment (*pap1*) was investigated for the use as seleetable marker gene in transformation of rice. Transformation of rice CV. Kitaake with *pap1* gene was condueted by *Agrobacterium*. The results showed 98% of hygromycin – resistant calli after 2 cycles of selection. The surviving calli were regenerated to shoots at 11% 4 -5 weeks after culture on regeneration medium. The transformed rice plants were developed at 13%. Leaf genomic DNA from the transformed plants were extracted and subjected to PCR technique using primers specific to *pap1* gene. Three out of eighteen transformed plants showed PCR products of 400 bp, indicating the presence of *pap1* gene in their plant genome.

In this study, leaf explants of tobacco cv. burley were transformed with *pap1* gene by *Agrobacterium* method. After 4 week-culture, the percentage of surviving leaf explants on selection medium containing hygromycin was 50%. The hygromycin resistant explants appeared green and all surviving explants generated shoot buds around the leaf edges. Some explants had red buds at 44.44%. After 8 week-culture, the shoot buds developed to 53 plantlets. The

transformed tobacco plants were green (like control untransformed plants) and red, which consisted of 37 green plants, 14 green plants with pink or red at leaf edges and 5 dark red plants. These transformed tobacco plants were analyzed by PCR teehnique to investigate the integration of *pap1* gene in plant genome. There were 12 plants that showed PCR positive results which consisted of 7 green plants, 2 green-red plants and 3 red plants. This research showed that the *pap1* gene ,which controls anthocyanin production, can be used as a selectable marker gene in transformation of tobacco.

Keywords: rice, tobacco, *pap1* gene, anthocyanin, marker gene, transformation

คำนำ

ระบบการส่งถ่ายยีนในปัจจุบัน มีการใช้ยีนต้านสารปฏิชีวนะและยีนต้านสารปราบวัชพืช มาใช้เป็นยีนเครื่องหมายคัดเลือกอย่างกว้างขวางซึ่งมีข้อกังวลในหลายด้าน เช่น การบริโภคยีนต้านสารปฏิชีวนะ และยีนต้านสารปราบวัชพืชอาจเป็นอันตรายต่อมนุษย์ สัตว์ และระบบนิเวศต่าง ๆ ดังนั้นจึงมีการพัฒนาระบบการถ่ายยีนเพื่อหลีกเลี่ยงการใช้ยีนต้านสารปฏิชีวนะและยีนต้านสารปราบวัชพืช เช่น การใช้ยีนสร้างสีเพื่อช่วยในการคัดเลือกเซลล์พืชที่ได้รับยีน

แอนโทไซยานิน คือรงควัตถุที่สังเคราะห์โดย secondary metabolic pathway จากกรดอะมิโน phenylalanine ทำให้เกิดสีต่าง ๆ ในพืช ในกระบวนการของการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน มียีนที่เกี่ยวข้องหลายยีน ยีน *pap1* (production of anthocyanin pigment) เป็นยีนสร้าง MYB transcription factor ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน และยังมีผลทำให้ส่งเสริมการแสดงออกของยีนหลายยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฟลาโวนอยด์

การพัฒนาในส่วนของยีนคัดเลือก ในการถ่ายยีนอาจใช้ยีนสร้างแอนโทไซยานินซึ่งก็คือยีนสีเข้ามาช่วยในการคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับยีน แทนการใช้ยีนต้านสารปฏิชีวนะและยีนต้านสารปราบวัชพืชเป็นยีนคัดเลือก ซึ่งจะเป็นการลดข้อวิตกกังวลในเรื่องของการถ่ายทอดยีนต้านสารปฏิชีวนะและสารปราบวัชพืช ในพืชที่ทำการดัดแปลงพันธุกรรมออกไปสู่สิ่งแวดล้อม

ในการทดลองนี้จึงได้ทำการถ่ายยีน *pap1* ซึ่งเป็นยีนควบคุมการสร้างแอนโทไซยานินเข้าสู่ข้าวพันธุ์ Kitaake และยาสูบพันธุ์เบอร์เลย์ด้วยอะโกรแบคทีเรียม เพื่อใช้เป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือกพืชดัดแปลงพันธุกรรมได้โดยง่าย โดยดูได้จากการเกิดสีของแอนโทไซยานิน และเป็นยีนรายงานผลสำหรับการถ่ายยีนเข้าสู่ข้าวและยาสูบ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาการใช้ยีนสร้างแอนโทไซยานินเป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายยีน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถใช้ยีน *pap1* เป็นยีนเครื่องหมายสำหรับการคัดเลือกพืชที่ได้รับยีนได้โดยง่ายจากการเกิดสีแดง

การตรวจเอกสาร

ข้าว

ข้าวเป็นพืชอาหารที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลก โดยเฉพาะประเทศในภูมิภาคเอเชียที่นิยมรับประทานข้าวเป็นอาหารประจำวันมากกว่าในภูมิภาคอื่นๆของโลก การผลิต บริโภคและการค้าข้าวส่วนใหญ่จึงกระจุกตัวอยู่ในทวีปเอเชีย แต่ข้าวที่ผลิตได้ส่วนใหญ่จะใช้ในการบริโภคภายในประเทศ ทำให้มีข้าวเพียงร้อยละ 6 เท่านั้นที่เข้าสู่ตลาดการค้าข้าวระหว่างประเทศ โดยประเทศที่มีบทบาทมากที่สุดในการส่งออกข้าว คือประเทศไทย รองลงมาคือ อินเดีย เวียดนาม จีนและพม่า ตามลำดับ โดยไทยส่งออกข้าวปีละประมาณ 7 ล้านตัน เป็นสัดส่วนประมาณร้อยละ 30 ของการส่งออกข้าวทั้งหมดทั่วโลก

พันธุ์ข้าว (เศรษฐกิจการเกษตร,2542: ระบบออนไลน์)

ข้าวที่นำมาปลูกเป็นอาหารนั้นแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ ข้าว *Oryza saiva* ปลูกในทวีปเอเชียและ *Oryza glaberrima* ปลูกในทวีปแอฟริกา แต่ข้าวที่ค้าขายกันในตลาดโลกเกือบทั้งหมดเป็นข้าวที่ปลูกจากแถบเอเชีย ซึ่งข้าวชนิดดังกล่าวยังสามารถแบ่งได้ตามแหล่งปลูกอีก คือ

1.) ข้าวอินดิกา (Indica) มีลักษณะเมล็ดยาวรี ต้นสูง เป็นข้าวที่ปลูกในเอเชียเขตมรสุม ตั้งแต่ จีน เวียดนาม ฟิลิปปินส์ ไทย อินโดนีเซีย อินเดีย และศรีลังกา ข้าวพันธุ์นี้ค้นพบครั้งแรกในอินเดียและต่อมาได้พัฒนาไปปลูกที่ทวีปอเมริกา

2.) ข้าวจาปอนิกา (Japonica) เป็นข้าวที่ปลูกในเขตอบอุ่น เช่น จีน ญี่ปุ่น เกาหลี มีลักษณะเมล็ดป้อม กลมรี ต้นเตี้ย

3.) ข้าวจาวานิกา (Javanica) ปลูกในอินโดนีเซียและฟิลิปปินส์ มีเมล็ดป้อมใหญ่ แต่ไม่ได้รับความนิยมเพราะให้ผลผลิตต่ำ

สำหรับข้าวที่ปลูกในไทยเป็นพันธุ์ข้าวเมล็ดยาว คือ ข้าวอินดิกา แต่ประกอบด้วยหลายพันธุ์ทั้งที่มีการพัฒนาขึ้นใหม่ และข้าวพันธุ์พื้นเมืองซึ่งมีอยู่ประมาณ 3,500 พันธุ์ ซึ่งมีข้าวป่า ข้าวพื้นเมือง และข้าวที่ผสมโดยมนุษย์ขึ้นมาใหม่

ลักษณะที่สำคัญของข้าว (สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน เล่ม 3: ระบบออนไลน์)

ลักษณะที่สำคัญของข้าวแบ่งออกได้เป็นลักษณะที่เกี่ยวกับการเจริญเติบโต และลักษณะที่เกี่ยวกับการขยายพันธุ์ ดังนี้

1. ลักษณะที่เกี่ยวกับการเจริญเติบโต

ลักษณะที่มีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของต้นข้าว ได้แก่ ราก ลำต้น และใบ

1.1 ราก รากเป็นส่วนที่อยู่ใต้ผิวดิน ใช้ยึดลำต้นกับดินเพื่อไม่ให้ต้นล้ม แต่บางครั้งก็มีรากพิเศษเกิดขึ้นที่ข้อซึ่งอยู่เหนือพื้นดินด้วย ต้นข้าวไม่มีรากแก้ว แต่มีรากฝอยแตกแขนงกระจายแตกแขนงอยู่ใต้ผิวดิน

1.2 ลำต้น มีลักษณะเป็นโพรงตรงกลางและแบ่งออกเป็นปล้องๆ โดยมีข้อกั้นระหว่างปล้อง ความยาวของปล้องนั้นแตกต่างกัน จำนวนปล้องจะเท่ากับจำนวนใบของต้นข้าว ปกติมีประมาณ 20-25 ปล้อง

1.3 ใบ ต้นข้าวมีใบไว้สำหรับสังเคราะห์แสง เพื่อเปลี่ยนแร่ธาตุ อาหาร น้ำ และคาร์บอนไดออกไซด์ให้เป็นแป้ง เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและ สร้างเมล็ดของต้นข้าว ใบประกอบด้วย กาบใบและแผ่นใบ

2. ลักษณะที่เกี่ยวกับการขยายพันธุ์

ต้นข้าวมีการขยายพันธุ์ด้วยเมล็ดซึ่งเกิดจากการผสมระหว่างเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย เพราะฉะนั้นลักษณะที่สำคัญเกี่ยวกับการ ขยายพันธุ์ ได้แก่ รวง ดอกข้าวและเมล็ดข้าว

2.1 รวงข้าว (panicle) หมายถึงช่อดอกของข้าว (inflorescence) ซึ่งเกิดขึ้นที่ข้อของปล้องอันสุดท้ายของต้นข้าว ระยะระหว่างข้ออันบนของปล้องอันสุดท้ายกับข้อต่อของใบธง เรียกว่า คอรวง

2.2 ดอกข้าว หมายถึง ส่วนที่เกสรตัวผู้และเกสรตัวเมียสำหรับผสมพันธุ์ ดอกข้าวประกอบด้วยเปลือกนอกใหญ่สองแผ่นประสานกัน เพื่อห่อ หุ้มส่วนที่อยู่ภายในไว้ เปลือกนอกใหญ่แผ่นนอกเรียกว่า เลมมา (lemma) ส่วนเปลือกนอกใหญ่แผ่นใน เรียกว่า พาเลีย (palea) ทั้งสองเปลือกนี้ภายนอกของมันอาจมีขนหรือไม่มีขนก็ได้

2.3 เมล็ดข้าว หมายถึง ส่วนที่เป็นแป้งที่เรียกว่า เอ็นโดสเปิร์ม (endosperm) และส่วนที่เป็นคัพภะซึ่งห่อหุ้มไว้โดยเปลือกนอกใหญ่สองแผ่น เอ็น โดสเปิร์มเป็นแป้งที่เราบริโภค คัพภะเป็นส่วนที่มีชีวิตและงอกออกมาเป็นต้นข้าวเมื่อเอาไปเพาะ

ข้าวพันธุ์ Kitaake

ข้าวพันธุ์ Kitaake จัดอยู่ในสายพันธุ์จาปอนิกา (Toki, 1997) มีโครโมโซมเป็น 2n = 2x = AA = 24 (สมศักดิ์ และคณะ, 2542) ลำต้นเตี้ย ความสูงประมาณ 60 – 100 เซนติเมตร ใบสั้นและแคบ เมล็ดป้อมสั้น ลักษณะพิเศษของข้าวญี่ปุ่น คือ ข้าวสารสุกได้อุณหภูมิต่ำประมาณ 65 – 85 องศาเซลเซียส ปริมาณอะไมโลสต่ำ ทำให้ข้าวสุกนุ่ม นวล ยืดหยุ่น และเหนียวคล้ายมียาง เมล็ดข้าวสุกจะเกาะกันต่างจากข้าวอินดิกาที่ปริมาณอะไมโลสสูง เมื่อหุงเสร็จข้อนข้างร่วนซุย ข้าวญี่ปุ่นใช้เวลาเพาะปลูก

จนถึงเก็บเกี่ยวเพียง 3 เดือน เป็นข้าวที่ไม่ต้องการใช้น้ำมากจึงเหมาะสำหรับที่เพาะปลูกที่ขาดแคลนน้ำและอายุเพาะปลูกสั้น

ข้าวที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสี

ข้าวเจ้าหอมนิล (บริษัท สีนิลไรซ์ จำกัด : ระบบออนไลน์)

เป็นข้าวที่กลายพันธ์จากข้าวเหนียวดำต้นเตี้ยของจีน โดยมีความสูงประมาณ 60-75 เซนติเมตร อายุวันเก็บเกี่ยว 95-105 วัน แตกกอดี ลำต้นและใบสีเขียวปนม่วง เมล็ดยาวมีสีม่วงเข้ม (ภาพที่ 1) กลิ่นหอม ผลผลิตประมาณ 400-700 กิโลกรัมต่อไร่ จากการศึกษาเอกลักษณ์พันธุกรรม โดยใช้ microsatellite จำนวน 48 ตำแหน่ง ชี้ให้เห็นว่า ข้าวเจ้าหอมนิลมีความแตกต่างข้าว Hei Bao และ Xua Bue Huq จากจีน แสดงให้เห็นว่า ข้าวทั้ง 3 ไม่ได้เป็นข้าวพันธุ์เดียวกัน

(ก.) (ข.)

ภาพที่ 1 ลักษณะของต้นและรวง ของข้าวเจ้าหอมนิล (ก.) และลักษณะเมล็ดข้าว (ข.)
ที่มา: บริษัท สีนิลไรซ์ จำกัด, 2553: ระบบออนไลน์

ข้าวเจ้าหอมนิลนับเป็นข้าวที่มีโภชนาการสูง โดยมีโปรตีนอยู่ในช่วงประมาณ 10-12.5 % มีแคลเซียม 4.2 มิลลิกรัมต่อ100 กรัม ธาตุเหล็กแปรปรวนระหว่าง 2.25-3.25 มิลิกรัมต่อ 100 กรัม และธาตุสังกะสีประมาณ 2.9 มิลลิกรัม มีปริมาณ antioxidation สูงประมาณ 293 ไมโครโมลต่อกรัม จากข้อมูลทางโภชนาการนับได้ว่าข้าวเจ้าหอมนิล เป็นข้าวที่มีศักยภาพในการแปรรูปทางอุตสาหกรรมอาหารสูง เช่น cracker หรือ cooky

คุณประโยชน์ของสีม่วงในข้าวเจ้าหอมนิล

ข้าวเจ้าหอมนิลมีเมล็ดสีม่วงดำ เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสีของเมล็ด สีม่วงดำประกอบไปด้วย สีม่วงเข้ม (cyanidin) สีชมพูอ่อน (peonidin) และสีน้ำตาล (procyanidin) ผสมกัน ซึ่งสีที่เห็นนั่นเป็นสารประกอบกลุ่ม flavonoid ที่เรียกว่า สารแอนโทไซยานิน (anthocyanin) ที่ประกอบไปด้วยสาร

cyanidin กับ สาร peonidin สารโปรแอนโทไซยานิดิน (proanthocyanidin) ประกอบด้วยสาร procyanidin (ภาพที่ 2) ซึ่งสารดังกล่าวทั้งหมดนี้เป็นสาร antioxidant ที่ทำหน้าจับกับอนุมูลอิสระแล้วช่วยทำให้กลไกลการทำงานของร่างกายมีประสิทธิภาพมากขึ้นกว่าปกติ

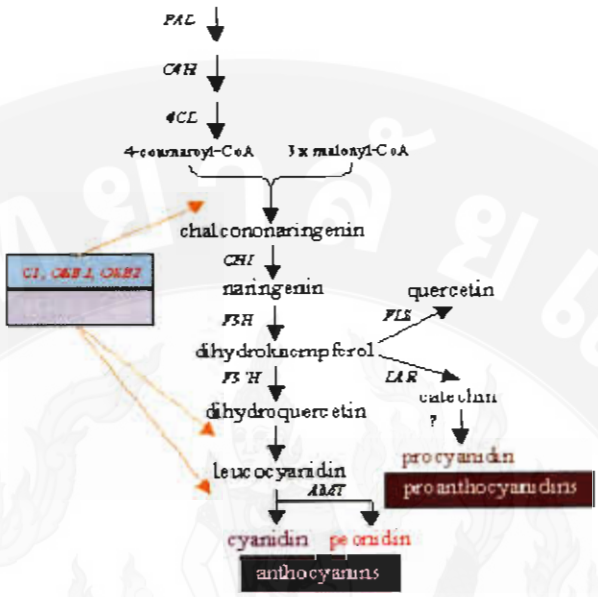
สารแอนโทไซยานิน มีรายงานวิจัยพบว่า สามารถช่วยลดการอักเสบของเนื้อเยื่อ ช่วยลดไขมันอุดตันในเส้นเลือดที่หัวใจ และสมอง บรรเทาโรคเบาหวาน ช่วยบำรุงสายตาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการมองเห็นเวลามองตอนกลางคืน สาร cyanidin มีประสิทธิภาพในการ antioxidation ได้ดีกว่าวิตามินอี หลายเท่า และยังยับยั้งการเจริญเติบโตของ epidermal growth factor receptor ในเซลล์มะเร็ง สารโปรแอนโทไซยานิดิน หรือเรียกว่าสาร condensed tannins มีรายงานวิจัยพบว่า สารโปรแอนโทไซยานิดิน ทำการ antioxidation ได้ดีกว่าวิตามินซี วิตามินอี และ เบต้าแคโรทีน (beta-carotene) สาร โปรแอนโทไซยานิดิน ยังไปจับกับอนุภาคของกัมมันตภาพรังสีทำให้เซลล์ในร่างกายทำงานได้อย่างปกติ และช่วยลดไขมันอุดตันในเส้นเลือดป้องกันโรคหัวใจ และโรคความดันโลหิตสูง ยังยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านม ปอด กระเพาะอาหาร และเม็ดเลือดขาว และยังป้องกันไวรัส HSV-1 และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ reverse transcriptase ใน ไวรัส HIV

การศึกษายีนที่ควบคุมการสังเคราะห์สีในเมล็ดข้าวเจ้าหอมนิล

ข้าวเจ้าหอมนิลมีเมล็ดข้าวกล้องสีดำ แต่ที่จริงคือสีม่วงเข้มที่สะสมอยู่ในส่วนของรำ (pericarp) ซึ่งประกอบไปด้วยทั้งหมดสามสี คือ สีน้ำตาลอ่อน (procyanidin), สีแดง (peonidin), และสีม่วง (cyanidin) (ภาพที่ 2) สีทั้งหมดของข้าวเป็นรงควัตถุ (pigments) ที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ flavonoid ในต้นข้าวซึ่งอาศัย 2 ปัจจัยหลักคือ

1.) ปัจจัยของพันธุกรรม (genetic factor) เช่น ระบบการทำงานของยีนควบคุม (regulatory genes) และยีนโครงสร้าง

2.) ปัจจัยของสภาพแวดล้อม (Environment factor) เช่น สภาพของดิน แร่ธาตุ สารอาหาร pH อุณหภูมิ และแสง



ภาพที่ 2 กระบวนการสังเคราะห์ฟลาโวลนอยด์
ที่มา: บริษัท สีนิลไรซ์ จำกัด, 2553: ระบบออนไลน์

ในข้าวสีดำจะมีการแสดงออกของยีนควบคุมการสังเคราะห์สี OSB1 ถูกแปลรหัสสารพันธุกรรม (translational) ไปเป็นโปรตีนที่ควบคุม การแสดงออกยีนโครงสร้าง (transcriptional activator) ส่วนในข้าวสีขาวไม่มีการแสดงออกยีนนี้

ข้าวเหนียวดำหรือข้าวก่ำ

ข้าวเหนียวดำหรือข้าวก่ำ (ภาพที่ 3) คือข้าวเหนียวที่มีเยื่อหุ้มเมล็ด (pericarp) สีม่วงแดงจนถึงสีดำ รวมทั้งการมีรงควัตถุ (pigment) ที่ปรากฏสีในส่วนต่างๆ ของต้นข้าว ซึ่งเป็นลักษณะประจำพันธุ์ของข้าวชนิดนี้ รงควัตถุที่มีสีส่วนใหญ่พบในส่วนของลำต้น ใบ และเกือบทุกส่วนของช่อดอก (floral part) ยกเว้นในส่วนของ embryo หรือ endosperm ที่ไม่พบการกระจายตัวของรงควัตถุ

ภาพที่ 3 ลักษณะของต้นข้าวเหนียวดำ และเมล็ด
ที่มา: ลัดดาวัลย์ กรรณนุช, 2553: ระบบออนไลน์

โดยทั่วไปข้าวเหนียวดำที่เกษตรกรปลูกเป็นข้าวพันธุ์พื้นเมือง ที่มีการปลูกเฉพาะพื้นที่มาเป็นเวลานานแล้ว และเกษตรกรจะเก็บเมล็ดพันธุ์ไว้สำหรับปลูกในฤดูปลูกต่อไปเอง พันธุ์ข้าวเหนียวดำที่เกษตรกรใช้ปลูกเป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตต่อพื้นที่ต่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับข้าวพันธุ์อื่นๆ นอกจากนี้ยังรวมถึงคุณภาพการหุงต้มของข้าวเหนียวดำยังไม่ดีพอ เช่น หลังจากหุงต้มแล้วข้าวแข็งและร่วนจนเกินไป และกลิ่นไม่หอม เป็นต้น ดังนั้นการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อเพิ่มผลผลิตและคุณภาพผลผลิตของข้าวเหนียวดำ โดยเฉพาะคุณภาพการหุงต้มจึงมีความจำเป็น การรวบรวมพันธุ์ข้าวเหนียวดำและนำมาปลูกเพื่อประเมินลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการให้ผลผลิตของข้าวเหนียวดำพันธุ์พื้นเมืองจึงมีความสำคัญ เพราะข้อมูลจากการศึกษาจะเป็นประโยชน์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ข้าวเหนียวดำต่อไป

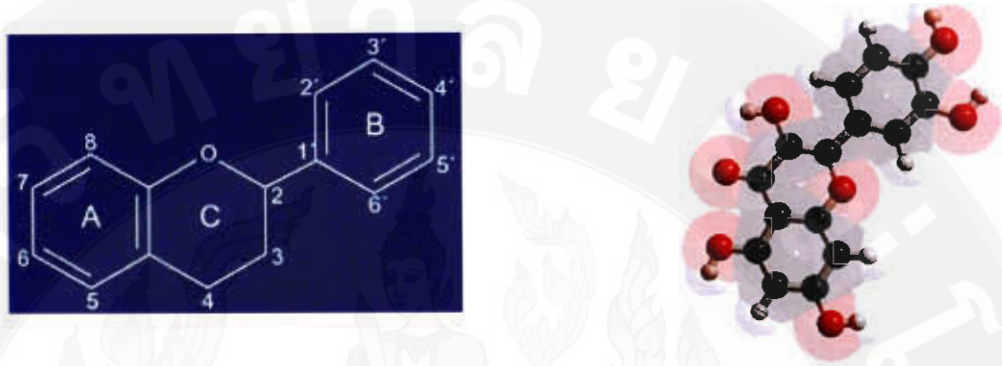
ข้าวเหนียวดำมีสารประกอบที่มีประโยชน์ต่อร่างกายที่สูงกว่าข้าวขาวกล่าวคือ มีสารแกมมา-โอไรซานอล (gamma oryzanol) ซึ่งเป็นสารประกอบที่พบในรำข้าวเหนียวดำปริมาณสูงถึง 2.70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับรำข้าวขาวซึ่งมีประมาณ 1.12 เปอร์เซ็นต์ (Teltathum, 2004) ตามภูมิปัญญาท้องถิ่นเชื่อกันว่าข้าวเหนียวดำเป็นสมุนไพร สารแกมมา-โอไรซานอลในน้ำมันรำข้าวมีคุณสมบัติเป็นสารแอนติออกซิแดนท์ ที่ดีกว่าวิตามินอี วิตามินซีและเบต้าแคโรทีน (สมวงษ์, 2546) นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถลดการดูดซึมคอเรสเตอรอลจากอาหารสู่ร่างกาย ลดการสังเคราะห์คอเรสเตอรอลในตับ ลดปริมาณคลอเรสเตอรอลในพลาสมา (DeJian et al., 2002) ลดอาการผิดปกติในสตรีวัยที่กำลังจะหมดประจำเดือน (Zu et al., 2001)

นอกจากนั้นแล้ว ข้าวเหนียวดำยังมีรงควัตถุที่สำคัญคือ แอนโทไซยานิน (anthocyanin) ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (antioxidation) ช่วยการหมุนเวียนของกระแสโลหิต ชะลอการเสื่อมของเซลล์ร่างกาย โดยเฉพาะแอนโทไซยานินชนิดที่พบในข้าวสีม่วงกลุ่มอินดิกา (indica type) (ซึ่งก็รวมข้าวเหนียวดำไทย) คือ cyanindin 3-glucoside มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอดได้อีกด้วย

ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) (นิตินุช สุดหนองบัว. 2553, ระบบออนไลน์)

ฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) เป็นสารกลุ่มที่รู้จักกันทั่วไปเกี่ยวกับความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (สารประกอบที่สามารถป้องกันหรือชะลอการเกิดกระบวนการออกซิเดชัน)

พบในธรรมชาติโดยเฉพาะในผลไม้ตระกูลส้ม เบอรี่ หัวหอม ชา โดยเฉพาะชาขาวและชาเขียว ไวน์แดง เป็นต้น



ภาพที่ 4 ตัวอย่างโครงสร้างและโมเลกุลของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)
ที่มา: นิตินุช สุดหนองบัว. 2553, ระบบออนไลน์

ตัวอย่างสารฟลาโวนอยด์ (ภาพที่ 4)

สารฟลาโวนอยด์ที่น่าสนใจหลายกลุ่มที่มีบทบาทที่สำคัญ Anthocyanidins, Catechins, Flavones, Isoflavones, Lignin, Tannins

สำหรับฟลาโวนอยด์หลายชนิดที่มีสี ที่จัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์จะมีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกัน แต่ก็มีคุณสมบัติแตกต่างกันมาก อาจแบ่งฟลาโวนอยด์ออกเป็นกลุ่ม 3 กลุ่ม คือ

1.) แอนโธซานติน มีสีเหลืองนวล

2.) แอนโทไซยานิน มีสีม่วงแดง

3.) แทนนิน ไม่มีสีแต่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลได้ง่าย

กลุ่มสารฟลาโวนอยด์ (Flavonoid)

เป็นสารที่มีอยู่ในกลุ่มโพลีฟีนอล (สารประกอบฟีโนลิก) มีบทบาทในการช่วยชะลอความแก่ต่อต้านการเกิดมะเร็ง และหัวใจได้

สมบัติเฉพาะของสารฟลาโวนอยด์ (Flavonoid)

เป็นกลุ่มสารที่ให้สีสันแก่พืช รวมถึงสีสันสวยงามของกลีบดอกไม้ สารกลุ่มนี้สามารถดูดซับ

รังสีอุลตร้าไวโอเลตได้ดีและเปล่งออกมา เป็นแสงสีต่างๆของดอกไม้ พืชได้พัฒนากระบวนการสร้างฟลาโวนอยด์ขึ้นเพื่อป้องกันอันตรายจากรังสีอุลตร้าไวโอเลต

การทำงานของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์

สามารถทำงานร่วมกับวิตามินซี โดยสามารถเปลี่ยนให้เป็นรูปแบบที่ออกฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีได้ นอกจากนี้ฟลาโวนอยด์ยังสัมพันธ์กับการควบคุมการสร้างไนตริกออกไซด์ (Nitric Oxide) ที่จำเป็นต่อการไหลเวียนโลหิต รวมทั้งการส่งผ่านสารอาหารให้กับเซลล์ประสาทอีกด้วยโดยปกติธรรมชาติอาจพบอนุพันธุ์ ฟลาโวนอยด์ในรูปของโพแอนโทไซยานิดิน (Proanthocyanidin) ในบิลเบอร์รี่ ซึ่งจะช่วยป้องกันการทำลายหลอดเลือดในดวงตา รวมทั้งยังช่วยส่งเสริมระบบไหลเวียนโลหิตอีกด้วยขณะที่ในชาเขียวจะพบสารฟลาโวนอยด์ที่มีบทบาทสำคัญในการป้องกันการทำลายเซลล์จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันแอลดีแอล

การต้านอนุมูลอิสระ

สามารถป้องกันความเสื่อมของเซลล์ต่าง ๆ อันเนื่องมาจากอนุมูลอิสระที่ได้มาจากปฏิกิริยา Oxidation โดยสามารถเลือกทานผักและผลไม้สด ชา หัวหอม ถั่วเหลือง ไวน์แดง ซึ่งอุดมไปด้วยสารฟลาโวนอยด์ หรืออาจรับประทานสารสกัดฟลาโวนอยด์เสริมร่วมไปกับสารสกัดเมล็ดองุ่น, สารสกัดเปลือกสนฝรั่งเศส, ไลโคปีน หรือสารสกัดชาเขียว ก็ได้ขนาดรับประทานที่แนะนำ สารฟลาโวนอยด์ 2-6 กรัม ร่วมกับสารสกัดเมล็ดองุ่นหรือสารสกัดเปลือกสนฝรั่งเศส 50 มิลลิกรัม และน้ำชาเขียว 3 ถ้วย หรือชาเขียวสกัด 300-400 มิลลิกรัม ทุกวัน

แอนโทไซยานิน

สาร Anthocyanin (แอนโทไซยานิน) เป็นสารที่มีสีตั้งแต่สีน้ำเงินเข้มในสภาพวะเป็นด่าง (pH>7) มีสีม่วงเมื่อเป็นกลาง (pH 7) และจะเปลี่ยนเป็นสีแดงถึงส้มได้ในสภาวะเป็นกรด (pH< 7) เป็นสารสีที่พบได้ทั่วไปในดอกไม้ ผลไม้บางชนิด ใบหรือลำต้นของพืชบางชนิดที่มีสีจัด ในปริมาณเพียงน้อยนิดก็สามารถแสดงสีได้ในความเข้มสูง มนุษย์ในบางพื้นที่รู้จักใช้สารตัวนี้มาเป็นเวลานานแล้วในกิจกรรมต่างๆ เช่น ไทยใช้สีจากดอกอัญชันทำขนม จีนใช้สีของเปลือกไม้และใบไม้บางชนิดในการย้อมผ้าให้มีสีต่างๆ ยุโรปใช้ผลไม้ป่า (Wild Berry) ในการทำเครื่องสำอางและทำขนม ซึ่งส่วนใหญ่แล้วจะเป็นอนุพันธ์หนึ่งของ Anthocyanin ที่พบได้ในธรรมชาติซึ่งให้สีน้ำเงิน สีม่วง และสีแดงบางชนิด เกิดจากสารกลุ่มแอนโทไซยานิน (Anthocyanin) เป็นโมเลกุลให้สีที่มีส่วนประกอบสองส่วนคือ แอนโทไซยานิดิน (Anthocyanidin) และน้ำตาล

แอนโทไซยานินมีหน้าที่ปกป้องผักและผลไม้จากการทำลายของรังสีอัลตราไวโอเลต มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การวิจัยพบว่าสารกลุ่มแอนโทไซยานินมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชั่นของไขมันแอลดีแอล (LDL) และยังทำให้เซลล์บุผนังหลอดเลือดมีความอ่อนนิ่ม การกินผักและผลไม้ที่มีสีน้ำเงินและสีม่วงจึงสามารถชะลอการเกิดโรคไขมันอุดตัน ในหลอดเลือดและโรคหลอดเลือดหัวใจแข็งตัวได้ ในประเทศไทยมีการใช้น้ำดอกอัญชันช่วยปลูกผมปลูกคิ้ว เชื่อว่าน้ำคั้นจากดอกอัญชันทำให้ผมดกดำได้สารแอนโทไซยานินในดอกอัญชันเพิ่มความสามารถในการมองเห็นหรือชะลอความเสื่อมของดวงตา เนื่องจากสารดังกล่าวเพิ่มความสามารถในการไหลเวียนเลือดในหลอดเลือดเล็กๆ ส่วนปลาย ทำให้มีเลือดมาเลี้ยงรากผมและดวงตาได้ดีขึ้นนั่นเอง ดอกอัญชันสามารถกินสดแก้ลมน้ำพริกหรือต้มน้ำดื่มก็ได้

แอนโทไซยานินสีม่วงจากพืชตระกูลบลูเบอร์รี่ ถูกใช้เพื่อเสริมสมรรถภาพการมองเห็นและลดปัญหาที่เกิดกับระบบหมุนเวียนของเลือด ในลักษณะเดียวกับการใช้น้ำคั้นอัญชันมาเป็นเวลานาน มีการใช้ในผู้ป่วยเบาหวานและแผลในกระเพาะอาหาร จึงมีคุณสมบัติต้านการเกิดโรคมะเร็ง ทำให้เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวตายและต้านการเกิดสารก่อมะเร็งในสัตว์ทดลอง พืชที่มีแอนโทไซยานินมักพบสารกลุ่มโพลีฟีนอลด้วย สารกลุ่มนี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและช่วยชะลอสภาวะเสื่อมของเซลล์ อาหารที่มีสีน้ำเงินและสีม่วง ได้แก่ กะหล่ำปลีม่วง มันสีม่วง องุ่นแดง ชมพู่มะเหมี่ยว ชมพู่แดงอื่นๆ ลูกหว้า ลูกไหน ลูกพรุน ลูกเกด ข้าวแดง ข้าวนิล ข้าวเหนียวดำ ถั่วแดงและถั่วดำ มะเขือม่วง หอมแดง หอมหัวใหญ่สีม่วง บลูเบอร์รี่ น้ำดอกอัญชัน น้ำว่านกาบหอย มันต้มสีม่วง และเผือก

ยีน *pap1*

ในการคัดเลือกพืชดัดแปลงพันธุกรรม โดยมีการใช้ยีนเครื่องหมายที่เป็นยีนต้านสารปฏิชีวนะ หรือยีนต้านสารปราบวัชพืช อาจทำให้ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชได้ และยังเป็นข้อจำกัดในการกีดกันทางด้านการค้า ดังนั้นการนำยีนเครื่องหมายที่ได้จากพืชมาใช้เป็นยีนคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับยีน จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งซึ่งจะไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อพืชและไม่กระทบต่อสิ่งแวดล้อม รวมทั้งยังลดข้อกังวลต่างๆ ที่เกิดจากการใช้สารปฏิชีวนะ หรือยีนต้านสารปราบวัชพืชอีกด้วย

ยีน *pap1* (production of anthocyanin pigment) เป็นยีนที่ส่งเสริมการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานินซึ่งทำให้เกิดสีต่างๆ ในพืช หากนำไปใช้เป็นยีนคัดเลือกต้นพืชที่ได้รับยีนจะทำให้ง่ายต่อการคัดเลือก โดยการสังเกตจากสีที่แสดงออก

ยีน *pap1* เป็นยีนสร้าง MYB75 transcription factor ที่ควบคุมการส่งเสริมการสังเคราะห์สาร anthocyanin ซึ่งยีน *pap1* แยกได้จากต้น mutant *Arabidopsis* ที่มีการแสดงออกอย่างมาก (overexpression) ของยีน *pap1* การถ่ายยีน *pap1* เข้าสู่ *Arabidopsis* ทำให้เกิดต้น transgenic ที่มีการแสดงออกเป็นสีม่วงอ่อนจนถึงสีม่วงเข้ม แสดงว่ายีน *pap1* ส่งเสริมการสร้าง anthocyanin และการ overexpression ของยีน *pap1* ทำให้ต้น *Arabidopsis* แสดงออก phenotype เป็นสีม่วงเข้ม และพบสีม่วงในทุกชิ้นส่วนของต้นพืชตลอดการพัฒนาการของพืช (Borevitz *et al.*, 2000)

การศึกษาการใช้ยีน *pap1* เป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือกและรายงานผล เป็นการสร้างองค์ความรู้ใหม่ในการถ่ายยีน *pap1* ที่ส่งเสริมการสังเคราะห์ anthocyanin เข้าสู่พืช เพื่อสามารถทำให้การคัดเลือกพืชดัดแปลงพันธุกรรมทำได้ง่ายโดยดูจากการเกิดสีของ anthocyanin และเพิ่มความปลอดภัยทางชีวภาพของการสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรม

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Zuluaga *et. al.* (2008) ได้ทำการศึกษาการแสดงของยีน *MYB75/PAP1* (*PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT 1*) ที่มีผลการสร้างแอนโทไซยานินในต้นมะเขือเทศที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรม โดยได้ทำการตัดต่อยีนจาก *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn. แล้วส่งถ่ายเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ GV3101 จากนั้นก็ทำการส่งถ่ายเข้าสู่เมล็ดมะเขือเทศ ผลที่ได้พบว่ามีการแสดงออกของ *AtMYB75* โดยมีการเพิ่มการสร้างแอนโทไซยานินทั้งในใบ ลำต้น รากและดอก รวมถึงผลภายใต้สภาวะการเจริญเติบโตตามปกติ แต่การแสดงออกนี้จะแสดงออกเฉพาะในส่วนของเซลล์ที่อยู่ใน Epidermal หรือเปลือกหุ้มด้านนอก หรือในกลุ่มของท่อลำเลียงเท่านั้น แต่ยังพบอีกว่ามีการสะสมของ DFR (dihydroflavonol 4-reductase) อีกด้วย

Zhou *et. al.* (2008) ได้ศึกษากระบวนการพัฒนาของแคลลัสของยาสูบ ซึ่งมีการแสดงออกของยีน *PAP1/MYB75* ที่มีผลต่อการ transcription และการแสดงออกของลักษณะ โดยได้ทำการถ่ายยีน *pap1* เข้าสู่แคลลัสทำให้แคลลัสเกิดเป็น 2 ลักษณะ คือ แคลลัสที่เป็นสีแดง และแคลลัสที่เป็นสีขาว จากนั้นทำการตรวจสอบความคล้ายกันของแคลลัสที่ได้ด้วยเทคนิค RT – PCR เพื่อดูการตอบสนองต่อการควบคุมของยีน *pap1* เพาะเลี้ยงแคลลัสเป็นระยะเวลา 25 วัน จากนั้นทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่ามี cyanidin, pelargonidin และ peonidin ซึ่งอยู่ในกลุ่มของ anthocyanidins และในการทดลองครั้งนี้ยังได้ศึกษาผลของ ความมืด แหล่งไนโตรเจน และออกซินต่อการสร้างแอนโทไซยานินในแคลลัสด้วย และยังนำไปสู่การศึกษาความเหมาะสมในการทำงานของ PAP1 ต่อการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในระดับposttranscriptional ในเซลล์

Kim *et. al.* (2007) ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน และตรวจสอบอุณหภูมิที่มีผลต่อการควบคุมการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ในข้าว 2 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ llpum และพันธุ์ Heugjinju ซึ่งเขาพบว่า ในพันธุ์ llpum ไม่มีการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ส่วนในพันธุ์ Heugjinju พบว่า มีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินได้ 3 ประเภท คือ cyanidin, cyanidin 3 - glucoside - O, และ peonidin 3 - glucoside – O นอกจากนี้ยังได้ทำการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนสร้างแอนโทไซยานินในการสังเคราะห์เอนไซม์ต่าง ๆ เช่น phenylalanine ammonia lyase (PAL), chalcone synthase (CHS), flavanone 3[3-hydroxylase (F3H), dihydroflavonol reductase (DFR), และ anthocyanin synthase (ANS) ซึ่งพบว่าในใบและเมล็ดของข้าวพันธุ์ Heugjinju จะมีการแสดงออกมากกว่าในข้าวพันธุ์ llpum และยังพบอีกว่าข้าวพันธุ์ Heugjinju มียีน 2 ยีน ที่มีระดับการแสดงออกที่ค่อนข้างสูงและมีความจำเพาะสำหรับการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน นั้นคือยีน DFR และ ANS นอกจากนี้การแสดงออกของยีน *CHS*, *F3H*, *DFR*, และ *ANS* ยังได้มีการเพิ่มขึ้นในระหว่างการสุกแก่เมล็ดพันธุ์ และมีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิในช่วงการเจริญเติบโตของต้นกล้าอีกด้วย

Borevitz *et. al.* (2000) ได้ทำการศึกษาการดิดแท็กเพื่อระบุตัวควบคุม MYB ของการสังเคราะห์ Phenylpropanoid โดยได้ทำการใช้การดิดแท็กโดยแท็กที่ใช้ได้จากการตัดต่อยีนอะโกรแบคทีเรียมเข้ากับ T – DNA ที่ประกอบ cauliflower mosaic virus 35S ซึ่งเมื่อติดแท็กนี้เข้ากับ *Arabidopsis* เขาก็ได้พบว่ามีการแสดงออกของสีม่วงที่มีความเข้มข้นสูงมากในส่วนต่างๆของต้นนั้น ผลจากการควบคุมให้มีการแสดงออกมากนี้เองทำให้เกิดลักษณะโดดเด่น จึงทำให้เกิดการเปิดใช้งานยีนในการสังเคราะห์ phenylpropanoid การเพิ่มการสะสมของลิกนิน, hydroxycinnamic acid esters และฟลาโวนอยด์ รวมถึงแอนโทไซยานินต่าง ๆ ที่สร้างสีม่วงด้วย ซึ่งเขากล่าวว่า ลักษณะที่เกิดขึ้นเหล่านี้เกิดจากการแทรกตัวของโปรโมเตอร์ในตำแหน่งยีนที่ใกล้กับ MYB transcription แสดงว่า การกระตุ้นโดยการดิดแท็กสามารถควบคุมลักษณะทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการสะสมสารต่าง ๆ ในระหว่างการพัฒนาของพืช

Endo *et. al.* (2002) ได้ศึกษาการถ่ายยีนขั้นตอนเดียวสำหรับการสร้างข้าวดัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนเครื่องหมายโดยใช้ระบบ MAT ชนิด *ipt* พบว่าระบบนี้ไม่เหมาะสำหรับพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากที่สุดเนื่องจากกระบวนการสร้างเอ็มบริโอจะขึ้นกับฮอร์โมนออกซิน ทำการทดลองโดยนำเนื้อเยื่อบริเวณ scutellum ของเมล็ดข้าวที่มีมีการเพาะเลี้ยงก่อนแล้ว 5 วัน มาทำการถ่ายยีน พบว่าข้าวดัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนเครื่องหมายสามารถที่จะเกิดเป็นต้นโดยตรงได้ 25.5 เปอร์เซ็นต์ จากเนื้อเยื่อทั้งหมดที่ทำการเพาะเลี้ยงร่วม โดยพบว่าปราศจากรูปแบบยอดกระจุกภายใน 4 สัปดาห์หลังจากการเพาะเลี้ยงร่วม โดยลักษณะยอดกระจุกที่หายไป

เกิดจากการตัดยีน *ipt* ออกทำให้ข้าวดัดแปลงพันธุกรรมเกิดเป็นต้นที่ปราศจากยีนเครื่องหมายผ่านทางเนื้อเยื่อเอ็มบริโอได้ ดังนั้นระบบนี้จึงไม่จำเป็นต้องมีสารที่ใช้ในการคัดเลือก และไม่มีการผสมข้ามของพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ไม่มียีนเครื่องหมาย ระบบนี้จะมีประสิทธิภาพสูงในการเริ่มต้นสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ปราศจากยีนเครื่องหมายในพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ

ToKi *et.al* (1997) ได้ปรับปรุงระบบการถ่ายยีนในข้าว โดยทำการปรับปรุงสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พลาสมิด สายพันธุ์อะโกรแบคทีเรียม และขั้นตอนการถ่ายยีนของ Hiei *et.al* (1994) และ Rashid *et.al* (1996) โดยใช้อาหารสูตร N6D สำหรับชักนำเมล็ดข้าวให้เกิดแคลลัส อาหาร 2N6-AS สำหรับเพาะเลี้ยงร่วมแคลลัสกับอะโกรแบคทีเรียม อาหารสูตร N6D ที่มีไฮโกรมัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นอาหารคัดเลือกแคลลัสที่ได้รับยีน อาหารสูตร MS ดัดแปลง ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโต kinetin ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และ NAA ความเข้มข้น 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนอาหารชักนำให้เกิดรากเป็นอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และมีไฮโกรมัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งวิธีการและสูตรอาหารเหล่านี้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายยีนให้ดีขึ้น และสามารถชักนำให้แคลลัสเป็นยอดได้ในระยะเวลาเพียง 2 เดือน

ยาสูบ

ยาสูบ หรือ จะวั้ว เป็นไม้ล้มลุก ลำต้นมีขนอ่อนนุ่มปกคลุม สูงประมาณ 1 - 1.5 เมตร ใบลักษณะเป็นรูปไข่กลับ โคนใบแคบ ใบโตหนามีขนอ่อนปกคลุม (ภาพที่ 1) ดอกออกเป็นช่อยาวที่ปลายยอด สีชมพูอ่อนหรือแดงเรื่อ ออกผลลักษณะเป็นแคปซูล ใช้ใบตากแห้งเป็นส่วนประกอบในบุหรี่ หรือยาเส้น

ชื่อสามัญ : Tobacco

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Nicotiana tabacum* L.

วงศ์ : ยาสูบเป็นพืชในวงศ์โซลานาซีอี (Solanaceae) เช่นเดียวกับมะเขือเทศ พริก มันฝรั่ง ผักต่างๆ ฯลฯ

สกุล : ยาสูบอยู่ในสกุลนิโคเทียน่า (Nicotiana)

ชื่ออื่นๆ : จะวั้ว (เขมร – สุรินทร์)

ชนิด : ยาสูบที่ปลูกกันทั่วไปมีมากกว่า 60 พันธุ์ หรือ 60 ชนิด แต่ที่ปลูกเป็นการค้าเกือบทั้งหมดเป็นพันธุ์ทาบาคัม (tabacum) มีบ้างที่ปลูกพันธุ์รัสติกา (rustica) ทางแถบยุโรปตะวันออกและเอเชียไมเนอร์

ภาพที่ 5 รูปภาพทั่วไปของต้นยาสูบ

ที่มา Eco-agrotech, 2550 : ระบบออนไลน์

ยาสูบถูกใช้เป็นพืชต้นแบบ (Model plant) ที่นำมาใช้ในการทดลองอย่างแพร่หลาย เป็นพืชใบเลี้ยงคู่ ซึ่งมีประสิทธิภาพการถ่ายยีนที่สูง ถ่ายยีนง่าย เจริญเติบโตได้รวดเร็ว เพราะฉะนั้นจึงเหมาะสมในการนำมาถ่ายยีนในปัจจุบัน

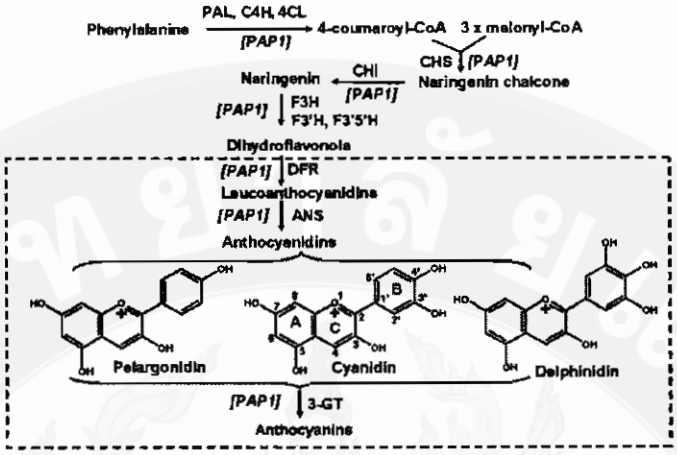
ลักษณะทางพันธุกรรม

สามารถจำแนกยาสูบออกเป็น 60 สปีชีส์ ซึ่ง 36 สปีชีส์ มีการปลูกอยู่ในแถบอเมริกาใต้ 36 สปีชีส์ มีการปลูกอยู่ในแถบอเมริกาเหนือ และ 9 สปีชีส์ มีการปลูกอยู่ในแถบออสเตรเลีย และหมู่เกาะแปซิฟิกตอนใต้ ในจำนวน 15 สปีชีส์ ทั้งหมดของยาสูบมีอยู่ 2 สปีชีส์ ที่นิยมใช้ปลูกเป็นอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน คือ *N. tabacum* และ *N. rustica* ซึ่งใช้ปลูกเพื่อผลิตเป็นยาสูบและยาเคี้ยว ยาสูบทั้งสองสปีชีส์ นี้มีการปลูกกันทั่วไปในแถบอเมริกาใต้ อเมริกากลาง หมู่เกาะอินเดียตะวันตก บริเวณแถบตะวันตกเฉียงใต้และภาคเหนือของเม็กซิโก

จำนวนโครโมโซมของยาสูบอยู่ในระหว่าง n = 9 ถึง n = 24 แต่ส่วนมากจะมีโครโมโซม n = 12 และ n = 24 ยาสูบพวก *N. tabacum* และ *N. rustica* มีจำนวนโครโมโซม n = 24 (2n=4x=48)

วิถีการสังเคราะห์สารแอนโทยานิน

ยีน *pap1* เป็นยีนควบคุมในการเปิดการทำงานของยีนสร้างเอนไซม์ต่าง ๆ ในการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน



ภาพที่ 6 วิถีการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานิน

ที่มา Jack Sullivan, 1998 : ระบบออนไลน์

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Geekiyanage *et. al.* (2007) ได้ใช้ยีน *VlmybA2* ในองุ่นให้แสดงออกในต้นยาสูบ และต้น *Arabidopsis* โดยทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นยาสูบและต้น *Arabidopsis* สำหรับอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นยาสูบ มีการเติมฮอร์โมน BA และ NAA ด้วย พบว่าต้นยาสูบและต้น *Arabidopsis* มีสีม่วงแดง ทั้งต้น ใบ ดอก เมล็ด และราก และยังพบว่า การ over-expression ของ *VlmybA2* เพียงอย่างเดียวใน tobacco และ *Arabidopsis* ที่ได้รับการถ่ายยีน สามารถสร้างแอนโทไซยานินได้ ดังนั้น *VlmybA2* อาจจะมีความสามารถในการทำงานอย่างหลากหลายในพืชใบเลี้ยงคู่ สำหรับการ over-expression ของ *VlmybA2* ใช้ในการแยกต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนเข้าไปได้ซึ่งเป็นการแก้ไขข้อกังวลที่เกี่ยวกับการสารยีนต้านสารปราบวัชพืชและยีนต้านสารปฏิชีวนะได้ ส่วนสีของเมล็ด *Arabidopsis* ทำให้เกิด phenotype ที่แตกต่าง จึงใช้ในการแยกเมล็ดที่ได้รับการถ่ายยีนได้

Xie *et. al.* (2006) ได้ใช้ anthocyanidin reductase และ PAP1 MYB transcription factor ให้แสดงออกร่วมกันใน metabolic engineering ของ proanthocyanidins พบว่า ต้นที่มีเฉพาะยีน *pap1* มีการแสดงออกของฟีโนไทป์มากกว่า ซึ่งจะเห็นเป็นสีม่วงแดงมากกว่า ไม่ว่าจะเป็นใบ ลำต้น ดอก และราก ก็มีสีม่วงแดง สำหรับต้นที่มีการแสดงออกร่วมกันของ anthocyanidin reductase และ PAP1 MYB transcription factor จะให้สีม่วงแดงน้อยกว่าซึ่งจะมีสีเขียวปนด้วย ส่วนต้นที่มีแต่ยีน anthocyanidin reductase จะให้ต้นที่มีสีเขียวเหมือนต้นควบคุม (control)

Zhang *et. al.* (2009) ได้ใช้ยีน *AtCPC* จากต้น *Arabidopsis thaliana* ให้แสดงออกในยาสูบ โดยใช้ ใช้ยาสูบพันธุ์ Xanthi ในการถ่ายยีน *Agrobacterium* สายพันธุ์ EHA 105 และใช้ hygromycin เป็นสารคัดเลือกบนอาหาร ซึ่งผลที่ได้คือ ยาสูบจะมีสีเขียว สีเขียวอมชมพู และสีชมพู

ซึ่งสรุปได้ว่า โปรตีน MYB ถึงจะมาจากหลายพืชที่แตกต่างสปีชีส์กัน แต่ก็มีส่วนในการควบคุม phenylpropanoid metabolism และ pathways ที่เป็นกิ่งก้านสาขา เป็นพวกที่มีการสังเคราะห์ flavonoid งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า *AtCPC* สามารถที่จะควบคุมการผลิต anthocyanin ได้

อุปกรณ์และวิธีการ

สายพันธุ์แบคทีเรียและพลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง

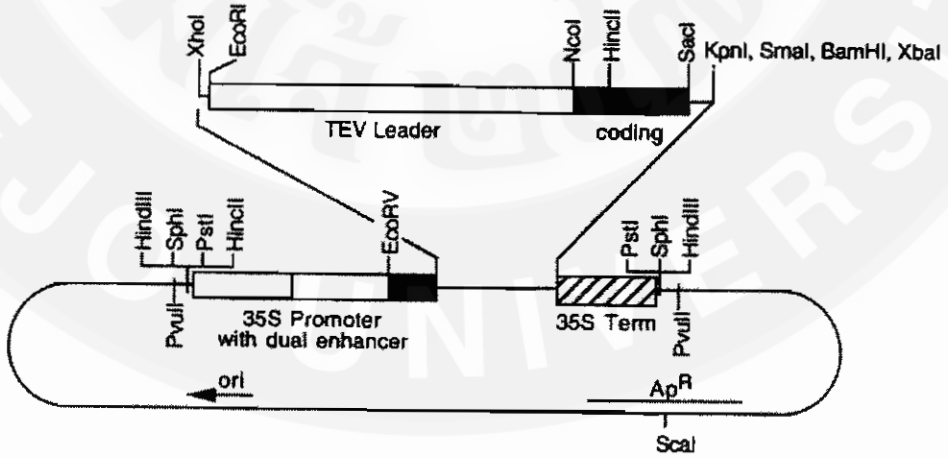
1. *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ที่มีพลาสมิด pRTL2 (ภาพที่ 7)

2. *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ที่มีพลาสมิด 3PAP-Red (ภาพที่ 8)

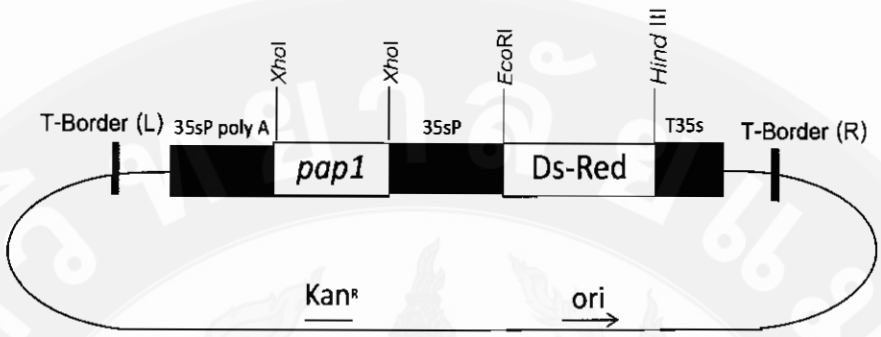
ยีน *pap1* เป็นยีนที่ได้จาก *Arabidopsis thaliana* ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.เจษฎาพร พิทักษ์สุธีพงษ์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ จ.ปทุมธานี

พลาสมิด 3PAP-Red ได้มาจากการนำยีน Ds-Red ที่ได้มาจากปะการัง โคลนเข้าที่ *Eco*RI และ *Hind*III sites ของพลาสมิด pCAMBIA 2300 ทำให้ได้พลาสมิดที่ชื่อ 23 Red จากนั้นนำยีน *pap1* ขนาด 747 bp ซึ่งได้มาจาก *Arabidopsis* โคลนเข้าที่ *Xho*I site โดยแทนที่ยีน *npt*II ใน พลาสมิด 23 Red ทำให้ได้พลาสมิดชื่อ 3PAP-Red

เนื่องจากพลาสมิด 3PAP-Red มียีน 2 ยีน ได้แก่ Ds-Red และ *pap1* แต่ยีนที่ต้องการนำไปใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่สบู่ดำ คือ ยีน *pap1* จึงต้องมีการสร้างชุดยีนขึ้นใหม่ โดยนำยีน *pap1* จากพลาสมิด 3PAP-Red โคลนเข้าไปในพลาสมิด pRTL2 เพื่อสร้างชุดยีนที่ทำงานภายใต้การควบคุมของ 35S dual promoter, TEV Leader และ 35S terminator ซึ่งจะทำให้ยีน *pap1* มีการแสดงออกอย่างมากตลอดเวลาในทุกเนื้อเยื่อ



ภาพที่ 7 แผนที่พลาสมิด pRTL2 แสดง 35S promoter with dual enhancer ต่อกับ TEV Leader coding sequence และ 35S terminator เพื่อใช้สำหรับโคลนยีน *pap1* เข้าที่ *NcoI*/*Sac*I sites โดยแทนที่ coding sequence นอกจากนี้ยังมียีนต้านยาแอมพิซิลิน (Ap^R) เพื่อใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิด



ภาพที่ 8 แผนที่พลาสมิด 3PAP-Red

วิธีการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้แบ่งเป็น 3 การทดลอง ได้แก่

การทดลองที่ 1 การสร้างชุดยีน *pap1* สำหรับถ่ายยีนในพืช

การทดลองที่ 2 การถ่ายยีนเข้าสู่ข้าว

การทดลองที่ 3 การถ่ายยีนเข้าสู่ยาสูบ

การทดลองที่ 1 การสร้างชุดยีน *pap1* สำหรับถ่ายยีนในพืช

ขั้นตอนในการสร้างชุดยีน *pap1* มีดังนี้

1.1. การเตรียม competent cell

1.2. การเตรียมพลาสมิดเวกเตอร์ (pRTL2) ด้วยวิธี Alkaline lysis method

1.3. การเพิ่มปริมาณชิ้นยีน *pap1* จากพลาสมิด 3PAP-Red ด้วยเทคนิค PCR

1.4. การโคลนยีน *pap1* เข้าสู่เวกเตอร์ pRTL2

1.5. การฝากถ่ายพลาสมิดสายผสม (pKL1) ที่ได้จากการเชื่อมต่อชิ้นยีน *pap1* กับเวกเตอร์ pRTL2 เข้าสู่ competent cell ของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธี Heat shock

วิธีทำ

1.1. การเตรียม competent cell

1. นำ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α มา streak บนอาหารแข็ง LB นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 17 ชั่วโมง

2. นำโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α เลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 – 17 ชั่วโมง
3. นำ *E. coli* ที่เลี้ยงได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที วัดค่าดูดกลืนแสงทุกชั่วโมง จนกว่าจะได้ค่าดูดกลืนแสง (OD_{600}) อยู่ในช่วง 0.2 – 0.5
4. เทเชื้อที่ได้ลงในหลอดที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร (แช่เย็น) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
5. เทอาหารออก นำตะกอนมาละลายด้วย $CaCl_2$ เข้มข้น 50 มิลลิลิตร (แช่เย็น) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมด้วยการปิเปตขึ้นลง
6. จากนั้นเติม $CaCl_2$ เข้มข้น 50 มิลลิลิตร (แช่เย็น) ลงไปอีก 16 มิลลิลิตร ผสมด้วยการ ปิเปตขึ้นลง บ่มในน้ำแข็งนาน 20 นาที
7. ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
8. เทส่วนใสทิ้ง แล้วละลายตะกอนกลับด้วย $CaCl_2$ เข้มข้น 50 มิลลิลิตร (แช่เย็น) ปริมาตร 2 มิลลิลิดร
9. เติม 80% glycerol ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมด้วยการปิเปต
10. แบ่ง competent cell ที่ได้ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 200 ไมโครลิดร
11. เก็บ competent cell ที่ตู้เก็บความเย็นที่ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

1.2. การเตรียมพลาสมิดเวกเตอร์ pRTL2 ด้วยวิธี Alkaline lysis method

<u>การเตรียมเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ที่มีพลาสมิด pRTL2</u>

1. นำ glycerol stock ของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ที่มีพลาสมิด pRTL2 มา streak บนอาหารแข็ง LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตรนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 17 ชั่วโมง

2. นำโคโลนีเดี่ยวของ *E. coli* มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 – 17 ชั่วโมง
3. นำ *E. coli* ที่เลี้ยงได้ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที
4. ปิเปตส่วนใสทิ้ง เก็บเฉพาะส่วนตะกอนไว้ ทำซ้ำอีกครั้ง

<u>การสกัดพลาสมิด pRTL2 ด้วยวิธี Alkaline lysis method</u>

1. ละลายตะกอนเซลล์ที่ได้ ด้วย Alkaline lysis solution I (แช่เย็น) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมโดยการนำไป vortex
2. เติม Alkaline lysis solution II (เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมด้วยการพลิกหลอดกลับไปมา 5 ครั้ง บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
3. เติม Alkaline lysis solution III (แช่เย็น) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมด้วยการพลิกหลอดกลับไปมา 5 ครั้ง นำไปแช่ที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที
4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นย้ายส่วนใสใส่ในหลอดใหม่
5. เติมครอโรฟอร์ม ปริมาตร 1 เท่าของสารละลาย นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ย้ายส่วนใสใส่ในหลอดใหม่
6. เติม absolute ethanol (แช่ใน -20 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมด้วยการพลิกหลอดกลับไปมา แช่ที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 10 – 40 นาที
7. นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 - 10 นาที ปิเปตส่วนใสทิ้ง
8. ล้างตะกอน โดยเติมเอทานอล เข้มข้น 70% (แช่ใน -20 องศาเซลเซียส) 1 มิลลิลิตร ผสมด้วยการพลิกหลอดกลับไปมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 - 10 นาที ปิเปตส่วนใสทิ้ง
9. ทำซ้ำข้อ 8. อีกครั้ง

10. เปิดฝาหลอดแล้วคว่ำหลอดบนกระดาษซับ จนกระทั่งตะกอนแห้ง
11. ละลายตะกอนด้วย dH_2O ที่มีเอนไซม์ RNasA ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 30 ไมโครลิตร
12. นำไปตรวจสอบด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอริซิส

<u>การเตรียมเวกเตอร์ pRTL2 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ</u>

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ส่วนผสมของปฏิกิริยา	ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร/ปฏิกิริยา)	ความเข้มข้นสุดท้าย
dH_2O	12	-
10X NE Buffer # 4	2	1X
Plasmid (pRTL2)	5	1μg
*Nco*I	0.5	-
*Sac*I	0.5	-
Total	**20**	**-**

วิธีการ

1. นำองค์ประกอบของปฏิกิริยาการตัด มาละลายบนน้ำแข็ง (ยกเว้นเอนไซม์)
2. คำนวณปริมาตรของสารละลายต่างๆ ที่จะใช้ (ตารางที่ I) แล้วนำสารละลายเหล่านั้นผสมกันในหลอด
3. เมื่อเตรียมปฏิกิริยาเสร็จแล้ว จากนั้นนำเอนไซม์ตัดจำเพาะออกมาจากตู้แช่ ปิเปดเอนไซม์ลงในหลอด ผสมด้วยการปิเปตขึ้นลง
4. ปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็วในไมโครฟิวจ์ เพื่อให้ปฏิกิริยาลงมาด้านล่างหลอดทั้งหมด
5. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน
6. หยุดการทำงานของเอนไซม์ ด้วยการบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที
7. นำไปตรวจสอบการตัดของเอนไซม์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอริซิส

8. แยกบริสุทธิ์เวกเตอร์ที่ได้ โดยใช้ชุด PCR clean-up Gel extraction
9. เก็บไว้ในที่เย็นจนกว่าจะใช้งาน

1.3. การเพิ่มปริมาณชิ้นยีน *pap1* จากพลาสมิด 3PAP-Red ด้วยเทคนิค PCR

1. สกัดพลาสมิด 3PAP-Red ด้วยชุด kit (Plasmid DNA Purification Nucleospin® Extract)
2. ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นยีน *pap1* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ คือ F1_NcoI PAP1 และ R_SacI PAP1

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มปริมาณชิ้นยีน *pap1*

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	ปริมาตร (ไมโครลิตร/1 ปฏิกิริยา)	ความเข้มข้นสุดท้าย
dH2O	34	-
10X Thermol pol Reaction buffer	5	1X
2.5 mM dNTP mix	4	0.2 มิลลิลิตร
F1_NcoI PAP1	2.5	0.5 µM
R_SacI PAP1	2.5	0.5 µM
Vent DNA polymerase (2 U/1 µl)	1	2 U
DNA Template (3PAP-Red)	1	-
Total	**50**	-

3. ผสมส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยา ดังตารางที่ 2 ตามลำดับ
4. ตั้งโปรแกรมเครื่อง PCR ดังนี้

Initial	Denaturaton	95 องศาเซลเซียส	3 min
	Denaturaton	95 องศาเซลเซียส	1 min
	Annealing	64 องศาเซลเซียส	30 sec

	Extension	72 องศาเซลเซียส	3 min
Final	Extension	72 องศาเซลเซียส	10 min
อุณหภูมิเก็บในเครื่อง		20 องศาเซลเซียส	
ทำทั้งหมด 35 cycles			

5. นำหลอด PCR ที่เตรียม ใส่เครื่อง PCR จากนั้นปิดฝาแล้วสั่งเครื่องให้ความร้อนที่ฝาเครื่อง เพื่อป้องกันการระเหยของปฏิกิริยาที่จะทำให้ปริมาตรเปลี่ยนแปลง
6. มื่อเครื่องทำงานเสร็จ นำไปเช็คผลผลิตด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโทรฟอริซิส
7. แยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอที่ได้ โดยใช้ชุด PCR clean-up Gel extraction
8. จากนั้นนำชิ้นยีน *pap1* มาตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I และ *Sac*I

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของการตัด PCR product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ส่วนผสมของปฏิกิริยา	ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร/ปฏิกิริยา)	ความเข้มข้นสุดท้าย
dH_2O	12	-
10X NE Buffer # 4	2	1X
PCR Product (ยีน *pap1*)	5	1µg
*Nco*I	0.5	-
*Sac*I	0.5	-
Total	**20**	-

9. นำองค์ประกอบของปฏิกิริยาการตัด มาละลายบนน้ำแข็ง (ยกเว้นเอนไซม์)
10. คำนวณปริมาตรของสารละลายต่างๆ ที่จะใช้ (ตารางที่ 3) แล้วนำสารละลายเหล่านั้นผสมกันในหลอด
11. เมื่อเตรียมปฏิกิริยาเสร็จแล้ว จากนั้นนำเอนไซม์ตัดจำเพาะออกมาจากตู้แช่ ปิเปตเอนไซม์ลงในหลอด ผสมด้วยการปิเปตขึ้นลง

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้

12. ปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็วในเครื่องไมโครฟิวจ์ เพื่อให้ปฏิกิริยาลงมาด้านล่างหลอดทั้งหมด
13. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน
14. หยุดการทำงานของเอนไซม์ ด้วยการบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที
15. นำไปตรวจสอบการตัดของเอนไซม์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอริซิส
16. แยกบริสุทธิ์เวกเตอร์ที่ได้ โดยใช้ชุด PCR clean-up Gel extraction
17. เก็บไว้ในที่เย็นจนกว่าจะใช้งาน

1.4. การโคลนยีน *pap1* เข้ากับเวกเตอร์ pRTL2

ตอนที่ 1 การเชื่อมต่อชิ้นยีน *pap1* กับเวกเตอร์ pRTL2

1. คำนวณหาปริมาณ เวกเตอร์ และชิ้นยีนที่สนใจ โดยใช้สูตร

$$\text{(Weight ratio)}\ \frac{V}{I} = \frac{1 \times \text{ความยาวของ DNA พาหะ (bp)} \times \text{MW ของ DNA 1 bp (660)}}{3 \times \text{ความยาวของชิ้นยีนที่สนใจ (bp)} \times \text{MW ของ DNA 1 bp (660)}}$$

ตารางที่ 4 องค์ประกอบของปฏิกิริยาการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ (ligation)

ส่วนผสมของปฏิกิริยา	ปริมาตรที่ใช้ (ไมโครลิตร/ปฏิกิริยา)		
	control	V:I=1:3	V:I=1:5
dH2O	3.5	1.5	4
10X buffer for T4 DNA ligase	1	1	1.5
Vector (pRTL2)	5	5	5
Insert (*pap1*)	-	2	4
T4 DNA Ligase	0.5	0.5	0.5
Total	**10**	**10**	**15**

2. ผสมส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยา ดังตารางที่ 4 ตามลำดับ
3. บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 17 ชั่วโมง

1.5. การถ่ายฝากพลาสมิดสายผสม (pKL1) ที่ได้จากการเชื่อมต่อชิ้นยีน *pap1* กับเวกเตอร์ pRTL2 เข้าสู่ competent cell *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธี Heat shock

1. นำ competent cell (DH5α) มาแช่ในน้ำแข็ง
2. จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ทำการเชื่อมต่อแล้วมาใส่ลงใน competent cell (DH5α)
3. บ่มทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 10 นาที
4. เมื่อครบนำมาบ่มใน water bath อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
5. บ่ม และเขย่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที นาน 30 - 60 นาที
6. นำเชื้อที่บ่มเสร็จมา spread บนอาหารแข็ง LB ที่เติมแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร
7. บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 17 ชั่วโมง
8. คัดเลือกโคลนที่ได้แล้วนำมาสกัดพลาสมิดสายผสมด้วยวิธี Alkaline lysis method
9. ตัดพลาสมิดสายผสมด้วยเอนไซม์ *Nco*I และ *Sac*I
10. นำไปตรวจสอบการตัดของเอนไซม์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอริซิส
11. คัดเลือกโคลนที่มีพลาสมิดสายผสม และเตรียมการสกัดพลาสมิดด้วยชุด kit เพื่อส่งหาลำดับเบสต่อไป

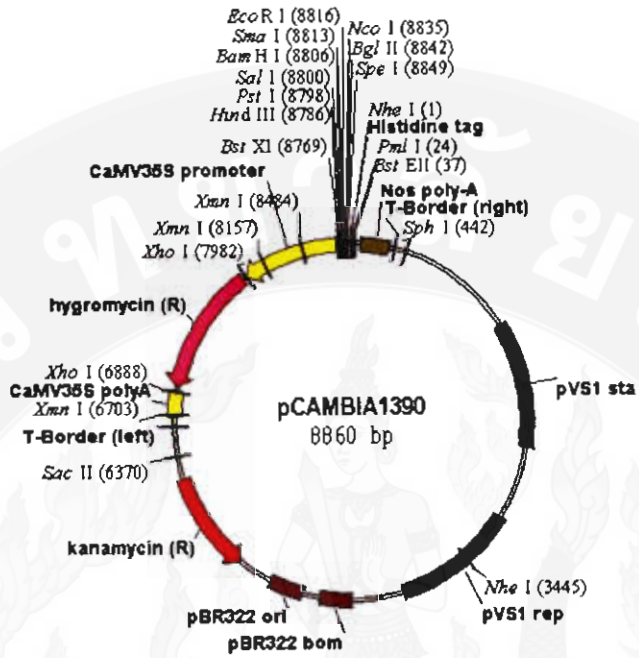
การทดลองที่ 2 การถ่ายยีนเข้าสู่ข้าว

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการทดลอง

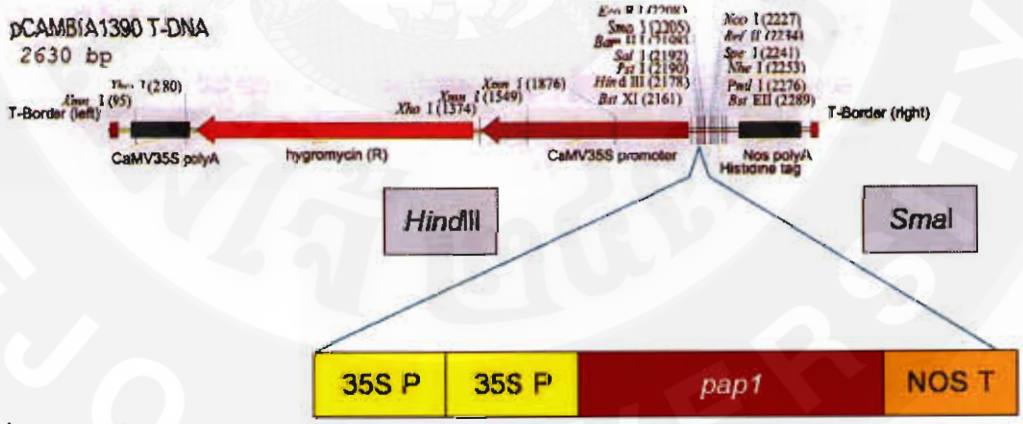
ข้าวพันธุ์ Kitaake จัดอยู่ในสายพันธุ์ japonica (Toki, 1997) มีโครโมโซมเป็น 2n = 2x = AA = 24 (สมศักดิ์ และคณะ, 2542) ลำต้นเตี้ย ความสูงประมาณ 60 – 100 เซนติเมตร ใบสั้นและแคบ เมล็ดป้อมสั้น

สายพันธุ์อะโกรแบคทีเรียมและพลาสมิดที่ใช้ในการทดลอง

ใช้อะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ AGL1 ที่มีพลาสมิด pPAP1 ซึ่งมียีน *pap1* ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ 35S มียีน *hpt*II เป็นยีนเครื่องหมายที่ใช้คัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับยีน



ภาพที่ 9 แผนที่พลาสมิด pCAMBIA 1390



ภาพที่ 10 แผนที่ T – DNA ของพลาสมิด pCAMBIA 1390

ยีน *pap1* มีขนาด 747 bp (บริเวณ จาก start codon - stop codon) อยู่ภายใต้การควบคุมของ 35S double promoter และ nos terminator และชุดยีนนี้ถูกโคลนอยู่ที่ MCS ของ pCAMBIA1390 ที่บริเวณ *Hin*dIII และ *Sma*I (ภาพที่ 10)

วิธีการทดลอง

ได้แบ่งเป็น 3 ขั้นตอนได้แก่

2.1. การถ่ายยีนสร้างแอนโทไซยานินเข้าสู่แคลลัสข้าว

2.2. การตรวจวิเคราะห์ต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน

2 1 การถ่ายยีนสร้างแอนโทไซยานินเข้าสู่แคลลัสข้าว

ตอนที่ 1 การชักนำให้เกิดแคลลัส

1. แกะเปลือกเมล็ดแก่ของข้าวพันธุ์ Kitaake
2. ฟอกฆ่าเชื้อด้วย 10% โซเดียมไฮโปคลอไรด์ 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที
3. นำเมล็ดแก่ของข้าวที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อแล้ว มาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
4. ซับเมล็ดข้าวบนกระดาษทิชชูที่ฆ่าเชื้อแล้ว
5. เพาะเลี้ยงเมล็ดให้เกิดเป็นแคลลัสโดยการปักเมล็ดข้าวที่ได้ ลงไปบนอาหารสูตร N6D ดัดแปลง โดยให้ส่วนที่เป็นเอ็มบริโอ (จมูกข้าว) โผล่พ้นขึ้นมาเหนืออาหาร
6. นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นระยะเวลา 3 – 4 สัปดาห์
7. ย้ายแคลลัสลงบนอาหารใหม่สูตรเดิม เพาะเลี้ยงในที่ 28±2 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน ก่อนนำมาถ่ายยีน

ตอนที่ 2 การเตรียมอะโกรแบคทีเรียมสำหรับใช้ถ่ายยีน

1. ทำการขีดอะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ AGL1 ที่มีพลาสมิด pPAP1 จากกลีเซอรอลเชื้อลงบนอาหารสูตร LB ที่มีกานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และไรแฟมมิซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร
2. นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 3 – 4 วัน เพื่อให้เกิดโคโลนีเดี่ยว
3. เลือกเอาโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่มี กานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และอะซิโตไซริงโกนความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร
4. นำเชื้อที่ได้ไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที (ข้ามคืน) ก่อนนำมาทำการถ่ายยีน
5. วัดค่าความเข้มข้นของสารแขวนลอยเชื้อด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสง(OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

6. ปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนอะโกรแบคทีเรียม โดยเทสารแขวนลอยอะโกรแบคทีเรียม ลงในหลอดพลาสติก และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
7. เทส่วนใสทิ้ง และละลายตะกอนด้วยอาหารเหลวสูตร 2N6 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร
8. เจือจางความเข้มข้นของสารแขวนลอยอะโกรแบคทีเรียมสำหรับการถ่ายยีนให้ได้ ค่า OD_{600} เท่ากับ 0.15 โดยปิเปตสารแขวนลอยจากข้อ 7 ตามปริมาตรที่คำนวณได้จากค่าความเข้มข้นเชื้อที่ต้องการใส่ในหลอดพลาสติก
9. เติมอาหารเหลวสูตร 2N6 ให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 35 มิลลิลิตร และเติมอะซิโตไซริงโกน ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์

ตอนที่ 3 การปลูกถ่ายเชื้อและการเพาะเลี้ยงร่วม

1. วางตะแกรงที่ฆ่าเชื้อแล้วบนก้นเพลทเปล่า ใส่แคลลัสที่ได้จากการย้ายวางบนอาหารใหม่ เป็นเวลา 3 วัน ไปบนตะแกรง
2. เทสารละลายเชื้อที่เตรียมได้ลงไป ทำการปลูกถ่ายเชื้อเป็นระยะเวลา 90 วินาที
3. นำตะแกรงที่มีแคลลัสไปซับบนกระดาษทิชชูที่ฆ่าเชื้อแล้วให้พอหมาด
4. นำแคลลัสที่ได้ไปวางบนอาหารสูตร Co-culture กระจายแคลลัสให้ทั่วเพลท
5. เพาะเลี้ยงร่วมระหว่างอะโกรแบคทีเรียมกับแคลลัสในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน

ตอนที่ 4 การคัดเลือกชิ้นส่วนที่ได้รับการถ่ายยีน

1. ทำการล้างแคลลัสด้วยน้ำกลั่น 3 – 4 ครั้งก่อน โดยเก็บแคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงร่วมใส่ในหลอดฝาเกลียวขนาด 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปประมาณ 35 – 40 มิลลิลิตร กลับกลอกไปมา 3 – 4 ครั้ง แล้วเทน้ำทิ้ง
2. เมื่อล้างด้วยน้ำกลั่นเสร็จแล้ว ก็จะทำการล้างอีกครั้งด้วยอาหารล้างเนื้อเยื่อที่เตรียมไว้ กลับกลอกไป 4 – 5 ครั้ง
3. ซับบนกระดาษทิชชูให้พอหมาด จากนั้นก็ย้ายแคลลัสที่ได้ไปวางบนอาหารคัดเลือก (สูตรN6D) ที่มีไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และซีโฟแทกซิมความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร

4. นำแคลลัสที่ได้ไปเลี้ยงในที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์
5. ทำการย้ายแคลลัสที่สามารถต้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินได้หลังจากการเลี้ยง 2 สัปดาห์ ลงบนอาหารคัดเลือกใหม่สูตรเดิมทีมีไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตรและซีโฟแทกซิมความเข้นข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์
6. ย้ายแคลลัสที่ต้านทานสารปฏิชีวนะลงบนอาหารคัดเลือกสูตรชักนำให้เกิดต้นที่มีไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตรและซีโฟแทกซิมความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ย้ายลงบนอาหารใหม่สูตรเดิม เพาะเลี้ยงจนกว่าจะได้ต้น

2.2 การตรวจวิเคราะห์ต้นที่ได้รับการถ่ายยีน

ตอนที่ 1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบข้าว

1. บดใบข้าวให้ละเอียด
2. เติมสารสะลาย mCTAB ซึ่งมี 1% (v/v) 2-mercaptoethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร หรือตามสัดส่วนปริมาณใบ ถ้าเติม mCTAB ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จะต้องเติม mercaptoethanol ปริมาตร 1 ไมโครลิตร หรือปรับปริมาตรตามความเหมาะสมของปริมาณใบที่บดได้ แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Vortex
3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที โดยผสมให้เข้ากันทุก 10 และ 20 นาที
4. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
5. ย้ายเอาส่วนใสใส่ในหลอดใหม่ โดยห้ามเอาตะกอนออกมา จากนั้น
    5.1 เติม RNase A ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่อสารละลาย 300 ไมโครลิตร
    5.2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อย่างน้อยเป็นเวลา 30 นาที
6. เติม Chloroform ปริมาตร 500 ไมโครลิตร หรือ 1 เท่าของปริมาตรสารละลาย mCTAB แล้วทำการ Vortex เล็กน้อย

7. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
8. ย้ายชั้นน้ำด้านบนใส่ในหลอดใหม่ (ทำซ้ำในข้อที่ 6-7 จนกระทั่งชั้นของโปรตีนเหลือน้อยที่สุด) ซึ่งการทำซ้ำที่ 2 ถ้าย้ายชั้นน้ำมาปริมาตรเท่าไหร่ ให้เติม Chloroform ในปริมาตรที่เท่ากัน
9. เติม 3 M Na-acetate, pH 5.2 ปริมาตร 1/10 เท่า แล้วเติม absolute ethanol เย็นปริมาตร 2 เท่าของสารละลาย (จะสังเกตเห็นตะกอนสีขาวขุ่น) แล้วผสมให้เข้ากัน
10. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
11. เท absolute ethanol ทิ้ง แล้วเติม Ethanol ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ที่เย็น เพื่อล้างตะกอน (ล้างตะกอน จำนวน 2 ครั้ง)
12. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที
13. ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง แล้วละลายกลับด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร (ถ้ายังมีความหนืดของสารละลายมาก ให้เติมเพิ่ม)
14. ทำการวิเคราะห์ผลการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอริซิส

ตอนที่ 2 การตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ทำการวิเคราะห์ต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน *PAP1* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ F_PAP1 และR_PAP1 ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1*

1. เตรียมองค์ประกอบที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 5 องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ สำหรับใช้ตรวจสอบต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (µl) ปฏิกิริยา
2X Go Taq	1X	10
10µM F_PAP1	0.5µM	1

10μM R_PAP1	0.5μM	1
Template DNA	-	1
dH_2O	-	7
Total	-	**20**

2. ตั้งโปรแกรมเครื่องพีซีอาร์ ดังนี้

Initial	Deneturation	95 องศาเซลเซียส	5 นาที	
	Deneturation	94 องศาเซลเซียส	1 นาที	35 รอบ
	Annealing	63 องศาเซลเซียส	1 นาที	
	Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final	Extention	72 องศาเซลเซียส	10 นาที	
	Set	20 องศาเซลเซียส	12 ชั่วโมง	

การทดลองที่ 3 การถ่ายยีนเข้าสู่ยาสูบ

ต้นยาสูบที่ใช้ในการทดลอง

ยาสูบสายพันธุ์เบอร์เลย์ (Burley) จาก อ.ดร.กนกวรรณ รมยานนท์ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สวทช.) และ อ.ดร.ศรีเมฆ ชาวโพงพาง ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (บางเขน) กรุงเทพมหานคร

วิธีการทดลอง

การทดลองการศึกษาการถ่ายยีนสร้างแอนโทไซยานินเข้าสู่ยาสูบแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน ได้แก่

3.1. การเตรียมชิ้นส่วนใบยาสูบเพื่อใช้ในการถ่ายยีน

3.2. การส่งถ่ายยีนเข้าสู่ใบยาสูบ

3.3. การวิเคราะห์ต้นยาสูบที่ได้รับยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์

3.1 การเตรียมชิ้นส่วนต้นยาสูบเพื่อใช้ในการถ่ายยีน

1. เพาะเลี้ยงต้นยาสูบบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตและสารปฏิชีวนะ

2. เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 27-29 องศาเซลเซียส จนเจริญเป็นต้น
3. ทำการย้ายเนื้อเยื่อ (subculture) ต้นยาสูบโดยตัดชิ้นส่วนตายอดมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ใหม่ ทุกๆ 1 เดือน

3. 2 การถ่ายยีนเข้าสู่ใบยาสูบ

1. นำเนื้อเยื่อใบของต้นยาสูบจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสภาพที่ปลอดเชื้อ ตัดใบยาสูบโดยใช้บริเวณตรงกลางใบ แล้วทำการหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ให้มีขนาดประมาณ 0.5 x 1 เซนติเมตร จำนวน 20 ชิ้น
2. หลังจากนั้นนำมาปลูกถ่ายเชื้อร่วมกับสารละลายอะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ AGL1 ที่มีพลาสมิด pPAP1 ที่เตรียมไว้ในการทดลองที่ 2 เติมเชื้อลงไปในหลอด เติมอะซิโตไซริงกอน 200 ไมโครโมลาร์ ลงไปในหลอด 8 µl นำหลอดไปเขย่า 110 รอบต่อนาที นาน 15 นาที
3. จากนั้นเทเนื้อเยื่อลงบนตะแกรงแล้วซับให้แห้ง
4. นำชิ้นส่วนใบยาสูบไปวางบนอาหารสูตร MS ดัดแปลงสำหรับ Co-culture เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน
5. หลังจากนั้นล้างเนื้อเยื่อ โดยล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 40 ml ประมาณ 3 – 4 ครั้งหรือล้างจนกว่าจะใส (ควรเขย่าเบาๆ เพื่อไม่ให้ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อช้ำ)
6. จากนั้นล้างด้วยอาหารสูตร MS ดัดแปลง 40 ml โดยเติม ซีโฟแทคซิม 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงไป 48 ไมโครลิตร แล้วเขย่าเบาๆให้เข้ากันแล้วเทส่วนใสทิ้ง
7. ซับด้วยกระดาษทิชชูวางเนื้อเยื่อใบยาสูบบนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 1 (สูตร MS ดัดแปลง ที่เติมซีโฟแทคซิม 300 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร นำไปเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 27-29 องศาเซลเซียส
8. เมื่อครบสองสัปดาห์ย้ายชิ้นส่วนใบยาสูบลงบนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 2 (สูตร MS ดัดแปลงที่เติมซีโฟแทคซิม 300 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซิน 30 มิลลิกรัมต่อลิตร และย้ายลงบนอาหารใหม่ทุกๆ 2 สัปดาห์ เพาะเลี้ยงจนกว่าจะเกิดต้น

3.3 วิเคราะห์ต้นยาสูบโดยเทคนิคพีซีอาร์

ตอนที่ 1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบยาสูบที่ผ่านการถ่ายยีน ด้วยวิธี mCTAB

วิธีการ

1. บดใบยาสูบให้ละเอียดและแช่บนน้ำแข็ง
2. เติมสารสะลาย mCTAB ซึ่งมี 1% (v/v) 2-mercaptoethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปรับตามสัดส่วนปริมาณใบ ถ้าเติม mCTAB ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จะต้องเติม mercaptoethanol ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Vortex
3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที โดยผสมให้เข้ากันทุก 10 และ 20 นาที
4. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
5. ย้ายเอาส่วนใสใส่ในหลอดใหม่ โดยห้ามเอาตะกอนออกมา จากนั้น
    a. เติม RNase A ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่อสารละลาย 300 ไมโครลิตร
    b. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที
6. เติม chloroform ปริมาตร 500 ไมโครลิตร หรือ 1 เท่าของปริมาตรสารละลาย mCTAB แล้วทำการ Vortex เล็กน้อย
7. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
8. ย้ายชั้นน้ำด้านบนใส่ในหลอดใหม่ (ทำซ้ำในข้อที่ 6-7 จนกระทั่งชั้นของโปรตีนเหลือน้อยที่สุด) ซึ่งการทำซ้ำที่ 2 ถ้าย้ายชั้นน้ำมาปริมาตรเท่าไหร่ ให้เติม Chloroform ในปริมาตรที่เท่ากัน
9. เติม 3 M Na-acetate, pH 5.2 ปริมาตร 1/10 เท่า แล้วเติม absolute ethanol เย็น ปริมาตร 2 เท่าของสารละลาย (จะสังเกตเห็นตะกอนสีขาวขุ่น) แล้วผสมให้เข้ากัน
10. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

11. เท absolute ethanol ทิ้ง แล้วเติม ethanol ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ที่เย็น เพื่อล้างตะกอน (ล้างตะกอน จำนวน 2 ครั้ง)
12. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที
13. ตาก pellet ให้แห้ง แล้วละลายกลับด้วย 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร (ถ้ายังมีความหนืดของสารละลายมาก ให้เติมเพิ่ม)

ตอนที่ 2 การวิเคราะห์ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *pap1* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1*

ตารางที่ 6 องค์ประกอบของพีซีอาร์ ในการวิเคราะห์ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *pap1* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1*

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร
2X GoTaq	1X	10 µl
10 µM F_PAP1	0.5 µM	1 µl
10 µM R_PAP1	0.5 µM	1 µl
DNA Template	-	1 µl
dH_2O	-	7 µl
Total	-	**20 µl**

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์พีซีอาร์ ของต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *pap1* ด้วยพลาสมิด pPAP1 คือ F_PAP1 [5'CTA AAC CGG TGC AGG AAA AG3']

R_PAP1 [5'GTC CAA GGC TAG GAG GAT TA3']

ตั้งโปรแกรมเครื่องพีซีอาร์ดังนี้

lnitial Denaturation	94°C	3 min	
Denaturation	95°C	1 min	35 รอบ
Annealing	55°C	1 min	
Extention	72°C	1 min	

Final Extention	72°C	10 min
Set	20°C	12 hr

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

การสร้างชุดยีน *pap1* สำหรับถ่ายยีนในพืช

การทดลองนี้ต้องการนำยีน *pap1* (production of anthocyanin pigment) ซึ่งเป็นยีนที่ส่งเสริมการสังเคราะห์สาร anthocyanin มาสร้างชุดยีนให้อยู่ภายใต้การควบคุมของ 35S dual promoter, TEV Leader sequence (ได้จาก Tobacco Etch Virus) และ 35S terminator แล้วนำใส่เข้าไปในพลาสมิดที่ต้องการ เพื่อที่จะใช้ถ่ายยีนเข้าไปในพืช ซึ่งหากยีน *pap1* อยู่ภายใต้การควบคุมดังกล่าว 35S dual promoter จะส่งผลให้พืชที่ได้รับยีนมีการแสดงออกของยีน *pap1* อย่างสูงและตลอดเวลาในทุกเนื้อเยื่อพืช และส่วนของ TEV Leader จะช่วยส่งเสริมให้ยีนที่ต่อจากส่วนนี้มีการแสดงออกอย่างสูง โดยยีน *pap1* จะแสดงออกเป็นสีแดงหรือม่วงเข้ม ทำให้ง่ายต่อการคัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับยีน ขั้นตอนการสร้างชุดยีน *pap1* มีดังนี้

1. การเตรียม competent cell

นำเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α มาเตรียม competent cell ด้วยวิธี $CaCl_2$ จากนั้นทำการทดสอบ competent cell โดยนำพลาสมิด pRTL2 มาถ่ายฝากเข้าสู่ competent cell แล้วเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่เติมแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทำ 3 ทรีตเมนต์ (ตารางที่ 15) พบว่า T1 และ T2 ซึ่งเป็นชุดควบคุมไม่เกิดโคโลนี แสดงว่า competent cell ไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อที่มีพลาสมิดต้านยาแอมพิซิลิน ส่วน T3 เกิดโคโลนี 1,520 โคโลนี แสดงว่า competent cell สามารถรับพลาสมิด pRTL2 เข้าไปได้ เมื่อนำมาคำนวณประสิทธิภาพของ competent cell โดยใช้สูตร

ประสิทธิภาพของ competent cell (จำนวนโคโลนีต่อ 1 ไมโครกรัม ดีเอ็นเอ)

$$= \frac{\text{จำนวนโคโลนี} \times \text{ปริมาตรสุดท้าย (จากการ transformation)} \times \text{dilution factor}}{\text{ปริมาตรที่ใช้ในการ spread} \times \text{ไมโครกรัมดีเอ็นเอที่ใช้}}$$

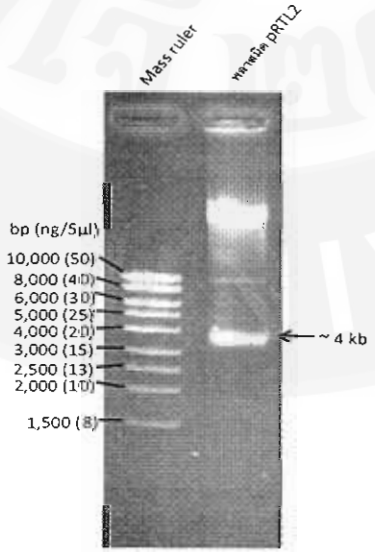
ได้เท่ากับ 1.52×10^4 โคโลนีต่อไมโครกรัมดีเอ็นเอ ซึ่งมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับค่าประสิทธิภาพของ competent cell ที่เตรียมด้วยวิธี $CaCl_2$ ตามทฤษฎี คือ $10^5 - 10^6$ ไมโครกรัม ดีเอ็นเอ จึงสามารถนำ competent cell ที่เตรียมมาใช้ในการทดลองต่อไปได้

ตารางที่ 7 การทดสอบ competent cell บนอาหารแข็ง LB ที่เติมแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

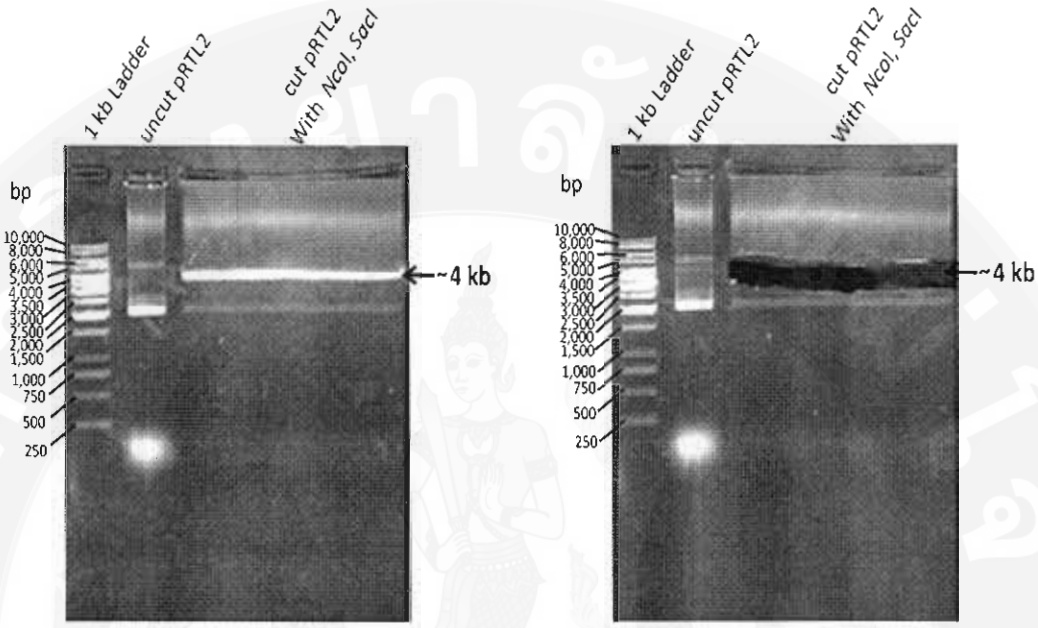
ทรีตเมนต์	Competent cell (ไมโครลิตร)	dH_2O (ไมโครลิตร)	pRTL2 (ไมโครลิตร)	จำนวนโคโลนี
T1	200	-	-	-
T2	200	5	-	-
T3	200	-	5	1,520

2. การเตรียมพลาสมิดเวกเตอร์ pRTL2

สกัดพลาสมิด pRTL2 (ภาพที่ 11) ซึ่งมีขนาด 3,900 bp ด้วยวิธี Alkaline lysis method (ภาพที่ 11) เพื่อใช้เป็นเวกเตอร์สำหรับการโคลนยีน *pap1* จากนั้นนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I และ *Sac*I เพื่อแยกเอา coding sequence ออก และใช้เป็นบริเวณสำหรับการโคลนยีน *pap1* จากนั้นทำการแยกบริสุทธิ์เวกเตอร์ pRTL2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I และ *Sac*I แล้วจากเจล โดยใช้ชุด PCR clean-up Gel extraction (ภาพที่ 12 ก และ ข) นำไปคำนวณความเข้มข้นของพลาสมิดด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอริซิส พบว่า ได้พลาสมิด pRTL2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I และ *Sac*I ขนาดประมาณ 4 kb (ภาพที่ 13) และมีความเข้มข้นเท่ากับ 16.66 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

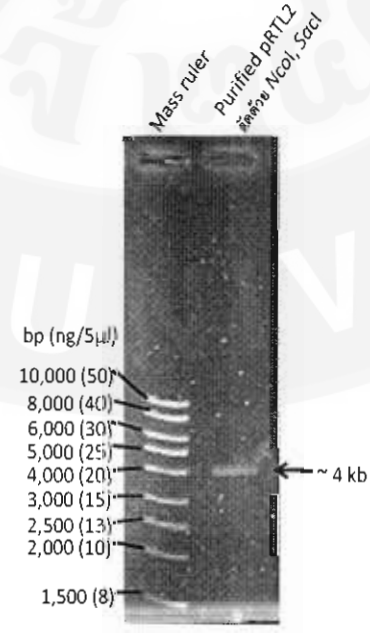


ภาพที่ 11 การวิเคราะห์พลาสมิด pRTL2 ที่สกัดด้วยวิธี Alkaline lysis method



ก. ข.

ภาพที่ 12 การวิเคราะห์พลาสมิด pRTL2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I และ *Sac*I เปรียบเทียบกับ พลาสมิด pRTL2 ที่ยังไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (uncut pRTL2) ก) ก่อนตัดเจล และ ข) หลังตัดเจลที่มีแถบดีเอ็นเอ

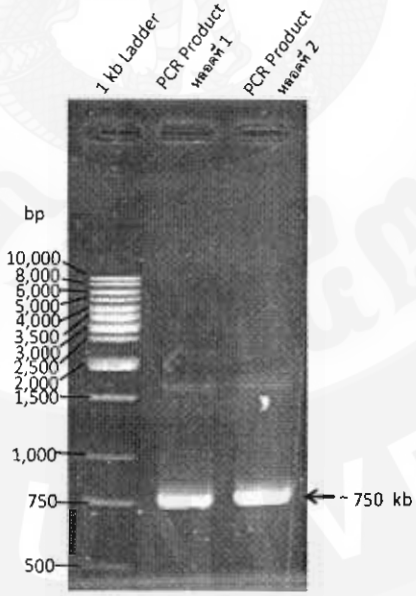


ภาพที่ 13 การวิเคราะห์พลาสมิด pRTL2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I และ *Sac*I แล้วทำการแยกบริสุทธิ์โดยใช้ชุด PCR clean-up Gel extraction

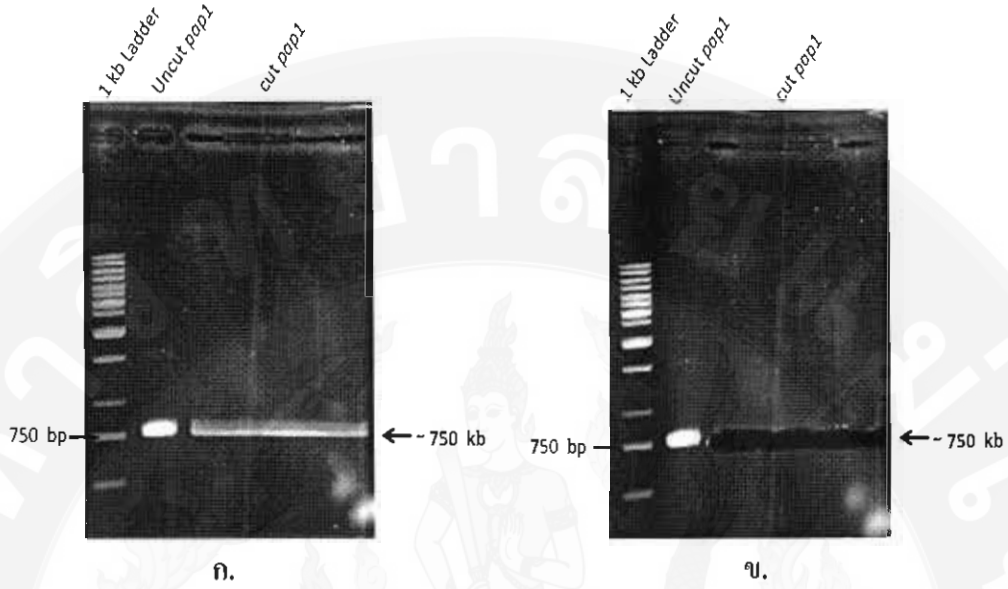
3. การเพิ่มปริมาณชิ้นยีน *pap1* จากพลาสมิด 3PAP-Red ด้วยเทคนิค PCR

นำพลาสมิด 3PAP-Red ขนาด 11 kb (ภาพที่ 8) ที่สกัดพลาสมิดด้วยชุด kit (Plasmid DNA Purification) มาเพิ่มปริมาณชิ้นยีน *pap1* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer F1_NcoI PAP1 และ R_SacI PAP1 ซึ่งจะได้ผลผลิต PCR คือ ชิ้นยีน *pap1* ที่มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ *Nco*I และ *Sac*I ที่ปลาย 5' และ 3' ของยีน ตามลำดับ (ภาพที่ 14)

จากนั้นนำชิ้นยีน *pap1* ที่ได้จากการทำ PCR มาแยกบริสุทธิ์จากเจล โดยใช้ชุด PCR clean-up Gel extraction นำดีเอ็นเอที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I และ *Sac*I แล้วทำการแยกบริสุทธิ์ดีเอ็นเอจากเจลอีกครั้ง (ภาพที่ 15 ก และ ข) จากนั้นคำนวณความเข้มข้นด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอริซิส พบว่า ได้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 750 bp (ภาพที่ 16) มีความเข้มข้น 21.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

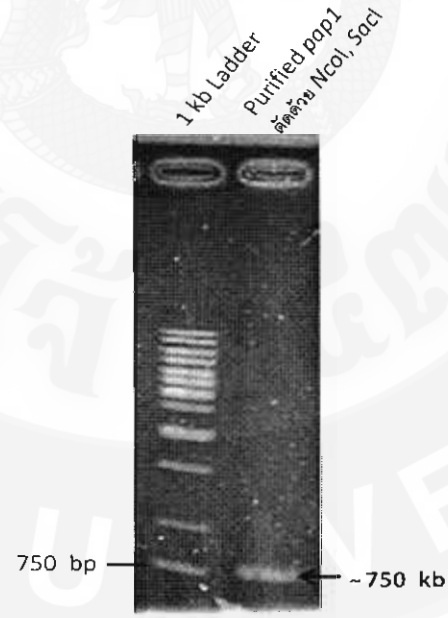


ภาพที่ 14 การวิเคราะห์ชิ้นยีน *pap1* ที่ได้จากเทคนิค PCR



ก. ข.

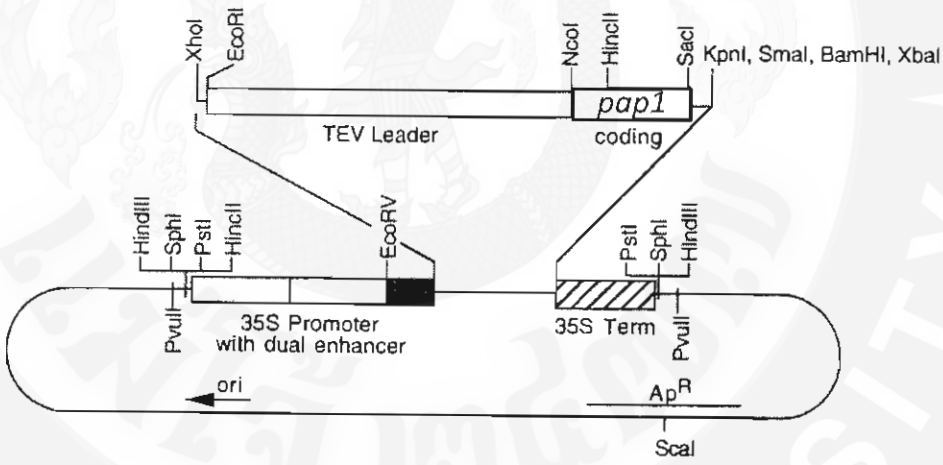
ภาพที่ 15 การวิเคราะห์ยีน *pap1* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I และ *Sac*I เปรียบเทียบกับยีน *pap1* ที่ยังไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (uncut *pap1*) ก) ก่อนตัดเจล และ ข) หลังตัดเจลที่มีแถบดีเอ็นเอ



ภาพที่ 16 การวิเคราะห์ชิ้นยีน *pap1* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I และ *Sac*I แล้วทำการการแยกบริสุทธิ์โดยใช้ชุด PCR clean-up Gel extraction

4. การเชื่อมต่อชิ้นยีน *pap1* กับเวกเตอร์ pRTL2

ทำการคำนวณหาปริมาณเวกเตอร์ pRTL2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I และ *Sac*I และชิ้นยีนที่สนใจ คือยีน *pap1* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I และ *Sac*I โดยกำหนดอัตราส่วนน้ำหนัก (Weight ratio) ของ vector (V) ต่อ insert (I) คือเวกเตอร์ (pRTL2) ต่อชิ้นยีนที่สนใจ (*pap1*) เท่ากับ 1:3 และ 1:5 จากนั้นทำการเชื่อมต่อเวกเตอร์ต่อชิ้นยีนที่สนใจ โดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase ทำปฏิกิริยา ligation ที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 – 17 ชั่วโมง จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาโดยบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วนำปฏิกิริยาที่ได้ไปฝากถ่ายเข้าสู่ competent cell ของ *E. coli* เพื่อคัดเลือกโคลนที่มีพลาสมิดสายผสมที่เกิดจากการเชื่อมต่อชิ้นยีน *pap1* กับ เวกเตอร์ pRTL2 โดยให้ชื่อพลาสมิดสายผสมที่ได้ว่า pKL1



ภาพที่ 17 แผนที่พลาสมิด pKL1

5. การถ่ายฝากพลาสมิดสายผสม (pKL1) ที่ได้จากการเชื่อมต่อชิ้นยีน *pap1* กับเวกเตอร์ pRTL2 เข้าสู่ competent cell *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธี Heat shock

นำพลาสมิดสายผสม pKL1 (ภาพที่ 17) ที่ได้จากการเชื่อมต่อชิ้นยีน *pap1* กับเวกเตอร์ pRTL2 ทำการถ่ายฝากเข้าสู่ competent cell ของ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธี Heat shock จากนั้น spread บนอาหารแข็ง LB ที่เติมแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทำ 3 ทรีตเมนต์ โดยให้ T1 เป็นชุดควบคุม T2 และ T3 คือ V:I = 1:3 และ 1:5 ตามลำดับ (ตารางที่ 8) พบว่า มีโคโลนี

เกิดขึ้นทั้ง 3 ทรีตเมนต์ จาก T1 แสดงว่าพลาสมิดเวกเตอร์ pRTL2 อาจตัดไม่สมบูรณ์ และจาก T2 และ T3 แสดงว่า competent cell อาจได้รับพลาสมิดสายผสม pKL1 เข้าไปในเซลล์

ตารางที่ 8 การถ่ายฝากพลาสมิดสายผสม (pKL1) เข้าสู่ competent cell และคัดเลือกโคลนบนอาหารแข็ง LB ที่เติม แอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

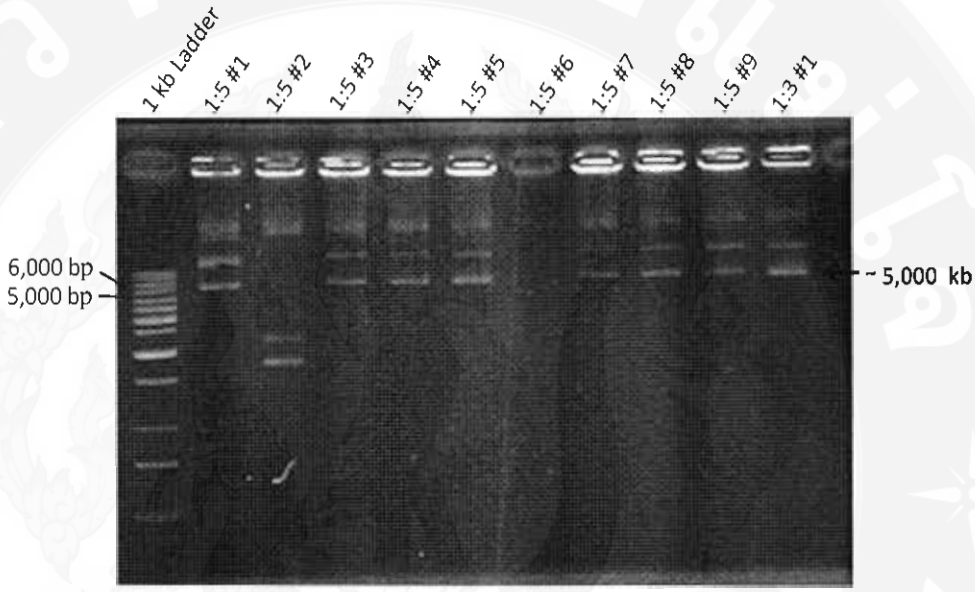
Treatment	ปฏิกิริยา ligation	จำนวนโคโลนี
T1	V	137
T2	V:I=1:3	มากกว่า 300
T3	V:I=1:5	มากกว่า 300

หมายเหตุ V = pRTL2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I และ *Sac*I และทำให้บริสุทธิ์แล้ว
1 = ยีน *pap1* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I และ *Sac*I และทำให้บริสุทธิ์แล้ว
T1 = V ที่ไม่เติมเอนไซม์ T4 DNA ligase

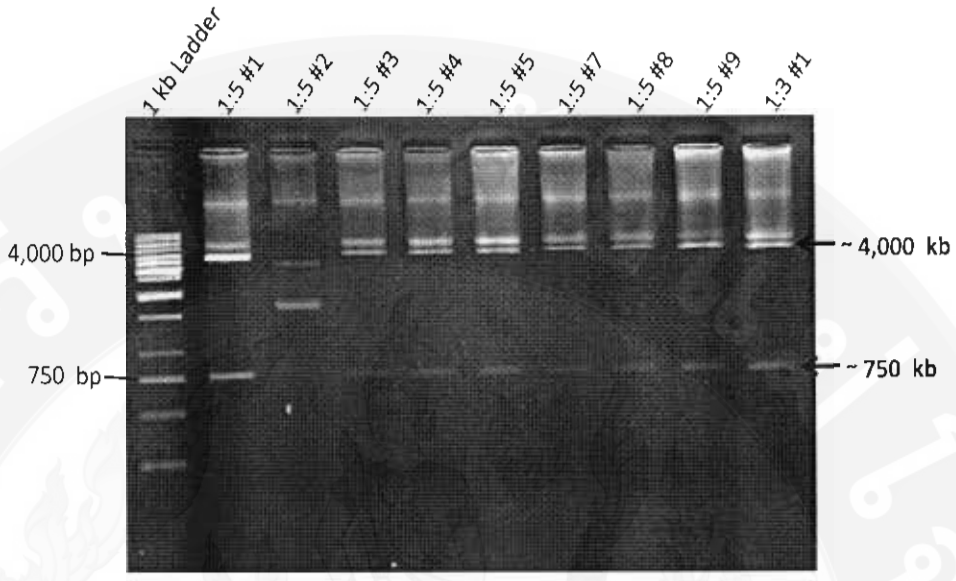
6. การตรวจสอบโคลนที่มีพลาสมิดสายผสม

นำโคลนที่ได้จากการถ่ายฝากพลาสมิดสายผสมไปตรวจสอบว่ามียีน *pap1* หรือไม่ ซึ่งคาดว่าเมื่อทำการสกัดพลาสมิดแล้ว นำไปตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I และ *Sac*I จะเห็นแถบดีเอ็นเอขนาด 3,900 bp (pRTL2) และ 750 bp (ยีน *pap1*) โดยนำโคโลนีเดี่ยวที่ได้จาก V:I = 1:3 จำนวน 1 โคโลนี และ V:I = 1:5 จำนวน 9 โคโลนี ไปสกัดพลาสมิดแล้วตรวจสอบด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอริซิส พบว่า มีแถบดีเอ็นเอขึ้นทุกตัวอย่าง ยกเว้น 1:5 โคโลนีที่ 6 โดย 1:3 โคโลนีที่ 1 และ 1:5 โคโลนีที่ 1, 3, 4, 5, 7, 8 และ 9 ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 5,000 bp ซึ่งน่าจะอยู่ในโครงรูป Relaxed และน่าจะเป็นพลาสมิดสายผสม pKL1 ซึ่งมีขนาดประมาณ 4,650 bp (pKL1 = pRTL2 3,900 bp + *pap1* 750 bp) และ 1:5 โคโลนีที่ 2 มีแถบดีเอ็นเอขนาดต่างจากโคลนอื่นแต่มีลักษณะคล้ายกันจึงนำไปทำการตรวจสอบต่อไป (ภาพที่ 18)

จากนั้นนำพลาสมิดที่สกัดได้ทุกโคลนไปตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I และ *Sac*I และทำการตรวจสอบด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอริซิส พบว่า ทุกโคลนยกเว้น 1:5 โคลนที่ 2 มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3,900 bp และ 750 bp เกิดขึ้น แสดงว่าทุกโคลนน่าจะมีพลาสมิดสายผสม pKL1 ซึ่งมีชิ้นยีน *pap1* แทรกอยู่ (ภาพที่ 19)

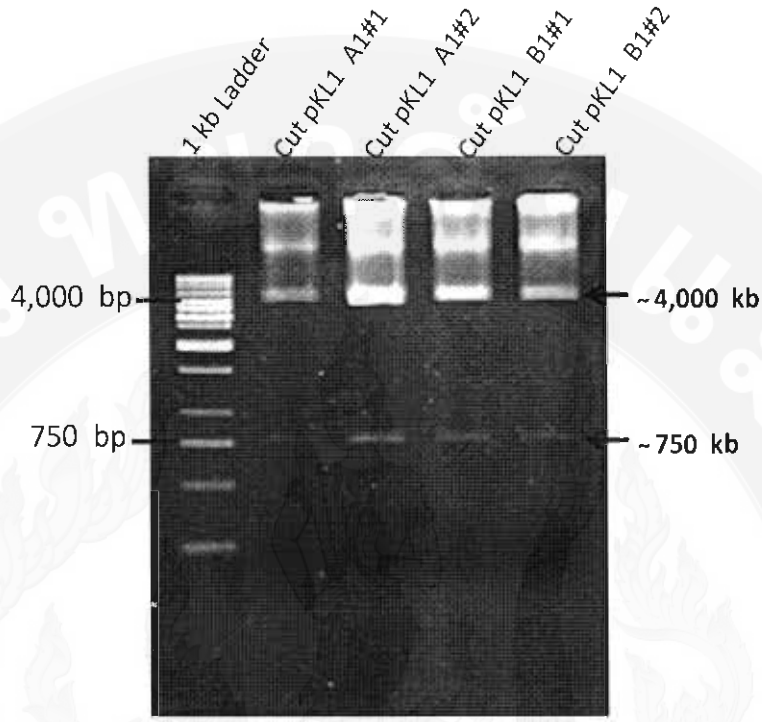


ภาพที่ 18 การวิเคราะห์พลาสมิดที่สกัดได้จาก 1:5 โคโลนีที่ 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 1:3 โคโลนีที่ 1 โดยเปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb Ladder Plus ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอริซิส



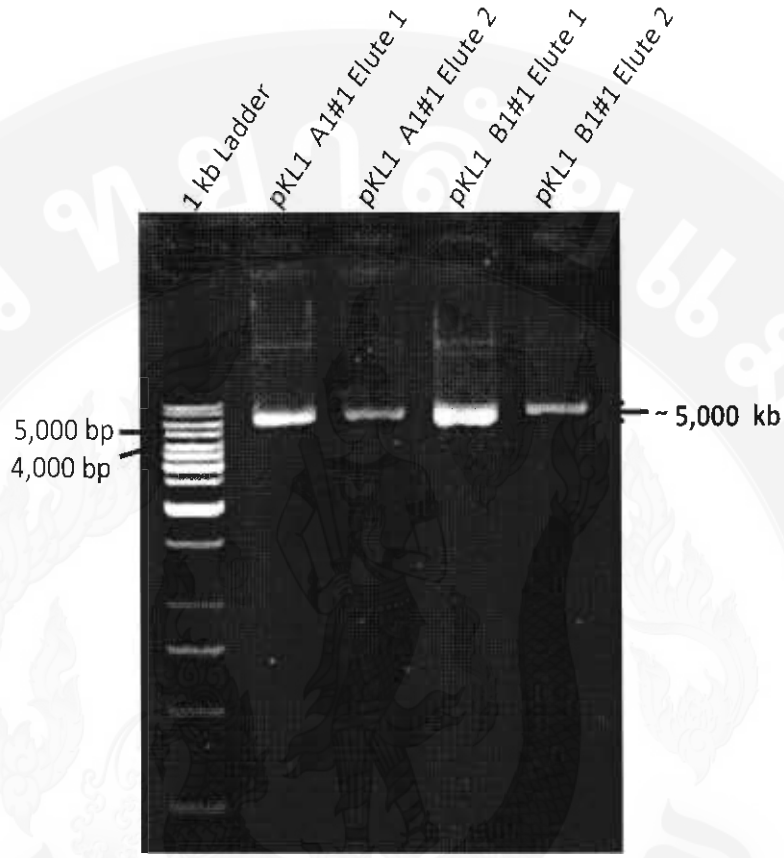
ภาพที่ 19 การวิเคราะห์โคลนที่มีพลาสมิดสายผสม pKL1 โดยดัดพลาสมิดที่สกัดได้จาก 1:5 โคโลนีที่ 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 1:3 โคโลนีที่ 1 ด้วยเอนไซม์ *Nco*I และ *Sac*I โดยเปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb Ladder Plus ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอริซิส

จากนั้นนำโคลน 1:3 โคลนที่ 1 โดยให้ชื่อว่า A และ 1:5 โคลนที่ 1 โดยให้ชื่อว่า B มา sterak บนอาหารแข็ง LB ที่เติมแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว (เนื่องจากโคลน A และ B เกิด Satellites ขึ้นรอบๆ โคโลนีเดี่ยว) แล้วเลือกโคโลนีเดี่ยวจากโคลน A จำนวน 2 โคโลนี (A1 และ A2) และ B จำนวน 2 โคโลนี (B1 และ B2) มาสกัดพลาสมิด และตรวจสอบโดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I และ *Sac*I แล้วทำการตรวจสอบด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอริซิส พบว่า ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3,900 bp และ 750 bp เกิดขึ้น (ภาพที่ 20) แสดงว่าโคลน A1, A2, B1 และ B2 มียีน *pap1* แทรกอยู่จากนั้นได้ทำการเก็บ glycerol stock ของ โคลน A1 และ B1



ภาพที่ 20 การวิเคราะห์พลาสมิด pKL1 ที่ได้จากโคลน A1, A2, B1 และ B2 โดยตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I และ *Sac*I เปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb Ladder Plus ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอริซิส

เตรียมพลาสมิด pKL1 ส่งไปวิเคราะห์หาลำดับเบส โดยนำ pKL1 จากโคลน A1 และจากโคลน B1 มาสกัด พลาสมิดด้วยชุด kit (Plasmid DNA Purification) ทำการตรวจสอบ และคำนวณความเข้มข้นด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอริซิส พบว่า มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 5,000 bp (ภาพที่ 21) โคลน A1 Elute1 และ B1 Elute1 มีความเข้มข้น 30.67 และ 61.33 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ นำพลาสมิด pKL1 ส่งไปวิเคราะห์ลำดับเบสเพื่อนำมาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีน *pap1* ที่รายงานใน GenBank (Accession number NM_104541.3)



ภาพที่ 21 การวิเคราะห์พลาสมิด pKL1 โคลน A1 Elute 1, A1 Elute 2, B1 Elute 1 และ B1 Elute 2 ที่ได้จากการสกัดด้วยชุดkit โดยเปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb Ladder Plus ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอริซิส

พลาสมิด pKL1 ได้ถูกส่งไปวิเคราะห์หาลำดับเบส และพบว่า มีลำดับเบสบางส่วนในบริเวณ coding region ของยีน *pap1* แตกต่างจากลำดับเบสของยีน *pap1* ที่รายงานใน GenBank จึงได้ทำการเลือกโคลนใหม่และสร้าง construct ใหม่ ที่มียีน *pap1* อยู่ภายใต้การควบคุมของ 35S dual promoter และ *nos* terminator และมีชื่อ construct หรือพลาสมิดว่า pPAP1 (ศรีเมฆ Unpublished, 2554) และถ่ายฝากเข้าสู่อะโกรแบคทีเรียม สายพันธุ์ AGL1 เพื่อใช้ถ่ายยีน *pap1* เข้าสู่ข้าวและยาสูบ

การถ่ายยีนสร้างแอนโทไซยานินเข้าสู่แคลลัสข้าว

การทดลองถ่ายยีน *pap1* เข้าสู่แคลลัสข้าวพันธุ์ Kitaake โดยใช้อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ AGL1 ที่มีพลาสมิด pPAP1 ซึ่งมียีน *pap1* อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ 35S มียีน *hpt*II เป็นยีนเครื่องหมายที่ใช้คัดเลือกเนื้อเยื่อที่ได้รับยีน เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีนสร้างสารแอนโทไซยานินเข้าสู่แคลลัสข้าว

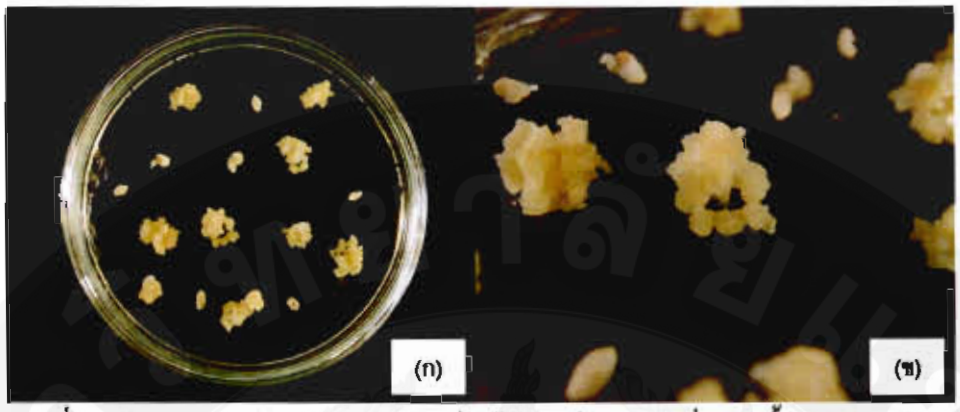
โดยทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดแก่ข้าวพันธุ์ Kitaake บนอาหารสูตร N6D เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 4 สัปดาห์ เพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส เนื้อเยื่อส่วนที่เป็นเอ็มบริโอหรือส่วนจมูกข้าวจะเกิดการเจริญและแตกตัวเป็นแคลลัส (ภาพที่ 22ก.) ซึ่งแคลลัสที่ดีจะต้องเป็นสีเหลืองอ่อน กลม แน่น และมีลักษณะของการแบ่งตัวที่ดี (ภาพที่ 22ข.)

จากนั้นทำการปลูกถ่ายเชื้อและเพาะเลี้ยงร่วมระหว่างแคลลัสกับอะโกรแบคทีเรียม เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N6D ดัดแปลง (อาหารสูตร N6D ที่เติมอะซิโตไซริงโกน) ในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน แคลลัสที่ได้จะมีเป็นสีเหลือง กลม แน่น (ภาพที่ 23)

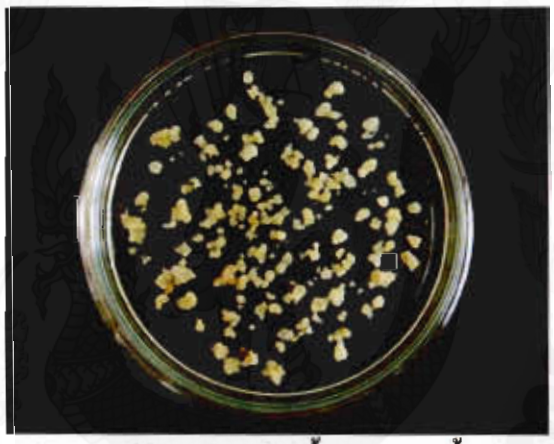
จากนั้นทำการล้างแคลลัสด้วยน้ำกลั่นและอาหารล้างเนื้อเยื่อที่เติมซีโฟแท็กซิม วางลงบนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 1 เพาะเลี้ยง 2 สัปดาห์ จากนั้นย้ายลงบนอาหารคัดเลือกครั้งที่ 2 เพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าแคลลัสที่ด้านทานสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน สามารถเจริญได้จะมีลักษณะเป็นสีเหลือง ส่วนแคลลัสที่ไม่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะก็จะตายลง (ภาพที่ 19) กลุ่มแคลลัสที่สามารถเจริญได้และรอดตายบนอาหารคัดเลือกอยู่ในช่วง 52 - 98 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 24)

หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกทั้ง 2 ครั้งแล้วก็จะทำการย้ายแคลลัสที่ต้านทานสารปฏิชีวนะลงบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น ทำการย้ายเนื้อเยื่อแคลลัสทุก 2 สัปดาห์ ลงบนอาหารสูตรเดิม กลุ่มแคลลัสที่เจริญได้จะเกิดการแบ่งตัวและเกิดเป็นจุดเขียวหรือขาวและเจริญเป็นยอด (ภาพที่ 25) กลุ่มแคลลัสที่เกิดยอดทั้งหมดอยู่ในช่วง 7 – 11 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 9) กลุ่มแคลลัสที่เกิดยอดสีเขียวบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นอยู่ในช่วง 5 - 11 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 9 และภาพที่ 25 ข.) กลุ่มแคลลัสที่เกิดยอดสีขาวบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นอยู่ในช่วง 2 – 3 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 9 และภาพที่ 25ค.) เมื่อทำการย้ายและเพาะเลี้ยงต่อไปบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น กลุ่มแคลลัสที่ต้านทานสารปฏิชีวนะก็จะเจริญเป็นต้น (ภาพที่ 26) ได้ทั้งหมดจำนวน 23 ต้น คิดเป็น 7 - 10 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 9) ของการถ่ายยีนทั้งหมด

จากนั้นนำต้นที่ได้ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS เพื่อชักนำให้เกิดรากบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญ (ภาพที่ 27) เมื่อสังเกตดูว่าต้นข้าวแข็งแรง มีการเพิ่มจำนวนของรากมากขึ้นก็จะทำการย้ายปลูกลงในกระถางต่อไป (ภาพที่ 28)



ภาพที่ 22 ลักษณะการเกิดแคลลัสของเมล็ดข้าวพันธุ์ Kitaake ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N6D ระยะเวลา 4 สัปดาห์



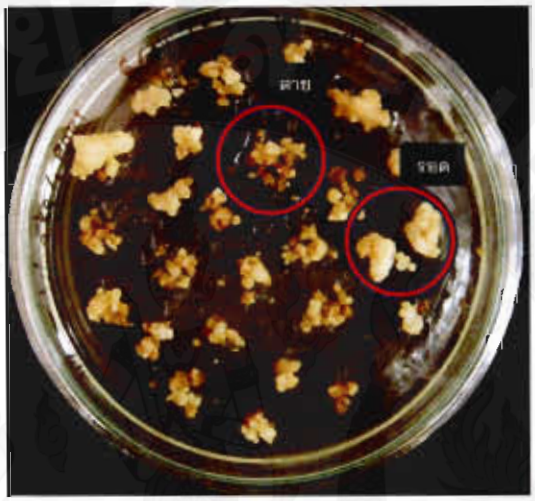
ภาพที่ 23 ลักษณะของแคลลัสภายหลังการปลูกถ่ายเชื้อและเพาะเลี้ยงร่วมเป็นระยะเวลา 3 วัน

ตารางที่ 9 ประสิทธิภาพการถ่ายยีน *pap1* เข้าสู่แคลลัสข้าวพันธุ์ Kitaake แสดงกลุ่มแคลลัสที่รอดบนอาหารคัดเลือก และการเกิดต้น

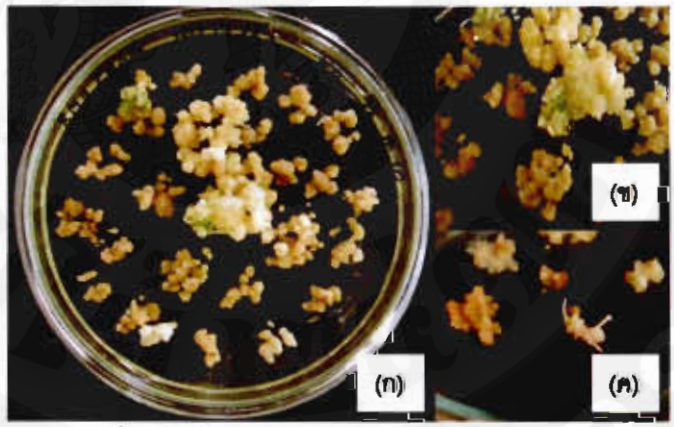
ครั้งที่ถ่ายยีน	จำนวนกลุ่มแคลลัสทั้งหมด	จำนวนกลุ่มแคลลัสที่รอดบนอาหารคัดเลือก	จำนวนกลุ่มแคลลัสที่เกิดยอดทั้งหมด	จำนวนกลุ่มแคลลัสที่เกิดยอดสีเขียว	จำนวนกลุ่มแคลลัสที่เกิดยอดสีขาว	จำนวนต้นทั้งหมด
1	76	58/76 (76)	4/58 (7)	3/58 (5)	1/58 (2)	6/58 (10)
2	97	56/97 (58)	4/56 (7)	3/56 (5)	1/56 (2)	4/56 (7)
3	82	43/82 (52)	3/43 (7)	3/43 (7)	0	3/43 (7)
4	60	59/60 (98)	5/59 (8)	3/59 (5)	2/59 (3)	5/59 (8)

5	57	47/57 (82)	5/47 (11)	5/ 47(11)	0	6/47 (13)

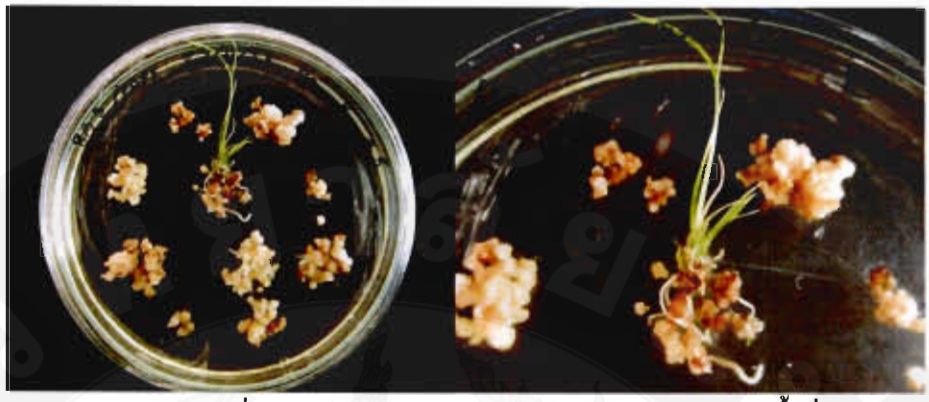
หมายเหตุ ใน 1 กลุ่มแคลลัส สามารถแยกเป็นต้นได้มากกว่า 1 ต้น



ภาพที่ 24 ลักษณะแคลลัสที่รอดตายบนอาหารคัดเลือกสูตร N6D ดัดแปลง ครั้งที่ 2 หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์

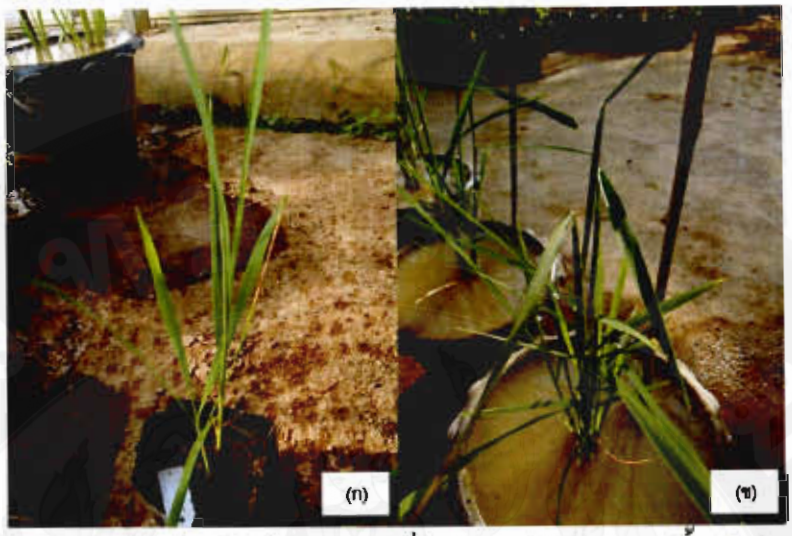


ภาพที่ 25 ลักษณะกลุ่มแคลลัสที่เกิดเป็นตายอดบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นครั้งที่ 2 หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (ก) ลักษณะของแคลลัสที่ต้านทานสารปฏิชีวนะและเกิดการแบ่งตัว (ข) ลักษณะของแคลลัสที่เกิดตายอดสีเขียว (ค) ลักษณะของแคลลัสที่เกิดตายอดสีขาว



ภาพที่ 26 ลักษณะของแคลลัสที่เจริญเป็นต้นบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นครั้งที่ 3 หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์

ภาพที่ 27 ลักษณะของต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ผ่านการถ่ายยีนและเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ระยะเวลา 3 สัปดาห์ (ก) ต้นข้าวปกติ (ข) ต้นข้าวสีขาว

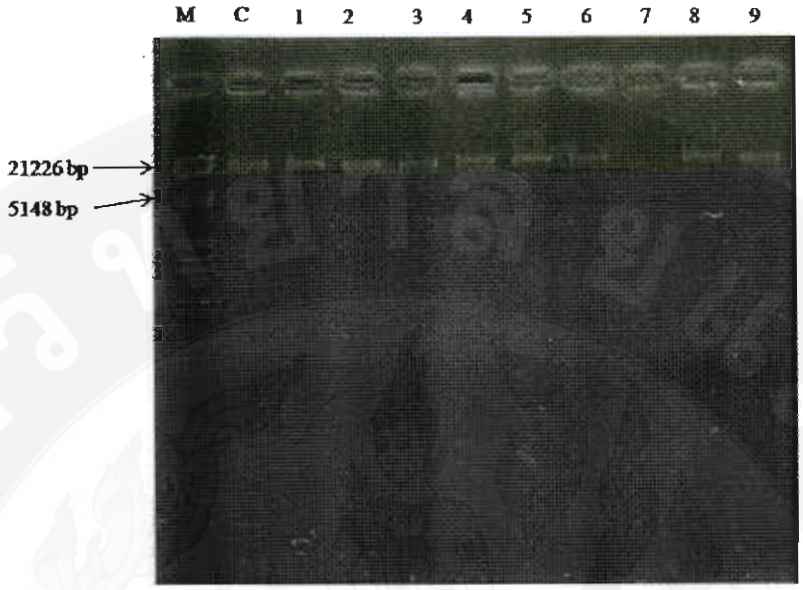


ภาพที่ 28 ลักษณะของต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ผ่านการถ่ายยีน เพาะเลี้ยงในโรงเรือนกระจก (ก) เพาะลงดินอายุ 2 สัปดาห์ (ข) เพาะลงดินอายุ 5 สัปดาห์

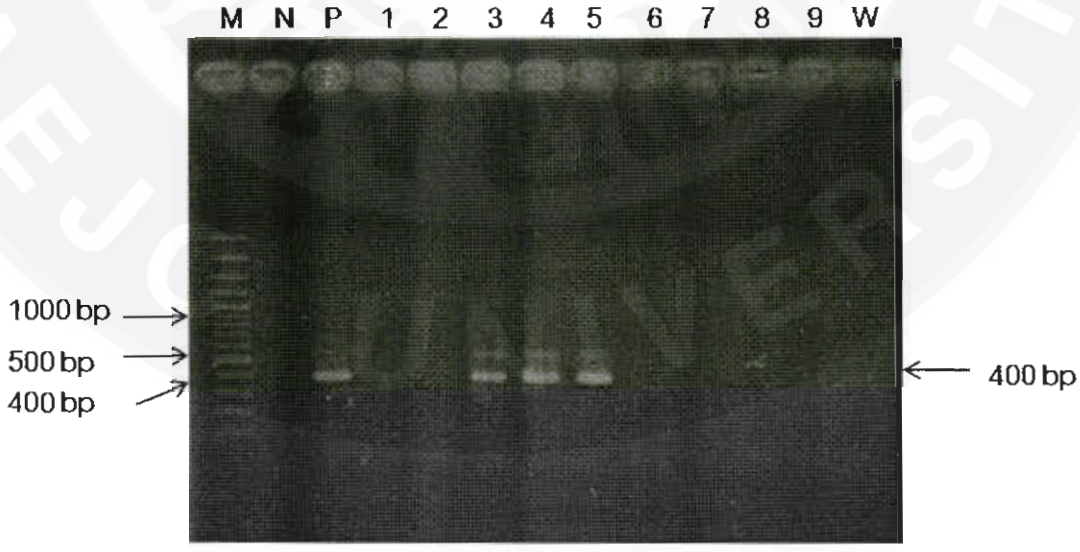
การตรวจวิเคราะห์ต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน *pap1* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

นำใบข้าวจากต้นที่ผ่านการถ่ายยีน *pap1* มาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยวิธี mCTAB โดยทำการสกัดทั้งหมด 2 ครั้ง พบว่า เห็นแถบดีเอ็นเอขนาดใหญ่และมีคุณภาพดี (ภาพที่ 29 และ 30 ตามลำดับ) สามารถนำไปใช้ทำพีซีอาร์ต่อไปได้

ผลการตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมข้าวด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ F_PAP1 และ R_PAP1 ซึ่งจำเพาะต่อยีน *pap1* โดยตรวจสอบข้าวทั้งหมด 18 ต้น ในการทำครั้งที่ 1 จากดีเอ็นเอตัวอย่าง 9 ต้น พบว่า มีอยู่ 3 ต้น ซึ่งได้จากการถ่ายยีนครั้งที่ 1 ที่มีแถบดีเอ็นขนาด 400 คู่เบส เกิดขึ้นและมีขนาดเท่ากับ พลาสมิด pPAP1 (Positive control) คิดเป็น 16.66 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 30 และตารางที่ 10) จึงกล่าวได้ว่า ทั้ง 3 ต้นมีการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมของข้าว ส่วนในครั้งที่ 2 จากดีเอ็นเอตัวอย่าง 9 ต้น พบว่า มีอยู่ 1 ต้น ซึ่งได้จากการถ่ายยีนครั้งที่ 5 ที่มีแถบดีเอ็นขนาด 400 คู่เบส เกิดขึ้นและมีขนาดเท่ากับพลาสมิด PAP1 (Positive control) คิดเป็น 5.55 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 30 และตารางที่ 10) จึงอาจกล่าวได้ว่า ต้นข้าวที่ได้นั้นมีการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมของข้าว



ภาพที่ 29 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ได้รับการถ่ายยีน *pap1* ครั้งที่ 1 จำนวน 9 ต้น M คือ Lambda DNA/*Eco*RI+*Hind*lll Marker, C คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน (Control) และ 1 – 9 คือต้นข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนและต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ได้แก่ ต้นที่ 3.1(1.1), 3.1(1.2), 3.1(1.3), 3.1(2.1), 3.1(3.1), 5.1(1.1), 5.1(1.1w), 3.1(1.4) และ 3.1(1.4w) ตามลำดับ



ภาพที่ 30 การตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมข้าวด้วยเทคนิคพีซีอาร์ครั้งที่ 1 โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1* โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder, N คือ ต้น

ข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน (Negative control), P คือ พลาสมิด pPAP1 (Positive control), 1 – 9 คือ ต้นข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนและต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ได้แก่ ต้นที่ 3.1(1.1), 3.1(1.2), 3.1(1.3), 3.1(2.1), 3.1(3.1), 5.1(1.1), 5.1(1.1w), 3.1(1.4) และ 3.1(1.4w) ตามลำดับ และ W คือ น้ำกลั่น

ตารางที่ 10 สรุปผลการทำพีซีอาร์ของต้นข้าวที่ผ่านการถ่ายยีน เพื่อตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมข้าว

ครั้งที่	ลักษณะ	จำนวนต้นที่ทำพีซีอาร์ทั้งหมด	จำนวนต้นที่ได้ผลพีซีอาร์บวก	ต้นที่ได้ผลพีซีอาร์บวก	เปอร์เซ็นต์ต้นที่ได้พีซีอาร์บวก
1	ยอดเขียว	6	3	3.1 (1.3) 3.1(2.1) 3.1(3.1)	16.66
	ยอดขาว	1	0	0	0
2	ยอดเขียว	2	0	0	0
	ยอดขาว	1	0	0	0
3	ยอดเขียว	0	0	0	0
	ยอดขาว	0	0	0	0
4	ยอดเขียว	1	0	0	0
	ยอดขาว	2	0	0	0
5	ยอดเขียว	5	1	11.1 (1.1)	5.55
	ยอดขาว	0	0	0	0

การถ่ายยีนสร้างแอนโทไซยานินเข้าสู่ใบยาสูบ

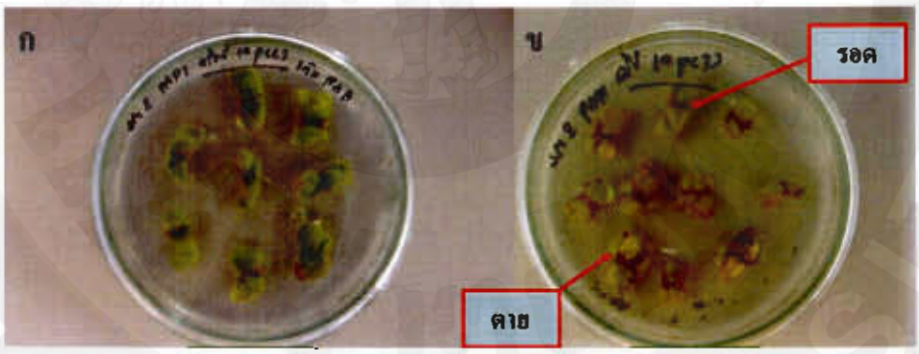
จากการทดลองถ่ายยีน *pap1* ซึ่งเป็นยีนสร้างแอนโทไซยานิน เข้าสู่ยาสูบพันธุ์เบอร์เลย์ด้วยอะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ AGL1 ที่มีพลาสมิด pPAP1 ซึ่งมียีน *pap1* อยู่ภายใต้การควบคุมของ 35S โปรโมเตอร์ เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีน ซึ่งมีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินเป็นสารคัดเลือก หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนใบยาสูบมีการรอดบนอาหารคัดเลือกสูงที่สุดคิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 11) หลังจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 4 – 6 สัปดาห์ พบว่าชิ้นส่วนใบเกิดตายอดทั้งหมดสูงสุดคิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 11) และเกิดตายอดสีแดงสูงสุดคิดเป็น 44.44 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 11) และหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ตายอดสามารถเจริญเป็นต้นทั้งหมด แบ่งออกเป็น 3 แบบ คือ ต้นที่เป็นสีเขียวทั้งต้น ต้นที่มีสีเขียวปนแดง และ ต้นที่มีสีแดง (ภาพที่ 34 และ 36) ซึ่งในบางกรณีบางต้นอาจจะมีสีแดงในสัปดาห์ที่ 8 หลังจากนั้นสัปดาห์ที่ 10 จะกลายเป็นต้นสีเขียว

ตารางที่ 11 ประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่ชิ้นส่วนใบยาสูบด้วยอะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ AGL1 ที่มีพลาสมิด pPAP1

ครั้งที่ถ่ายยีน	จำนวนชิ้นส่วนเริ่มต้นทั้งหมด	จำนวนชิ้นส่วนที่รอดบนอาหารคัดเลือก	จำนวนชิ้นส่วนที่เกิดตายอดทั้งหมด	จำนวนชิ้นส่วนที่เกิดตายอดสีแดง	จำนวนต้นทั้งหมด
1	40	9/40 (22.5)	9/40 (22.5)	4/9 (44.44)	42/40 (105)
2	40	19/40 (47.5)	19/40 (47.5)	3/19 (15.8)	5/40 (12.5)
3	40	16/40 (40)	16/40 (40)	1/16 (6.25)	3/40 (7.5)
4	40	17/40 (42.5)	17/40 (42.5)	3/17 (17.64)	2/40 (5)
5	40	20/40 (50)	20/40 (50)	2/20 (10)	1/40 (2.5)

** หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บคือ เปอร์เซ็นต์ต่างๆ*

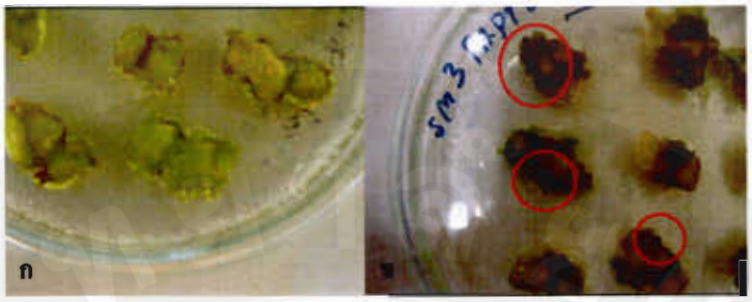
ภาพที่ 31 ลักษณะของชิ้นส่วนใบยาสูบที่ผ่านการถ่ายยีน แล้วนำไปวางบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ดัดแปลง ที่ประกอบด้วย BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีโฟแทคซิม 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จะสังเกตเห็นว่าชิ้นส่วนของใบยาสูบมีลักษณะสีเขียว



ภาพที่ 32 ลักษณะชิ้นส่วนใบยาสูบบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ดัดแปลง ที่ประกอบด้วย BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีโฟแทกซิม 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซิน 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

(ก) ลักษณะชิ้นส่วนของใบยาสูบที่สามารถต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินได้ ซึ่งจะมีลักษณะเป็นสีเขียว

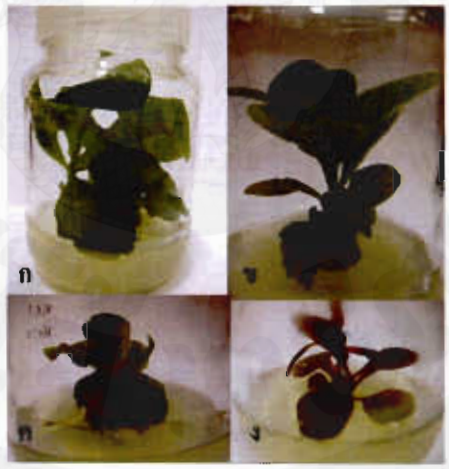
(ข) ลักษณะชิ้นส่วนของใบยาสูบที่รอดและตายบนอาหารคัดเลือก



ภาพที่ 33 ลักษณะชิ้นส่วนใบยาสูบบนอาหารคัดเลือกสูตร MS คัดแปลง ที่ประกอบด้วย BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีโฟแทกซิม 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซิน 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

(ก) ลักษณะการเกิดตายอดจากชิ้นส่วนของใบยาสูบ ซึ่งจะมีลักษณะเป็นตุ่มเล็กๆ สีเขียวตามขอบของชิ้นส่วนใบยาสูบ

(ข) ลักษณะการเกิดตายอดสีแดงจากชิ้นส่วนของใบยาสูบ ซึ่งจะมีลักษณะเป็นตุ่มเล็กๆ สีแดงตามขอบของชิ้นส่วนใบยาสูบ



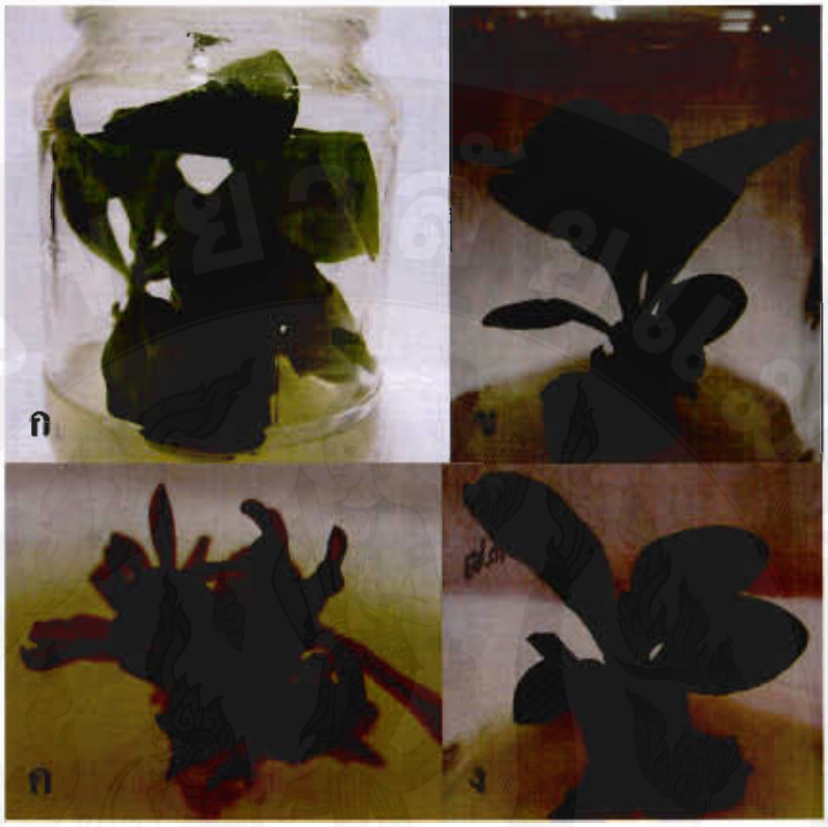
ภาพที่ 34 ลักษณะของต้นยาสูบที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียมที่มีพลาสมิด pPAP1 เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในขวดที่มีอาหารคัดเลือกสูตร MS คัดแปลง ที่ประกอบด้วย BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีโฟแทคซิม 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซิน 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

(ก) ต้นยาสูบที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน (ต้นควบคุม)

(ข) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน แสดงต้นที่มีสีเขียว

(ค) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน แสดงต้นที่มีสีเขียวปนแดง

(ง) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน แสดงต้นที่มีสีแดง



ภาพที่ 35 ลักษณะของต้นยาสูบที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียมที่มีพลาสมิด pPAP1 แต่ต้นไม่สมบูรณ์ เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในขวดที่มีอาหารคัดเลือกสูตร MS ดัดแปลง ที่ประกอบด้วย ซีโฟแทคซิม 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซิน 30 มิลลิกรัมต่อลิตร

(ก) ต้นยาสูบที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน (ต้นควบคุม) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

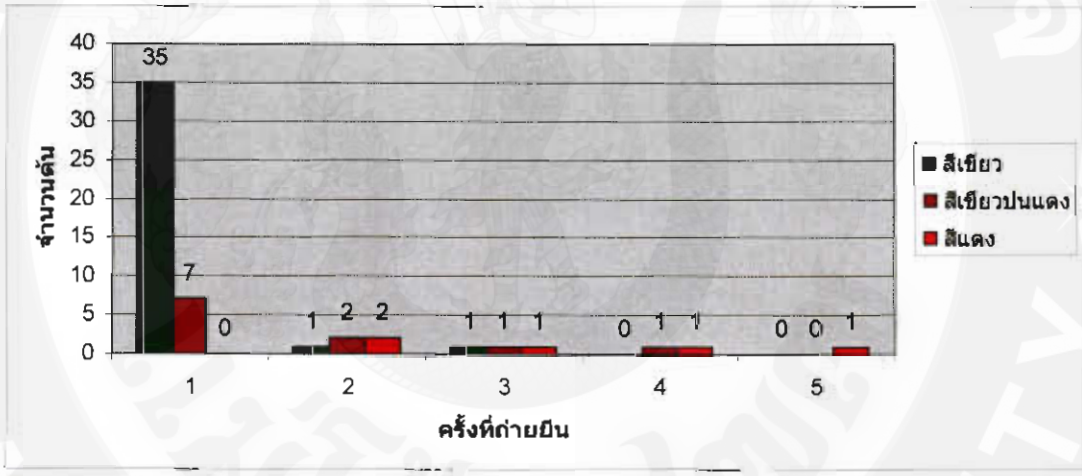
(ข) ต้นยาสูบสีเขียวที่ได้รับการถ่ายยีน แสดงต้นที่ปกติ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

(ค) ต้นยาสูบสีแดงที่ได้รับการถ่ายยีน แสดงต้นที่ผิดปกติ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

(ง) ต้นยาสูบสีแดงที่ได้รับการถ่ายยีนและพัฒนาเป็นต้นสีเขียว เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 – 12 สัปดาห์ แสดงต้นที่ปกติ

ต้นยาสูบที่มีสีแดงเข้มต้นจะเล็กและมีการเจริญเติบโตผิดปกติ โดยใบยาสูบจะมีลักษณะเป็นใสๆ ฉ่ำน้ำ ใบเล็กลีบและบางต้นใบจะหงิกงอมีลักษณะแห้ง และต้นเจริญเติบโตได้ช้ากว่าปกติ (ภาพที่ 35 ค) ซึ่งเปรียบเทียบกับต้นสีเขียวที่ได้รับยีน เพาะเลี้ยงเป็นเวลาเท่ากัน (ภาพที่ 35 ข) โดยจะเห็นได้ว่าต้นสีเขียวใบจะใหญ่กว่าและมีการเจริญเติบโดที่ดีกว่าต้นสีแดง ซึ่งถ้าเพาะเลี้ยงต่อไปเรื่อยๆ ต้นสีแดงที่ได้จะพัฒนาเป็นต้นสีเขียวและต้นจะมีลักษณะตามปกติ (ภาพที่ 35 ง)

การเจริญเติบโตที่ผิดปกติของต้นสีแดงเข้มอาจเกิดจากมีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินมากเกินไป อาจทำให้มีการดึง phenylalanine และสาร intermediate ในวิถีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินไปใช้จำนวนมาก จึงมีผลกระทบต่อวิถีการสังเคราะห์อื่น ซึ่งส่งผลให้การเจริญและการพัฒนาของต้นยาสูบสีแดงผิดปกติ



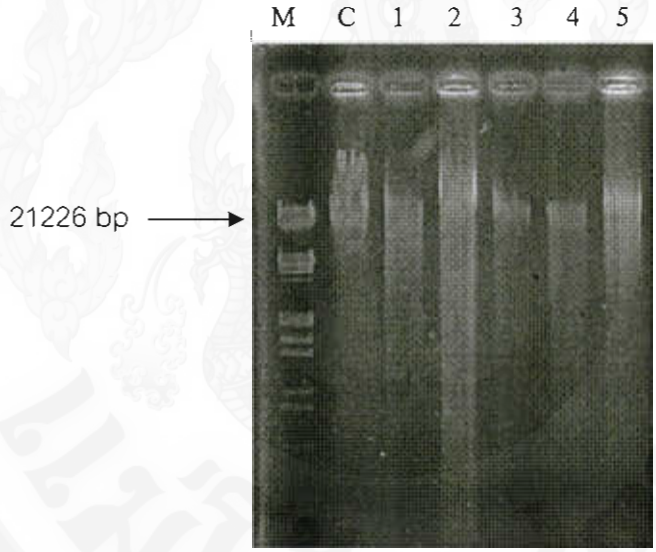
ภาพที่ 36 การเกิดต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *pap1* แสดงการเกิดต้นสีเขียว ต้นสีเขียวปนแดง และต้นสีแดง จากการถ่ายยีน 5 ครั้ง

การวิเคราะห์ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนโดยเทคนิคพีซีอาร์

นำต้นยาสูบที่ได้ทั้งหมดมาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอโดยใช้วิธี CTAB แล้วก็นำไปวิเคราะห์การแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมยาสูบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1* คือ F_PAP1 และ R_PAP1

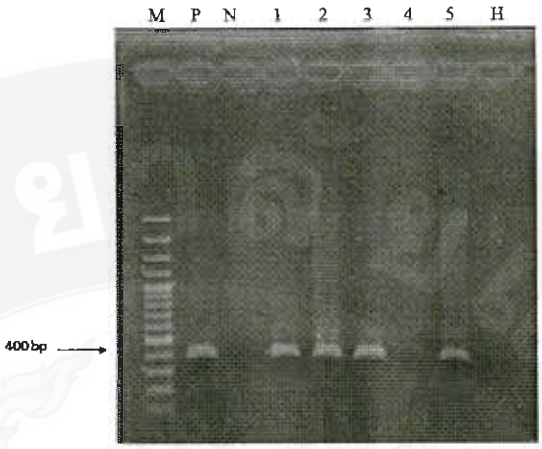
จากการตรวจสอบต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *pap1* โดยนำต้นยาสูบที่ได้มาทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอริซิส พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีโมเลกุล

ขนาดใหญ่ (ภาพที่ 37) แสดงว่ามีคุณภาพดี แต่จะมีการแตกหักของดีเอ็นเอบางส่วนสังเกตจากแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นปื้น (smear) และสามารถนำไปวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิคพีซีอาร์ต่อไปได้



ภาพที่ 37 ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน □/ *Eco*RI + *Hin*dIII ช่อง C คือ ต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ช่องที่ 1 - 5 คือ ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน ต้น 7.1.11, 7.1.14, 7.2.9, 7.1.3 และ 7.4.5 ตามลำดับ

เมื่อนำจีโนมิกดีเอ็นเอของต้นยาสูบ ที่ได้รับการถ่ายยีน *pap1* มาตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมยาสูบ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1* พบว่าจากต้นยาสูบที่นำมาทำพีซีอาร์ทั้งหมด 26 ต้น มีต้นยาสูบจำนวน 12 ต้น เกิดแถบดีเอ็นเอขนาด 400 bp แสดงว่าเป็นต้นที่มียีน *pap1* แทรกอยู่ในจีโนมคิดเป็น 46.15 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 38 ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder ช่อง P คือ พลาสมิด pPAP1 (Positive control) ช่อง N คือต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (Negative control) ช่องที่ 1-5 คือ ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *pap1* ต้นที่ 7.1.11, 7.1.14, 7.2.9, 7.1.3 และ 7.4.5ตามลำดับ และช่อง H คือ น้ำกลั่น

จากการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากต้นยาสูบที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียม ที่มีพลาสมิด pPAP1 ที่มียีน *pap1* แล้วก็นำไปวิเคราะห์การแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมยาสูบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน คือ F_PAP1 และ R_PAP1 สรุปผล PCR ที่ได้ (ตารางที่ 12) พบว่าต้นสีเขียวที่นำมาทำพีซีอาร์ทั้งหมดจำนวน 13 ต้น ให้ผลพีซีอาร์บวกจำนวน 7 ต้น แสดงว่าต้นที่ให้ผลพีซีอาร์บวกมียีน *pap1* เข้าไปแทรกอยู่ในจีโนมของยาสูบที่ได้รับยีน แต่ต้นยาสูบสีเขียวที่ให้ผลพีซีอาร์ลบไม่มียีน *pap1* เข้าไปแทรกอยู่ในจีโนมยาสูบ สำหรับต้นสีเขียวที่ได้ผลพีซีอาร์บวก เพราะว่าได้รับยีน *pap1* แต่การแสดงออกของยีน *pap1* น้อยมาก หรือไม่แสดงออก ส่วนต้นสีเขียวปนแดงที่นำมาทำพีซีอาร์ทั้งหมดจำนวน 9 ต้น ให้ผลพีซีอาร์บวกจำนวน 2 ต้น และต้นสีแดงที่นำมาทำพีซีอาร์ทั้งหมดจำนวน 4 ต้นให้ผลพีซีอาร์บวกจำนวน 3 ต้น พบว่าต้นที่ให้ผลพีซีอาร์บวกมียีน *pap1* เข้าไปแทรกอยู่ในจีโนมของยาสูบที่ได้รับยีน แต่ต้นยาสูบสีเขียวปนแดงและต้นที่สีแดงที่ให้ผลพีซีอาร์ลบอาจมียีนเข้าไปแทรกอยู่ในจีโนมของยาสูบเหมือนกัน แต่ที่ให้ผลพีซีอาร์ลบเพราะว่าในการวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิคพีซีอาร์ยังมีปัจจัยหลายอย่าง เช่น ดีเอ็นเอไม่สะอาด หรือ ในการสกัดจีโนมิกดีเอ โดยดีเอ็นเอที่ได้ยังไม่เหมาะกับการนำไปทำพีซีอาร์ ซึ่งดีเอ็นเอที่ได้มีปริมาณมากเกินไป หรือมีปริมาณน้อยเกินไป ซึ่งกรณีที่ดีเอ็นเอมีมากเกินไปควรจะนำไปเจือจางก่อนที่จะนำมาทำพีซีอาร์ต่อไป

สำหรับต้นที่ได้จากการถ่ายยีนทั้งหมด 53 ต้น แล้วนำไปวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิคพีซีอาร์ จำนวน 26 ต้น ที่เหลืออีก 27 ต้น ตายระหว่างการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากต้นยาสูบมีการปนเปื้อนเชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย และอะโกรแบคทีเรียม

ตารางที่ 12 สรุปผลการทำพีซีอาร์ของต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน เพื่อตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมยาสูบ

ครั้งที่ถ่ายยีน	ลักษณะสีของต้นยาสูบ	จำนวนต้นทั้งหมดที่นำมาทำ PCR	จำนวนต้นที่มีผล PCR บวก	ต้นที่มีผล PCR บวก	เปอร์เซ็นต์ต้นที่มีผล PCR บวก
1	เขียว	11	7	7.1.11, 7.3.1, 7.3.7, 7.1.14, 7.2.9, 7.4.2 , 7.4.5	63.63
	เขียวปนแดง	6	1	7.1.5	16.7
	แดง	0	0	-	0
2	เขียว	1	0	-	0
	เขียวปนแดง	2	0	-	0
	แดง	2	1	10.9.2	50
3	เขียว	1	0	-	0
	เขียวปนแดง	0	0	0	0
	แดง	0	0	0	0
4	เขียว	0	0	0	0
	เขียวปนแดง	1	1	15.18.2	100
	แดง	1	1	15.18.1	100
5	เขียว	0	0	0	0
	เขียวปนแดง	0	0	0	0
	แดง	1	1	19.24.1	100

สรุปผลการทดลอง

1. **การสร้างชุดยีน *pap1* สำหรับถ่ายยีนในพืช**

จากการสร้างชุดยีน *pap1* สามารถสร้างพลาสมิดสายผสมที่มียีน *pap1* ซึ่งทำงานภายใต้การควบคุมของ 35S dual promoter และ *nos* terminator ได้สำเร็จ (35SPdual :: *pap1* :: nosT) และนำชุดยีนถ่ายฝากเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α และถ่ายฝากเข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ AGL1 เพื่อใช้สำหรับถ่ายยีนเข้าสู่พืช

2. **การถ่ายยีนสร้างแอนโทไซยานินเข้าสู่แคลลัสข้าว**

การถ่ายยีน *pap1* เข้าสู่แคลลัสข้าวพันธุ์ Kitaake โดยใช้วิธีอะโกรแบคทีเรียม พบว่า กลุ่มแคลลัสที่สามารถเจริญได้และรอดตายบนอาหารคัดเลือกได้เป็น 98 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้น พบว่า กลุ่มแคลลัสได้พัฒนาเป็นยอดทั้งหมด 21 กลุ่มแคลลัส ได้เป็น 11 เปอร์เซ็นต์ โดยแบ่งเป็นกลุ่มแคลลัสที่เกิดยอดสีเขียวทั้งหมด 17 กลุ่มแคลลัส และเป็นกลุ่มแคลลัสที่เกิดยอดสีขาวทั้งหมด 4 กลุ่มแคลลัส และเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปได้เจริญเป็นต้นทั้งหมดจำนวน 24 ต้น คิดเป็น 13 เปอร์เซ็นต์ ของการถ่ายยีนทั้งหมด

3. **การตรวจวิเคราะห์ต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน *pap1* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์**

การตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมข้าวด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ F_PAP1 และ R_PAP1 ซึ่งจำเพาะต่อยีน *pap1* จากต้นข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนทั้งหมด 18 ต้น แบ่งต้นข้าวปกติสีเขียวจำนวน 14 ต้น และต้นข้าวผิดปกติสีขาวจำนวน 4 ต้น พบว่า มีต้นข้าวทั้งหมด 4 ต้นที่ให้ผลพีซีอาร์บวก คือ เห็นแถบดีเอ็นเอขนาด 400 คู่เบส ซึ่งต้นข้าวทั้ง 4 ต้น ที่ให้ผลพีซีอาร์บวกนั้นเกิดจากต้นข้าวสีเขียวซึ่งได้จากการถ่ายยีนครั้งที่ 1 จำนวน 3 ต้น คิดเป็น 16.66 เปอร์เซ็นต์ และเกิดจากต้นสีเขียวซึ่งได้จากการถ่ายยีนครั้งที่ 5 จำนวน 1 ต้น คิดเป็น 5.55 เปอร์เซ็นต์ จึงอาจกล่าวได้ว่า ต้นข้าวที่ได้นั้นมีการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมของข้าว

จากการทดลองตรวจวิเคราะห์ต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน *pap1* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่ามีการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมข้าว ซึ่งตามสมมติฐานต้นข้าวที่ได้จะต้องเกิดสีแดงจากการสร้างรงควัตถุแอนโทไซยานิน เนื่องจากว่ายีน *pap1* จะเข้าไปเปิดการทำงานของยีนหลายยีน แต่ผลการทดลองที่ได้พบว่าได้ต้นข้าวที่มีฟีโนไทป์ปกติสีเขียว และผิดปกติได้ต้นสีขาว ในต้นข้าวสีเขียวที่มีผลพีซีอาร์บวก แต่ไม่มีการแสดงออกของการสร้างแอนโทไซยานิน อาจเป็นผลมาจากยีน *pap1* เข้าไปในแทรกจีโนมโดยที่ตำแหน่งของยีนในจีโนมข้าวที่ยีน *pap1* เข้าไปแทรก อาจจะไม่เหมาะสมที่จะทำให้เกิดการแสดงออกของยีน *pap1* หรืออีกประการหนึ่งยีนที่ส่งถ่ายเข้าไปไม่สามารถกระตุ้น pathway ในการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน ซึ่งอาจเนื่องมาจากยีน *pap1* เป็นยีนที่

ได้จาก *Arabidopsis* ซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ เมื่อนำมาทดสอบในข้าวซึ่งเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวยีน *pap1* จึงอาจไม่สามารถทำงานได้ ดังนั้นต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

ในต้นข้าวสีขาวเกิดลักษณะที่ผิดไปจากปกติ คือต้นข้าวที่ได้ไม่มีการสร้างคลอโรฟิลล์ ฟีโนไทป์ที่ได้จึงเกิดเป็นสีข้าวทั้งต้น สามารถเจริญได้ในอาหารสังเคราะห์แต่ไม่สามมารถเจริญได้เมื่อปลูกลงดิน ซึ่งเมื่อนำใบจากต้นสีขาวที่ได้มาตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ จำนวน 4 ต้น จากต้นข้าวที่ตรวจวิเคราะห์ทั้งหมด 18 ต้น พบว่า ไม่มีต้นข้าวสีขาวให้ผลพีซีอาร์บวก ซึ่งได้ตั้งสมมติฐานว่าต้นสีขาวที่เกิดขึ้นนั้น อาจเกิดจากความผิดปกติของยีนอันเนื่องจากการแทรกตัวของยีน *pap1* ทำให้ไปหยุดกระบวนการในการสร้างคลอโรฟิลล์ในต้นข้าว แต่สาเหตุที่ตรวจไม่พบยีน *pap1* อาจเกิดจากขั้นตอนการทำพีซีอาร์ดีเอ็นเอที่ได้หรือปริมาณดีเอ็นเอมากเกินไปไม่สะอาดพอทำให้ไม่พบแถบดีเอ็นเอหลังการทำพีซีอาร์และตรวจสอบด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอริซิส

4. **การถ่ายยีนสร้างแอนโทไซยานินเข้าสู่ยาสูบ**

การถ่ายยีน *pap1* ซึ่งเป็นยีนสร้างแอนโทไซยานินเข้าสู่ยาสูบพันธุ์เบอร์เลย์ด้วยอะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ AGL1 ที่มีพลาสมิด pPAP1 เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพการถ่ายยีน ซึ่งมีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินเป็นสารคัดเลือก หลังจากเพาะเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก พบว่า ชิ้นส่วนใบยาสูบที่วางบนอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีชิ้นส่วนที่สามารถต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินได้สูงสุดคิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์

เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 – 6 สัปดาห์ พบว่าบริเวณขอบของชิ้นส่วนใบยาสูบ เริ่มมีตายอดสีเขียวเกิดขึ้น และในบางชิ้นส่วนมีตายอดสีแดงเกิดขึ้น คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดตายอดทั้งหมดสูงสุดคิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์และการเกิดตายอดสีแดงสูงสุดคิดเป็น 44.44 เปอร์เซ็นต์

หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าได้ต้นยาสูบทั้งหมด 53 ต้น แยกเป็นต้นสีเขียวจำนวน 37 ต้น ต้นที่มีสีเขียวปนแดงจำนวน 11 ต้น และต้นที่มีสีแดงจำนวน 5 ต้น

5. **การตรวจวิเคราะห์ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์**

สำหรับต้นยาสูบที่ได้จากการถ่ายยีนทั้งหมดจำนวน 53 ต้น เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าจากต้นยาสูบที่นำมาทำพีซีอาร์ทั้งหมด 26 ต้น มีต้นยาสูบจำนวน 12 ต้น ที่ให้ผลพีซีอาร์บวก แยกออกเป็นต้นสีเขียวจำนวน 7 ต้น ต้นสีเขียวปนแดงจำนวน 2 ต้น และต้นสีแดงจำนวน 3 ต้น ซึ่งเป็นต้นที่มียีน *pap1* แทรกอยู่ในจีโนมคิดเป็น 46.15 เปอร์เซ็นต์

จากการทดลองนี้พบว่า สามารถนำยีน *pap1* ซึ่งควบคุมการสร้างแอนโทไซยานินไปใช้เป็นยีนเครื่องหมายคัดเลือกยาสูบที่ได้รับยีนแทนการใช้ยีนต้านสารปฏิชีวนะได้

เอกสารอ้างอิง

สีนิลไรซ์. ม. ป. ป. **ข้าวสีนิล.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.sininrice.com/insight_sinin.html (25 มกราคม 2554)

สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน). ม. ป. ป. **ประวัติความเป็นมาของข้าว.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://kasetinfo.arda.or.th/rice/rice-histories.html (7 มกราคม 2554).

ศูนย์วิจัยข้าวชุมแพ. ม. ป. ป. **"ข้าวเหนียวดำ" หลากประโยชน์ หลายแนวคิด เสริมเศรษฐกิจไทย สู่สากล.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://www.brrd.in.th/main/document/Pattaya52%20report/25.pdf (3 กุมภาพันธ์ 2554).

สุทธิพร ศิริพาณิช. 2549. **ประวัติยาสูบ.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา : http://kanchanapisek.or.th/kp6/BOOK15/chapter3/t15-3-11.htm. (23 ธันวาคม 2553)

ธรรมนูญ ฤทธิเมธี. 2550. **ประวัติยาสูบ.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา : http://www.ubon.ricethailand.org/document/warapong/gep.htm. (23 ธันวาคม 2553)

อุทิศ เกตุทัต. 2542. **สาราณุกรมไทยสำหรับเยาวชนฯ เล่มที่ 25 ประวัติยาสูบ.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา : http://kanchanapisek.or.th/kp6/New/sub/book/book.php?book=15&chap=3&page=chap3.htm. (23 ธันวาคม 2553)

Borevitz J. O., Xia Y. Blount J., Dixon R. A. and Lamb C. 2000. Activation Tagging Identifies a Conserved MYB Regulator of Phenylpropanoid Biosynthesis. **The Plant Cell.** 12: 2383–2393.

Endo S., Sugita K., Sakai M., Tanaka H. and Ebinuma H. 2002. Single-step transformation for generating marker-free transgenic rice using the ipt-type MAT vector system. The Plant Journal. 30(1): 115 – 122.

Geekiyanage S., Takase T., Ogura Y. and Kiyosue T. 2007. Anthocyanin production by over-expression of grape transcription factor gene VlmybA2 in transgenic tobacco and Arabidopsis. **Plant Biotech Rep.** 1:11–18

Kim B. G., Kim J. H., Min S. Y., Shin K., Kim J. H., Kim H. Y., Ryu S. N. and Ahn J. 2007. Anthocyanin Content in Rice Is Related to Expression Levels of Anthocyanin Biosynthetic Genes. **Journal of Plant Biology.** 50(2) : 156-160

Toki S. 1997. Rapid and Efficient Agrobacterium-Mediated Transformation in Rice. **Plant Molecular Biology Reporter**.15 (1): 16 – 21.

Xie D., Sharma B. S., Wright E., Wang Z. and Dixon A. R. 2006. Metabolic engineering of proanthocyanidins through co-expression of anthocyanidin reductae and the PAP1 MYB transcription factor. **Plant Journal**. Vol. 45, 895 - 907

Zhang W., Ning G., Lv H., Liao. And Bao M. 2009. Single MYB – type transcription factor AtCAPRICE: A new efficint tool to engineer the production of anthocyanin in tobacco. **Biochemical and Biophysical Research**. 742 – 747

Zhou L., Zeng H., Shi M. and Xie D. 2008. Development of tobacco callus cultures over expressing Arabidopsis PAP1/MYB75 transcription factor and characterization of anthocyanin biosynthesis. Planta. 229: 37–51.

Zuluaga D. L., Gonzali S., Loreti G. S., Pucciariello C., Innocentic E. D., Guidic L., Alpi A. and Perata P. 2008. Arabidopsis thaliana MYB75/PAP1 transcription factor induces anthocyanin production in transgenic tomato plants. **Functional Plant Biology**. 35: 606 – 618.