

แบบรายงานเรื่องเต็ม ผลการวิจัยที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2558

1. ชุดโครงการวิจัย แผนงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
2. โครงการวิจัย การผลิตไบโอเอทานอลจากชีวมวลโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ
3. ชื่อภารกิจกรรมที่ 2 การศึกษาศักยภาพของพืชและชีวมวล (Biomass) ในประเทศไทย
สำหรับผลิตไบโอเอทานอล

ชื่อกิจกรรมย่อยที่ 2.3 การพัฒนาพันธุ์พืชที่มีปริมาณลิกนินต่ำสำหรับการผลิตไบโอเอทานอล

ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) การโคลนยีนที่ควบคุมการสร้างลิกนินในพืช

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) Cloning of Lignin Synthesis Gene in Plant

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวสุภาวดี จ้อเหรียญ	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	นายพยุงค์ศักดิ์ รวยอารี	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นายพงศกร สรรค์วิทยากุล	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

Abstract

4-coumarate:CoA ligase (*4CL*), cinnamyl alcohol dehydrogenase (*CAD*), caffeic acid O-methyltransferase (*COMT*) and caffeoyl coenzyme A O-methyltransferase (*CCOMT*) is an enzyme that plays a key role in the biosynthesis of lignin in plants. In this study, four full-length cDNA sequences of napier grass (*Pennisetum purpureum* Schumach.) encoding *Pp4CL*, *PpCAD*, *PpCOMT* and *PpCCOMT* have been isolated from two napier grass variety names Kingnapair and Pak-chong 1 via RT – PCR based method with *4CL* (forward) + *4CL* (reverse), *CAD* (forward) + *CAD* (reverse), *COMT* (forward) + *COMT* (reverse) and *CCOMT* (forward) + *CCOMT* (reverse). The *Pp4CL*, *PpCAD*, *PpCOMT* and *PpCCOMT* gene sequence contains a fragment of 1,659, 1,101, 1,083 and 735 bp complete ORF, encoded for 553, 367, 361 and 245 amino acids polypeptide. The highly conserved region of the *Pp4CL* gene is 4-coumarate CoA ligase which are also found in *Cenchrus purpureus* (JN980970.1) and *Setaria italica* (L.) Beauv. (XM004951660.1) with 98% and 95% of homology respectively, *PpCAD* gene is cinnamyl alcohol dehydrogenase which are also found in *Pennisetum purpureum* Schumach. (HQ840705.1) and *Setaria italica* (L.) Beauv. (XM004951572.1) with 99% and 94% of homology respectively, *PpCOMT* gene is caffeic acid 3-O-methyltransferase which are also found in *Setaria italica* (L.) Beauv. (XM004972743.1) and *Panicum virgatum* L. (HQ645965.1) with 96% and 93% of homology respectively and *PpCCOMT* gene is tricin synthase 1-like which are also found in *Setaria italica* (L.) Beauv. (XM004973751.2) and caffeoyl CoA O-methyltransferase which are also found in *Panicum virgatum* L. (AB723826.1) with 95% and 91% of homology respectively. A 1,659, 1,101, 1,083 and 735 bp fragment of the *Pp4CL*, *PpCAD*, *PpCOMT* and *PpCCOMT* genes were inserted into plant expression vector (pCAMBIA2300) by antisense construction. pCAMBIA2300 containing 35SCaMV promoter and NOS terminator, *nptII* as selectable marker with total size of 11.3, 10.7, 10.7 and 10.4 kb for pCAMBIA2300 – Anti*Pp4CL*, pCAMBIA2300 – Anti*PpCAD*, pCAMBIA2300 – Anti*PpCOMT* and pCAMBIA2300 – Anti*PpCCOMT* expression cassette to inhibit the expression of genes that have low lignin content suitable for the production of bio-ethanol.

บทคัดย่อ

การโคลนยีนที่ควบคุมการสร้างลิกนินในพืช มีวัตถุประสงค์เพื่อโคลนยีนและศึกษาคุณสมบัติของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างลิกนินในพืชและสร้างชุด cassette ยีนในรูปแบบ antisense เพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน สำหรับนำไปถ่ายฝากเข้าสู่พืชเพื่อใช้ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีปริมาณลิกนินต่ำเหมาะสมกับการนำไปผลิตไบโอเอทานอล โดยยีนที่ทำการโคลนในครั้งนี้มีจำนวน 4 ยีน ได้แก่ 4-coumarate:CoA ligase (4CL), cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD), caffeic acid O-methyltransferase (COMT) และ caffeoyl coenzyme A O-methyltransferase (CCOMT) เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์ลิกนินในพืช งานวิจัยนี้ได้ทำการโคลนยีน 4CL CAD COMT และ CCOMT จากหญ้าคิงเนเปียร์ (KN) และหญ้าคิงเนเปียร์ลูกผสมปากช่อง 1 (KP) ซึ่งเป็นพืชชีวมวลทางเลือกสำหรับนำมาผลิตไบโอเอทานอล โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ในบริเวณที่มีความเหมือนของลำดับพันธุกรรมอย่างสูง (conserved region) จากยีน 4CL CAD COMT และ CCOMT ในพืชชนิดต่างๆ ที่ค้นหาได้จากฐานข้อมูล NCBI นำมาทำปฏิกิริยา RT – PCR กับอาร์เอ็นเอรวมของหญ้าคิงเนเปียร์ (KN) และหญ้าคิงเนเปียร์ลูกผสมปากช่อง 1 (KP) ได้ยีน *Pp4CL* *PpCAD* *PpCOMT* และ *PpCCOMT* มีขนาดเท่ากับ 1,659 1,101 1,083 และ 735 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์โครงสร้างของยีนโดยใช้โปรแกรม EMBL-EBI database พบว่า ยีน *Pp4CL* *PpCAD* *PpCOMT* และ *PpCCOMT* ที่ได้มีส่วนประกอบครบทั้งยีน ซึ่งประกอบด้วย ลำดับเบสในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน open reading frame (ORF) จำนวน 1 exon สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนของยีน *Pp4CL* *PpCAD* *PpCOMT* และ *PpCCOMT* เท่ากับ 553 367 361 และ 245 amino acids การเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์กับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ยีน *Pp4CL* ที่โคลนได้จากหญ้าคิงเนเปียร์มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน 4-coumarate CoA ligase (4CL) ที่พบในหญ้า (*Cenchrus purpureus*) (JN980970.1) และข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italica* (L.) Beauv.) (XM004951660.1) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 98% และ 95% ตามลำดับ ยีน *PpCAD* มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) ที่พบในหญ้าเนเปียร์ (*Pennisetum purpureum* Schumach.) (HQ840705.1) และข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italica* (L.) Beauv.) (XM004951572.1) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 99% และ 94% ตามลำดับ ยีน *PpCOMT* มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน caffeic acid 3-O-methyltransferase (COMT) ที่พบในข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italica* (L.) Beauv.) (XM004972743.1) และหญ้า Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) (HQ645965.1) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 96% และ 93% ตามลำดับ และยีน *PpCCOMT* ที่โคลนได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน tricin synthase 1-like ที่พบในข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italica* (L.) Beauv.) (XM004973751.2) และยีน caffeoyl CoA O-methyltransferase (CCOMT) ที่พบในหญ้า Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) (AB723826.1) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 95% และ 91% ตามลำดับ จากนั้นทำการสร้างชุด cassette ของยีน *Pp4CL* *PpCAD* *PpCOMT* และ *PpCCOMT* ในรูปแบบ antisense เพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน โดยการเชื่อมต่อกันแต่ละยีนเข้ากับ plant expression vector (pCambia2300) ที่ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ (35SCaMV) และเทอร์มินเตอร์ (NOS) ได้พลาสมิดสายผสม pCambia2300 – Anti*Pp4CL* pCambia2300 – Anti*PpCAD* pCambia2300 – Anti*PpCOMT* และ pCambia2300 – Anti*PpCCOMT* มีขนาด 11.3 10.7

10.7 และ 10.4 กิโลเบส ตามลำดับ สามารถนำชุดยีนดังกล่าวไปศึกษาการแสดงออกของยีน โดยการถ่ายฝากเข้าสู่พืชชีวมวล เช่น หญ้าคิงเนเปียร์ อ้อย และ เล้า เป็นต้น เพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีปริมาณลิกนินต่ำเหมาะสมกับการนำไปผลิตไบโอเอทานอลต่อไป

คำนำ

ปัจจุบันน้ำมันเชื้อเพลิงซึ่งเป็นแหล่งพลังงานสำคัญกำลังจะหมดลง จึงมีความจำเป็นเร่งด่วนที่จะต้องพัฒนาแหล่งพลังงานเชื้อเพลิงเหลวแหล่งใหม่ การผลิตไบโอเอทานอลจากเซลลูโลสที่ได้จากพืชและเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ได้แก่ อ้อย ข้าวฟ่างหวาน ข้าวโพด ฟางข้าว หญ้าอาหารสัตว์ และวัชพืชต่างๆ จะเป็นแหล่งพลังงานทดแทนใหม่ได้ดี แต่การนำวัตถุดิบเหล่านี้มาใช้ยังพบปัญหาปริมาณลิกนินสูง ซึ่งจะเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไม่ดี และยังเป็นอุปสรรคต่อการหมัก (fermentation) จึงจำเป็นต้องมีการปรับสภาพวัตถุดิบเพื่อแยกลิกนินและเฮมิเซลลูโลสออก และเป็นการปรับโครงสร้างของเซลลูโลสให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาการย่อยด้วยเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อราแบคทีเรีย หรือ แอคติโนมัยซิส ก่อนที่จะเปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลแล้วหมักด้วยยีสต์จนได้เป็นแอลกอฮอล์ ในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลสำหรับเป็นพลังงานทดแทนจากเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร นอกจากจะมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการย่อยและกระบวนการหมักให้ได้เอทานอลแล้ว ยังจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาพัฒนาพันธุ์พืชให้มีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการนำไปเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตไบโอเอทานอลอีกด้วย

ลิกนิน (Lignin) เป็นสารประกอบที่มีอยู่มากในพืชรองลงมาจากเซลลูโลส (cellulose) และเฮมิเซลลูโลส (hemicelluloses) มีอยู่ในผนังชั้นที่สอง (secondary layer) ของผนังเซลล์ และใน middle lamella ห่อหุ้มเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสของพืช มีลักษณะเป็นอะโรมาติก (aromatic) ที่มีหน่วย phenylpropane เชื่อมต่อกันเป็นพหุหลายหน่วยอย่างไร้ระเบียบ ด้วยพันธะโคเวเลนต์ที่มีพันธะอีเธอร์ (ether bond, C-O-C) และพันธะระหว่างคาร์บอน (carbon bond, C-C) ซึ่งพันธะเหล่านี้ถูกย่อยสลายยาก จึงมีหน้าที่ช่วยให้ผนังเซลล์ของพืชมีความแข็งแรงและยังป้องกันไม่ให้ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ นอกจากนี้ยังพบว่า ลิกนินมีคุณสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิก ไม่ยอมให้น้ำซึมผ่านได้ จึงช่วยลดการระเหยของน้ำที่อยู่ระหว่างเนื้อเยื่อไซเลมและผนังเซลล์ อีกทั้งยังช่วยป้องกันการทำลายเนื้อเยื่อของพืชโดยจุลินทรีย์ (Crowford, 1976) ความแตกต่างในองค์ประกอบของลิกนินขึ้นอยู่กับชนิดของพืช เนื้อเยื่อ ชนิดของเซลล์ รวมถึงระยะการเจริญเติบโตด้วย (Campbell and Sederoff, 1996)

การสังเคราะห์ลิกนิน พืชจะตรึงคาร์บอนไดออกไซด์จากบรรยากาศด้วยกระบวนการสังเคราะห์แสงสำหรับสร้างคาร์โบไฮเดรต แล้วเข้าสู่วิถีการสังเคราะห์กรดอะมิโนอะโรมาติก (shikimic acid pathway) ในกลุ่ม phenylpropane amino acid เช่น L-phenylalanine ซึ่งมีสาร shikimic acid เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์ (อาภัสสร, 2537) กรดอะมิโนเหล่านี้ถูกเปลี่ยนไปเป็น cinnamic acid, ferulic acid, sinapic acid และในที่สุดเป็นลิกนิน (Brett, 1996) การจับกันของสารตั้งต้นทั้งสามเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์เปอออกซิเดซ (peroxidase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีหมู่ฮีม (heme enzyme) สามารถเร่งปฏิกิริยาการรีดิวซ์ H_2O_2 ไปเป็นน้ำได้ (อาภัสสร, 2537; Gold and Alic, 1993) ที่ผนังเซลล์พืชเป็นผลให้เกิดการสร้าง heterogeneous, amorphous, optically inactive, random และ highly branch polymer ซึ่งมีอย่างน้อย 12 ชนิดที่ต่างกันในเรื่องของพันธะ (linkages) เช่น aryl-ether และ carbon-carbon bond ที่เชื่อมต่อกับ aromatic nuclei ซึ่ง

พันธะเหล่านี้ไม่สามารถย่อยสลายด้วยขบวนการ hydrolysis ได้ ลิกนินเป็นสารประกอบ aromatic ซึ่งถูกทำลายหรือย่อยสลายได้ค่อนข้างยาก ลิกนินไม่ละลายน้ำ ไม่ละลายในกรด แต่ลิกนินสามารถละลายได้ในสารละลายที่เป็นด่างความเข้มข้นสูง และที่อุณหภูมิสูง 130 – 280 องศาเซลเซียส (Avgerinos and Wang, 1983) และอาจจะถูกออกซิไดซ์ได้ในบรรยากาศ (Janshekar and Fiechter, 1983) ในการย่อยสลายลิกนินทางเคมีทำให้เกิดการแตกตัวของสารเคมีที่เป็นอันตราย ถึงแม้ว่าในดินโดยทั่วไปจะมีจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายลิกนินได้อาศัยอยู่จำนวนมากชนิดด้วยกัน แต่อัตราการย่อยสลายลิกนินเป็นไปอย่างเชื่องช้า (จิตรรัตน์, 2542) ในกระบวนการสังเคราะห์ลิกนินจะมีเอนไซม์หลายชนิดเข้ามาเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Smita and Upendra, 2008) ชนิดของเอนไซม์ที่มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารลิกนินในพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ (1) phenylalanine ammonialyase-lyase (PAL); (2) cinnamate 4-hydroxylase (C4H); (3) cinnamate 3-hydroxylase or *p*-coumaroyl shikimic acid / quinic acid 3-hydroxylase (C3H); (4) *O*-methyltransferase (OMT); (5) *p*-hydroxy cinnamoyl-CoA : shikimate / quinate *p*-hydroxy cinnamoyl transferase (HCT); (6) caffeoyl coenzyme A *O*-methyltransferase (CCoAOMT); (7) ferulate 5-hydroxylase (F5H); (8) 4-Coumarate : coenzyme A ligase (4CL); (9) cinnamoyl coenzyme A reductase; (CCR); (10) coniferaldehyde 5-hydroxylase (Cald5H); (11) 5-hydroxy coniferaldehyde *O*-methyltransferase (AldOMT); (12) sinapyl alcohol dehydrogenase (SAD); (13) cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงได้นำเทคโนโลยีด้านการโคลนยีนมาประยุกต์ใช้ในการค้นหาและศึกษาคุณสมบัติของกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างลิกนินในพืช และสร้างชุด cassette ยีนในรูปแบบ antisense เพื่อยับยั้งการแสดงออกของยีน สำหรับนำไปถ่ายฝากเข้าสู่พืชชีวมวลทางเลือก เช่น หญ้าเนเปียร์ อ้อย และ เล้า เป็นต้น เพื่อใช้ในการกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีปริมาณลิกนินต่ำเหมาะสมกับการนำไปผลิตไบโอเอทานอลต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. หญ้าคิงเนเปียร์ (KN) และหญ้าคิงเนเปียร์ลูกผสมปากช่อง 1 (KP) (ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น)
2. ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีน 4CL CAD COMT และ CCOMT ได้แก่ 4CL (forward) 4CL (reverse) CAD (forward) CAD (reverse) COMT (forward) COMT (reverse) CCOMT (forward) และ CCOMT (reverse) ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน 4CL CAD COMT และ CCOMT ได้แก่ 4CLBmHI_Ant (forward) 4CLXbaI_Ant (reverse) CADKpnI_Ant (forward) CADXbaI_Ant (reverse) COMTKpnI_Ant (forward) COMTXbaI_Ant (reverse) CCOMTBmHI_Ant (forward) และ CCOMTXbaI_Ant (reverse) ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการเชื่อมต่อของชิ้นยีน 4CL CAD COMT และ CCOMT เข้ากับ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) คือ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse)
3. Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) ขนาด 9,640 คู่เบส มีส่วนประกอบของโปรโมเตอร์ (35SCaMV) และเทอร์มิเนเตอร์ (NOS) ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีน มียีน neomycin

phosphotransferase (*nptII*) ซึ่งควบคุมลักษณะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin เป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือก (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.ศรีเมฆ ชาวโพรงพาง, ม. เกษตรศาสตร์)

4. อุปกรณ์ในการสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ ได้แก่ โกร่ง เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบสูงแบบควบคุมอุณหภูมิต่ำได้ (Refrigerated Centrifuge) หลอดใส่ตัวอย่างขนาดต่างๆ อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

5. ไมโครปิเปตขนาด P1,000 P200 P100 และ P2 ไมโครลิตร

6. อุปกรณ์การอ่านภาพ และบันทึกผล ได้แก่ Gel documentation พร้อมเครื่องพิมพ์

7. เครื่อง Spectrophotometer สำหรับใช้วัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D.)

8. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม PCR (Thermal Cycle 9700)

9. เครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI Prism 310

10. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอ (MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit) ของ Epicentre® Biotechnologies

11. สารเคมีที่ใช้ในการทำ Electrophoresis และ Molecular Weight Marker

12. สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR Amplification) (HotStartTaq Master Mix Kit) ของ QIAGEN

13. สารเคมีที่ใช้ในการทำ RT-PCR (SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase Kit) ของ Invitrogen

14. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากเจล (QIAquick Gel Extraction Kit) ของ QIAGEN

15. สารเคมีที่ใช้ในการโคลนยีน (T&A Cloning Kit) ของ Invitrogen

16. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit) ของ Fermentas

17. เซลล์แบคทีเรียเชลล์เจ้าบ้าน (Competent Cells) *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α

18. สารเคมีสำหรับใช้กับเครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI Prism 310

19. การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปและโปรแกรมบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต

- โปรแกรม BLAST จากเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Blast/>
- โปรแกรม ClustalW Multiple Alignment จากเว็บไซต์ <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>
- โปรแกรม DNASTar software analysis (DNASTAR, Inc, USA)
- โปรแกรม ChromasPro version 1.33 จากเว็บไซต์ <http://www.techneysium.com.au/ChromasPro.html>

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่างพืช

นำท่อนพันธุ์หญ้าคิงเนเปียร์ (KN) และหญ้าคิงเนเปียร์ลูกผสมปากช่อง 1 (KP) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์ท่อนพันธุ์จากศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น มาปลูกในกระถางที่เตรียมไว้ รดน้ำ 2 – 3 วัน/ครั้ง เมื่ออายุประมาณ 30 วัน นำใบอ่อนมาสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อหาส่วนของยีนที่มีการแสดงออก

2. ออกแบบไพรเมอร์ในส่วนของยีนที่มีการแสดงออก

ทำการศึกษา และค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างลิกนินในพืช ได้แก่ ยีน *4CL* *CAD* *COMT* และ *CCOMT* ที่มีรายงานในพืชชนิดต่างๆ จากฐานข้อมูลทางอินเทอร์เน็ต (www.ncbi.nlm.nih.gov/) นำมาวิเคราะห์ลำดับเบสที่มีความเหมือนกันอย่างสูง (conserve region) โดยใช้โปรแกรม ClustalW2 Multiple Alignment (European Bioinformatics Institute, UK) ออกแบบไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีน *4CL* คือ *4CL* (forward) และ *4CL* (reverse) ไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีน *CAD* คือ *CAD* (forward) และ *CAD* (reverse) ไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีน *COMT* คือ *COMT* (forward) และ *COMT* (reverse) ไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีน *CCOMT* คือ *CCOMT* (forward) และ *CCOMT* (reverse) (ตารางที่ 1)

3. การโคลนยีน *4CL* *CAD* *COMT* และ *CCOMT* จากหญ้าคิงเนเปียร์ในส่วนของยีนที่มีการแสดงออก

3.1 การสกัดอาร์เอ็นเอรวม

ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ หญ้าคิงเนเปียร์ (KN) และ หญ้าคิงเนเปียร์ลูกผสมปากช่อง 1 (KP) เมื่ออายุได้ 30 วัน นำใบอ่อนมาสกัดอาร์เอ็นเอรวม โดยใช้ MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit (BIONEER Corporation) ตัดใบอ่อนของหญ้าปริมาณ 5 มิลลิกรัม บดในโถงพร้อม กับ ไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงแป้ง ย้ายตัวอย่างลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำ Tissue and Cell Lysis Solution 300 ไมโครลิตร ผสมโดยการเอียงหลอดไปมาเบาๆ บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 65°C นาน 15 นาที เขย่าทุกๆ 5 นาที วางตัวอย่างบนน้ำแข็งนาน 5 นาที เติมน้ำ MPC Protein Precipitation Reagent 150 ไมโครลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน นาน 10 วินาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ย้ายส่วนใสในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำ Isopropanol 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 30 – 40 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที เทส่วนใสออกให้หมด ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย DNaseI Solution 200 ไมโครลิตร บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที เติมน้ำ MPC Protein Precipitation Reagent 200 ไมโครลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน นาน 10 วินาที วางตัวอย่างบนน้ำแข็ง นาน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ย้ายสารละลายอาร์เอ็นเอที่ได้ลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำ Isopropanol 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 30 – 40 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ระวังอย่าให้ตะกอนหลุดหาย ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 75% Ethanol 300 ไมโครลิตร (ทำ 2 ครั้ง) เอา Ethanol ออกให้หมดโดยใช้ไปเปิดละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย TE buffer 35 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำ Script Guard RNase

Inhibitor 1 ไมโครลิตร เพื่อยับยั้งไม่ให้อาร์เอ็นเอถูกย่อย วัดค่าความเข้มข้น (O.D.) ของสารละลายอาร์เอ็นเอที่ได้ โดยใช้เครื่อง spectrophotometer เก็บสารละลายอาร์เอ็นเอที่ -80°C จนกว่าจะใช้งาน

3.2 การสังเคราะห์ cDNA จาก total RNA โดยวิธี RT-PCR

ทำการสังเคราะห์ cDNA จากอาร์เอ็นเอรวมของหูกิ่งเนเปียร์ (KN) และ หูกิ่งเนเปียร์ลูกผสมปากช่อง 1 (KP) โดยใช้ SuperScriptTM III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) ด้วยวิธี One-Step RT-PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน 4CL ได้แก่ 4CL (forward) และ 4CL (reverse) ยีน CAD ได้แก่ CAD (forward) และ CAD (reverse) ยีน COMT ได้แก่ COMT (forward) และ COMT (reverse) และไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน CCOMT ได้แก่ CCOMT (forward) และ CCOMT (reverse) ในปริมาตรของปฏิกิริยาปอลิเมอเรสทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลาย total RNA 10 นาโนกรัม – 1 ไมโครกรัม, 10 μM Gene Specific Primer (forward), 10 μM Gene Specific Primer (reverse), 2X Reaction Mix, 2U SuperScriptTM III RT/Platinum Taq Mix นำปฏิกิริยาเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม PCR (Thermal Cycle 9700) โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre-Denature 55°C 30 วินาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94°C 2 วินาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denature 94°C 15 วินาที, Anneal 60°C 30 วินาที, Extend 68°C 3 นาที จำนวน 40 รอบ ตามด้วยขั้นตอน 68°C 5 นาที อีก 1 รอบ หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วเก็บตัวอย่างไว้ที่ 4°C และนำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1% agarose gel electrophoresis และเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

3.3 การโคลนยีน 4CL CAD COMT และ CCOMT เข้าสู่เวกเตอร์ และการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

นำผลผลิต PCR มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) นำมาแยกด้วย 0.8% low melting gel แล้วย้อมด้วย Gel Star (Cambrex Bio Science Rockland, Inc) จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอบนเครื่อง Dark Reader Transilluminators ใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชั่งน้ำหนักเจลที่ได้เติม QG Buffer 3 เท่าของน้ำหนักเจล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50°C นาน 1 ชั่วโมง เขย่าแรงๆ ทุก 2 นาที จนเจลละลายหมด เติม Isopropanol 1 เท่าของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากัน ย้ายสารละลายทั้งหมดใส่ใน Binding Column บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม PE Buffer 750 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ย้าย Binding Column วางลงบนหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม EB Buffer (อุ่นที่อุณหภูมิ $50 - 60^{\circ}\text{C}$) 30 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 15 – 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ตรวจสอบคุณภาพด้วย 1.5% Agarose gel electrophoresis จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยา ligation โดยใช้ T&A Cloning Kit (RBC Bioscience, Taiwan) ในปริมาตรของปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย Gel-purified PCR product 4 ไมโครลิตร, T&A Cloning vector 2 ไมโครลิตร, Ligation Buffer A 1 ไมโครลิตร, Ligation Buffer B 1 ไมโครลิตร, T4 DNA Ligase 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ ผสม

ปฏิกิริยาทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 22°C เป็นเวลา 15 – 30 นาที และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4°C นานข้ามคืน จากนั้นทำการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α โดยนำปฏิกิริยา ligation จำนวน 2 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดคอมพิเทนต์เซลล์ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และแช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไป heat – shock ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 30 วินาที (ไม่ต้องเขย่า) นำไปแช่บนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที เติม S.O.C. medium 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไป spread บนอาหารแข็ง LB (เตรียม 1 ลิตร: 10 กรัม NaCl, 10 กรัม Tryptone, 5 กรัม Yeast extract, 15 กรัม Bacto-Agar, ddH $_2$ O) เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเพลทไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นานข้ามคืน

3.4 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ และการตรวจสอบการปรากฏของยีน

คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่มีขึ้น insert ของยีน นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที นาน 12–16 ชั่วโมง นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้ GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, USA) นำเซลล์ที่เลี้ยงไว้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ เทอาหารทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วย Resuspension Solution 250 ไมโครลิตร เขย่าให้เซลล์ละลาย เติม Lysis Solution 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดขึ้นลง 4 – 6 ครั้ง เติม Neutralization Solution 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดขึ้นลง 4 – 6 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นย้ายสารละลายเซลล์ลงใน GeneJET™ spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม Wash Solution 500 ไมโครลิตร เพื่อล้าง column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) ย้าย GeneJET™ spin column วางบนหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Elution Buffer 50 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้นาน 15 – 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1% agarose gel electrophoresis และเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

การตรวจสอบการปรากฏของยีน *4CL CAD COMT* และ *CCOMT* โดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *KpnI* ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 100 – 200 นาโนกรัม, 1X FastDigest Buffer, 0.5U FastDigest Enzyme ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80°C นาน 5 นาที นำมาตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis

3.5 การวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA Sequencing)

นำตัวอย่างพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีขึ้นส่วนของยีน *4CL CAD COMT* และ *CCOMT* มาเป็นต้นแบบในการวิเคราะห์ลำดับเบส โดยใช้สารเคมี ABI PRISM® BigDye® Terminator Cycle Sequencing V3.1 Kit (Perkin-Elmer) ร่วมกับไพรเมอร์ M13 (forward) 5' – GTA AAA CGA CGG CCA GT – 3' และ M13 (reverse) 5' –

GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG G – 3' ในการทำปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมีดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม, BigDye™ 2 ไมโครลิตร, Ready Reaction buffer 1 ไมโครลิตร, 5 ไมโครโมล ไพรมอร์ Forward / Reverse และ ddH₂O 3.4 ไมโครลิตร นำปฏิกิริยา cycle sequencing ที่ได้ เข้าเครื่อง Thermal Cycler 9700 โดยตั้งรอบปฏิกิริยาดังนี้ Denaturation 96°C 10 วินาที, Annealing 50°C 5 วินาที, Extension 60°C 4 นาที จำนวน 25 รอบ และ Hold ที่ 4°C infinity (α) หลังจากนั้นทำการล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน โดยนำผลผลิตที่ได้ใส่ลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำ Solution A (ddH₂O 16 ไมโครลิตร: 95% ethanol 64 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที ผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดขึ้นลงทุก 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0°C ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70% Ethanol 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0°C ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนแห้งในที่มืด จากนั้นละลายตะกอนด้วย Hidi-formamide 10 ไมโครลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากันในหลอด นำไปปั่นให้ดีเอ็นเอตกที่ก้นหลอด นำตัวอย่างใส่หลอด Septa บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 2 นาที และแช่ไว้บนน้ำแข็งทันที นำตัวอย่าง load เข้าเครื่อง ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบส จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าต่างๆ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปและโปรแกรมบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต

4. การสร้างชุด cassette ยีน และการตรวจสอบการปรากฏของยีน 4CL CAD COMT และ CCOMT

4.1 การสร้างชุด cassette ยีน

4.1.1 การเพิ่มปริมาณยีน 4CL CAD COMT และ CCOMT จากพลาสมีดีเอ็นเอของหญ้า โดยวิธี PCR

นำพลาสมีดีเอ็นเอที่มียีน 4CL CAD COMT และ CCOMT ไปเพิ่มปริมาณส่วนที่ต้องการในหลอดทดลองกับไพรมอร์ที่จำเพาะกับยีน 4CL คือ 4CLBmHI_Ant (forward) และ 4CLXbaI_Ant (reverse) ยีน CAD คือ CADKpnI_Ant (forward) และ CADXbaI_Ant (reverse) ยีน COMT คือ COMTKpnI_Ant (forward) และ COMTXbaI_Ant (reverse) ยีน CCOMT คือ CCOMTBmHI_Ant (forward) และ CCOMTXbaI_Ant (reverse) ซึ่งได้เติมลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อบังคับทิศทางของการเชื่อมต่อขึ้นยีนในรูปแบบ Antisense โดยใช้ Hot Start Taq Master Mix Kit (QIAGEN, USA) ในปริมาตรของปฏิกิริยาพอลิเมอเรสทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม, 0.5U HotStart Taq Master Mix, 0.4 μM Gene Specific Primer (forward), 0.4 μM Gene Specific Primer (reverse) ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำโดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre-Denature 93°C 15 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denature 94°C 30 วินาที, Anneal 60°C 30 วินาที, Extend 68°C 1 นาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วยขั้นตอน 72°C 10 นาที อีก 1 รอบ หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาเก็บตัวอย่างไว้ที่ 4°C และตรวจวิเคราะห์ผล โดยนำผลผลิต PCR ที่ได้มาตรวจสอบขนาดขึ้นดีเอ็นเอด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis นำไปย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transilluminators พร้อมบันทึกภาพ

4.1.2 การเชื่อมต่อนิยีน *4CL CAD COMT* และ *CCOMT* เข้ากับ Plant Expression Vector

นำพลาสมิด pCambia2300 ที่มีส่วนประกอบของโปรโมเตอร์ (35SCaMV) และเทอร์มินเตอร์ (NOS) ซึ่งมีขนาด 9,648 คู่เบส มาใช้เป็น Plant Expression Vector นิยีน *nptII* (kanamycin) เป็นนิยีนเครื่องหมายในการคัดเลือก และขึ้นต้นนิยีนของนิยีน *4CL CAD COMT* และ *CCOMT* ขนาด 1,659 1,101 1,083 และ 735 คู่เบส นำแต่ละตัวอย่างมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *KpnI* (*CAD* และ *COMT*) *XbaI* และ *BamHI* (*4CL* และ *CCOMT*) โดยในปฏิกิริยาทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย นิยีนของนิยีน *4CL CAD COMT* และ *CCOMT*/พลาสมิดนิยีนของ pCambia2300 ที่ความเข้มข้นตัวอย่างละ 1 ไมโครกรัม, 1X FastDigest Buffer, 1U FastDigest enzyme ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที และนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 80°C นาน 5 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นนำมาแยกด้วย 0.8% low melting gel แล้วย้อมด้วย Gel Star (Cambrex Bio Science Rockland, Inc) ตัดแถบนิยีนที่ต้องการบนเครื่อง Dark Reader Transilluminators และแยกสกัดนิยีนออกจากเจลโดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) (ข้อ 3.3.1) จะได้ขึ้นพลาสมิด pCambia2300 และขึ้นนิยีน *4CL CAD COMT* และ *CCOMT* โดยที่ปลายข้างหนึ่งเป็นตำแหน่งจำจุดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และอีกข้างหนึ่งเป็นตำแหน่งของเอนไซม์ *KpnI* และ *BamHI* นำขึ้นนิยีน *4CL/CAD/COMT/CCOMT* เชื่อมต่อเข้ากับ Plant Expression Vector (pCambia2300) เพื่อสร้างพลาสมิดนิยีนสายผสมที่สมบูรณ์ ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยขึ้นนิยีนของนิยีน *4CL/CAD/COMT/CCOMT* 200 นาโนกรัม, pCambia2300 400 นาโนกรัม, 1X Ligation Buffer, T4 DNA ligase, ปรับปริมาตรด้วยน้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 22°C นาน 1 ชั่วโมง และนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 65°C นาน 10 นาที จากนั้นทำการถ่ายฝากนิยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α โดยนำปฏิกิริยา ligation จำนวน 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดคอมพิเทนต์เซลล์ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และแช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไป heat – shock ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 45 วินาที นำไปแช่บนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำ S.O.C. medium 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไป spread บนอาหารแข็ง LB (เตรียม 1 ลิตร : 10 กรัม NaCl, 10 กรัม Tryptone, 5 กรัม Yeast extract, 15 กรัม Bacto-Agar, ddH₂O) เติมน้ำสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเพลทไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นานข้ามคืน

4.2 การตรวจสอบการปรากฏของนิยีน ใน Plant Expression Vector

4.2.1 การตรวจสอบการปรากฏของนิยีน *4CL CAD COMT* และ *CCOMT* ด้วยเทคนิค PCR

คัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าได้รับพลาสมิดสายผสมของแต่ละนิยีน นำมาสกัดพลาสมิดนิยีนโดยใช้ชุดสกัดพลาสมิด GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, USA) (ข้อ 3.3.2) นำพลาสมิดนิยีนที่สกัดได้ นำมาทำปฏิกิริยา PCR ร่วมกับไพรเมอร์ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse) (ตารางที่ 1) ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดนิยีน 50 นาโนกรัม, 2U HotStart Taq Master Mix, 0.5 μ M Primer (forward), 0.5 μ M Primer (reverse) ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre-

Denature 95°C 15 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denature 94°C 30 วินาที, Anneal 60°C 30 วินาที, Extend 72°C 3 นาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วยขั้นตอน 72°C 10 นาที อีก 1 รอบ และ Hold ที่ 4°C infinity (α) ตรวจวิเคราะห์ผลด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis เทียบขนาดแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker พร้อมบันทึกภาพ

4.2.2 การตรวจสอบการปรากฏของยีน *4CL CAD COMT* และ *CCOMT* ด้วยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

การตรวจสอบการปรากฏของยีน *4CL CAD COMT* และ *CCOMT* ด้วยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *KpnI* (*CAD* และ *COMT*) *XbaI* และ *BamHI* (*4CL* และ *CCOMT*) ในปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร, 1X FastDigest buffer, 0.5U FastDigest enzyme, ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่ 80°C นาน 5 นาที จากนั้นนำไปตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis เทียบขนาดแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas, USA)

เวลา และสถานที่ทำการทดลอง

ระยะเวลาทำการทดลอง เดือน ตุลาคม 2555 – เดือน กันยายน 2558

สถานที่ทำการทดลอง สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อ. ัญบุรี จ. ปทุมธานี

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การโคลนยีน *4CL CAD COMT* และ *CCOMT* จากหนูในส่วนที่ยีนที่มีการแสดงออก

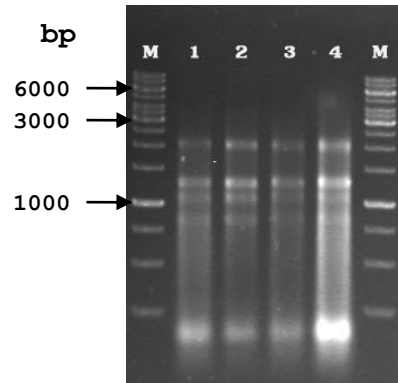
จากการโคลนยีน *4CL CAD COMT* และ *CCOMT* ในส่วนที่ยีนที่มีการแสดงออก โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ บริเวณที่มีความเหมือนกันอย่างสูงที่มีรายงานในพืชชนิดต่างๆ จากฐานข้อมูลทางอินเทอร์เน็ต NCBI สามารถออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *4CL* คือ *4CL* (forward) และ *4CL* (reverse) ยีน *CAD* คือ *CAD* (forward) และ *CAD* (reverse) ยีน *COMT* คือ *COMT* (forward) และ *COMT* (reverse) และไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *CCOMT* คือ *CCOMT* (forward) และ *CCOMT* (reverse) (ตารางที่ 1) โดยนำไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ได้มาทำปฏิกิริยา RT – PCR กับอาร์เอ็นเอรวมของหนูคิงเนเปียร์ และหนูคิงเนเปียร์ปากช่อง 1 (ภาพที่ 1) พบว่า สามารถสังเคราะห์ยีน *4CL CAD COMT* และ *CCOMT* ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.6 1.1 1.1 และ 0.7 กิโลเบส ตามลำดับ (ภาพที่ 2ก 2ข 2ค และ 2ง) นำดีเอ็นเอของยีน *4CL CAD COMT* และ *CCOMT* ที่ได้ไปเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ T&A Cloning Vector Kit และถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย DH5 α คัดเลือกโคลนที่คาดว่าจะมียีน *4CL CAD COMT* และ *CCOMT* นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (ภาพที่ 3ก 3ข 3ค และ 3ง) และตรวจสอบโคลนที่ได้รับการถ่ายยีนโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *KpnI* พบว่า

รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของยีน *4CL CAD COMT* และ *CCOMT* ที่มีความถูกต้องจำนวน 2 แถบ ได้แก่ ขนาดประมาณ 2.7 กิโลเบส เป็นขนาดของเวกเตอร์ (Vector) และขนาดประมาณ 1.6 1.1 1.1 และ 0.7 กิโลเบส เป็นขนาดของยีน *4CL CAD COMT* และ *CCOMT* ตามลำดับ (ภาพที่ 4ก 4ข 4ค และ 4ง) นำพลาสมิดดีเอ็นเอโคลนที่มียีน *4CL CAD COMT* และ *CCOMT* จากหลั้ว ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer พบว่า ยีน *4CL* จากหลั้วทั้ง 2 พันธุ์ มีลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 1,659 คู่เบส และสามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนในส่วนที่มีการแสดงออก (ORF) ของยีน *4CL* ได้จำนวน 553 amino acid (ภาพที่ 5) ยีน *CAD* จากหลั้วทั้ง 2 พันธุ์ มีลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 1,101 คู่เบส และสามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนในส่วนที่มีการแสดงออก (ORF) ของยีน *CAD* ได้จำนวน 367 amino acid (ภาพที่ 6) ยีน *COMT* จากหลั้วทั้ง 2 พันธุ์ มีลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 1,083 คู่เบส และสามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนในส่วนที่มีการแสดงออก (ORF) ของยีน *COMT* ได้จำนวน 361 amino acid (ภาพที่ 7) และยีน *CCOMT* จากหลั้วทั้ง 2 พันธุ์ มีลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 1,101 คู่เบส และสามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนในส่วนที่มีการแสดงออก (ORF) ของยีน *CCOMT* ได้จำนวน 245 amino acid (ภาพที่ 8)

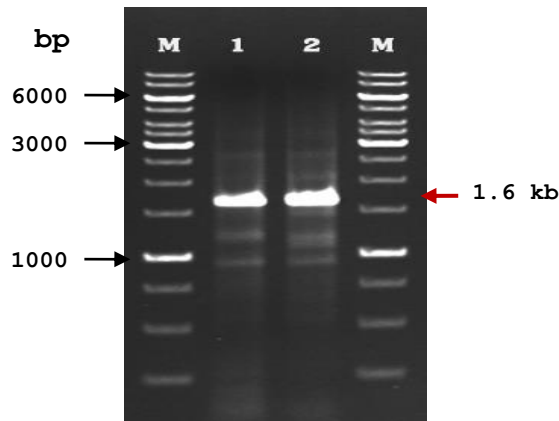
ตารางที่ 1 แสดงคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา RT – PCR ของยีน *4CL CAD COMT* และ *CCOMT*

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3')	ขนาด (bp.)	อุณหภูมิ Tm (°C)	GC content (%)
<i>4CL</i> (forward)	ATG GGT TCC GTG GAC GMG TCG KCG GYG GCG GMG GTG	36	80.8 (60)	72.2
<i>4CL</i> (reverse)	TCA GTG GAC GCC AGC GGC GAG CCT GGC TCT CAA R	34	78.3 (60)	66.2
<i>CAD</i> (forward)	ATG GGG AAC CTG GCG TCG GAT AAG ACA GTG G	31	72.9 (60)	58.1
<i>CAD</i> (reverse)	CTA GTT GCT CGG CGC CTC CGC GGC GGC GGC CTC C	34	82.8 (60)	79.4
<i>COMT</i> (forward)	ATG GGY TCS ACC GCC GMS GAC RTG GCC GCG	30	79.8 (60)	71.1
<i>COMT</i> (reverse)	CTA CTT GRT GAA CTC GAT GGC CCA BGC GKT G	31	71.0 (60)	53.8
<i>CCOMT</i> (forward)	ATG ACG ACC GGC GGC GTT GCC AAC GTC CAC	30	77.5 (60)	66.7
<i>CCOMT</i> (reverse)	TCA GAC GAG GCG GCG GCA GAT GGT GAC GCC	30	78.5 (60)	70.0
<i>4CLBmHI_Ant</i> (forward)	CAC GGA TCC ATG GGT TCC GTG GAC GMG TCG KCG GYG GCG GMG	42	75.9 (60)	71.4
<i>4CLXbaI_Ant</i> (reverse)	CAC TCT AGA TCA GTG GAC GCC AGC GGC GAG CCT GGC TCT C	40	72.2 (60)	65.0
<i>CADKpnI_Ant</i> (forward)	CAC GGT ACC ATG GGG AAC CTG GCG TCG GAT AAG ACA G	37	69.0 (60)	59.4
<i>CADXbaI_Ant</i> (reverse)	CAC TCT AGA CTA GTT GCT CGG CGC CTC CGC GGC GGC GGC	39	75.2 (60)	71.7
<i>COMTKpnI_Ant</i> (forward)	CAC GGT ACC ATG GGB TCS ACS GCV RVS GAY RTG GCS	36	73.1 (60)	68.0
<i>COMTXbaI_Ant</i> (reverse)	CAC TCT AGA YYA CTT GRT GAA CTC GAT GGC MMA BGC G	37	65.8 (60)	51.8
<i>CCOMTBmHI_Ant</i> (forward)	CAC GGA TCC ATG ACG ACC GGC GGC GTT GCC AAC GTC	36	72.7 (60)	66.6
<i>CCOMTXbaI_Ant</i> (reverse)	CAC TCT AGA TCA GAC GAG GCG GCG GCA GAT GGT GAC	36	69.2 (60)	61.1

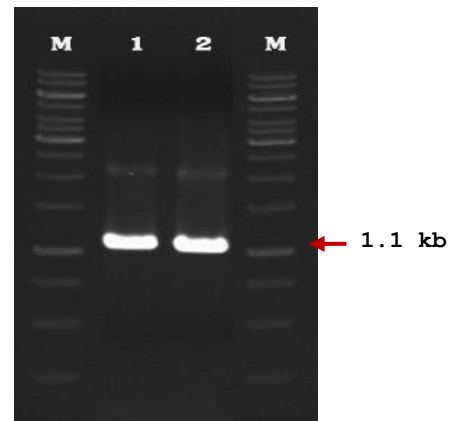
NOS (forward)	GTT TGA ACG ATC GGG GAA ATT	28	67.5 (60)	50.0
	CGA GCT C			
35SCaMV (reverse)	CAT TTG GAG AGG ACA CGC TGA	30	70.1 (60)	53.3
	CAA GCT GAC			



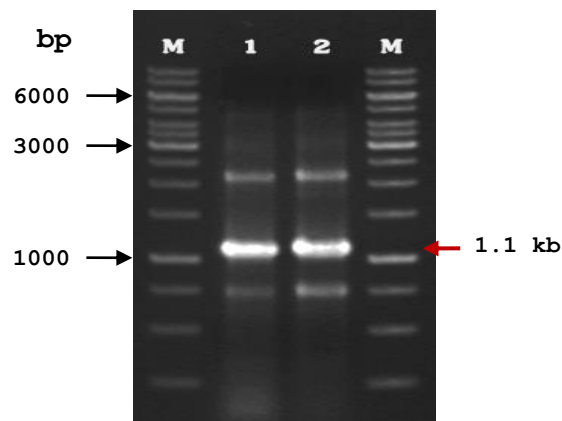
ภาพที่ 1 แสดงอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้จากหญ้า 2 พันธุ์, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = หญ้าคิงเนเปียร์ (KN) และ Lane 3-4 = หญ้าคิงเนเปียร์ปากช่อง 1 (KP)



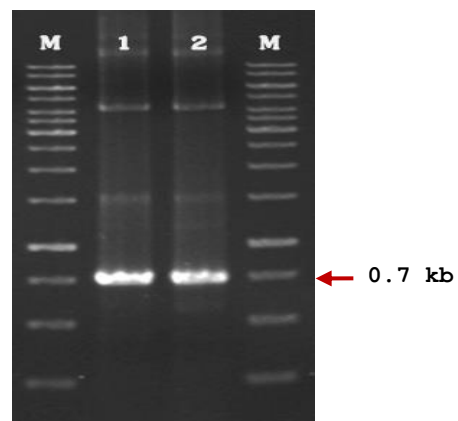
ก



ข

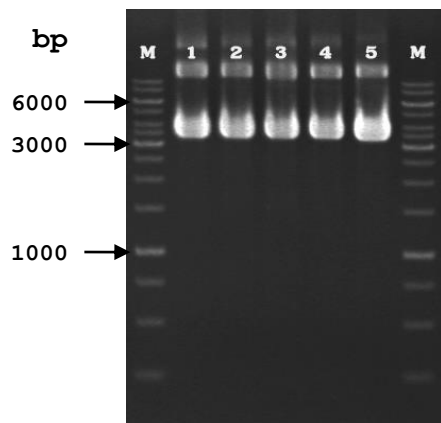


ค

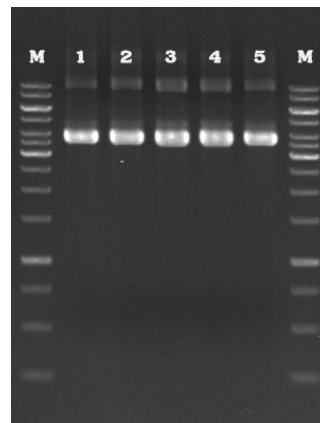


ง

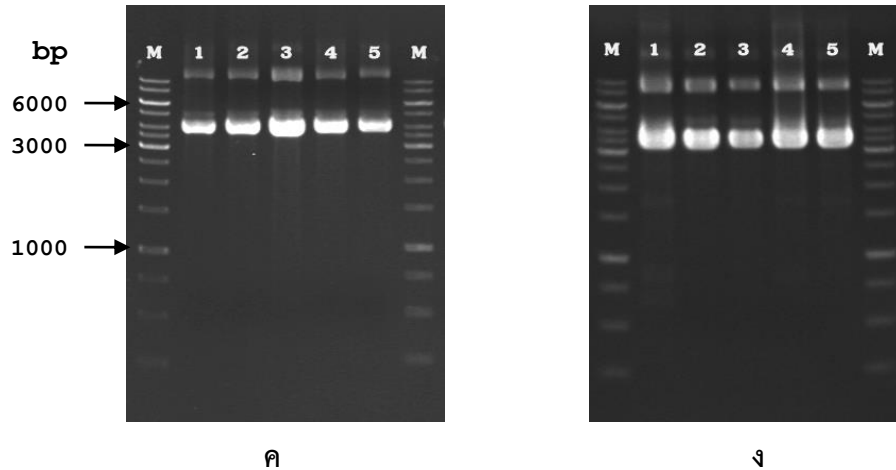
- ภาพที่ 2 ก. แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน *4CL* ที่เพิ่มปริมาณได้จากหญ้า 2 พันธุ์ ร่วมกับคู่ไพรเมอร์ *4CL* (forward) และ *4CL* (reverse) ด้วยเทคนิค RT-PCR, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = แถบดีเอ็นเอของยีน *4CL* ในหญ้าคิงเนเปียร์ (KN), Lane 2 = แถบดีเอ็นเอของยีน *4CL* ในหญ้าคิงเนเปียร์ปากช่อง 1 (KP)
- ข. แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน *CAD* ที่เพิ่มปริมาณได้จากหญ้า 2 พันธุ์ ร่วมกับคู่ไพรเมอร์ *CAD* (forward) และ *CAD* (reverse) ด้วยเทคนิค RT-PCR, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = แถบดีเอ็นเอของยีน *CAD* ในหญ้าคิงเนเปียร์ (KN), Lane 2 = แถบดีเอ็นเอของยีน *CAD* ในหญ้าคิงเนเปียร์ปากช่อง 1 (KP)
- ค. แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน *COMT* ที่เพิ่มปริมาณได้จากหญ้า 2 พันธุ์ ร่วมกับคู่ไพรเมอร์ *COMT* (forward) และ *COMT* (reverse) ด้วยเทคนิค RT-PCR, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = แถบดีเอ็นเอของยีน *COMT* ในหญ้าคิงเนเปียร์ (KN), Lane 2 = แถบดีเอ็นเอของยีน *COMT* ในหญ้าคิงเนเปียร์ปากช่อง 1 (KP)
- ง. แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน *CCOMT* ที่เพิ่มปริมาณได้จากหญ้า 2 พันธุ์ ร่วมกับคู่ไพรเมอร์ *CCOMT* (forward) และ *CCOMT* (reverse) ด้วยเทคนิค RT-PCR, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = แถบดีเอ็นเอของยีน *CCOMT* ในหญ้าคิงเนเปียร์ (KN), Lane 2 = แถบดีเอ็นเอของยีน *CCOMT* ในหญ้าคิงเนเปียร์ปากช่อง 1 (KP)



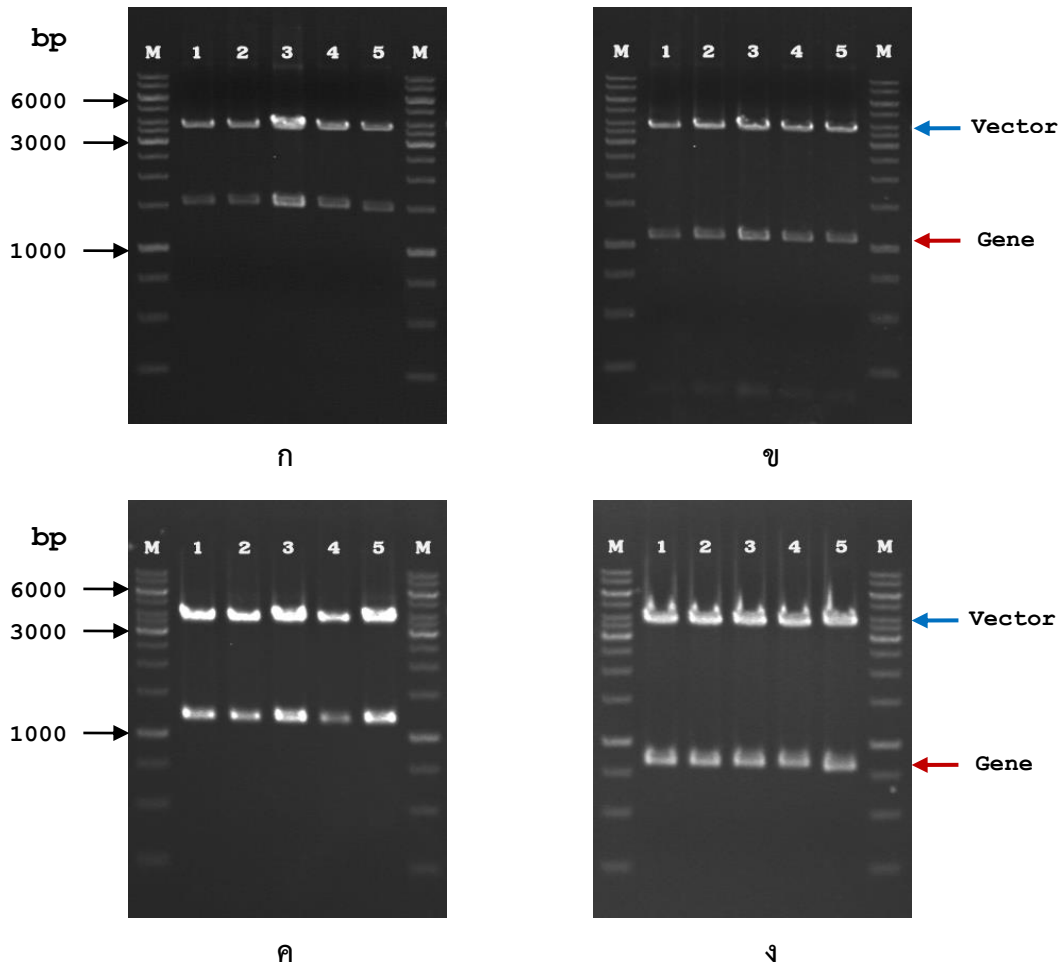
ก



ข



- ภาพที่ 3 ก. แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโคโลนีที่คาดว่าจะมียีน *4CL*, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอหญ้าคิงเนเปียร์ (KN), Lane 3-5 = แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอหญ้าคิงเนเปียร์ปากช่อง 1 (KP)
- ข. แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโคโลนีที่คาดว่าจะมียีน *CAD*, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอหญ้าคิงเนเปียร์ (KN), Lane 3-5 = แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอหญ้าคิงเนเปียร์ปากช่อง 1 (KP)
- ค. แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโคโลนีที่คาดว่าจะมียีน *COMT*, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอหญ้าคิงเนเปียร์ (KN), Lane 3-5 = แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอหญ้าคิงเนเปียร์ปากช่อง 1 (KP)
- ง. แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโคโลนีที่คาดว่าจะมียีน *CCOMT*, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอหญ้าคิงเนเปียร์ (KN), Lane 3-5 = แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอหญ้าคิงเนเปียร์ปากช่อง 1 (KP)



ภาพที่ 4 ก. แสดงรูปแบบของพลาสมิดดีเอ็นเอของยีน *4CL* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *KpnI*, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = รูปแบบของแถบ ดีเอ็นเอหัวคิงเนเปียร์ (KN), Lane 3-5 = รูปแบบของแถบดีเอ็นเอหัวคิงเนเปียร์ปากช่อง 1 (KP)

ข. แสดงรูปแบบของพลาสมิดดีเอ็นเอของยีน *CAD* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *KpnI*, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = รูปแบบของแถบ ดีเอ็นเอหัวคิงเนเปียร์ (KN), Lane 3-5 = รูปแบบของแถบดีเอ็นเอหัวคิงเนเปียร์ปากช่อง 1 (KP)

ค. แสดงรูปแบบของพลาสมิดดีเอ็นเอของยีน *COMT* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *KpnI*, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = รูปแบบของแถบ ดีเอ็นเอหัวคิงเนเปียร์ (KN), Lane 3-5 = รูปแบบของแถบดีเอ็นเอหัวคิงเนเปียร์ปากช่อง 1 (KP)

ง. แสดงรูปแบบของพลาสมิดดีเอ็นเอของยีน *CCOMT* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *KpnI*, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = รูปแบบของแถบ ดีเอ็นเอหัวคิงเนเปียร์ (KN), Lane 3-5 = รูปแบบของแถบดีเอ็นเอหัวคิงเนเปียร์ปากช่อง 1 (KP)

1 atggggttcggtggacgcgtcgccggcgccggcggtgccgggtgccggcgccggcgaggagaag
 M G S V D A S A A A A V P V P A A E E K
 61 ccgggtggtgttcgggtcgaagcttccccgacatcgagatcaacaacagccagtctctgcag
 P V V F R S K L P D I E I N N S Q S L Q
 121 gcctactgcttcggccgtatgagcgaggtggcgccggcgcccggtgcctgacgacgggcag
 A Y C F G R M S E V A A R P C L I D G Q
 181 acgggcgcgctcctacacctacgcggaggtggagtcacctgacgcgcgcgcgcgcgctcgggt
 T G A S Y T Y A E V E S L T R R A A S G
 241 ctccgcgcgtatggcggtgggaagggggacgtggtcatgaacctcctccgcaactgcccc
 L R R M G V G K G D V V M N L L R N C P
 301 gagttcgcttctcgttccctcgccggcgccggcggtggcgccgcgccaccactacggcgaa
 E F A F S F L G A A R L G A A T T T A N
 361 ccgtttacaccccgacgagatccaccgccaggcgaggcgccggcgccgcgcgcggtcatc
 P F Y T P H E I H R Q A E A A G A R L I
 421 gtcaccgaggcctgcgcgcgtggagaaggtccgcgggttcgcgcgcgagcggggcatcccc
 V T E A C A V E K V R G F A A E R G I P
 481 gtggtcaccgtcgacggcaggttcgagggctgcgcgcgagttcgccgaggtgatcgccga
 V V T V D G R F E G C A E F A E V I A A
 541 gaggagctcgagggcgacgaagacgtccaccccgacgacgtcgtcgtgctgcctactcc
 E E L E A D E D V H P D D V V V L P Y S
 601 tccggcaccacgggctccccaaggcggtcatgctcaccacccgcagcctcaccacc
 S G T T G L P K G V M L T H R S L I T S
 661 gtgcgcgacgaggttgacggcgagaacccgaacctgtacttcagcaaggacgacgtgctg
 V A Q Q V D G E N P N L Y F S K D D V L
 721 ctgtgcctgctgcgcgtgttcacatctactcgtcactcggtgctgctggcggtctc
 L C L L P L F H I Y S L N S V L L A G L
 781 cgtgccccggtcgcccatcgatcatgcgcaagttcgacctggcgcgctcgtcgacctg
 R A G S A I V I M R K F D L G A L V D L
 841 gtgcgcgcgccacggcatcaccatcgccgcttcgtcccccccatcgctcgatcgatgcc
 V R R H G I T I A P F V P P I V V E I A
 901 aagagccccgcgtcaccgcgcgacacctcgctccatccgcatggtcatgtccggcgcc
 K S P R V T A D D L A S I R M V M S G A
 961 gcccccatgggcaaggagctccaggacgcgttcgatggccaagatccccaacgcgctctc
 A P M G K E L Q D A F M A K I P N A V L
 1021 ggccaggggtacgggatgacggaggccgggcccgggtgctggcgatgtgcctggcggttcgcc
 G Q G Y G M T E A G P V L A M C L A F A
 1081 aaggagccggttcagggtgaagtcgggtcgtgcggcacggtggtgcggaacgcgagctc
 K E P F Q V K S G S C G T V V R N A E L
 1141 aagatcgctgaccccgacacccggcgccgcccctcgcccggaacgagcccggcgagatatgc
 K I V D P D T G A A L G R N E P G E I C
 1201 atccgcgggggacgagatcatgaaaggttacctgaacgaccccgagtcgacgaagaacacc
 I R G E Q I M K G Y L N D P E S T K N T
 1261 atcgacaaggacggctggtgcacacccgggacatcggtacgtggacgacgacgacgag
 I D K D G W L H T G D I G Y V D D D D E
 1321 atcttcacgtcgacaggctcaaggagatcatcaagtacaagggttcagggtgccgcg
 I F I V D R L K E I I K Y K G F Q V P P
 1381 gccgagctcgaggcgctcctcatcacgcaccccgagatcaaggacgcgcgcgctcgtctca
 A E L E A L L I T H P E I K D A A V V S
 1441 gagaaggatgatctcgccggtgaaatcccggtcgccttcacgtcgcgacggaagggtct
 E K D D L A G E I P V A F I V R T E G S
 1501 gaactcactgaggacgagatcaagcaatttgttgccaaagaggttggtgtctacaagaag
 E L T E D E I K Q F V A K E V V F Y K K
 1561 attcagaggttttcttcaccgagtcaccccaagaaccttcgggaagatcttacgg
 I H E V F F T E S I P K N P S G K I L R
 1621 aaggacttgagagccaggctcgccgctggcgctccactga
 K D L R A R L A A G V H S

ภาพที่ 5 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน 4CL ที่โคลนได้จากหญ้าคิงเนเปียร์ (KN) ในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน

```

1  atggggaacctggcgctcgataaagacagtgggtgggatgggccgccgcgacgccaccggc
   M G N L A S D K T V V G W A A R D A T G
61  cacctctccccctacacctacaccgtcaggaagacaggcgctgaagatgtgggtggaag
   H L S P Y T Y T V R K T G A E D V V V K
121 gtgctctactgtgggatctgccacactgacctccaccaggccaagaaccacctcggtgct
   V L Y C G I C H T D L H Q A K N H L G A
181 tcaaagtaccccatggtccctgggcacatgaggtgggtcggtgaggtagtggaggtcggggccc
   S K Y P M V P G H E V V G E V V E V G P
241 gaggtgagcaagtacagcggtgggcgacgtcggtcggtcggtgaggtgaggtgaggtgaggtg
   E V S K Y S V G D V V G V G V I V G C C
301 cgcgagtgcgcgcccttgcaaggccaaacgtcgagcagtagtactgcaacaaggagatctgggtcc
   R E C R P C K A N V E Q Y C N K R I W S
361 tacaacgatgtctacaccgacggcgccgtccacgcagggaggggttcgcctccaccatgggtt
   Y N D V Y T D G R P T Q G G F A S T M V
421 gtcgaccagaagtctcggtggaagatccctgatggtctggcgccggagcagggcgggcgccg
   V D Q K F V V K I P D G L A P E Q A A P
481 ctactatgcgcgggcgtgacagtgtacagcccgctaaagcacttcggtctgacatccccc
   L L C A G V T V Y S P L K H F G L T S P
541 ggctcccgcgggcgccatcctgggtctcgggcggtggggccacatgggcgtgaaggtagcc
   G L R G G I L G L G G V G H M G V K V A
601 aaagccatggggccaccacgtgacgggtgataagctcgtcggtcccggaagcgcgcgaggcg
   K A M G H H V T V I S S S S R K R A E A
661 atggaacacctgggcgcggacgcgtacctgggtgagctcgagcgtcgacgccatggcgggcc
   M E H L G A D A Y L V S S D V D A M A A
721 gccgcccgaactccctggactacatcatcgacacgggtgcccgcgccaccacccgctggaaccg
   A A D S L D Y I I D T V P A H H P L E P
781 tacctggcgctgctgaagatggacgggcaagcacgtgctgctcggtcggtcggtcggtcggtcg
   Y L A L L K M D G K H V L L G V I G E P
841 ctcagcttcgtgtcccccatgggtgatgctggggcgcaagtccatcacggggagcttcctc
   L S F V S P M V M L G R K S I T G S F I
901 ggcagcgtggacgagaccgcccagacgctgcagttctgctcgacaaaggggtcacgtca
   G S V D E T A E T L Q F C V D K G L T S
961 cagatcgaggtgggtcaagatgggttacgtcaacgagggcgctcgagcgggtcgagcgcgaac
   Q I E V V K M G Y V N E A L E R L E R N
1021 gacgtcaggtaccggttcgtcggtcgacgtcggtcggtcggtcggtcggtcggtcggtcggtcg
   D V R Y R F V V D V A G S N I E E A A A
1081 gcgggagggcgccgagcaac tag
      A E A P S N S

```

ภาพที่ 6 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน CAD ที่โคลนได้จากหญ้าคิงเนเปียร์ (KN) ในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน


```

1  atgggttcgaccgccgaggacgtggccgcggctcgccgacgaggaggcggtgcatgtacgcg
   M G S T A E D V A A V A D E E A C M Y A
61  ctgcagctggtgtcgtcgtccatcctgccgatgacgctcaagaacgccatcgagctgggc
   L Q L V S S S I L P M T L K N A I E L G
121 ctgctggagattctccagaaggaccccgccggcggtgctgcgaggagggtggtggcg
   L L E I L Q K D P A A A L S P E E V V A
181 cggctccccgtggcgccgaccaacccggacgcggcggtgatggtggaccgcatgctccgg
   R L P V A P T N P D A A V M V D R M L R
241 ctgctcgcatcctacgacgtcgtcaggtgcaagatggaggacaaggacggcaagtacgag
   L L A S Y D V V R C K M E D K D G K Y E
301 cgccggtactccgcgcgcgggtgtgcaagtggctcgacccaacgaggacggcgctctcc
   R R Y S A A P V C K W L A P N E D G V S
361 atggccgcgctcgcgctcatgaaccaggacaaggctcctcatggagagctggtactacctc
   M A A L A L M N Q D K V L M E S W Y Y L
421 aaggacgctgtgctggacggcgccatcccgttcaacaaggcgtaaggcatgacggcgcttc
   K D A V L D G G I P F N K A Y G M T A F
481 gagtaccacggcacggaccacgcttcaaccgcgtgttcaacgagggcatgaagaaccac
   E Y H G T D P R F N R V F N E G M K N H
541 tcggtgatcatcaccaagaagctcctcgagttctacacgggcttcgacggcgctcagcacc
   S V I I T K K L L E F Y T G F D G V S T
601 ctcgtcgacgtcgggcgccgcatcgggcgccacgctccacgccatcacctcgggccaccgcg
   L V D V G G G I G A T L H A I T S A H P
661 cagatcaaggcggtcaacttcgacctccccacgtgatctccgagggcgccgcttcccc
   Q I K G V N F D L P H V I S E A P P F P
721 ggcgtgacgacgctcgggcgccgacatgttcaagtcggtccccgcggcgacgccatcctc
   G V Q H V G G D M F K S V P A G D A I L
781 atgaagtggatcctccacgactggagcgacgccactgcgcgacgatcctcaagaactgc
   M K W I L H D W S D A H C A T I L K N C
841 tacgacgcgctgccggccaacggcaaggtgatcatcgctcgagtgctgctgccggtgaac
   Y D A L P A N G K V I I V E C V L P V N
901 ccggaggcgacaccaaggcgagggcggtgtttcacgtcgacatgatcatgctcgccac
   P E A T P K A Q G V F H V D M I M L A H
961 aaccccgcgccgcaaggagaggtacgagagggagttcagggagctcgccaaggagcgggc
   N P G G K E R Y E R E F R E L A K G A G
1021 ttcaccgggttcaaggccacctacatctacgccaacgcatgggccatcgagttcaccaag
   F T G F K A T Y I Y A N A W A I E F T K
1081 tag
      S

```

ภาพที่ 7 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *COMT* ที่โคลนได้จากหนูคิงเนเปียร์ (KN) ในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน

```

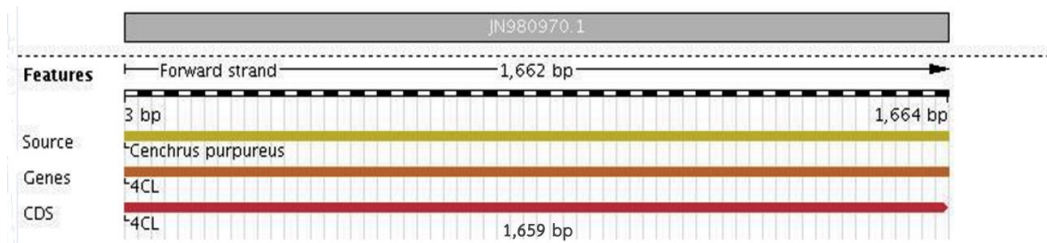
1  atgacgaccggcggttgccaacgtccaccaaggcctcgacagcagcaacaagaccctg
   M T T G G V A N V H Q G L D S S N K T L
61  ctcaagagcgcgagccctgtacaagtacgtgctggacacgtcggtgctgcgcgacgagccg
   L K S E A L Y K Y V L D T S V L P H E P
121 gagtgcacgagcgcgagctgcggctggtgacggacaagcaccagtggtgggttcacgagtcg
   E C M R E L R L V T D K H Q W G F M Q S
181 tccccggacgagggcgcagctgctccgatgctcatcaagctgacggggcgcgcaacacg
   S P D E A Q L L R M L I K L T G A R N T
241 ctggaggtggcggtgttcacgggtactccctcctggccacgcctcgccctccccgac
   L E V G V F T G Y S L L A T A L A L P D
301 gacggcaaggtgatcgccatcgacgtcgaccgcgagtgactacgagatcgccgcgccttc
   D G K V I A I D V D R E Y Y E I G R P F
361 atcgagaagggcggtgctgcgcacaaggtggacttccgcgaggggccccgcgctggaccac
   I E K A G V A H K V D F R E G P A L D H
421 ctcgacgcgctcctcgccgacgagggccaacgtcgggcggttcgacttcgccttcgctcgac
   L D A L L A D E A N V G A F D F A F V D
481 gccgacaagcccaactacgtcaagtaccacgagcagcttctccggctggtgaaggtcggg
   A D K P N Y V K Y H E Q L L R L V K V G
541 ggaaccatcgtgtacgacaacacgctgtggggcgggcaccgtggcgatgcgcgccgacacc
   G T I V Y D N T L W A G T V A M P P D T
601 cccatgtccgacctcgaccgcaggttctccgcccgcacagggacctcaacgtccgactc
   P M S D L D R R F S A A I R D L N V R L
661 tccgcccgcgacccgcgtcgaggtctgccagctcgccatcgccgacggcgctcaccatctgc
   S A D D R V E V C Q L A I A D G V T I C
721 cgccgcctcgtc tga
   R R L V S

```

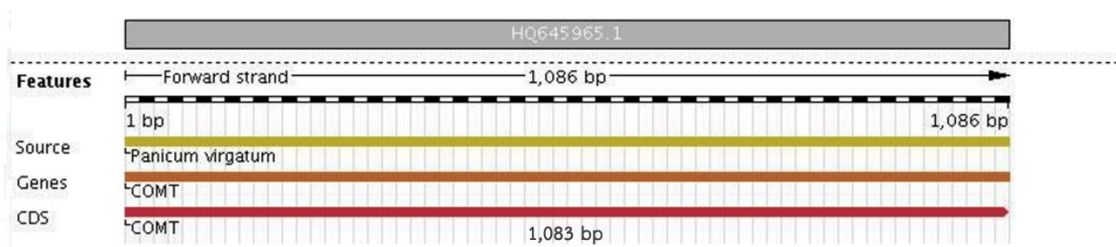
ภาพที่ 8 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *CCOMT* ที่โคลนได้จากหญ้าคิงเนเปียร์ (KN) ในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน

เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์โครงสร้างของยีน โดยใช้โปรแกรม EMBL – EBI database บนอินเทอร์เน็ตพบว่า ยีน *4CL CAD COMT* และ *CCOMT* มีส่วนประกอบครบทั้งยีน ซึ่งประกอบด้วย ลำดับเบสส่วนที่มีการแสดงออกของยีน open reading frame (ORF) หรือ coding sequence (CDS) ของยีน *4CL* ขนาด 1,659 คู่เบส มีจำนวน 1 exon ยีน *CAD* ขนาด 1,101 คู่เบส มีจำนวน 1 exon ยีน *COMT* ขนาด 1,083 คู่เบส มีจำนวน 1 exon และยีน *CCOMT* ขนาด 735 คู่เบส มีจำนวน 1 exon (ภาพที่ 9ก 9ข 9ค และ 9ง) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *4CL* ที่โคลนได้จากหญ้าคิงเนเปียร์มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน 4-coumarate CoA ligase (*4CL*) ที่พบในหญ้า (*Cenchrus purpureus*) (JN980970.1) และข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italica* (L.) Beauv.) (XM004951660.1) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 98% และ 95% ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CAD* ที่โคลนได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน cinnamyl alcohol dehydrogenase (*CAD*) ที่พบในหญ้าเนเปียร์ (*Pennisetum purpureum*) (HQ840705.1) และข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italica*) (XM004951572.1) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 99% และ 94% ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COMT* ที่โคลนได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน caffeic acid 3-O-methyltransferase (*COMT*) ที่พบในข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italica*) (XM004972743.1) และหญ้า Switchgrass (*Panicum virgatum*) (HQ645965.1) โดยมีค่า % Max

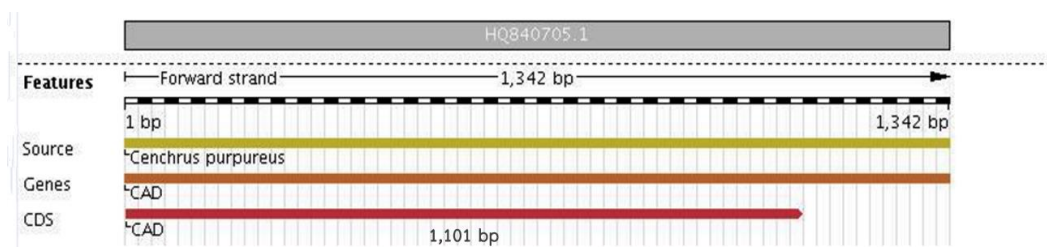
Identities เท่ากับ 96% และ 93% ตามลำดับ (ตารางที่ 4) และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CCOMT* ที่โคลนได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน Tricin syntase 1-like ที่พบในข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italica*) (XM004973751.2) และยีน Caffeoyl CoA O-methyltransferase (*CCOMT*) ที่พบในหญ้า Switchgrass (*Panicum virgatum*) (AB723826.1) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 95% และ 91% ตามลำดับ (ตารางที่ 5)



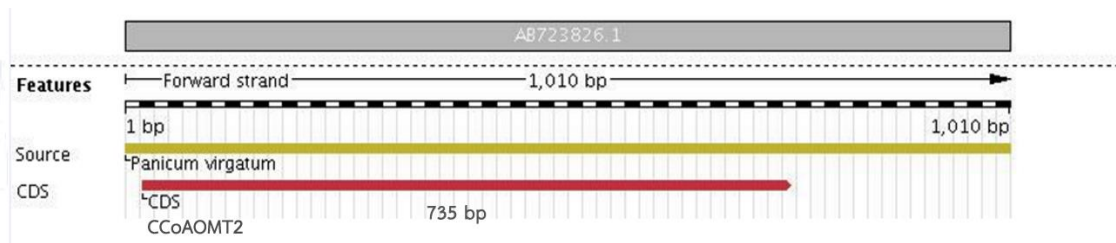
ก



ข



ค



ง

ภาพที่ 9 โครงสร้างของยีนในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน coding sequence (CDS) (แถบลูกศรสีแดง) วิเคราะห์โดยโปรแกรม EMBL-EBI database.

ก. ยีน 4-coumarate CoA ligase (4CL)

- ข. ยีน cinnamyl alcohol dehydrogenase (*CAD*)
- ค. ยีน caffeic acid *O*-methyltransferase (*COMT*)
- ง. ยีน caffeoyl coenzyme A *O*-methyltransferase (*CCOMT*)

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *4CL* ที่โคลนได้จากหญ้าคิงเนเปียร์ (KN) กับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank บนอินเทอร์เน็ตโปรแกรม www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Identities	Accession
Cenchrus purpureus cultivar Huanan 4-coumarate CoA ligase (4CL) mRNA, complete cds	2861	2861	100%	0.0	98%	JN980970.1
Setaria italica probable 4-coumarate-CoA ligase 3- like (LOC101769243),mRNA	2612	2612	100%	0.0	95%	XM004951660.1
Zea mays 4-coumarate coenzyme A ligase (4CL) mRNA, complete cds	2264	2264	100%	0.0	91%	EU491511.1
Panicum virgatum 4-coumarate coenzyme A ligase 1 (4CL 1) mRNA, complete cds	2264	2264	100%	0.0	90%	AY566301.1
Oryza sativa Japonica Group 4CL-3 mRNA for 4-coumarate: CoA ligase-3, complete cds	2035	2035	97%	0.0	88%	AB234050.1

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CAD* ที่โคลนได้จากหญ้าคิงเนเปียร์ (KN) กับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank บนอินเทอร์เน็ตโปรแกรม www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Identities	Accession
Pennisetum purpureum cultivar Huanan cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) mRNA, complete cds	2111	2111	100%	0.0	99%	HQ840705.1
Setaria italica probable cinnamyl alcohol dehydrogenase-like (LOC101769241), mRNA	1385	1385	99%	0.0	94%	XM004951572.1
Panicum virgatum cultivar Alamo cinnamyl alcohol	1590	1590	99%	0.0	92%	GU045611.1

dehydrogenase 1 mRNA, complete cds						
Sorghum bicolor genotype	1538	1538	99%	0.0	91%	HQ668168.1
IS21891 cinnamyl alcohol dehydrogenase 2 (CAD2) mRNA, complete cds						

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *COMT* ที่โคลนได้จากหญ้าคิงเนเปียร์ (KN) กับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank บนอินเทอร์เน็ตโปรแกรม www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Identities	Accession
Setaria italic caffeic acid 3-O-methyltransferase-like (LOC101765311), mRNA	1813	1813	99%	0.0	96%	XM004972743.1
Panicum virgatum caffeic acid 3-O-methyltransferase (COMT) mRNA, complete cds	1623	1623	100%	0.0	93%	HQ645965.1
Saccharum officinarum mRNA for caffeic acid 3-O-methyltransferase	1542	1542	99%	0.0	92%	AJ231133.1
Miscanthus sinensis caffeic acid 3-O-methyltransferase mRNA, complete cds	1525	1525	99%	0.0	91%	HM062766.1
Sorghum sudanense caffeic acid O-methyltransferase (COMT) mRNA, complete cds	1438	1438	99%	0.0	90%	KJ101565.1

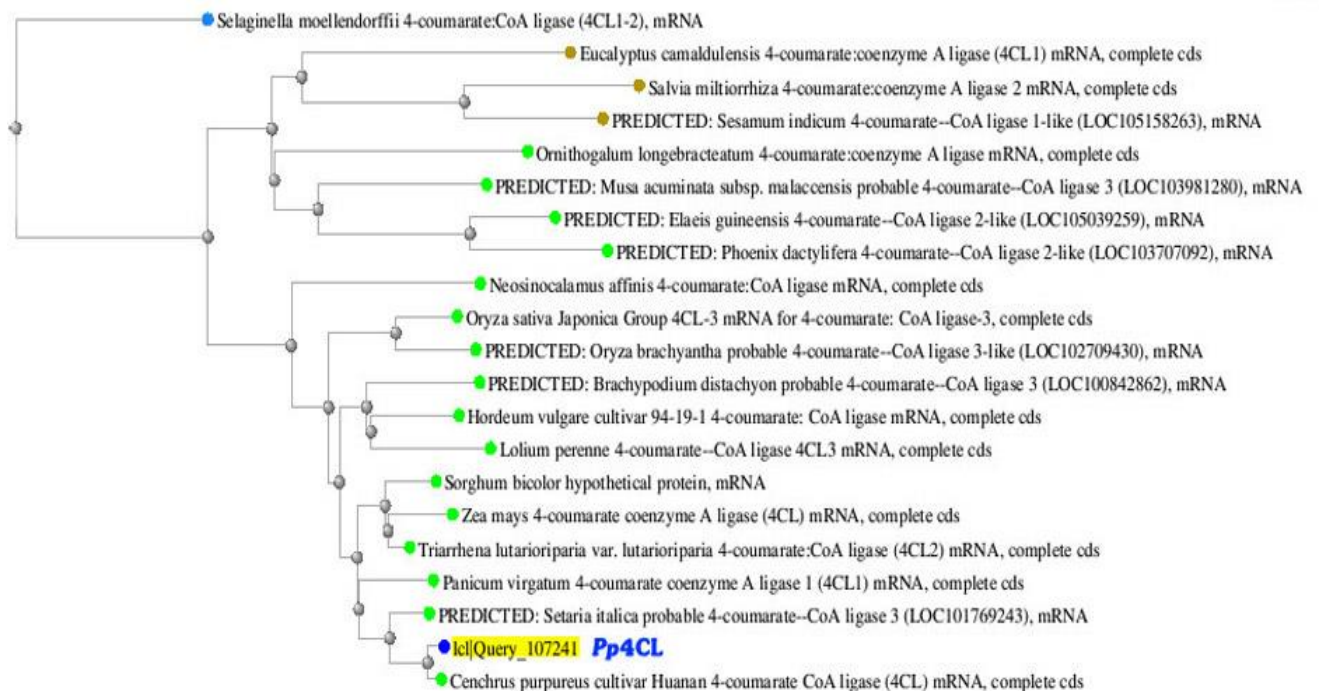
ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CCOMT* ที่โคลนได้จากหญ้าคิงเนเปียร์ (KN) กับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank บนอินเทอร์เน็ตโปรแกรม www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Identities	Accession
Setaria italic tricin syntase 1-like (LOC101753161), mRNA	1175	1175	100%	0.0	95%	XM004973751.2
Panicum virgatum mRNA for caffeoyl CoA O-methyltransferase 2, complete cds	1054	1054	100%	0.0	91%	AB723826.1
Zea mays caffeoyl CoA O-methyltransferase 1 (LOC100286151), mRNA	935	935	97%	0.0	89%	NM001159039.1
Brachypodium distachyon tricin synthase 1-like	780	780	100%	0.0	84%	XM003574661.1

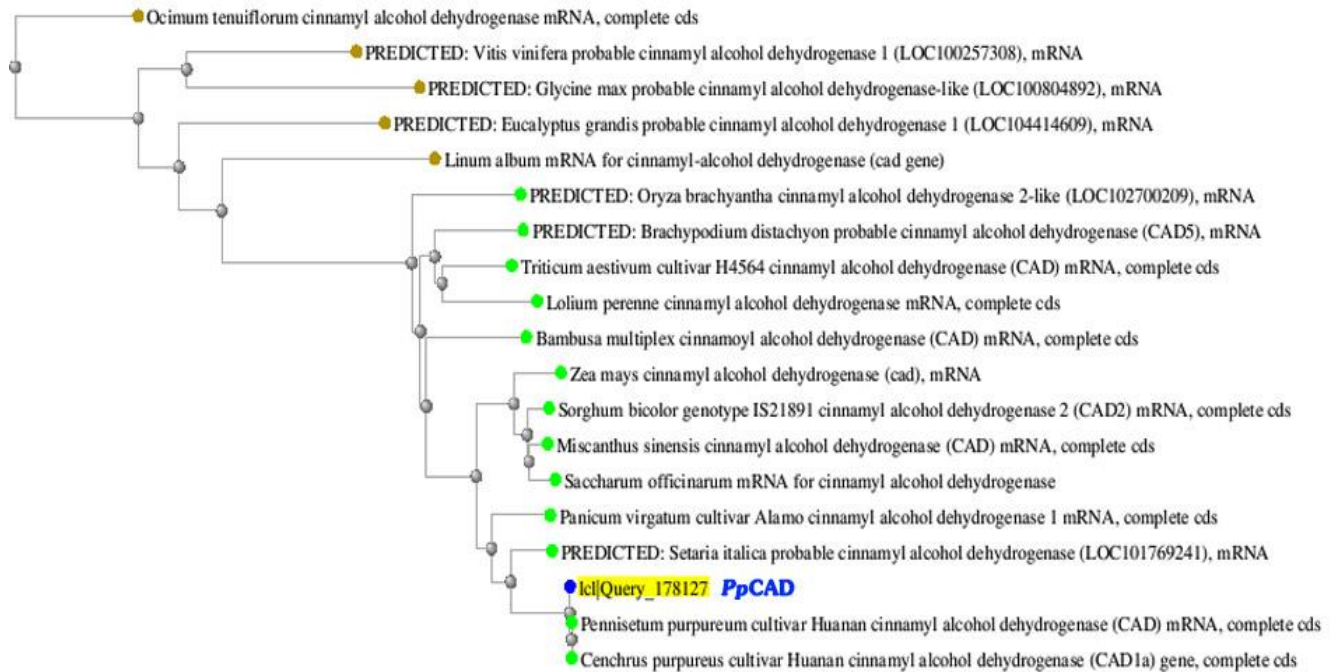
(LOC100835440), mRNA

Oryza sativa Japonica Group mRNA for caffeoyl-CoA 3-O- methyltransferase, complete cds, clone:12FPR057	713	713	97%	0.0	82%	AB110168.1
---	-----	-----	-----	-----	-----	------------

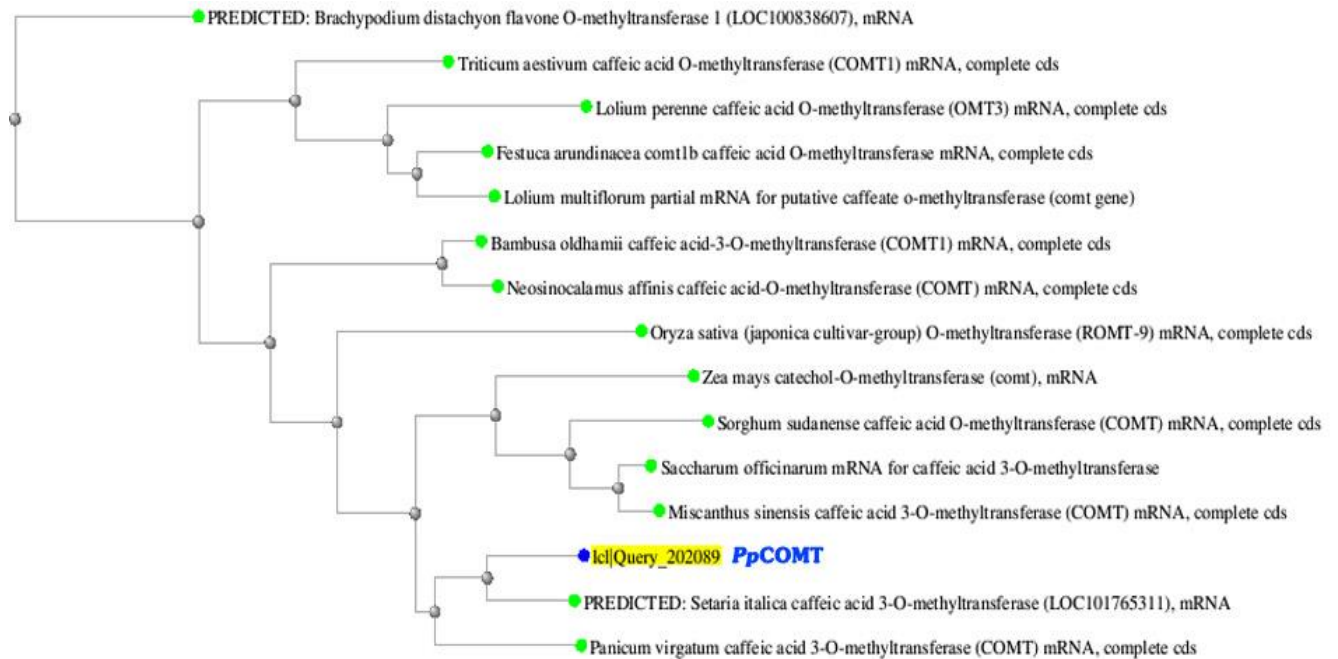
เมื่อนำข้อมูลยีน 4CL CAD COMT และ CCOMT จากหญาคิงเนเปียร์มาศึกษาความสัมพันธ์กับยีนชนิดเดียวกันในพืชชนิดต่างๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/treeView.cgi) พบว่า ยีน 4CL ที่โคลนได้จากหญาคิงเนเปียร์ (*Pennisetum purpureum*) มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับพืชในกลุ่มใบเลี้ยงเดี่ยว คือ หญา (*Cenchrus purpureus*) ข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italica*) และ หญา Switchgrass (*Panicum virgatum*) มากกว่าพืชในกลุ่มใบเลี้ยงคู่ ได้แก่ กล้วยป่า (*Musa acuminata*) ปาล์มน้ำมัน (*Elaeis guineensis*) และ อินทผลัม (*Phoenix dactylifera*) และกลุ่มพืชใบเลี้ยงคู่ ได้แก่ ยูคาลิปตัส (*Eucalyptus camaldulensis*) พืชสมุนไพร (*Salvia Miltiorrhiza*) และ งา (*Sesamum indicum*) เป็นต้น (ภาพที่ 10) ยีน CAD ที่โคลนได้มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับพืชในกลุ่มใบเลี้ยงเดี่ยว คือ หญาเนเปียร์ (*Pennisetum purpureum*) หญา (*Cenchrus purpureus*) และ ข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italica*) มากกว่าพืชในกลุ่มใบเลี้ยงคู่ ได้แก่ ยูคาลิปตัส (*Eucalyptus camaldulensis*) ถั่วเหลือง (*Glycine max*) และ องุ่น (*Vitis vinifera*) เป็นต้น (ภาพที่ 11) ยีน COMT ที่โคลนได้มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับพืชในกลุ่มใบเลี้ยงเดี่ยว คือ ข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italica*) และ หญา Switchgrass (*Panicum virgatum*) มากกว่าพืชในกลุ่มใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น หญา (*Brachypodium distachyon*) ข้าวสาลี (*Triticum aestivum*) และ หญา ryegrass (*Lolium perenne*) เป็นต้น (ภาพที่ 12) และยีน CCOMT ที่โคลนได้มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับพืชในกลุ่มใบเลี้ยงเดี่ยวคือ ข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italica*) และ หญา Switchgrass (*Panicum virgatum*) มากกว่าพืชในกลุ่มใบเลี้ยงเดี่ยว ได้แก่ ไม้ (*Neosinocalamus affinis*) ไม้หยกอินโด (*Bambusa oldhamii*) และ หญา (*Triarrhena lutarioriparia*) เป็นต้น (ภาพที่ 13)



ภาพที่ 10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างยีน *4CL* ที่โคลนได้จากหญ้าคิงเนเปียร์ (KN) เปรียบเทียบกับพืชชนิดต่างๆ โดยใช้โปรแกรม www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/treeView.cgi

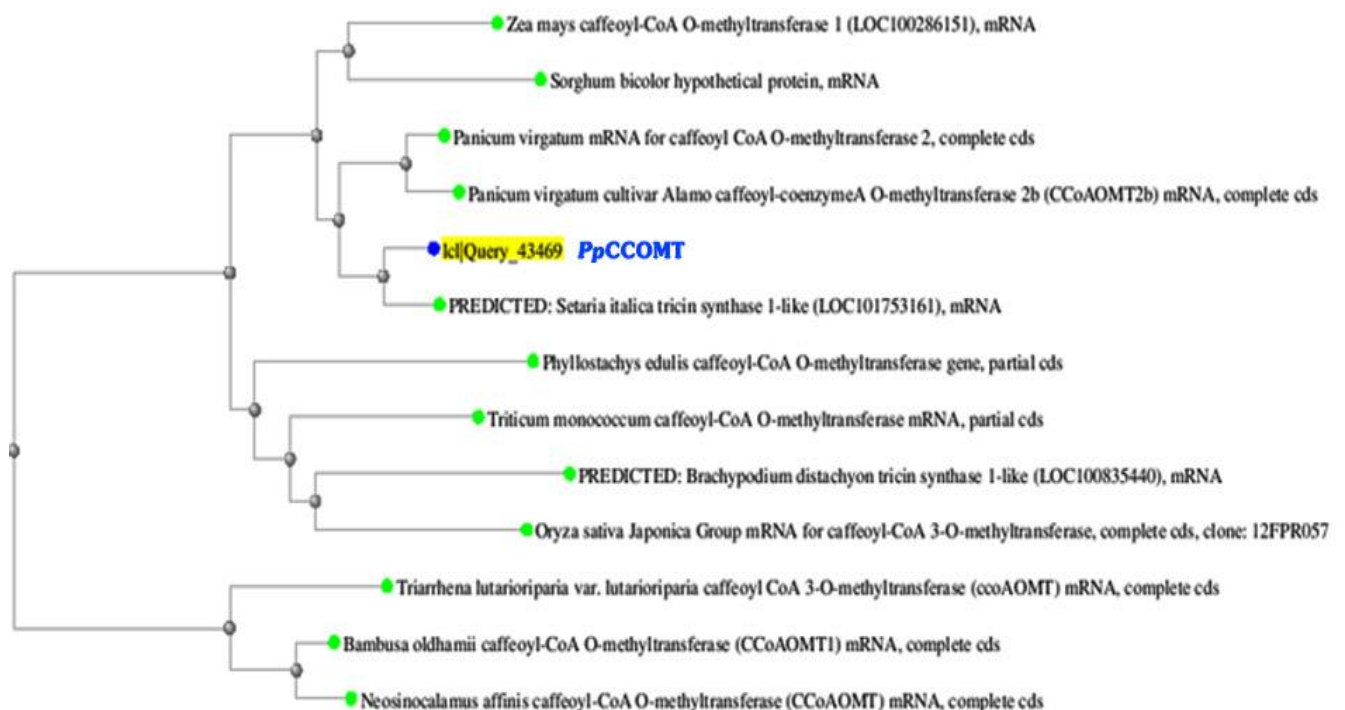


ภาพที่ 11 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างยีน *CAD* ที่โคลนได้จากหญ้าคิงเนเปียร์ (KN) เปรียบเทียบกับพืชชนิดต่างๆ โดยใช้โปรแกรม www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/treeView.cgi



ภาพที่ 12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างยีน *COMT* ที่โคลนได้จากหญ้าคิงเนเปียร์ (KN) เปรียบเทียบกับพืชชนิดต่างๆ

โดยใช้โปรแกรม www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/treeView.cgi



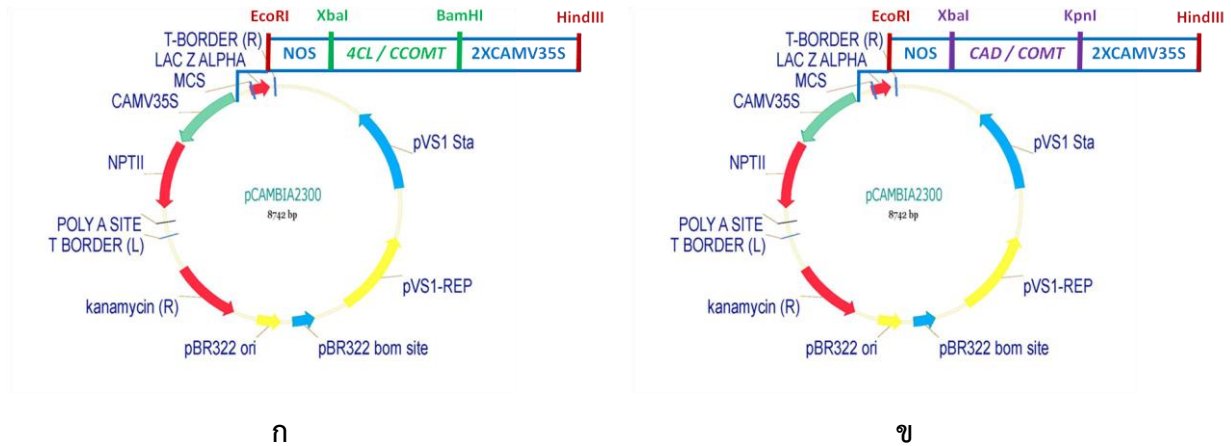
ภาพที่ 13 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างยีน *CCOMT* ที่โคลนได้จากจากหญ้าคิงเนเปียร์ (KN) เปรียบเทียบกับ

พืชชนิดต่างๆ โดยใช้โปรแกรม www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/treeView.cgi

3. การสร้างชุด cassette ยีน และการตรวจสอบการปรากฏของยีน 4CL CAD COMT และ CCOMT

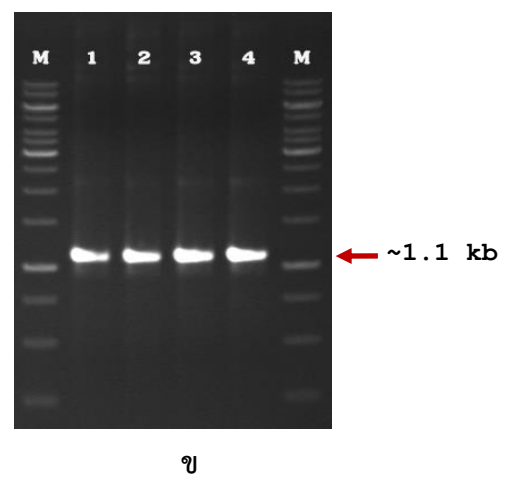
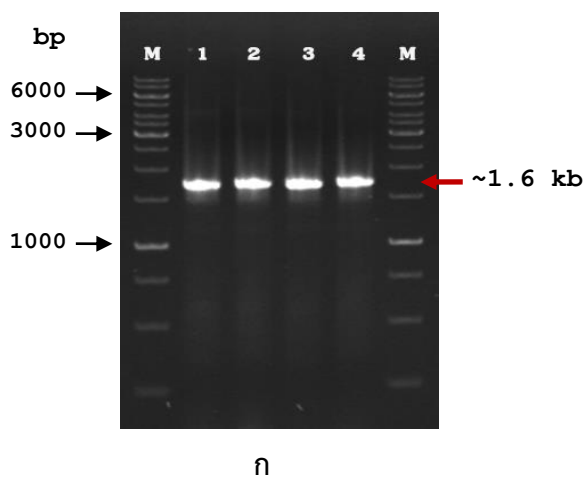
ใน Plant Expression Vector

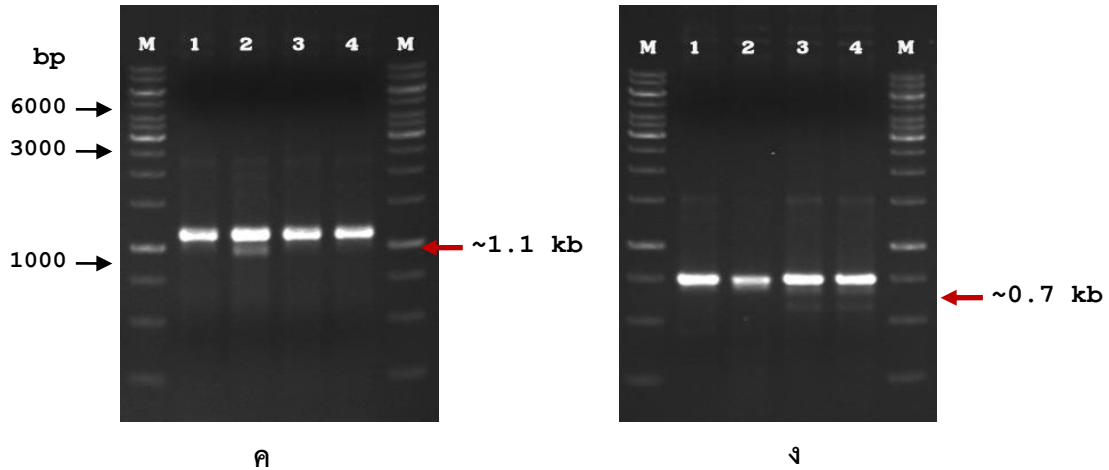
การเพิ่มปริมาณยีน 4CL CAD COMT และ CCOMT ในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน โดยการทำปฏิกิริยา PCR กับพลาสมิดดีเอ็นเอของหญ้าทั้ง 2 พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน 4CL คือ 4CLXbaI (forward) และ 4CLBamHI (reverse) ยีน CAD คือ CADKpnI (forward) และ CADXbaI (reverse) ยีน COMT คือ COMTKpnI (forward) และ COMTXbaI (reverse) และยีน CCOMT คือ CCOMTXbaI (forward) และ CCOMTBamHI (reverse) ซึ่งได้เติมตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ XbaI และ BamHI สำหรับตัดต่อยีน 4CL และ CCOMT และเอนไซม์ตัดจำเพาะ XbaI และ KpnI สำหรับตัดต่อยีน CAD และ COMT เข้าสู่เวกเตอร์ในรูปแบบ Antisense ได้ขึ้นยีนขนาด 1,659 1,101 1,083 และ 735 คู่เบส ตามลำดับ นำแต่ละยีนมาเชื่อมต่อเข้ากับ plant expression vector (pCAMBIA2300) ที่มีขนาด 9,640 คู่เบส โดยที่ pCAMBIA2300 ประกอบด้วย โปรโมเตอร์ (35SCaMV) และเทอร์มิเนเตอร์ (NOS) ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีน มียีน neomycin phosphotransferase (nptII) ควบคุมลักษณะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin เป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือก ซึ่งผ่านการทำ double digestion ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ XbaI + BamHI และ XbaI + KpnI (ภาพที่ 14ก และ 14ข) จากนั้นทำการเชื่อมต่อขึ้นยีน 4CL และ CCOMT เข้ากับ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) ในตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ XbaI + BamHI และเชื่อมต่อขึ้นยีน CAD และ COMT เข้ากับ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) ในตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ XbaI + KpnI ทำการถ่ายฝากชุด cassette ยีนทั้ง 4 ชุด เข้าสู่เซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ DH5 α โดยวิธี heat – shock และตรวจสอบการปรากฏของยีน 4CL CAD COMT และ CCOMT ที่อยู่ใน pCAMBIA2300 ซึ่งมี 2 วิธีด้วยกัน วิธีแรกคือ การตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse) พบว่า สามารถทำปฏิกิริยาได้แถบดีเอ็นเอของยีน 4CL CAD COMT และ CCOMT ขนาดประมาณ 1.6 1.1 1.1 และ 0.7 กิโลเบส ตามลำดับ (ภาพที่ 15ก 15ข 15ค และ 15ง) และวิธีที่สองคือ การตรวจสอบด้วยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ XbaI และ BamHI สำหรับตรวจสอบยีน 4CL และ CCOMT และการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ XbaI และ KpnI สำหรับตรวจสอบยีน CAD และ COMT พบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ถูกต้องจำนวน 2 แถบ ได้แก่ ขนาดประมาณ 1.6 1.1 1.1 และ 0.7 กิโลเบส ซึ่งเป็นขนาดของขึ้นยีน 4CL CAD COMT และ CCOMT และขนาดประมาณ 9 กิโลเบส ซึ่งเป็นขนาดของเวกเตอร์ pCAMBIA2300 ตามลำดับ (ภาพที่ 16ก 16ข 16ค และ 16ง) เมื่อนำพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมที่มีชิ้นส่วนของยีน 4CL CAD COMT และ CCOMT สอดแทรกอยู่ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดพบว่า ตำแหน่งในการเชื่อมต่อของยีนทั้ง 4 ยีน ที่อยู่ภายในเวกเตอร์ pCAMBIA2300 มีความถูกต้อง โดยโครงสร้างของพลาสมิดสายผสมที่มีความสมบูรณ์สามารถเชื่อมต่อขึ้นยีนเข้ากับ Plant Expression Vector ได้จำนวน 4 ชุด cassette ยีน คือ [1] pCAMBIA2300 – AntiPp4CL [2] pCAMBIA2300 – AntiPpCAD [3] pCAMBIA2300 – AntiPpCOMT และ [4] pCAMBIA2300 – AntiPpCCOMT โดยแต่ละชุด cassette จะมีขนาดประมาณ 11.3 10.7 10.7 และ 10.4 กิโลเบส ตามลำดับ (ภาพที่ 17ก 17ข 17ค และ 17ง)



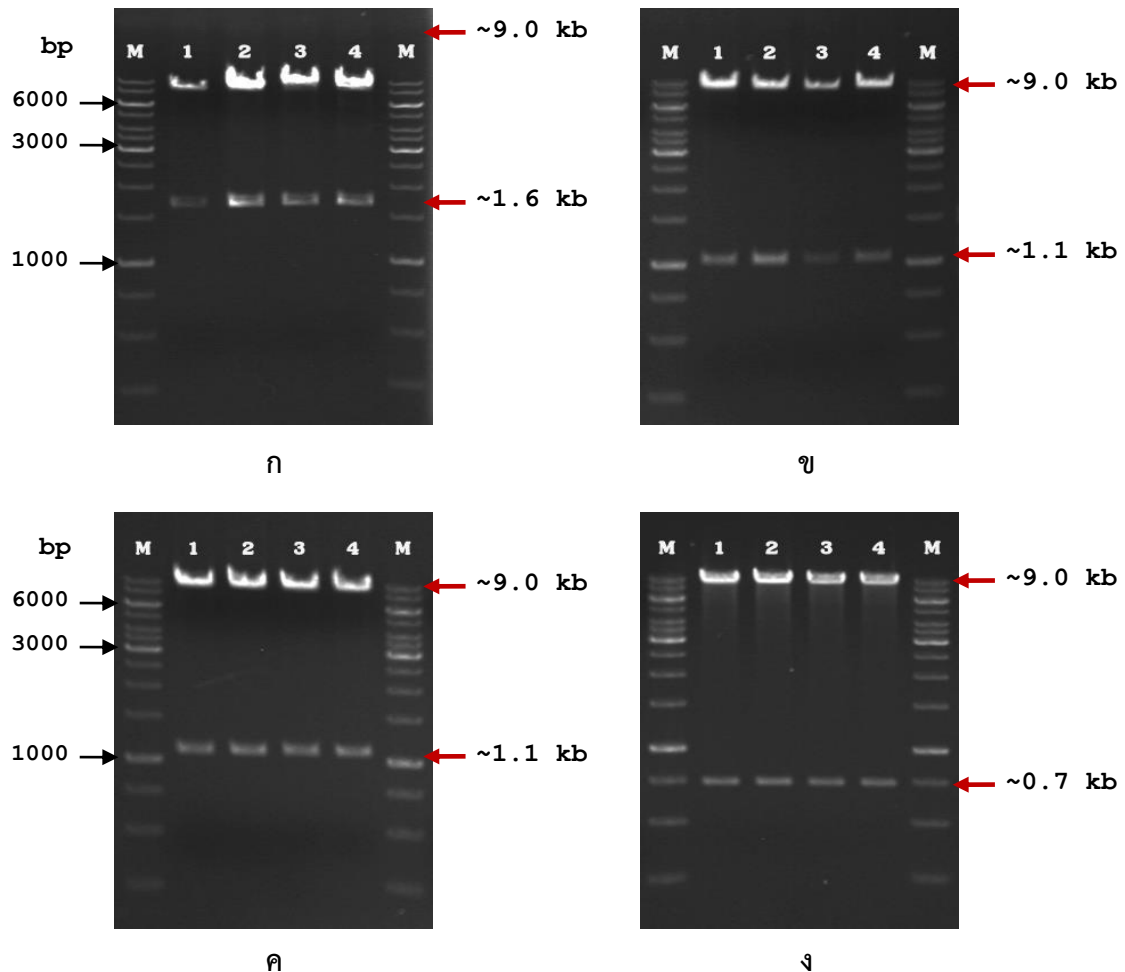
ภาพที่ 14 ก. แผนที่ของ Plant Expression Vector (pCambia2300) และตำแหน่งในการเชื่อมต่อชิ้นยีน *4CL* และ *CCOMT* ในรูปแบบ antisense

ข. แผนที่ของ Plant Expression Vector (pCambia2300) และตำแหน่งในการเชื่อมต่อชิ้นยีน *CAD* และ *COMT* ในรูปแบบ antisense



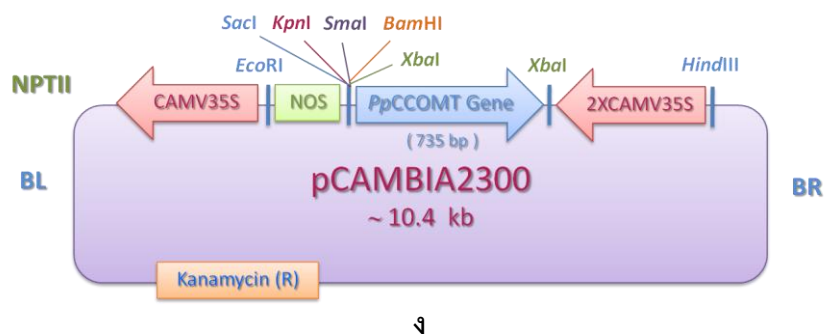
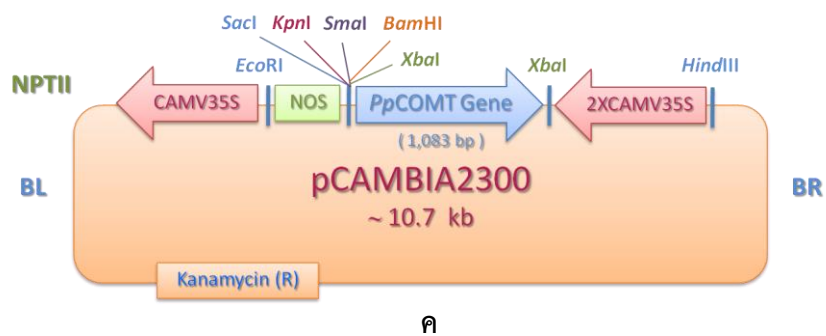
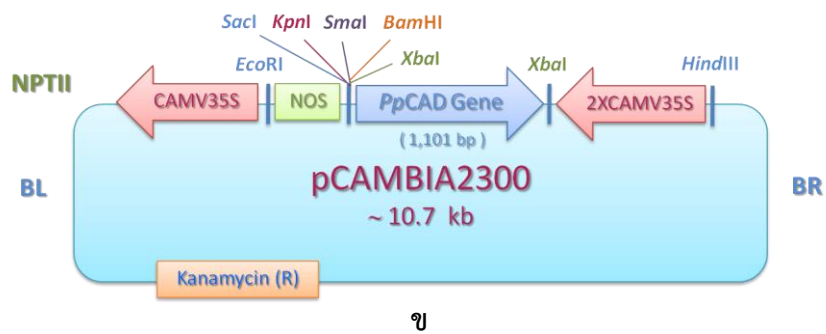
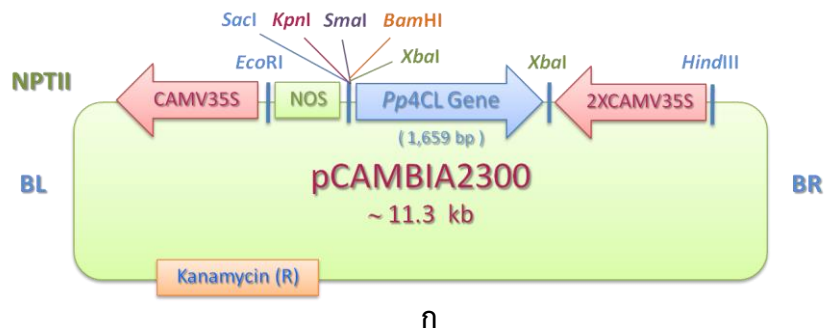


- ภาพที่ 15 ก. แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR กับพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pCAMBIA2300 – Anti*Pp4CL* โดยใช้ไพรเมอร์ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse), Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1–2 = แถบดีเอ็นเอของหญ้าน้ำคิงเนเปียร์ (KN), Lane 3–4 = แถบดีเอ็นเอของหญ้าน้ำคิงเนเปียร์ปากช่อง 1 (KP)
- ข. แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR กับพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pCAMBIA2300 – Anti*PpCAD* โดยใช้ไพรเมอร์ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse), Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1–2 = แถบดีเอ็นเอของหญ้าน้ำคิงเนเปียร์ (KN), Lane 3–4 = แถบดีเอ็นเอของหญ้าน้ำคิงเนเปียร์ปากช่อง 1 (KP)
- ค. แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR กับพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pCAMBIA2300 – Anti*PpCOMT* โดยใช้ไพรเมอร์ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse), Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1–2 = แถบดีเอ็นเอของหญ้าน้ำคิงเนเปียร์ (KN), Lane 3–4 = แถบดีเอ็นเอของหญ้าน้ำคิงเนเปียร์ปากช่อง 1 (KP)
- ง. แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR กับพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pCAMBIA2300 – Anti*PpCCOMT* โดยใช้ไพรเมอร์ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse), Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1–2 = แถบดีเอ็นเอของหญ้าน้ำคิงเนเปียร์ (KN), Lane 3–4 = แถบดีเอ็นเอของหญ้าน้ำคิงเนเปียร์ปากช่อง 1 (KP)



- ภาพที่ 16 ก. แสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pCambia2300 – AntiPp4CL ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Bam*HI, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1–2 = แถบดีเอ็นเอของหญ้าคิงเนเปียร์ (KN), Lane 3–4 = แถบดีเอ็นเอของหญ้าคิงเนเปียร์ปากช่อง1 (KP)
- ข. แสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pCambia2300 – AntiPpCAD ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1–2 = แถบดีเอ็นเอของหญ้าคิงเนเปียร์ (KN), Lane 3–4 = แถบดีเอ็นเอของหญ้าคิงเนเปียร์ปากช่อง1 (KP)
- ค. แสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pCambia2300 – AntiPpCOMT ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1–2 = แถบดีเอ็นเอของหญ้าคิงเนเปียร์ (KN), Lane 3–4 = แถบดีเอ็นเอของหญ้าคิงเนเปียร์ปากช่อง1 (KP)
- ง. แสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pCambia2300 – AntiPpCCOMT ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Bam*HI, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb

DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = แลบดีเอ็นเอของหญ้าคิงเนเปียร์ (KN), Lane 3-4 = แลบดีเอ็นเอของหญ้าคิงเนเปียร์ปากช่อง1 (KP)



ภาพที่ 17 แสดงโครงสร้างพลาสมิดสายผสมที่มีความสมบูรณ์

ก. pCambia2300 – AntiPp4CL

ข. pCambia2300 – AntiPpCAD

ค. pCambia2300 – AntiPpCOMT

ง. pCambia2300 – AntiPpCCOMT

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การโคลนยีน *4CL CAD COMT* และ *CCOMT* ในส่วนของยีนที่มีการแสดงออกจากอาร์เอ็นเอรวมของหญ้า 2 พันธุ์ ได้แก่ หญ้าคิงเนเปียร์ (KN) และ หญ้าคิงเนเปียร์ลูกผสมปากช่อง 1 (KP) ด้วยเทคนิค RT – PCR พบว่า ยีน *4CL* ที่สังเคราะห์ได้มีขนาด 1,659 คู่เบส ยีน *CAD* มีขนาด 1,101 คู่เบส ยีน *COMT* มีขนาด 1,083 คู่เบส และยีน *CCOMT* ที่สังเคราะห์ได้มีขนาด 735 คู่เบส เมื่อนำไปวิเคราะห์โครงสร้างของยีนด้วยโปรแกรม EMBL-EBI database บนอินเทอร์เน็ต พบว่า ยีนที่โคลนได้มีส่วนประกอบครบทั้งยีน และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปแปลรหัสเป็นโปรตีน พบว่า ยีน *4CL* สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนได้จำนวน 553 amino acid ยีน *CAD* มีลำดับกรดอะมิโน จำนวน 367 amino acid ยีน *COMT* มีลำดับกรดอะมิโน จำนวน 361 amino acid และ ยีน *CCOMT* สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนได้จำนวน 245 amino acid

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *4CL CAD COMT* และ *CCOMT* ไปเปรียบเทียบกับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ยีน *4CL* มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน 4-coumarate CoA ligase (*4CL*) ที่พบในหญ้า (*Cenchrus purpureus*) (JN980970.1) และข้าวฟ่างทางหมา (*Setaria italica*) (XM004951660.1) โดยมีค่าความเหมือน (% Max Identities) เท่ากับ 98% และ 95% ตามลำดับ ยีน *CAD* มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน cinnamyl alcohol dehydrogenase (*CAD*) ที่พบในหญ้าเนเปียร์ (*Pennisetum purpureum*) (HQ840705.1) และข้าวฟ่างทางหมา (*Setaria italica*) (XM004951572.1) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 99% และ 94% ตามลำดับ ยีน *COMT* มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน caffeic acid 3-O-methyltransferase (*COMT*) ที่พบในข้าวฟ่างทางหมา (*Setaria italica*) (XM004972743.1) และหญ้า Switchgrass (*Panicum virgatum*) (HQ645965.1) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 96% และ 93% ตามลำดับ และยีน *CCOMT* มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน Tricin syntase 1-like ที่พบในข้าวฟ่างทางหมา (*Setaria italica*) (XM004973751.2) และยีน caffeoyl CoA O-methyltransferase (*CCOMT*) ที่พบในหญ้า Switchgrass (*Panicum virgatum*) (AB723826.1) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 95% และ 91% ตามลำดับ

การสร้างชุด cassette ยีน ในรูปแบบ antisense โดยการเชื่อมต่อยีน *4CL CAD COMT* และ *CCOMT* เข้ากับ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ 35SCaMV และเทอร์มิเนเตอร์ NOS ได้พลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม จำนวน 4 ชุดยีน ได้แก่ [1] pCAMBIA2300 – AntiPp4CL [2] pCAMBIA2300 – AntiPpCAD [3] pCAMBIA2300 – AntiPpCOMT และ [4] pCAMBIA2300 – AntiPpCCOMT ซึ่งมีขนาดประมาณ 11.3 10.7 10.7 และ 10.4 กิโลเบส ตามลำดับ

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

การโคลนยีนที่ควบคุมการสร้างลิคินินในพืช ได้แก่ ยีน *4CL CAD COMT* และ *CCOMT* และการสร้างชุด cassette ยีน ในรูปแบบ antisense จำนวน 4 ชุดยีน ได้แก่ pCAMBIA2300 – AntiPp4CL pCAMBIA2300 –

AntiPpCAD pCAMBIA2300 – *AntiPpCOMT* และ pCAMBIA2300 – *AntiPpCCOMT* ซึ่งขณะนี้ได้มีการนำชุดยีนดังกล่าวไปถ่ายฝากเข้าสู่พืชชีวมวล ได้แก่ หญ้าคิงเนเปียร์ เพื่อศึกษาเทคนิคในการยับยั้งการแสดงออกของยีนสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีปริมาณลิกนินต่ำเหมาะสมกับการนำไปผลิตไบโอเอทานอลต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- จิตรัตน์ ศรีสุโขทัย. 2542. ผลกระทบที่เกิดขึ้นต่อชุมชนและสิ่งแวดล้อมจากการผลิตกระดาษสา. ในเอกสารประกอบการประชุมเชิงปฏิบัติการ. สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 57 น.
- อาภัสสรรา ชมิดท์. 2537. ชีวเคมี. ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร. 660 น.
- Avgerinos, G.C. and D.I.C. Wang. 1983. Selective delignification for fermentation of enhancement. *Biotechnol Bioeng*. 25: 67 – 83.
- Brett, C. and K. Waldron. 1996. Physiology and biochemistry of plant cell wall. London: Chapman & Hall.
- Campbell, M.M. and R.R. Sederoff. 1996. Variation in lignin content and composition (Mechanisms of control and implications for the genetic improvement of plants). *Plant Physiol*. 110(1): 3 – 13.
- Crawford, D.L. and R.L. Crawford. 1976. Microbial degradation of lignocellulose: the lignin component. *Appl Environ Microbiol*. 31(5): 714 – 717.
- Gold, M.H. and M. Alic. 1993. Molecular biology of the lignin degrading basidiomycete. *Phanerochaete chrysosporium*. *Micro biological Reviews*. 57: 605 – 622.
- Janshekar, H. and A. Fiechter. 1983. Lignin: biosynthesis, applications and biodegradation. In pentoses and lignin. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol*. 27: 119 – 178.
- Smita R. and N.D. Upendra. 2008. Manipulation of lignin in plants with special reference to O-methyltransferase. *Plant Science*. 174(3): 264 – 277.

Cenchrus purpureus cultivar Huanan 4-coumarate CoA ligase (4CL) mRNA, complete cds
Sequence ID: [gb|JN980970.1](#) Length: 1943 Number of Matches: 1

Range 1: 3 to 1664		GenBank	Graphics	▼ Next Match ▲ Previous Match	
Score	Expect	Identities		Gaps	Strand
2861 bits(3172)	0.0	1632/1662(98%)		3/1662(0%)	Plus/Plus
Query 1		ATGGGTTCCGTGGACGCGT		cgccggcgccggcggtgcccgtgcccgg---	cgccggAGGAG
Sbjct 3		ATGGGTTCCGTGGACGCGT		CGTGGCGCGGTGGTGGCGCGGTGCGCGGAGGAG	62
Query 58		AAGCCGGTGGTGTTCGGT		CGAAGCTTCCCGACATCGAGATCAACACAGCCAGTCTCTG	117
Sbjct 63		AAGCCGGTGGTGTTCGGT		CGAAGCTTCCCGACATCGAGATCAACACAGCCAGTCTCTG	122
Query 118		CAGGCCTACTGCTTCGGC		CGTATGAGCGAGGTGGCGCGCGCCCGTGCCTGATCGACGGG	177
Sbjct 123		CAGGCCTACTGCTTCGGC		CGTATGAGGTGGCGCGCGCCCGTGCCTGATCGACGGG	182
Query 178		CAGACGGGCGCGTCTAC		ACCTACGCGGAGGTGGAGTCCCTGACGCGCGCGCGCGCTCG	237
Sbjct 183		CAGACGGGCGCGTCTAC		ACCTACGCGGAGGTGGAGTCCCTGACGCGCGCGCGCGCTCG	242
Query 238		GGTCTCCGCGTATGGCG		TGGGGAAGGGGACGTGGTTCATGAACCTCCTCCGCAACTGC	297
Sbjct 243		GGTCTCCGCGTATGGCG		TGGGGAAGGGGACGTGGTTCATGAACCTCCTCCGCAACTGC	302
Query 298		CCCAGATTGCGCTTCTC		GTTCCTCGGCGCGCGCGGTGGGCGCGCGCCACCACTACGGCG	357
Sbjct 303		CCCAGATTGCGCTTCTC		GTTCCTCGGCGCGCGCGGTGGGCGCGCGCCACCACTACGGCG	362
Query 358		AACCCGTTCTACACCCG		CACGAGATCCACCGCCAGGCGGAGGCGGCGCGCGCGGCTC	417
Sbjct 363		AACCCGTTCTACACCCG		CACGAGATCCACCGCCAGGCGGAGGCGGCGGCGCGCGGCTC	422
Query 418		ATCGTCACCGAGGCTCG		CGCCGTGGAGAAGGTCCGCGGTTTCGCCCGGAGCGGGGCATC	477
Sbjct 423		ATCGTCACCGAGGCTCG		CGCCGTGGAGAAGGTCCGCGGTTTCGCCCGGAGCGGGGCATC	482
Query 298		CCCAGATTGCGCTTCTC		GTTCCTCGGCGCGCGCGGTGGGCGCGCGCCACCACTACGGCG	357
Sbjct 303		CCCAGATTGCGCTTCTC		GTTCCTCGGCGCGCGCGGTGGGCGCGCGCCACCACTACGGCG	362
Query 358		AACCCGTTCTACACCCG		CACGAGATCCACCGCCAGGCGGAGGCGGCGGCGCGCGGCTC	417
Sbjct 363		AACCCGTTCTACACCCG		CACGAGATCCACCGCCAGGCGGAGGCGGCGGCGCGCGGCTC	422
Query 418		ATCGTCACCGAGGCTCG		CGCCGTGGAGAAGGTCCGCGGTTTCGCCCGGAGCGGGGCATC	477
Sbjct 423		ATCGTCACCGAGGCTCG		CGCCGTGGAGAAGGTCCGCGGTTTCGCCCGGAGCGGGGCATC	482
Query 478		CCCGTCGTACCGTCGAC		GGCAGGTTTCGAGGGCTGCGCCGAGTTCGCCGAGGTGATCGCC	537
Sbjct 483		CCCGTCGTACCGTCGAC		GGCAGGTTTCGAGGGCTGCGCCGAGTTCGCCGAGGTGATCGCC	542
Query 538		GCAGAGGAGCTCGAGG		CCGACGAAGACGTCCACCCGACGACGTCTGTCGTGCTGCCCC	597
Sbjct 543		GCAGAGGAGCTCGAGG		CCGACGAAGACGTCCACCCGACGACGTCTGTCGTGCTGCCCC	602
Query 598		TCCTCGGGCACCAACGG		GCTCCCCAAGGGCGTCATGCTCACCACCGCAGCCTCATCACC	657
Sbjct 603		TCCTCGGGCACCAACGG		GCTCCCCAAGGGCGTCATGCTCACCACCGCAGCCTCATCACC	662
Query 658		AGCGTCGCGCAGCAGGT		TGACGGCGAGAACCAGAACCTGTACTTCAGCAAGGACGACGTG	717
Sbjct 663		AGCGTCGCGCAGCAGGT		TGACGGCGAGAACCAGAACCTGTACTTCAGCAAGGACGACGTG	722
Query 718		CTGCTGTGCGCTGCTG		CGCGCTGTTCCACATCTACTCGCTCAACTCGGTGCTGCTGGCGGT	777
Sbjct 723		CTGCTGTGCGCTGCTG		CGCGCTGTTCCACATCTACTCGCTCAACTCGGTGCTGCTGGCGGT	782
Query 778		CTCCGTGCGGGTTCGGC		CATCGTATGCGCAAGTTCGACCTGGGCGCGCTCGTCGAC	837
Sbjct 783		CTCCGTGCGGGTTCGGC		CATCGTATGCGCAAGTTCGACCTGGGCGCGCTCGTCGAC	842
Query 838		CTGGTGCGCCGCCACGG		CATCACCATCGCGCCCTTCGTccccccATCGTTCGTGAGATC	897
Sbjct 843		CTGGTGCGCCGCCACGG		CATCACCATCGCGCCCTTCGTGCCCCCATCGTTCGTGAGATC	902
Query 898		GCCAAGAGCCCGCGCT		CACCGCCGACGACCTCGCGTCCATCCGATGGTTCATGTCGGGC	957
Sbjct 903		GCCAAGAGCCCGCGCT		CACCGCCGACGACCTCGCGTCCATCCGATGGTTCATGTCGGGC	962
Query 958		GCCGCCCCCATGGGCA		AGGAGCTCCAGGACGCGTTCATGGCCAAGATCCCCAACGCCGTC	1017
Sbjct 963		GCCGCCCCCATGGGCA		AGGAGCTCCAGGACGCGTTCATGGCCAAGATCCCCAACGCCGTC	1022
Query 1018		CTCGGCCAGGGGTACGG		ATGACGGAGGCGGGCGCGGTGCTGGCGATGTGCTGGCGTTC	1077
Sbjct 1023		CTCGGCCAGGGGTACGG		ATGACGGAGGCGGGCGCGGTGCTGGCGATGTGCTGGCGTTC	1082
Query 1078		GCCAAGGAGCCGTTCC		AGGTGAAGTCCGGGTCGTGGGCACGGTGGTGGGAAACGCGAG	1137
Sbjct 1083		GCCAAGGAGCCGTTCC		AGGTGAAGTCCGGGTCGTGGGCACGGTGGTGGGAAACGCGAG	1142
Query 1138		CTCAAGATCGTCGACCC		GACACCGGCGCCGCTTCGGCCGGAACGAGCCCGGCGAGATA	1197
Sbjct 1143		CTCAAGATCGTCGACCC		GACACCGGCGCCGCTTCGGCCGGAACGAGCCCGGCGAGATC	1202
Query 1198		TGCAATCCGCGGGGAGC		AGATCATGAAAGGTTACCTGAACGACCCGAGTCGACGAAGAAC	1257
Sbjct 1203		TGCAATCCGCGGGGAGC		AGATCATGAAAGGTTACCTGAACGACCCGAGTCGACGAAGAAC	1262
Query 1258		ACCATCGACAAAGGACG		GGCTGSCACACCGGGGACATCGGCTACGTGGACGACGACGAC	1317
Sbjct 1263		ACCATCGACAAAGGACG		GGCTGSCACACCGGGGACATCGGCTACGTGGACGACGACGAC	1322
Query 1318		GAGATCTTCATCGTCG		ACAGGCTCAAGGAGATCATCAAGTACAAGGGCTTCCAGGTGCCG	1377
Sbjct 1323		GAGATCTTCATCGTCG		ACAGGCTCAAGGAGATCATCAAGTACAAGGGCTTCCAGGTGCCG	1382
Query 1378		CCGGCCGAGCTCGAGG		CGCTCCTCATCACGCAACCCGAGATCAAGGACGCCCGCTCGTC	1437
Sbjct 1383		CCGGCCGAGCTCGAGG		CGCTCCTCATCACGCAACCCGAGATCAAGGACGCCCGCTCGTC	1442
Query 1438		TCAGAGAAGGATGATCT		CGCCGGTGAATCCCGGTTCGCTTCATCGTGGGACGGAAGGG	1497
Sbjct 1443		TCAGAGAAGGATGATCT		CGCCGGTGAATCCCGGTTCGCTTCATCGTGGGACGGAAGGG	1502
Query 1498		TCTGAACCTCACTGAGG		ACGAGATCAAGCAATTGTTGCCAAGAGGTTGTGTTCTACAG	1557
Sbjct 1503		TCTGAACCTCACTGAGG		ACGAGATCAAGCAATTGTTGCCAAGAGGTTGTGTTCTACAG	1562
Query 1558		AAGATTACGAGGTTTTT		CTTACCCGAGTCCATCCCCAAGAACCTTCCGGCAAGATCTTA	1617
Sbjct 1563		AAGATTACGAGGTTTTT		CTTACCCGAGTCCATCCCCAAGAACCTTCCGGCAAGATCTTA	1622
Query 1618		CGGAAGGACTTGAGAG		CCAGGCTCGCGCTGGCGTCCACTGA	1659
Sbjct 1623		CGGAAGGATTGAGAG		CCAGGCTCGCGCTGGCGTCCACTGA	1664

ภาพผนวกที่ 2 การวิเคราะห์ alignment ระหว่างลำดับเบสของยีน CAD ของหญ้าเนเปียร์ที่ accession number HQ840705.1 กับ ลำดับเบสของยีน CAD ที่โคลนได้จากหญ้าคิงเนเปียร์ (KN)

Panicum virgatum caffeic acid 3-O-methyltransferase (COMT) mRNA, complete cds					
Sequence ID: gb HQ645965.1 Length: 1086 Number of Matches: 1					
Range 1: 1 to 1086 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match					
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1600 bits(1774)	0.0	1007/1086(93%)	3/1086(0%)	Plus/Plus	
Query 1	ATGGGTTTCGACCGCCGAGGACGTGGCCGCGGTCGCGGACGAGGAGGCGTGCATGTACGCG				60
Sbjct 1	ATGGGCTCCACCGCCACCGACGTGGCCGCGGCGCGGACGAGGAGGCGTGCATGTACGCG				60
Query 61	CTGCAGCTGGTGTCTGCTCCATCCTGCCGATGACGCTCAAGAACGCCATCGAGCTGGGC				120
Sbjct 61	CTGCAGCTGGCGTCTGCTCCATCCTGCCGATGACGCTCAAGAACGCCATCGAGCTGGGC				120
Query 121	CTGCTGGAGATTCTCCAGAAGGACCCCGCGGCGGCGTGTGCGCGGAGGAGGTGGTGGCG				180
Sbjct 121	CTGCTGGAGGTGCTCCAGAAGGACCCCGCGGCGGCGTGTGCGCGGAGGAGGTGGTGGCG				180
Query 181	CGGCTCCCCGTGGCGCGGACCAACCCGGACGCGGCGGTGATGGTGGACCGCATGCTCCGG				240
Sbjct 181	CAGCTGCCCCGTGGCGCGGCGCAACCCGGACGCGGCGGCGCATGGTTCGACCGCATGCTGCGC				240
Query 241	CTGCTCGCATCCTACGACGTCTGTCAGGTGCAAGATGGAGGA---CAAGGACGGCAAGTAC				297
Sbjct 241	CTGCTCGCCTCCTACGACGTCTGTCAGGTGCAAGATGGAGGAGGGCAAGGACGGCCGGTAC				300
Query 298	GAGCGCCGGTACTCCGCGCGCGGCTGTGCAAGTGGCTCGCACCCAACGAGGACGGCGTC				357
Sbjct 301	TCGCGCCGGTACGCTGCCGCGCGGCTGTGCAAGTGGCTCACCCCAACGAGGACGGCGTC				360
Query 358	TCCATGGCCGCGCTCGCGCTCATGAACCAGGACAAAGTCTCATGGAGAGCTGGTACTAC				417
Sbjct 361	TCCATGGCCGCGCTCGCGCTCATGAACCAGGACAAAGTCTCATGGAGAGCTGGTACTAC				420
Query 418	CTCAAGGACGCTGTGCTGGACGGCGGCATCCCGTTCAACAAGGCGTACGGCATGACGGCG				477
Sbjct 421	CTCAAGGACGCGGTGCTGGAGGGCGGCATCCCGTTCAACAAGGCGTACGGCATGACGGCG				480
Query 478	TTTCAGTACCACGGCACGGACCCACGCTTCAACCGCGTGTTCACGAGGGCATGAAGAAC				537
Sbjct 481	TTTCAGTACCACGGCACGGACCCGCGCTTCAACCGCGTGTTCACGAGGGCATGAAGAAC				540
Query 538	CACCTCGGTGATCATCACCAGAAGCTCTCGAGTTCTACAGGGGCTTCGACGGCGTCAGC				597
Sbjct 541	CACCTCGGTGATCATCACCAGAAGCTGCTCGAGTTCTACGCGGGCTTCGAGGGCGTCGGC				600
Query 598	ACCTCTCGTCGACGTGCGCGGCGGCATCGGCGCCACGCTCCACGCCATCACCTCGGCCAC				657
Sbjct 601	ACCTTGGTCGACGTGCGCGGCGGCGTTCGCGGCCACCTGCACGCCATCACCTCCGCTAC				660
Query 658	CCGACATCAAGGGCGTCAACTTCGACCTCCCCACGTGATCTCCGAGGCGCGCCGTTTC				717
Sbjct 661	CCCGGCATCAGGGGGTCAACTTCGACCTGCCACGTGATCTCCGAGGCGCGCCGTTTC				720
Query 718	CCCGGCGTGCAGCACGTGCGCGGCGACATGTTCAAGTCCGTCCCCGCGGCGACGCCATC				777
Sbjct 721	CCCGGCGTGGAGCACGTGCGCGGCGGACATGTTCAAGGCCGTGCCCGCGGCGACGCCATC				780
Query 778	CTCATGAAGTGGATCCTCCACGACTGGAGCGACGCCACTGCGCGACGATCCTCAAGAAC				837
Sbjct 781	CTCATGAAGTGGATCCTCCACGACTGGAGCGACGCCACTGCGCGGCGATCCTCAAGAAC				840
Query 838	TGCTACGACGCGCTGCCGCCAACGGCAAGGTGATCATCGTCGAGTGCCTGCTGCCGGTG				897
Sbjct 841	TGCTACGACGCGCTCCCCGCCGCGGCAAGGTGATCGCCGTGAGTGCATCCTGCCGGTG				900
Query 898	AACCCGGAGGCGACACCCAAGGCGCAGGGCGTGTTCACGTCGACATGATCATGCTCGCC				957
Sbjct 901	AACCCGGAGGCGACGCCCAAGGCGCAGGGCGTCTTCCACGTCGACATGATCATGCTCGCG				960
Query 958	CACAACCCCGGCGGCAAGGAGAGGTACGAGAGGGAGTTTCAGGAGCTCGCCAAGGGAGCG				1017
Sbjct 961	CACAACCCCGGCGGCAAGGAGCGCTACGAGAGGGAGTTTCAGGAGCTCGCCAAGGGCGCC				1020
Query 1018	GGCTTCACCGGGTTCAAGGCCACCTACATCTACGCCAACGCATGGGCCATCGAGTTCACC				1077
Sbjct 1021	GGCTTCACCGGGTTCAAGGCCACCTACATCTACGCCAACGCATGGGCCATCGAGTTCACC				1080
Query 1078	AAGTAG	1083			
Sbjct 1081	AAGTAG	1086			

ภาพผนวกที่ 3 การวิเคราะห์ alignment ระหว่างลำดับเบสของยีน *COMT* ของหญ้า Switchgrass ที่ accession number HQ645965.1 กับ ลำดับเบสของยีน *COMT* ที่โคลนได้จากหญ้าคิงเนเปียร์ (KN)

Panicum virgatum mRNA for caffeoyl CoA O-methyltransferase 2, complete cds

Sequence ID: [dbj|AB723826.1](#) Length: 1010 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1054 bits(1168)	0.0()	678/741 (91%)	6/741 (0%)	Plus/Plus	
Features:					
<u>Query</u> 1	ATGACGACCGGCGGCG-----TTGCCAACGTCCACCAAGGCCTCGACAGCAGCAACAAG	54			
<u>Sbjct</u> 21	ATGGCGGCGGCGGCGACACCATGCCCCGGGTCCACACCGGCATCGACAGCAGCAACAAG	80			
<u>Query</u> 55	ACCCTGCTCAAGAGCGAGGCCCTGTACAAGTACGTGCTGGACACGTCGGTGCTGCCGCAC	114			
<u>Sbjct</u> 81	ACGCTGCTCAAGAGCGAGGCCCTCTACAAGTACGTGCTGGACACGTCGGTGCTGCCGCAC	140			
<u>Query</u> 115	GAGCCGGAGTGCATGCGCGAGCTGCGGCTGGTGACGGACAAGCACAGTGGGGGTTTCATG	174			
<u>Sbjct</u> 141	GAGCCGGAGTGCATGCGTGAGCTGCGGCTGGTGACGGACAAGCACAGTGGGGGTTTCATG	200			
<u>Query</u> 175	CAGTCGTCCCGGACGAGGCGCAGCTGCTCCGGATGCTCATCAAGCTGACGGGCGCGCGC	234			
<u>Sbjct</u> 201	CAGTCGTCCCGGACGAGGCGCAGCTGCTGCGGATGCTCATCAAGCTGACGGGCGCGCGC	260			
<u>Query</u> 235	AACACGCTGGAGGTGGGCGTGTTACGGGCTACTCCCTCCTGGCCACCGCCCTCGCCCTC	294			
<u>Sbjct</u> 261	AACACGCTGGAGGTGGGCGTGTTACGGGCTACTCTCTCCTCGCCACCGCGCTCGCGCTC	320			
<u>Query</u> 295	CCCGACGACGGCAAGGTGATCGCCATCGACGTCGACCGCGAGTACTACGAGATCGGCCGC	354			
<u>Sbjct</u> 321	CCCGAGGACGGCCGGGTGATCGCCGTGACGCTGGACCGCGACTACTACGAGATCGGCCGG	380			
<u>Query</u> 355	CCGTTTCATCGAGAAGGCCGGGTCGCGCACAAGGTGGACTTCCGCGAGGGCCCCGCGCTG	414			
<u>Sbjct</u> 381	CCCTTCATCGAGAAGGCCGGGTCGCGCACAAGGTGGACTTCCGCGAGGGCCCCGCGCTG	440			
<u>Query</u> 415	GACCACCTCGACGCGCTCCTCGCCGACGAGGCCAACGTCGGCGCGTTTCGACTTCGCCTTC	474			
<u>Sbjct</u> 441	GACCACCTGGACGCGCTCCTCGCCGACGAGCGAACCTGGGCGCCTTCGACTTCGCCTTC	500			
<u>Query</u> 475	GTCGACGCCGACAAGCCCCAACTACGTCAAGTACCACGAGCAGCTTCTCCGGCTGGTGAAG	534			
<u>Sbjct</u> 501	GTCGACGCCGACAAGCCCCAACTACGTGCGCTACCACGAGCAGCTGCTCCGCCTGGTGCGC	560			
<u>Query</u> 535	GTCGGGGGAACCATCGTGACACAACGCTGTGGGCGGGCACCGTGGCGATGCCGCC	594			
<u>Sbjct</u> 561	GTGGGGGACCATCGTGACACAACGCTGTGGGCGGGCACCGTGGCGCTGCCCCG	620			
<u>Query</u> 595	GACACCCCATGTCCGACCTCGACCGCAGGTTCTCCGCCGCCATCAGGGACCTCAACGTC	654			
<u>Sbjct</u> 621	GACACGCCGCTCTCCGACCTCGACCGCGCTTCTCCGCCGCCATCAGGGACCTCAACGCC	680			
<u>Query</u> 655	CGACTCTCCGCCGACGACCGGTCGAGGTCTGCCAGCTCGCCATCGCCGACGGCGTCACC	714			
<u>Sbjct</u> 681	CGCCTCTCCGCCGACGAGCGGTCGAGGTCTGCCAGCTCGCCATCGCCGACGGCGTCACC	740			
<u>Query</u> 715	ATCTGCCGCCGCGCTCGTCTGA	735			
<u>Sbjct</u> 741	ATCTGCCGCCGCGCTCGTCTGA	761			

ภาพผนวกที่ 4 การวิเคราะห์ alignment ระหว่างลำดับเบสของยีน *CCOMT* ของหญ้า Switchgrass ที่ accession number AB723826.1 กับลำดับเบสของยีน *CCOMT* ที่โคลนได้จากหญ้าคิงเนเปียร์ (KN)