แบบรายงานเรื่องเต็ม ผลการวิจัยที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2560

1. **แผนงานวิจัย** แผนงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

2. **โครงการวิจัย** การค้นหาและศึกษาหน้าที่ของยีนเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่

   ชื่อกิจกรรมที่ 2 การโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของยีนในสิ่งมีชีวิตต้นแบบ

3. **ชื่อการทดลอง 2.1 (ภาษาไทย)** การโคลนยีนและการแสดงออกของยีน *N-acetylglutamate synthase* เพื่อให้ทนต่อสภาวะขาดน้ำในพืชต้นแบบ

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) Gene Cloning and Gene Expression of *N-acetylglutamate synthase* for Drought Stress in Model Plant

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวสุภาวดี ง้อเหรียญ	**สังกัด**	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	นางสาวภรณี สว่างศรี	**สังกัด**	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางสาวภุมรินทร์ วณิชชนานันท์	**สังกัด**	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางสาวอัจฉราพรรณ ใจเจริญ	**สังกัด**	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นายสมชาย หลวงสนาม	**สังกัด**	มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

Abstract

N-acetylglutamate synthase (*NAGS*) genes is a major enzyme in ornithine, arginine and proline biosynthesis. Ornithine and arginine are important amino acid in urea cycle that involved the process of removing excess ammonia from the cells. Proline acts as an osmolite preventing against protein degradation and maintaining cell structure. These enzymes play a critical role in regulating plant responses in order to survive under abiotic stress conditions such as drought and high salinity. In this study, a full-length genomic DNA sequences of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) encoding *N-acetylglutamate synthase* (*NAGS*) have been isolated from tree tomato variety names cherry, tho and seeda via PCR – based method. The gene sequence contains a fragment of 9,345 bp, including with 10 exons, a 1,812 bp complete ORF, plus a TATA signal (TATTTATT) and a polyA signal AATAAA motif. *SINAGS* gene encoding the 604 amino acid polypeptide. The highly conserved region of the gene is probable amino-acid acetyltransferase NAGS1 which are also found in dicots *Solanum lycopersicum* (L.) (FJ543466.1) and *Solanum tuberosum* (L.) (XM_006350559.2) with 99% and 98% of homology respectively. A 1,812 bp fragment of the *SINAGS* gene was amplified by RT – PCR method with the addition of *Bam*HI and *Kpn*I restriction sites for protein translation purpose and then inserted into plant expression vector pCAMBIA2300 containing 35SCaMV promoter and NOS terminator, *npt*II as selectable marker with total size of 11.5 kb for pCAMBIA2300 – *SINAGS* over – expression cassette.

บทคัดย่อ

การโคลนยีน *N-acetylglutamate synthase* (*NAGS*) ที่ทนต่อสภาวะขาดน้ำในมะเขือเทศ มีวัตถุประสงค์เพื่อโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการทนต่อสภาวะขาดน้ำในพืช สำหรับนำไปใช้ในการพัฒนาพันธุ์พืชให้มีศักยภาพในการให้ผลผลิตและสามารถทนต่อสภาวะขาดน้ำในพืชได้ โดยยีน *NAGS* เป็นเอนไซม์หลักในกระบวนการสังเคราะห์สารออร์นิทีน (ornithine) อาร์จินีน (arginine) และโพรลีน (proline) ซึ่ง ornithine และ arginine เป็นสารสำคัญในวัฏจักรยูเรีย (urea cycle) เกี่ยวข้องกับกระบวนการกำจัดแอมโมเนียส่วนเกินออกจากเซลล์ ส่วน proline ทำหน้าที่เป็นสารออสโมไลท์ช่วยป้องกันการเสียสภาพของโปรตีน และโครงสร้างของเซลล์ ทำให้พืชสามารถอยู่รอดได้ภายใต้สภาวะเครียดอันเนื่องจากสภาวะขาดน้ำ งานวิจัยนี้ได้ทำการโคลนยีน *NAGS* จากมะเขือเทศ โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ในบริเวณที่มีความเหมือนของลำดับพันธุกรรมอย่างสูง (conserved region) จากยีน NAGS ในพืชชนิดต่างๆ ที่ค้นหาได้จากฐานข้อมูล NCBI นำไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มาทำปฏิกิริยา PCR กับจีโนมิกดีเอ็นเอของมะเขือเทศ 3 พันธุ์ ได้แก่ เชอรี่ ท้อ และสีดา ได้ยีนขนาด 9,345 คู่เบส เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์โครงสร้างของยีนโดยใช้โปรแกรม Software GenScan Version 1.0 พบว่า ยีน NAGS ที่ได้มีส่วนประกอบครบทั้งยีน ซึ่งประกอบด้วย ลำดับเบสในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน Open Reading Frame (ORF) จำนวน 10 exon, ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง TATA signal (TATAAA) อยู่ในส่วนของ 5′UTR ระหว่างตำแหน่งของลำดับเบสที่ 112–117, ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง PolyA signal (AATAAA) อยู่ในส่วนของ 3′UTR ระหว่างตำแหน่งของลำดับเบสที่ 9111–9116 จากนั้นทำการโคลนยีนในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน โดยการทำปฏิกิริยา RT–PCR กับอาร์เอ็นเอรวมของมะเขือเทศทั้ง 3 พันธุ์ ร่วมกับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน ซึ่งได้เติมตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I เพื่อบังคับทิศทางของการแปลรหัส สามารถโคลนยีน *NAGS* มีขนาดเท่ากับ 1,812 คู่เบส และถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนของยีน *NAGS* ได้เท่ากับ 604 amino acids เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ยีน *N-acetylglutamate synthase* (*NAGS*) ที่โคลนได้จากมะเขือเทศมีความเหมือนอย่างสูงกับยีน *NAGS* ที่พบในมะเขือเทศ (*Solanum lycopersicum*) (FJ543466.1) และ มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) (XM_006350559.2) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 99% และ 98% ตามลำดับ จากนั้นทำการสร้างชุด cassette ยีน โดยการเชื่อมต่อชิ้นยีน *SINAGS* เข้ากับ plant expression vector (pCAMBIA2300) ที่ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ (35SCaMV) และเทอร์มิเนเตอร์ (NOS) ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีน มียีน NPTII เป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือก ได้พลาสมิดสายผสม pCAMBIA2300 – *SINAGS* มีขนาดประมาณ 11.5 กิโลเบส สามารถนำชุดยีนดังกล่าวไปศึกษาการแสดงออกของยีนโดยการถ่ายฝากยีนเข้าสู่พืชต้นแบบ เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับนำไปพัฒนาพันธุ์พืชเศรษฐกิจที่สนใจ เช่น ข้าวโพด ถั่วเหลือง อ้อย ฯลฯ เพื่อเพิ่มศักยภาพการทนต่อสภาวะขาดน้ำต่อไปในอนาคต

คำนำ

สภาวะเครียด (abiotic stress) ได้แก่ สภาวะแห้งแล้ง ดินเค็ม อุณหภูมิต่ำทำให้อากาศหนาวเย็นหรืออุณหภูมิสูงทำให้อากาศร้อน ที่เกิดจากภาวะภูมิอากาศเปลี่ยนแปลง (Climate Change) หรือ ภาวะโลกร้อน (Global Warming) ซึ่งปัจจุบันมีความรุนแรงมากยิ่งขึ้น และเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อการดำรงอยู่ของสิ่งมีชีวิตทั้งคน สัตว์ และพืช ทำให้ไม่สามารถคาดการณ์ปริมาณน้ำฝนที่ตกในแต่ละปีได้ อาจเกิดสภาวะน้ำท่วมฉับพลัน หรือเกิดความแห้งแล้งอย่างรุนแรง ส่งผลกระทบต่อผลผลิตทางการเกษตรอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ การปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้ทนต่อสภาวะเครียดต่างๆ โดยอาศัยวิธีการแบบปกติ (conventional breeding) ที่ผ่านมาไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร และต้องอาศัยระยะเวลานานในการคัดเลือกพืชที่มีลักษณะตรงตามต้องการ ปัจจุบันนักวิจัยได้พยายามหาแนวทางการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยอาศัยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วยในการพัฒนาพันธุ์พืชกันมากขึ้นทั้งในประเทศ และต่างประเทศ ซึ่งเป็นการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการค้นหายีน การศึกษาหน้าที่และกลไกการทำงานของยีนหรือกลุ่มยีน และการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะเครียด โดยการนำยีนและข้อมูลยีนที่ได้มาใช้ในการพัฒนาพันธุ์พืชเพื่อให้ทนต่อสภาวะเครียด ซึ่งนับว่าเป็นพืชทางเลือกหนึ่งในการช่วยลดปัญหาอันเกิดจากภาวะโลกร้อน อีกทั้งยังเป็นการช่วยเร่งรัดกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชอีกทางหนึ่งด้วย

N-acetylglutamate synthase (*NAGS*) เป็นเอนไซม์หลักในกระบวนการสังเคราะห์สารออร์นิทีน (ornithine) อาร์จินีน (arginine) และโพรลีน (proline) พบได้ทั้งในเซลล์โปรคารีโอต (prokaryotes) และยูคารีโอต (eukaryotes) โดยเป็นเอนไซม์ที่ช่วยกระตุ้นในปฏิกิริยาการผลิตสาร *N*-acetylglutamate (NAG) จาก glutamate และ acetyl-CoA (Meijer *et al*., 1985) ซึ่ง ornithine และ arginine เป็นสารที่มีความสำคัญในวัฏจักรยูเรีย (urea cycle) ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการกำจัดแอมโมเนีย (McCudden and Powers-Lee, 1996; Caldovic *et al*., 2004) และพบว่าเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะเครียดจะทำให้มีปริมาณแอมโมเนียในเซลล์สูง จึงจำเป็นต้องมีการกำจัดแอมโมเนีย โดยการสังเคราะห์ arginine ให้เป็นยูเรีย และขับออกนอกเซลล์ ในส่วนของ proline เป็นกรดอะมิโนที่ได้จากวัฏจักรการสังเคราะห์ proline โดยมี ornithine เป็นสารตั้งต้น ซึ่ง proline เป็นสารประกอบไนโตรเจนทำหน้าที่เป็นสารออสโมไลท์ช่วยป้องกันการเสียสภาพของโปรตีน และโครงสร้างของเซลล์ (Slocum, 2005) L-arginine มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเจริญเติบโต และการงอกของเมล็ด รวมทั้งการขนส่งสารอาหารผ่านท่อลำเลียงต่างๆ ซึ่งสารชนิดนี้จะพบมากในพืชที่อยู่ในสภาวะเครียด โดย ornithine และ citrulline ทำหน้าที่เป็นสารตัวกลางในกระบวนการสังเคราะห์ arginine สำหรับในพืช ornithine เป็นสารที่มีความจำเป็นในกระบวนการสังเคราะห์ polyamines และ alkaloids (Shargool *et al*., 1988) ส่วน citrulline เป็นหนึ่งในกรดอะมิโนอิสระที่มีความสำคัญ พบสะสมในใบของแตงโมที่อยู่ในสภาวะขาดน้ำ กรดอะมิโนชนิดนี้จะช่วยให้พืชสามารถทนต่อสภาวะเครียดเนื่องจากการขาดน้ำอย่างรุนแรงได้ (Akashi *et al*., 2001; Yokota *et al*., 2002) ในปัจจุบันเราสามารถทราบลำดับเบส expressed sequence tags (ESTs) ของ NAGS จากพืชหลายชนิด เช่น ข้าวโพด ข้าวถั่วเหลือง และมะเขือเทศ (Slocum, 2005) สำหรับยีน *SlNAGS1* ที่แยกได้จากมะเขือเทศ (tomato) นับเป็นยีนที่แยกได้จากพืชเป็นครั้งแรก และทำการถ่ายฝากยีน *NAGS* ในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน open reading frame

(ORF) เข้าสู่ *Arabidopsis thaliana* ซึ่งอยู่ภายใต้การควบคุมของ CaMV35S promoter โดยใช้เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* ในการนำยีน *SINAGS1* เข้าสู่เซลล์พืช ส่งผลทำให้พืชที่ได้รับการถ่ายยีนนี้มีความสามารถการทนต่อสภาวะเครียด เช่น สภาวะความเค็มสูง และสภาวะขาดน้ำได้ดี โดยพบว่ายีน *SINAGS1* มีการแสดงออกระดับสูงในอวัยวะส่วนที่อยู่เหนือพื้นดิน ส่วนในเมล็ดมีการแสดงออกในระดับปกติ แต่ไม่พบในส่วนของราก นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของยีนในผลมะเขือเทศระยะที่ผลมีสีแดง และในสภาวะความเข้มข้นของออกซิเจนต่ำพบว่า มีการแสดงออกของยีน *SINAGS1* เพิ่มขึ้นในระยะที่ผลของมะเขือเทศมีสีเขียวและเจริญเติบโตเต็มที่ ซึ่งสามารถตรวจพบได้ตั้งแต่ชั่วโมงแรกที่มะเขือเทศอยู่ในสภาวะดังกล่าว สำหรับพืชที่ได้รับการถ่ายยีน *SINAGS1* จะพบการสะสมของ ornithine ระดับสูงในส่วนของใบ เมื่อเปรียบเทียบกับพืชป่า (WT) และการทดสอบความสามารถในการงอกของเมล็ดเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือ (NaCl) 250 mM พบว่าความสามารถในการงอกของเมล็ดสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับพืชป่า โดยพืชที่เจริญเติบโตเต็มที่จะสามารถทนต่อสภาวะเครียด (สภาวะดินเค็มสูง และสภาวะขาดน้ำ) ได้ดีกว่าพืชป่า (Kalamaki *et al*., 2009)

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงได้นำเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วยในการโคลนยีน และศึกษาการแสดงออกของยีนเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะขาดน้ำ หากสามารถโคลนยีน *NAGS* ได้ และยีนที่ได้มีการแสดงออกในลักษณะทนทานต่อสภาวะขาดน้ำในพืชต้นแบบ จะเป็นข้อมูลสำคัญที่จะนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชเศรษฐกิจเพื่อให้ทนทานต่อสภาวะขาดน้ำได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. มะเขือเทศพันธุ์ เชอรี่, ท้อ และ สีดา
2. ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน *N-acetylglutamate synthase* (*NAGS*) คือ GNAGS (forward) และ GNAGS (reverse) ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนในส่วนที่มีการแสดงออกของยีนคือ CNAGS (forward) CNAGS (reverse) NAGSBamHI (forward) และ NAGSKpnI (reverse) ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการเชื่อมต่อของชิ้นยีน *SINAGS* 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 phosphortransferase (nptII) ซึ่งควบคุมลักษณะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin เป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือก (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.ศรีเมฆ ชาวโพงพาง, ม. เกษตรศาสตร์)
4. อุปกรณ์ในการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ โกร่ง เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบสูงแบบควบคุมอุณหภูมิต่ำได้ (Refrigerated Centrifuge) หลอดใส่ตัวอย่างขนาดต่างๆ และอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath)
5. เครื่องมือที่ใช้สำหรับวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) PERKIN ELMER รุ่น MBA 2000

6. เครื่องมือที่ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Polymerase Chain Reaction) GeneAmp® PCR System 9700 ของ Applied Biosystems

7. เครื่องมือที่ใช้สำหรับถ่ายภาพและวิเคราะห์สารพันธุกรรม (Gel Documentation) BIORAD รุ่น Gel Doc 2000 พร้อมเครื่องพิมพ์

8. เครื่องมือที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI Prism 310® DNA Sequencer

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

10. สารเคมีที่ใช้ในการทำ Electrophoresis และ Molecular Weight Marker

11. สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง HotStart Taq Master Mix Kit ของ QIAGEN

12. สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา RT – PCR SuperScript™ III One-Step RT – PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase Kit ของ Invitrogen

13. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit ของ QIAGEN

14. สารเคมีที่ใช้ในการโคลนยีน TOPO® XL PCR Cloning Kit และ TA Cloning Kits® ของ Invitrogen

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

16. เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน (Competent Cells) *Escherichia coli* สายพันธุ์ TOP10 และ DH5α

17. สารเคมีสำหรับใช้กับเครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI Prism 310® DNA Sequencer

18. 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 CromasPro version 1.33 จากเว็บไซต์ http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่างพืช

ทำการปลูกมะเขือเทศ จำนวน 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์เชอรี่, พันธุ์ท้อ และพันธุ์สีดา (บริษัทเจียไต๋) โดยนำเมล็ดพันธุ์มาปลูกในกระถางที่เตรียมไว้ รดน้ำทุกวัน เมื่ออายุประมาณ 30 วัน นำใบอ่อนมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อหาส่วนของยีนทั้งจีโนม และเมื่อมะเขือเทศอายุประมาณ 45 วัน งดให้น้ำ นำใบอ่อนมาสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อหาส่วนของยีนที่มีการแสดงออก

2. ออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีน *N-acetylglutamate synthase*

ทำการศึกษาและค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการทนต่อสภาวะขาดน้ำในมะเขือเทศ ได้แก่ ยีน *N-acetylglutamate synthase* (NAGS) ที่มีรายงานในพืชชนิดต่างๆ จากฐานข้อมูลทางอินเทอร์เน็ต (www.ncbi.nim.nih.gov/) นำมาวิเคราะห์ลำดับเบสที่มีความเหมือนกันอย่างสูง (conserve region) โดยใช้โปรแกรม ClustalW2 Multiple Alignment (European Bioinformatics Institute, UK) ออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีนคือ GNAGS (forward) และ GNAGS (reverse) ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนในส่วนที่มีการแสดงออกของยีนคือ CNAGS (forward) CNAGS (reverse) NAGSBamHI (forward) และ NAGSKpnI (reverse) ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการเชื่อมต่อของชิ้นยีน *SINAGS* เข้ากับ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) คือ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse) **(ตารางที่ 1)**

3. การโคลนยีน *N-acetylglutamate synthase* (*NAGS*) ในส่วนของยีนที่สมบูรณ์

3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

ตัวอย่างมะเขือเทศที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ เชอรี่ ท้อ และสีดา เมื่ออายุได้ 1 เดือน นำมาสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด Genomic DNA Extraction Kit (RBC Bioscience, Taiwan) ตัดใบอ่อนของอ้อยประมาณ 50–100 กรัม บดในโกร่งพร้อมกับไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงแป้ง ย้ายตัวอย่างลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม GP1 buffer หรือ GPX1 buffer 400 ไมโครลิตร และ RNase A (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 5 ไมโครลิตร ผสมโดยการเอียงหลอดไปมาเบาๆ บ่มที่อุณหภูมิ 65°C นาน 10 นาที เขย่าทุกๆ 5 นาที เติม GP2 buffer 100 ไมโครลิตร ผสมโดยการเอียงหลอดไปมาเบาๆ วางตัวอย่างบนน้ำแข็งนาน 3 นาที วาง Filter column ลงใน Collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร และย้ายตัวอย่างลงใน Filter column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 3 นาที ทิ้ง Filter column และย้ายน้ำใสลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม GP3 buffer 750 ไมโครลิตร (1.5 เท่าของสารละลาย DNA ที่ได้) เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน นาน 5 วินาที วาง GD column ลงใน Collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร และย้ายตัวอย่างลงใน GD column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที ทิ้งน้ำใสใน Collection tube และเก็บ GD column ไว้ (ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที อีกครั้ง นาน 2 นาที ทิ้งน้ำใสใน Collection tube เติม W1 buffer 400 ไมโครลิตร ลงใน GD column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 30 วินาที เทน้ำใสทิ้ง และวาง GD column ลงใน Collection tube อีกครั้ง เติม Wash buffer 600 ไมโครลิตร ลงใน GD column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 30 วินาที เทน้ำใสทิ้ง และวาง GD column ลงใน Collection tube อีกครั้ง (ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที อีกครั้ง นาน 3 นาที เพื่อให้ Column แห้ง) ย้าย GD column ที่แห้งแล้วลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Preheat Elution buffer 100 ไมโครลิตร ลงตรงกลางของ Column matrix ทิ้งไว้นาน 3 – 5 นาที จนกระทั่ง Elution buffer ถูกดูดซับโดย matrix ได้มากที่สุด นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 30 วินาที จะได้สารละลายดีเอ็นเอที่มีคุณภาพ เก็บสารละลาย DNA (original) ที่ –20°C จนกว่าจะนำไปใช้ นำสารละลาย DNA ที่ได้ไปวัดค่าความ

เข้มข้น (Optical Density : OD) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer และนำมาเจือจางด้วย TE (Tris-EDTA) buffer หรือน้ำ ให้ได้ความเข้มข้น 60 นาโนกรัม เพื่อนำไปทำ PCR ต่อไป

3.2 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ จาก genomic DNA โดยวิธี PCR Amplification

นำดีเอ็นเอของมะเขือเทศที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการในหลอดทดลองกับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *NAGS* ที่ออกแบบไว้จำนวน 1 คู่ ได้แก่ GNAGS (forward) และ GNAGS (reverse) ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยใช้ LongRange PCR Using Q-Solution (QIAGEN, USA) ในปริมาตรของปฏิกิริยาพอลิเมเรสทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ 40 – 100 นาโนกรัม, 1X LongRange PCR Enzyme Mix with $Mg2^{+}$, 2U LongRange PCR Enzyme Mix, dNTP mix (500 μM of each dNTP), 1X Q-Solution, 0.4 μM Gene Specific Primer (forward), 0.4 μM Gene Specific Primer (reverse) โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre-Denature 93°C 3 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denature 93°C 15 วินาที, Anneal 60°C 30 วินาที, Extend 68°C 8 นาที จำนวน 40 รอบ ตามด้วยขั้นตอน 72°C 7 นาที อีก 1 รอบ หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วเก็บตัวอย่างไว้ที่ 4°C และตรวจวิเคราะห์ผล โดยนำผลผลิต PCR ที่ได้มาตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วย 1% Agarose gel electrophoresis เทียบขนาดแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas, USA) นำไปย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel-Doc Transluminator (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) พร้อมบันทึกภาพ และเก็บตัวอย่างที่เหลือไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

3.3 การโคลนยีน *NAGS* 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 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม PE Buffer 750 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ย้าย Binding Column วางลงบนหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม EB Buffer (อุ่นที่อุณหภูมิ 50 - 60°C) 30 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 15 – 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที ตรวจสอบคุณภาพด้วย 1.5% Agarose gel electrophoresis นำดีเอ็นเอที่ได้มาทำปฏิกิริยา ligation โดยใช้ TOPO® XL PCR Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) ในปริมาตรของปฏิกิริยาทั้งหมด 5 ไมโครลิตร ประกอบด้วย Gel-purified long PCR product 4 ไมโครลิตร, pCR®-XL-

TOPO® vector 1 ไมโครลิตร ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากันบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 25°C เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติม 6X TOPO Cloning Stop Solution 1 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา ผสมปฏิกิริยาทั้งหมดให้เข้ากันและนำไปปั่นเป็นเวลา 3 - 5 วินาที นำไปวางบนน้ำแข็งทันที จากนั้นทำการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* โดยใช้ One Shot® TOP10 chemically competent cells นำปฏิกิริยา 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 Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC) medium 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้รับการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียแล้วไป spread บนอาหารแข็ง Luria Bertani (LB) (เตรียม 1 ลิตร : 10 กรัม NaCl, 10 กรัม Tryptone, 5 กรัม Yeast extract, 15 กรัม Bacto-Agar, ddH_2O) เติมสารปฏิชีวนะ Kanamycin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มเพลทไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นานข้ามคืน

3.4 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ และการตรวจสอบการปรากฏของยีน

คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่มีชิ้น insert ของยีน นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ Kanamycin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบ/นาที นาน 12–16 ชั่วโมง นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้ GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, USA) นำเซลล์ที่เลี้ยงไว้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที 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 รอบ/นาที นาน 5 นาที จากนั้นย้ายสารละลายเซลล์ลงใน GeneJET™ spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม Wash Solution 500 ไมโครลิตร เพื่อล้าง column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที 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 รอบ/นาที นาน 1 นาที นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1% Agarose gel electrophoresis และเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

การตรวจสอบการปรากฏของยีน *NAGS* โดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Apa*I และ *Kpn*I 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)

นำตัวอย่างพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของยีน *NAGS* 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 พลาสมิดดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม, BigDye™ 2 ไมโครลิตร, Ready Reaction buffer 1 ไมโครลิตร, 5 ไมโครโมล ไพรเมอร์ Forward / Reverse และ ddH_2O 3.4 ไมโครลิตร นำปฏิกิริยา cycle sequencing ที่ได้ เข้าเครื่อง Thermal Cycler 9700 โดยตั้งรอบปฏิกิริยาดังนี้ Denaturation 96°C 10 วินาที, Annealing 50°C 5 วินาที, Extention 60°C 4 นาที จำนวน 25 รอบ และ Hold ที่ 4°C infinity (α) หลังจากนั้นทำการล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน โดยนำผลผลิตที่ได้ใส่ลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Solution A (ddH_2O 16 ไมโครลิตร: 95% ethanol 64 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงทุก 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0°C ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70% Ethanol 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0°C ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที 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. การโคลนยีน *N-acetylglutamate synthase* (*NAGS*) ในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน

4.1 การสกัดอาร์เอ็นเอรวม

ตัวอย่างมะเขือเทศที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ เชอรี่ ท้อ และสีดา เมื่ออายุได้ 45 วัน งดให้น้ำ นำมาสกัดอาร์เอ็นเอรวม โดยใช้ MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit (BIONEER Corporation) ตัดใบอ่อนของข้าวโพดประมาณ 5 มิลลิกรัม บดในโกร่งพร้อมกับไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงแป้ง ย้ายตัวอย่างลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Tissue and Cell Lysis Solution 300 ไมโครลิตร ผสมโดยการเอียงหลอดไปมาเบาๆ บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 65°C นาน 15 นาที เขย่าทุกๆ 5 นาที วางตัวอย่างบนน้ำแข็งนาน 3 – 5 นาที เติม MPC Protein Precipitation Reagent 150 ไมโครลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน นาน 10 วินาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ย้ายส่วนใสใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Isopropanol 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 30 – 40 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที เทส่วนใสออกให้หมด ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย DNaseI Solution 200 ไมโครลิตร บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 37°C นาน 10 – 30 นาที

เติม MPC Protein Precipitation Reagent 200 ไมโครลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน นาน 10 วินาที วางตัวอย่างบนน้ำแข็ง นาน 3 – 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ย้ายสารละลายอาร์เอ็นเอที่ได้ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Isopropanol 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 30 – 40 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 75% Ethanol 300 ไมโครลิตร (ทำ 2 ครั้ง) เอา Ethanol ออกให้หมดโดยใช้ไปเปตละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย TE buffer 35 ไมโครลิตร แล้วเติม Script Guard RNase Inhibitor 1 ไมโครลิตร เพื่อยับยั้งไม่ให้อาร์เอ็นเอถูกย่อย วัดค่าความเข้มข้น (O.D.) ของสารละลายอาร์เอ็นเอที่ได้โดยใช้เครื่อง spectrophotometer เก็บสารละลายอาร์เอ็นเอที่ -80°C จนกว่าจะใช้งาน

4.2 การสังเคราะห์ cDNA จาก total RNA โดยวิธี RT–PCR

ทำการสังเคราะห์ cDNA จากอาร์เอ็นเอรวมของมะเขือเทศทั้ง 3 พันธุ์ โดยใช้ SuperScrip™ III One–Step RT–PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) ด้วยวิธี One–Step RT–PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน NAGS คือ CNAGS (forward) และ CNAGS (reverse) ในปริมาตรของปฏิกิริยาพอลิเมเรสทั้งหมด 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 SuperScript™III RT/Platinum Taq Mix นำปฏิกิริยาเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม PCR (Thermal Cycle 9700) โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre–Denature 55°C 30 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94°C 2 นาที 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

4.3 การเชื่อมต่อชิ้นยีน *NAGS* เข้ากับเวกเตอร์ และการตรวจสอบการปรากฏของยีน

4.3.1 การเชื่อมต่อชิ้นยีน *NAGS* เข้ากับเวกเตอร์ 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 ใส่ในหลอดทดลองขนาด 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 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม PE Buffer 750 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที

นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ย้าย Binding Column วางลงบนหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม EB Buffer (อุ่นที่อุณหภูมิ 50 – 60°C) 30 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 15 – 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที ตรวจสอบคุณภาพด้วย 1.5% Agarose gel electrophoresis จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยา ligation โดยใช้ TA Cloning Kit (Invitrogen, USA) ในปริมาตรของปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย Gel-purified PCR product 4 ไมโครลิตร, pCR®2.1 vector 2 ไมโครลิตร, 5X ExpressLink™T4 DNA Ligase Buffer 2 ไมโครลิตร, ExpressLink™T4 DNA Ligase 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ ผสมปฏิกิริยาทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4°C นานข้ามคืน จากนั้นทำการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α 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_2O) เติมสารปฏิชีวนะ amplicillin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มเพลทไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นานข้ามคืน

4.3.2 การตรวจสอบการปรากฏของยีน *NAGS* ในเวกเตอร์

คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่มีชิ้นส่วนของยีนสอดแทรกอยู่ นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ amplicillin 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 รอบ/นาที นาน 5 นาที จากนั้นย้ายสารละลายเซลล์ลงใน GeneJET™ spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม Wash Solution 500 ไมโครลิตร เพื่อล้าง column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) ย้าย GeneJET™ spin column วางบนหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Elution Buffer 50 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้นาน 15 – 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1% agarose gel electrophoresis และเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

การตรวจสอบการปรากฏของยีน *NAGS* โดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Not*I ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 100 – 200 นาโนกรัม, 1X FastDigest Buffer, 0.5U FastDigest Enzyme ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่

อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80°C นาน 5 นาที นำมาตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis

4.5 การวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA Sequencing)

นำตัวอย่างพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของยีน *NAGS* 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 พลาสมิดดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม, BigDye™ 2 ไมโครลิตร, Ready Reaction buffer 1 ไมโครลิตร, 5 ไมโครโมล ไพรเมอร์ Forward / Reverse และ ddH_2O 3.4 ไมโครลิตร นำปฏิกิริยา cycle sequencing ที่ได้ เข้าเครื่อง Thermal Cycler 9700 โดยตั้งรอบปฏิกิริยาดังนี้ Denaturation 96°C 10 วินาที, Annealing 50°C 5 วินาที, Extention 60°C 4 นาที จำนวน 25 รอบ และ Hold ที่ 4°C infinity (α) หลังจากนั้นทำการล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน โดยนำผลผลิตที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Solution A (ddH_2O 16 ไมโครลิตร: 95% ethanol 64 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงทุก 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 รอบ/นาที 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

5. การสร้างชุด cassette ยีน และการตรวจสอบการปรากฏของยีน *SINAGS*

5.1 การสร้างชุด cassette ยีน

5.1.1 การเพิ่มปริมาณยีน *SINAGS* จากพลาสมิดดีเอ็นเอของข้าวโพด โดยวิธี PCR

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน *SINAGS* ไปเพิ่มปริมาณส่วนที่ต้องการในหลอดทดลองกับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนคือ NAGSBamHI (forward) และ NAGSKpnI (reverse) ซึ่งได้เติมลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I เพื่อบังคับทิศทางของการเชื่อมต่อชิ้นยีน โดยใช้ Hot Start Taq Master Mix Kit (QIAGEN, USA) ในปริมาตรของปฏิกิริยาพอลิเมเรสทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วยสารละลายดีเอ็นเอ 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 ที่ได้มาตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis นำไปย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transiluminators พร้อมบันทึกภาพ

5.1.2 การเชื่อมต่อชิ้นยีน *SINAGS* เข้ากับ Plant Expression Vector

นำพลาสมิด pCAMBIA2300 ที่มีส่วนประกอบของโปรโมเตอร์ (35SCaMV) และเทอร์มิเนเตอร์ (NOS) ซึ่งมีขนาด 9,648 คู่เบส มาใช้เป็น Plant Expression Vector มียีน nptII (kanamycin) เป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือก และชิ้นดีเอ็นเอของยีน *SINAGS* ขนาด 1,812 คู่เบส นำแต่ละตัวอย่างมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *KpnI* โดยในปฏิกิริยาทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอของยีน *SINAGS*/พลาสมิดดีเอ็นเอของ 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) ตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการบนเครื่อง Dark Reader Transilluminators และแยกสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) (ข้อ 3.3.1) จะได้ชิ้นพลาสมิด pCAMBIA2300 และชิ้นยีน SINA3/SINAT3 โดยที่ปลายข้างหนึ่งเป็นตำแหน่งจำจดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และอีกข้างหนึ่งเป็นตำแหน่งของเอนไซม์ *Kpn*I นำชิ้นยีน *SINAGS* เชื่อมต่อเข้ากับ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) เพื่อสร้างพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมที่สมบูรณ์ ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยชิ้นดีเอ็นเอของยีน *SINAGS* 200 นาโนกรัม, pCAMBIA2300 400 นาโนกรัม, 1X Ligation Buffer, T4 DNA ligase, ปรับปริมาตรด้วยน้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 22°C นาน 1 ชั่วโมง และนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 65°C นาน 10 นาที จากนั้นทำการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดยนำปฏิกิริยา ligation จำนวน 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดคอมพิเทนต์เซลล์ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และแช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไป heat – shock ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 45 วินาที นำไปแช่บนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 30 นาที เติม S.O.C. medium 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบ/นาที 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_2O) เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเพลทไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นานข้ามคืน

5.2 การตรวจสอบการปรากฏของยีน *SINAGS* ใน Plant Expression Vector

5.2.1 การตรวจสอบการปรากฏของยีน *SINAGS* ด้วยเทคนิค PCR

คัดเลือกโคโลนีที่คาดว่าได้รับพลาสมิดสายผสม นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดพลาสมิด GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, USA) (ข้อ 3.3.2) นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้นำมาทำปฏิกิริยา PCR ร่วมกับไพรเมอร์ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse) **(ตารางที่ 1)** ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัม, 2U HotStart Taq Master Mix, 0.5 µM Primer (forward), 0.5 µM 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

5.2.2 การตรวจสอบการปรากฏของยีน *SINAGS* ด้วยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ

การตรวจสอบการปรากฏของยีน *SINAGS* ด้วยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I 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)

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาทำการทดลอง เดือน ตุลาคม 2558 – เดือน กันยายน 2560

สถานที่ทำการทดลอง สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อ. ธัญบุรี จ. ปทุมธานี

ผลการทดลองและวิจารณ์

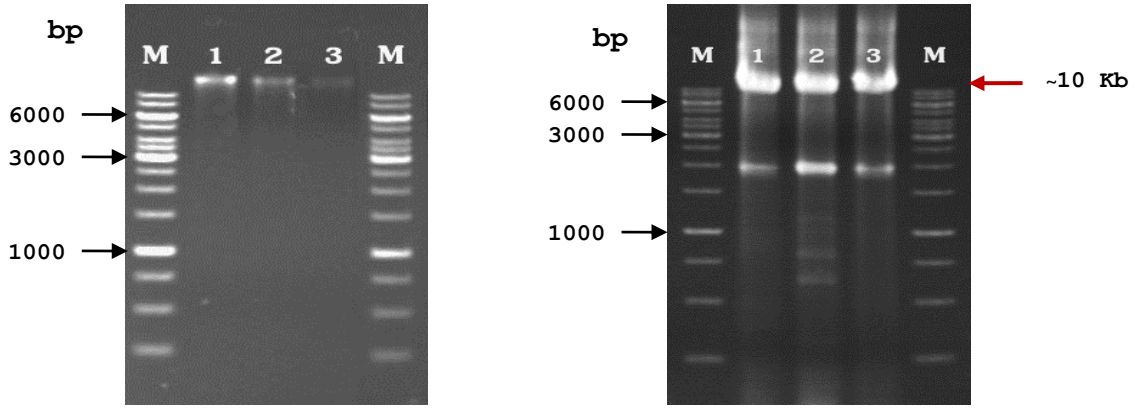
1. การโคลนยีน *N-acetylglutamate synthase* (*NAGS*) ในส่วนของยีนที่สมบูรณ์

จากการโคลนยีน *N-acetylglutamate synthase* (*NAGS*) ในส่วนของยีนที่สมบูรณ์ โดยทำการออกแบบไพรเมอร์บริเวณที่มีความเหมือนของลำดับพันธุกรรมอย่างสูง (conserved region) ที่มีรายงานในพืชชนิดต่างๆ จากฐานข้อมูลทางอินเทอร์เน็ต NCBI สามารถออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *NAGS* ได้จำนวน 1 คู่ คือ GNAGS (forward) และ GNAGS (reverse) **(ตารางที่ 1)** โดยนำไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ได้มาทำปฏิกิริยา PCR กับจีโนมิกดีเอ็นเอของมะเขือเทศทั้ง 3 พันธุ์ **(ภาพที่ 1ก)** พบว่า สามารถทำปฏิกิริยาได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 10 กิโลเบส **(ภาพที่ 1ข)** นำดีเอ็นเอของยีน *NAGS* ที่ได้ไปเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ TOPO® XL PCR Cloning Kit และถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย One Shot® TOP10 chemically competent cells คัดเลือกโคโลนีที่คาดว่ามียีน *NAGS* นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ จำนวน 6 โคลน **(ภาพที่ 2ก)** และตรวจสอบโคโลนีที่ได้รับการถ่ายยีนโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Apa*I และ *Kpn*I พบว่า รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของยีน *NAGS* ที่มี ความถูกต้องจำนวน 2 แถบ คือ ขนาดประมาณ 3.5 กิโลเบส (vector) และขนาดประมาณ 10 กิโลเบส (ยีน) **(ภาพที่ 2ข)** นำพลาสมิดดีเอ็นเอโคลนที่มียีน *NAGS* ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer พบว่า ยีน *NAGS* มีลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 9,345 คู่เบส **(ภาพที่ 3)**

ตารางที่ 1 แสดงลำดับเบส, Melting temperature (Tm) และ % GC content ของคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR และ RT-PCR กับยีน *N-acetylglutamate synthase (NAGS)*

Primer name	Base sequence (5' → 3')	Size (bp)	Tm (°C)	GC content (%)
GNAGS_F	GTC GAC AGT TAA CCA GTG GCA CTA CCG GTT CAT G	34	65.3 (60)	52.9
GNAGS_R	CTA TGG AGC ACA AGA AGG AAC CTT AGC TCC AGC	33	64.0 (60)	51.5
CNAGS_F	ATG TCA GCT TCA CCG GCA ACG CCT TGT GCT CC	32	73.6 (60)	59.4
CNAGS_R	TTA TGA AAA GGG GTT GTC AAA GCG TAT ACC	30	64.6 (60)	40.0
NAGSBamHI_F	CAC GGA TCC ATG TCA GCT TCA CCG GCA ACG CCT TGT GC	38	71.1 (60)	60.5
NAGSKpnI_R	CAC GGT ACC TTA TGA AAA GGG GTT GTC AAA GCG TAT ACC	39	64.3 (60)	46.2
35sPromotor_F	CAT TTG GAG AGG ACA CGC TGA CAA GCT GAC	30	63.9 (60)	53.3

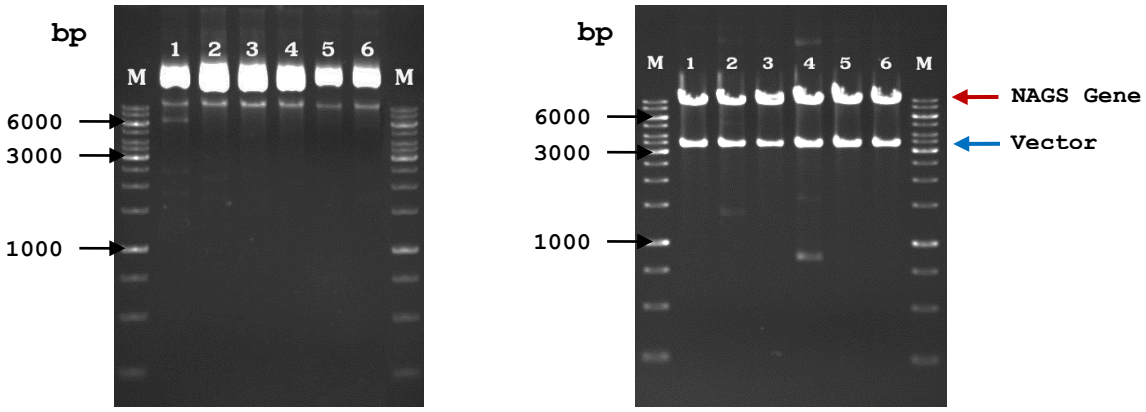
NOS_R	GCC AAA TGT TTG AAC GAT CGG GGA AAT TCG	30	61.9 (60)	46.7



ก ข

ภาพที่ 1 ก. แสดงจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากมะเขือเทศ, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = มะเขือเทศพันธุ์เชอรี่, Lane 2 = มะเขือเทศพันธุ์ท้อ, Lane 3 = มะเขือเทศพันธุ์สีดา

ข. แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน *N-acetylglutamate synthase* (*NAGS*) ที่เพิ่มปริมาณได้จากมะเขือเทศ 3 พันธุ์ ร่วมกับคู่ไพรเมอร์ GNAGS (forward) และ GNAGS (reverse) ด้วยเทคนิค PCR, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = มะเขือเทศพันธุ์เชอรี่, Lane 2 = มะเขือเทศพันธุ์ท้อ, Lane 3 = มะเขือเทศพันธุ์สีดา



ก ข

ภาพที่ 2 ก. แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดพลาสมิดโคโลนีสีขาวที่คาดว่ามียีน *N-acetylglutamate synthase* (*NAGS*), Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 =

พลาสมิดดีเอ็นเอของมะเขือเทศพันธุ์เชอรี่, Lane 3-4 = พลาสมิดดีเอ็นเอของมะเขือเทศพันธุ์ท้อ, Lane 5-6 = พลาสมิดดีเอ็นเอของมะเขือเทศพันธุ์สีดา

ข. แสดงรูปแบบของพลาสมิดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Apa*I, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = รูปแบบดีเอ็นเอของมะเขือเทศพันธุ์เชอรี่, Lane 3-4 = รูปแบบดีเอ็นเอของมะเขือเทศพันธุ์ท้อ, Lane 5-6 = รูปแบบดีเอ็นเอของมะเขือเทศพันธุ์สีดา

```
   1  gtcgacagtt aaccagtggc actaccggtt catgtccatt cccgttgccg gcgaacattt
                                                            TATA signal
  61  cttattcaaa attctccgat tccgactccg actctgactt cagcaactcc ctataaattt
 121  ccaatgtcag cttcaccggc aacgccttgt gctccagtta ttaaacaatg taagctacca
 181  attttcgctc gcagcgatgt ttggacaact ccagttgaaa atagtttcca agggaggcga
 241  aagttgttat cattaagggt taatttttcg aagagattgt caattaggtg cggtgtttat
 301  ggggaaacgg aaagtgcagc tggtttttcc gacgtgagca gtgcaataaa agatgactta
 361  ttcattgggt tttttcgaga agcttggcct tattttcttg cgcatagagg aagcactttt
 421  gttgttttaa tctcagctga aattgttgat agtcctcatt tggatcatct tcttatggca
 481  tgttcctatt ttaactttgt cttccagtta tctcgtttgg ccatacattt tgaagctaaa
 541  acttgaaaat atgagtttgc gaagttgtga ttttgggaac ttcaagtttt gtttggacat
 601  ggattttaat tgaattgttt tgtcaagttt cgcgattgaa agtgaaattt ctttcaaaac
 661  ggcgagtttt tggaaacttg taaatgttcg aagatcagat ttcatggcca aatagatatt
 721  tgaagataaa ttttcagaaa ctactggcaa gatctatggc caaacgttag ctcaatgtgt
 781  ttgttttctt tttccttttc tagtagtgac attccaagtt tggatttttt taaataagat
 841  ttggttggag attttgtaac tctgctgttt aatgtgtgat ttagggaagt tataaatttt
 901  aagagaactt taactgataa aaaatttaag aagattcacg tagttgaact gggttagttt
 961  gggattgagt agtgattgat tgatttttgg taattgtaag ttcattagtt tgttgattta
1021  tcccactttt agtaatgcat gacggtttgt tttacgcaca aactttgcag gatatctcgc
1081  tccttcatgg cctgggaatc aagtttgttc ttgtacccgg aactcatgtc caaattgata
1141  ggtttctggc tgaaagaggt cagcaaaatg ttgttgtttt cttttcttgt tcagtttgat
1201  agtgctagtt tctagcagct cgtgtgtttt cttcactatt tctgatgctg atagcaaata
1261  attgttattc tcttaatttt attattcttg atgatagaca aaaaatttca gcttaggctc
1321  cacttaaatt aggtcaatat ttaccaggag tcttcgtact tagtgaaaga cttgtatgtc
1381  catgttcttt gagatttagt taacctcttg ttttagagaa ctcgtaatat aattttaaaa
1441  acactctgga gtacttagta ttggaacgaa atggagctga atgtgaattc agttgattcg
1501  tatagctggt gttggctagt ttgtgattga tacagagtta atcaattaat agttatatca
1561  gacggagttt tgatgacttt tgtcttagct aaaatattaa ttttcctcgt cttgatgttg
1621  tcatcgtcta gaaagtgtcc ctgcgttggt acatgcatca tcctattaga ttaacagaaa
1681  caatctaagc atgttttact gacaaactct gaagatatta agctaataaa gactcagtaa
1741  agtctaaaag gtattctgcc tctaatttcg ctcgacaatt gcttgggtct gctctaaaca
1801  gtgaaaactt caggttaaag cttgatcaac ttgctaatga tgagctggag ctcataacct
1861  agtaaatagt ttagatgcaa gatccttttt cctattatat tgattgtaat gcatttccaa
1921  aaattgctaa aattaacatg gagaaaccca aagcttcggc atccattttc attcatagaa
1981  agaggaatca atagcattaa tggcttgatg attatgcatt ttagaataac caaattttgc
2041  atggaaagga gtttaacagt ctttactatt caaactcctg gatttttcc tttttaatta
2101  gcaccattat attatttttc tttctctaaa ctacaacttt atctctatct taagaagaat
2161  attctcagaa gcaagtgatt tgaaactctt tcttacagga agtgagccca agtatgtagg
2221  ccgctacaga gtaacagacc ctgattcact gatggctgca atggatgcag ctggaagaat
2281  tcgtcttatg atagaggcaa agttgtctcc ggggccatca ttgactggtg tccgccggca
2341  tggagaaaat agtcgctggc atgatggtgt tagtgttgct agcggtaatt ttctagcaat
2401  gaaggtgaga atataatgtc attgcacaat gtaaatatta tgaaatatat ttcattcttt
2461  taaggtttta aatttttgc atcaaatgtc atttcaatga caatgaggtt gacttgggat
2521  tttcattata aatttcggca gagaagagga gttgtagaag gaactgatta tgcagcgact
2581  ggtgaagtaa agaagataga cgtttctcgc attcgtgaga gacttgatcg ggatagcatt
2641  gtgttattaa gcaatcttgg atattccagc tctggagaag ttttgaactg caagtatgct
2701  ttatggtttt tgataggtat ctttgttgtt gttgagcatc attagtcctg catcttgttc
2761  taagaaaatc gtcaaaatca gcgagcaaac agaatttcag gaagctatat actagagtat
2821  agtgatacat aagacttcac cttagtagtg atcaattttc cggttctacc ctctgtttta
2881  ataaaactgg taagcttcta ttatcaagtt tcctttaact tatgggacat tctcctttct
2941  ttcttcaact gcttgacagg cattaagtgc tccttctctc ttcttcttcg cctgcttatt
3001  cttcttcatc tttttttttt ttgtgaaaac tcgtgcactt ggaagattgc aatacttaaa
```

ภาพที่ 3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *N-acetylglutamate synthase (NAGS)* ในมะเขือเทศ

```
3061  tctcagtgat aggatcaaaa ctcataagct aaatcaaaag gaagtcttct agtgaaattc
3121  ttaaaacgaa aaaaggggaa ataactaaca agaatgtgat ttatgcctag ggtgcatgtc
3181  aactattatc agaagtgtaa aattaattat tgtaaaagaa atatttcttc aggttgatct
3241  cattttggtc acacttttgg gtttatgttt acttgattga ataggttaca ctcaatttgg
3301  gtggtttctt atggtaacat tacctatcaa ttattgtctt cacgattcat gtagttttag
3361  atataattca gacactatca acacggtgat aaggaagtac actaacattc tctgctcttc
3421  tttcattaca agatagtact aataaaaaaa tattgtgctc gtgcagacac acacacatat
3481  ttgacattat gactcccatc tattgggggc gatatagatg gacttgtgga gttgaagtta
3541  gcttaacatc gaactttgaa catatctcta tccctcacca tgagtagaag ccaataattt
3601  catgatttta tgtgtgtcag tgccctctgc gggaatgcta tttttttaat atcaatctgc
3661  ttttcttggg aacttagctt gttttaatca gtggtcatgt gtttgcagat attacttcat
3721  ttcttaatgt gtactagttt ttcatgtttt tacaaaacta tttctagagg ctctagagga
3781  aaaagtcttt ctacttacaa aaggtagggt aaggctgcgt aacaaaaccc tccccagacc
3841  ccacttgtag gattacactg gttatgttgt tgtacaaaac tatatctaat taactgggct
3901  agatgttcag tacaccacat ttttctgaaa ctaccattgt aagtcagctt tttgtgaata
3961  tgtttaagtg tgtcacagcc ctcgatgtga atgcttatct tttaaatcaa tctactatct
4021  tgggaactca acttgtatta cacagtcgtc atctgttcat gatcccatgt tgacttatgt
4081  tagaatagga ataagtattt cttacttaat atagggatta gaataggaac aagaatagga
4141  attctagttg gaaaaggttt ccaatgtagt gtctataaat agggtcttca tgtaacaata
4201  gatacgcaat tcaaaagtat tttctccaat atttctcaca agttatgttg agttaattca
4261  ttttacaatt cctaatgtgt aacatgtttt actttttcct ataagcattt tccgattgat
4321  taagctatag atgctcagca cacgacattc ccgactcttc aatcatgagt cggtgtttcg
4381  tggatatgtt ttttctttcc gtctttattt tgccttgagt ttaagattga tagtgtgttt
4441  tattttattg aagcacatat gaagttgcta cagcttgtgc cttggctcta ggagcagaga
4501  aactgatttg tattatagat ggtccaattc tggatgagtc tggccgtctt attcgtttct
4561  tgactcttca agatgctgac atgctggttc gcaaacgagc agaacaaagt gaggcagcag
4621  ctaattatgt aaaagctgtc agtcaagagg acttcaattg tttaggtcac aatggttcta
4681  atggatcaat ctcttcctac aatatgaatg ggtttagcca aaaatacagt gtttttcaga
4741  atggtgttgg ttttgacaat gggaatgggc tttggtctag tgagcagggt tttgccattg
4801  gaggacaaga gaggttaagt cgactaaatg gttatctttc agagttagct gcagctgctt
4861  tcgtgtgcag agtaagatcc tggctgtcta atcactatat ctgcagattt ttcgaagtgt
4921  ccaaactaga gaataattgt ctatgttatt tacccgaacc ctaaacatac aacagaaaat
4981  tgcatgtttt ctaaacttga ccgttgatgg ctaaaggggt agaatttgga agttgtcact
5041  ctttgctgtt aaaacttctt ttataatagc ttgtgcatta gagatatgta tatttacaga
5101  atagtaacta gtttcatgtt ctcactacat attatggcta tatatggttt gctgtgtcta
5161  gtaactatca acttttacag tgatctatca tctgatcaaa ttttcatgtc tctactaaat
5221  tgactcctca tttatcaata tgatatctct attggcttat tggttaaaaa ttttgccaat
5281  tctgtactcc atttgccatc agggaggtgt tcaacgagtt cacctgctgg atggtactat
5341  tggtggagtt ttactaaagg aattgttcca aagagatgga gttgggacaa tggtagctag
5401  gtatgcaaat cttgatgaaa tattgcttgt aatttagtca agacatgttg atattcattt
5461  ctccacattt acatcatttc ctctttaagt tgatcaatga tattcacttt tccttgtgtt
5521  tttgaaccgt caaatccatg gtacaaatag ttcactgtca aagcaagtca tgaatgagac
5581  gacaaaaata taatctacaa ttaacgagct cagttggtta agagtaacaa actgggctaa
5641  tgtgagccac ctttcaccat tatgattaaa acaccaccaa tgtggagaag aacagctgaa
5701  attactgtgc tattatttca ttccaaattt gacattttgt ttctttgtgg agaaatccat
5761  ggcgcaactt acaagattca atcccctagg acacaatttg gtatatgact aattgaagta
5821  atatccagaa tttcctaaga tgttaaacga gctacttaca ttgccaaaat aaacttagct
5881  ttacttttac aatattgata tatagaactc cctgagcagt gagaatctac atgtctctgg
5941  ttgtctgatc gtctccctat atgacattat gtttctcacc acaaaagttc atggtttcgc
6001  ggtctctagg attaacagtt gtactctcag tcgtataatt acgttaggac atggctaatt
6061  gatatttgct atctttttta tgactatctt tcgactaaga tgtgcatgaa tctctttttc
6121  tcagtgatct ttatgaagga acacgaatgg ctcggctgtc agatattccc gagatcaaac
6181  aattattaca acctctagaa gagtctggaa cattgatcag aaggagcgag gaagaggtta
```

ภาพที่ 3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *N-acetylglutamate synthase (NAGS)* ในมะเขือเทศ (ต่อ)

```
6241  atcttgatgc tttttattat ggaaaaatac ttgctaaatc agcttctatt tggttaatgt
6301  ttgtatcact tttctttttt cataattatg tgtttttttac ttattctagc ttgtggaggc
6361  actgcattca ttcattgttg tggagagaga aggccatgtt atagcttgtg ctgctctctt
6421  tccttacttt gaagaaaaat gtggagaggt tgctgctatt gccgtttctc ctgattgtcg
6481  tggccaagga caaggagaca aattactagg taactctttc tcatagtaaa actaattact
6541  tcttcgatta taatgcatgt aagcagtttc aggatgttgt gattatttgc atttgtccga
6601  tgaagttgca aacacgttaa caaaggaaca accttaggtt taaaatattt cgtaaagcct
6661  ttaatcactt ggattagcaa acagtgcaaa gcataaaata aagacatgat gaatctactt
6721  accatgaatg acatgttata tatcagaaca ttgtcacaaa tgataatatg ccaccaacat
6781  aagttgtaag actaagttca gtacctccag taatacctta agatttttta ggaagctcaa
6841  gcattaaaat gagccaatta tacatactgt atatagcaat ggaatgtgat catttagtat
6901  ttccccatgt gattatccat tcctccaaac tttccttgta cgtgtggaag aaatttttga
6961  aagcaaacac ttagatataa aagctcctca actacaccct tacgtgcttt ccctctaaga
7021  tgtccctcaa cttttgtgtt tctctcatta caacctctac tctctctaat aatcagacac
7081  agtctagcct ttttccgttc tatgaaaatc catagttcga aatcaactca ccgaaatcat
7141  tgacatttgt tgaatttctt gaggttattt tctagaatgg aattgatgtg aagagtaagg
7201  gatgataaaa gctaacaggc taaaatcaac gaaataaatg agaaagcaca aatgaaatat
7261  tggatcaata ttaagaacat tttactgcaa actagcacta gattgttctc aaccagaatc
7321  caattttttg cccaccaatg gattttgtct agccataaaa tcaaagaaaa ttctttctcc
7381  tgtttttttc cccctaatat tcttcttgaa tataaacaat aacaacaatg aaaacaaccg
7441  tcgtttttac tttttattaa taaacaagaa ctaagacata aaggtttata ggaataagtc
7501  caagccaaag ctgtgatttt agatcattgt tttttttttt ttttgaggaa gtaacttgta
7561  ttaccaatag aggagtactc cagaagtagt ccagtaatac ttgcaaaaca aagatcacag
7621  atttggaata cctttaaacc agaacttgac aattagatgt tacttgggta gcaaatgcaa
7681  cttattgact cgtattttgt aacaatgttc tcttcaactt gtttgtaaaa attcccaagc
7741  tccaaacgag gtattccttg aacgccttgg tcttgacacg agttaacggt ccactaaaca
7801  tctcagaatt gtacacaata ggctgcttag tgtctgtcta tccaggatcg tatcaactta
7861  tttctcatag ttatgctttg ttggtcttac actttattaa agaatgttgt gtccttaaaa
7921  gttgagacaa attgttatgt gtttacttct tttctatcta cctaaacaca gttggtgtcc
7981  ttgaacattt tggtctgatc aaaattctgc acttattatt gcaatagcca ataactttct
8041  attccaaaaa tgaattgtag attacatcga gaagaaggca tcatcccttg gattgcaaat
8101  gttgtttctg cttacaactc gcacagctga ttggtacgct ctttccactt tcctgctccc
8161  tggctaatat atacattgtt cttccaattg gcaaacgaac attgattgcc aaactaaagt
8221  gcaatggaca atggcagatt actgagtgtc attaaattta ttgcaatatt tatactgaat
8281  ttgagaatac aagtccttta gtcatttcaa cggggagata aagctaagat gctatgtcaa
8341  ggtacagaga atcataaagg aaaagaagaa aagagttcct cttgattatt attactactt
8401  gtttttttggg tatgcatgtt gcacgtgtaa ttcatatcaa tgagtataaa attttaaaaa
8461  tagcataaat atttaaaact gcgtttgagt tataaaatta attcaaaagt ataagctctt
8521  tgagaagatg gatgttgatc ctatttaact aacccaataa aaaaagctgt cccgtaaaag
8581  tattcagatg ctttgttata attttgacat gttagttctg catttgcttt acagcacaga
8641  cagtagcaca atgtgcttac ttgtacatca ttaaatcatg aagttcatgt gatttacttt
8701  gttaaactca aaatggagca ctaatgaatc taacattttc tcttaagata aagctgccct
8761  gcaagagtat tcagacacaa gaaacctcat aatcaagcat ttttgtcata gttgcattca
8821  tataatgttc aaagttgaga ctggattttg tccttgaaca agaaaaatat cattaacaga
8881  tggtttcttg atttgatatt catgtatgca tttctctcct ttacaggttt gtgaggcgcg
8941  gtttttctga atgttctatc gaccgtatac cagctcaaaa aaggaaaaag atcaatctct
9001  ctcgtaggtc aaagtactac atgaagaagc tgctacctga tagaagtggt atacgctttg
                                                          PolyA signal
9061  acaacccctt ttcataagaa caaaaacggg tttctgcgta gtgtctctgc aataaagctt
9121  ggattaaatg gttaatcctt gttaatctgt gtccattagg tgtaatcata gcaaagaatg
9181  tataaagcta tgcacctgta aaatctcagg catggtacat tgtctgctct ataatgtagc
9241  ttatgcttga tttggtcgct aacattcatc tgtcttttac ctttttgggt caaattttta
9301  gagttaagaa aagctggagc taaggttcct tcttgtgctc catag
```

ภาพที่ 3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *N-acetylglutamate synthase* (*NAGS*) ในมะเขือเทศ

เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์โครงสร้างของยีน โดยใช้โปรแกรม Software GenScan บนอินเทอร์เน็ต พบว่า ยีน *N-acetylglutamate synthase* ที่ได้มีส่วนประกอบครบทั้งยีน ซึ่งประกอบด้วย ลำดับเบสในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน Open Reading Frame (ORF) จำนวน 10 exons **(ตารางที่ 2)** และพบลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง TATA signal (TATAAA) อยู่ในส่วนของ 5′UTR ระหว่างตำแหน่งของลำดับเบสที่ 112–117, ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง PolyA signal (AATAAA) อยู่ในส่วนของ 3′UTR ระหว่างตำแหน่งของลำดับเบสที่ 9111–9116 **(ภาพที่ 3)**

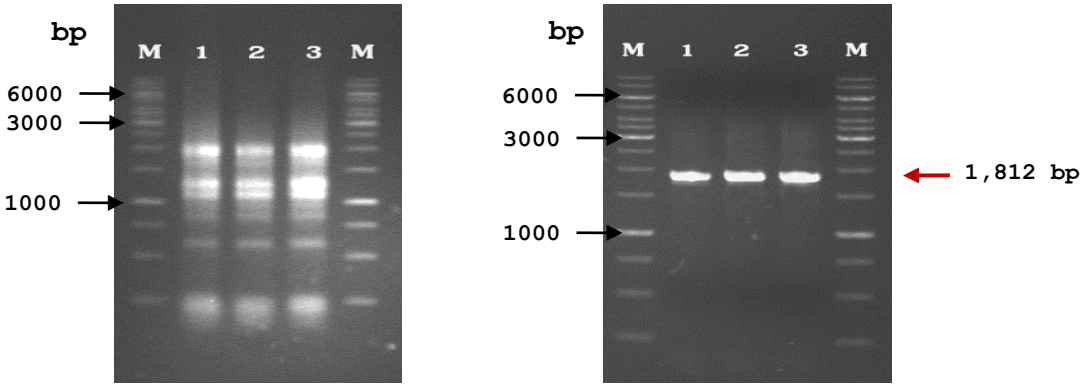
ตารางที่ 2 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *N-acetylglutamate synthase* (*NAGS*) ในส่วนของยีนที่มีการแสดงออก (exon) บนอินเทอร์เน็ตโปรแกรม www.genes.mit.edu/GENSCAN.html

ลำดับที่	ชนิดของยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์เริ่มต้น (bp)	ลำดับนิวคลีโอไทด์สิ้นสุด (bp)	ความยาว exon (bp)
1.01	Initial exon (ATG to 5' splice site)	124	169	46
1.02	Internal exon (3' to 5′splice site)	1033	1158	126
1.03	Internal exon (3' to 5' splice site)	2199	2404	206
1.04	Internal exon (3' to 5' splice site)	2542	2693	152
1.05	Internal exon (3' to 5' splice site)	4454	4871	418
1.06	Internal exon (3' to 5' splice site)	5303	5400	98
1.07	Internal exon (3′ to 5' splice site)	6125	6236	112
1.08	Internal exon (3' to 5' splice site)	6350	6509	160
1.09	Internal exon (3′ to 5' splice site)	8061	8133	73
1.10	Terminal exon (3′to stop codon)	8927	9077	151
1.11	PolyA signal	9111	9116	6

2. การโคลนยีน *N-acetylglutamate synthase* (*NAGS*) ในส่วนที่มีการแสดงออก

ทำการโคลนยีน *NAGS* ในส่วนที่มีการแสดงออก โดยนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *NAGS* ทั้งจีโนมที่วิเคราะห์ได้ มาออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีนในส่วนของยีนที่มีการแสดงออก ซึ่งได้เติมลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I เพื่อบังคับทิศทางของการแปลรหัส คือ NAGSBamHI (forward) และ NAGSKpnI (reverse) **(ตารางที่ 1)** โดยนำไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ไว้มาทำปฏิกิริยา RT-PCR กับอาร์เอ็นเอรวมของมะเขือเทศทั้ง 3 พันธุ์ **(ภาพที่ 4ก)** พบว่า สามารถทำปฏิกิริยาได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.8 กิโลเบส **(ภาพที่ 4ข)** นำแถบดีเอ็นเอที่ได้ไปเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ T&A Cloning Vector และถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ DH5α ทำการคัดเลือกโคโลนีสีขาวนำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ **(ภาพที่ 5ก)** และตรวจสอบโคโลนีที่มีชิ้นส่วนของยีน *NAGS* โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Not*I พบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่มีความถูกต้องจำนวน 2 แถบ ได้แก่ ขนาดประมาณ 2.7 กิโลเบส เป็นขนาดของเวกเตอร์ (Vector) และ 1.8 กิโลเบส เป็นขนาดของยีน (*NAGS* Gene) ตามลำดับ **(ภาพที่ 5ข)** จากนั้นนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่มี

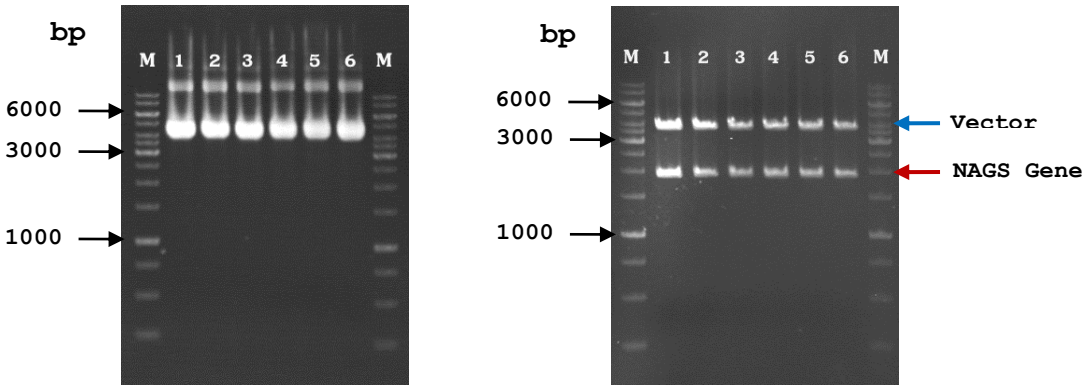
ชิ้นส่วนของยีนไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer พบว่า ยีน *NAGS* ลำดับนิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 1,812 คู่เบส สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนของยีน *N-acetylglutamate synthase* (*NAGS*) โดยใช้โปรแกรม ExPASy Bioinformatics Resource Portal บนอินเทอร์เน็ต จำนวน 604 amino acid และอยู่ภายใน Open reading frame ระหว่างตำแหน่งของลำดับดับเบสที่ 1 – 1,812 **(ภาพที่ 6)** เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ยีนที่ได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน *N-acetylglutamate synthase* (NAGS) ที่พบในมะเขือเทศ (*Solanum lycopersicum*) (FJ543466.1) และ มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) (XM_006350559.2) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 99% และ 98% ตามลำดับ **(ตารางที่ 3)**



ก ข

ภาพที่ 4 ก. แสดงอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้จากมะเขือเทศ, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = มะเขือเทศพันธุ์เชอรี่, Lane 2 = มะเขือเทศพันธุ์ท้อ, Lane 3 = มะเขือเทศพันธุ์สีดา

ข. แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน *N-acetylglutamate synthase* (*NAGS*) ที่เพิ่มปริมาณได้จากมะเขือเทศ 3 พันธุ์ ร่วมกับคู่ไพรเมอร์ GNAGS (forward) และ GNAGS (reverse) ด้วยเทคนิค RT-PCR, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = มะเขือเทศพันธุ์เชอรี่, Lane 2 = มะเขือเทศพันธุ์ท้อ, Lane 3 = มะเขือเทศพันธุ์สีดา



ก ข

ภาพที่ 5 ก. แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดพลาสมิดโคโลนีสีขาวที่มียีน *N-acetylglutamate synthase* (*NAGS*), Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = พลาสมิดดีเอ็นเอมะเขือเทศพันธุ์เชอรี่, Lane 3-4 = พลาสมิดดีเอ็นเอมะเขือเทศพันธุ์ท้อ, Lane 5-6 = พลาสมิดดีเอ็นเอมะเขือเทศพันธุ์สีดา

ข. แสดงรูปแบบของพลาสมิดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Kpn*I และ *Not*I, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = รูปแบบดีเอ็นเอมะเขือเทศพันธุ์เชอรี่, Lane 3-4 = รูปแบบดีเอ็นเอมะเขือเทศพันธุ์ท้อ, Lane 5-6 = รูปแบบดีเอ็นเอมะเขือเทศพันธุ์สีดา

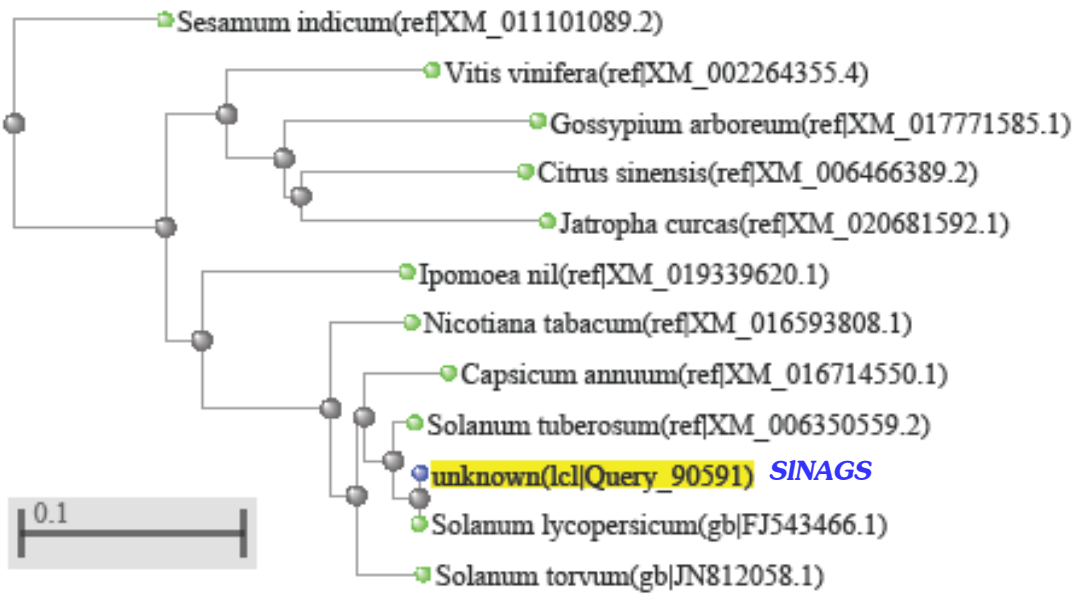
```
   1  atgtcagcttcaccggcaacgccttgtgctccagttattaaacaatgtaagctaccaatt
      M  S  A  S  P  A  T  P  C  A  P  V  I  K  Q  C  K  L  P  I
  61  ttcgctcgcagcgatgtttggacaactccagttgaaaatagtttccaagggaggcgaaag
      F  A  R  S  D  V  W  T  T  P  V  E  N  S  F  Q  G  R  R  K
 121  ttgttatcattaagggttaatttttcgaagagattgtcaattaggtgcggtgtttatggg
      L  L  S  L  R  V  N  F  S  K  R  L  S  I  R  C  G  V  Y  G
 181  gaaacggaaagtgcagctggtttttccgacgtgagcagtgcaataaaagatgacttattc
      E  T  E  S  A  A  G  F  S  D  V  S  S  A  I  K  D  D  L  F
 241  attgggtttttcgagaagcttggccttattttcttgcgcatagaggaagcacttttgtt
      I  G  F  F  R  E  A  W  P  Y  F  L  A  H  R  G  S  T  F  V
 301  gttttaatctcagctgaaattgttgatagtcctcatttggatcatcttcttatggacatc
      V  L  I  S  A  E  I  V  D  S  P  H  L  D  H  L  L  M  D  I
 361  tcgctccttcatggcctgggaatcaagtttgttcttgtacccggaactcatgtccaaatt
      S  L  L  H  G  L  G  I  K  F  V  L  V  P  G  T  H  V  Q  I
 421  gataggtttctggctgaaagaggaagtgagcccaagtatgtaggccgctacagagtaaca
      D  R  F  L  A  E  R  G  S  E  P  K  Y  V  G  R  Y  R  V  T
 481  gaccctgattcactgatggctgcaatggatgcagctggaagaattcgtcttatgatagag
      D  P  D  S  L  M  A  A  M  D  A  A  G  R  I  R  L  M  I  E
 541  gcaaagttgtctccggggccatcattgactggtgtccgccggcatggagaaaatagtcgc
      A  K  L  S  P  G  P  S  L  T  G  V  R  R  H  G  E  N  S  R
 601  tggcatgatggtgttagtgttgctagcggtaattttctagcaatgaagagaagaggagtt
      W  H  D  G  V  S  V  A  S  G  N  F  L  A  M  K  R  R  G  V
 661  gtagaaggaactgattatgcagcgactggtgaagtaaagaagatagacgtttctcgcatt
      V  E  G  T  D  Y  A  A  T  G  E  V  K  K  I  D  V  S  R  I
 721  cgtgagagacttgatcaggatagcattgtgttattaagcaatcttggatattccagctct
      R  E  R  L  D  Q  D  S  I  V  L  L  S  N  L  G  Y  S  S  S
 781  ggagaagttttgaactgcaacacatatgaagttgctacagcttgtgccttggctctagga
      G  E  V  L  N  C  N  T  Y  E  V  A  T  A  C  A  L  A  L  G
 841  gcagagaaactgatttgtattatagatggtccaattctggatgagtctggccgtcttatt
      A  E  K  L  I  C  I  I  D  G  P  I  L  D  E  S  G  R  L  I
 901  cgtttcttgactcttcaagatgctgacatgctggttcgcaaacgagcagaacaaagtgag
      R  F  L  T  L  Q  D  A  D  M  L  V  R  K  R  A  E  Q  S  E
 961  gcagcagctaattatgtaaaagctgtcagtcaagaggacttcaattgtttaggtcacaat
      A  A  A  N  Y  V  K  A  V  S  Q  E  D  F  N  C  L  G  H  N
1021  ggttctaatggatcaatctcttcctacaatatgaatgggtttagccaaaaatacagtgtt
      G  S  N  G  S  I  S  S  Y  N  M  N  G  F  S  Q  K  Y  S  V
1081  tttcagaatggtgttggttttgacaatgggaatgggctttggtctagtgagcagggtttt
      F  Q  N  G  V  G  F  D  N  G  N  G  L  W  S  S  E  Q  G  F
1141  gccattggaggacaagagaggttaagtcgactaaatggttatctttcagagttagctgca
      A  I  G  G  Q  E  R  L  S  R  L  N  G  Y  L  S  E  L  A  A
1201  gctgctttcgtgtgcagaggaggtgttcaacgagttcacctgctggatggtactattggt
      A  A  F  V  C  R  G  G  V  Q  R  V  H  L  L  D  G  T  I  G
1261  ggagttttactaaaggaattgttccaaagagatggagttgggacaatggtagctagtgat
      G  V  L  L  K  E  L  F  Q  R  D  G  V  G  T  M  V  A  S  D
1321  ctttatgaaggaacacgaatggctcggctgtcagatattcccgagatcaaacaattatta
      L  Y  E  G  T  R  M  A  R  L  S  D  I  P  E  I  K  Q  L  L
1381  caacctctagaagagtctggaacattgatcagaaggagcgaggaagagcttgtggaggca
      Q  P  L  E  E  S  G  T  L  I  R  R  S  E  E  E  L  V  E  A
1441  ctgcattcattcattgttgtggagagagaaggccatgttatagcttgtgctgctctctttt
      L  H  S  F  I  V  V  E  R  E  G  H  V  I  A  C  A  A  L  F
1501  ccttactttgaagaaaaatgtggagaggttgctgctattgccgtttctcctgattgtcgt
      P  Y  F  E  E  K  C  G  E  V  A  A  I  A  V  S  P  D  C  R
1561  ggccaaggacaaggagacaaattactagattacatcgagaagaaggcatcatcccttgga
      G  Q  G  Q  G  D  K  L  L  D  Y  I  E  K  K  A  S  S  L  G
1621  ttgcaaatgttgtttctgcttacaactcgcacagctgattggtttgtgaggcgcggtttt
      L  Q  M  L  F  L  L  T  T  R  T  A  D  W  F  V  R  R  G  F
1681  tctgaatgttctatcgaccgtataccagctcaaaaaaggaaaaagatcaatctctctcgt
      S  E  C  S  I  D  R  I  P  A  Q  K  R  K  K  I  N  L  S  R
1741  aggtcaaagtactacatgaagaagctgctacctgatagaagtggtatacgctttgacaac
      R  S  K  Y  Y  M  K  K  L  L  P  D  R  S  G  I  R  F  D  N
1801  ccctttcataa
      P  F  S  *
```

ภาพที่ 6 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *N-acetylglutamate synthase* (*NAGS*) ในส่วนที่มีการแสดงออก

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *N-acetylglutamate synthase* (*NAGS*) ที่โคลนได้จากมะเขือเทศพันธุ์สีดากับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank บนอินเทอร์เน็ตโปรแกรม www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Identities	Accession
Solanum lycopersicum N-acetylglutamate synthase mRNA, complete cds	3263	3263	100%	0.0	99%	FJ543466.1
Solanum tuberosum probable amino-acid acetyltransferase NAGS1, chloroplastic (LOC102598178),transcript variant X2, mRNA	3092	3092	100%	0.0	98%	XM006350559.2
Solanum torvum N-acetylglutamate synthase (NAGS) mRNA, complete cds	2771	2771	100%	0.0	94%	JN812058.1
Nicotiana tabacum probable amino-acid acetyltransferase NAGS1, chloroplastic (LOC107774310),transcript variant X3, mRNA	2486	2486	94%	0.0	92%	XM016593808.1
Nicotiana sylvestris probable amino-acid acetyltransferase NAGS1, chloroplastic (LOC104246911),transcript variant X2, mRNA	2486	2486	94%	0.0	92%	XM009802820.1
Capsicum annuum probable amino-acid acetyltransferase NAGS1, chloroplastic (LOC107868013),transcript variant X1, mRNA	2360	2360	85%	0.0	94%	XM016714550.1

เมื่อนำข้อมูลยีน *N-acetylglutamate synthase* (*NAGS*) จากมะเขือเทศมาศึกษาความสัมพันธ์กับยีน *NAGS* ในพืชชนิดต่างๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/ treeView.cgi) พบว่า ยีน *NAGS* ที่สังเคราะห์ได้จากมะเขือเทศ (*Solanum lycopersicum* L.) มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับพืชกลุ่มใบเลี้ยงคู่ ได้แก่ มันฝรั่ง (*solanum tuberosum* L.) และ มะเขือพวง (*Solanum torvum* L.) มากกว่าพืชกลุ่มใบเลี้ยงคู่ ได้แก่ งา (*Sesamum indicum* L.) และ องุ่น (*Vitis vinifera* L.) **(ภาพที่ 7)**

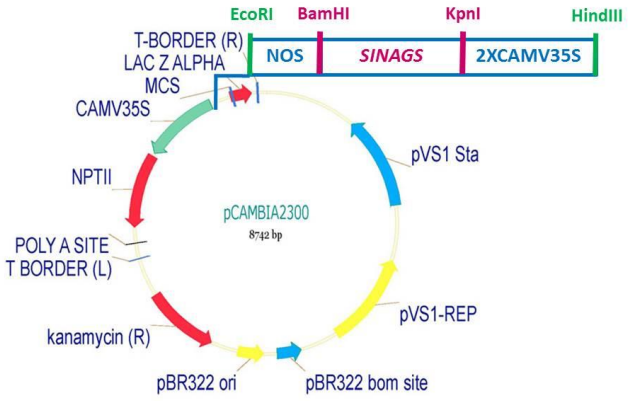


ภาพที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างยีน *N-acetylglutamate synthase* (*NAGS*) ที่โคลนได้จากมะเขือเทศ เปรียบเทียบกับพืชชนิดต่างๆ โดยใช้โปรแกรม www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/treeView.cgi

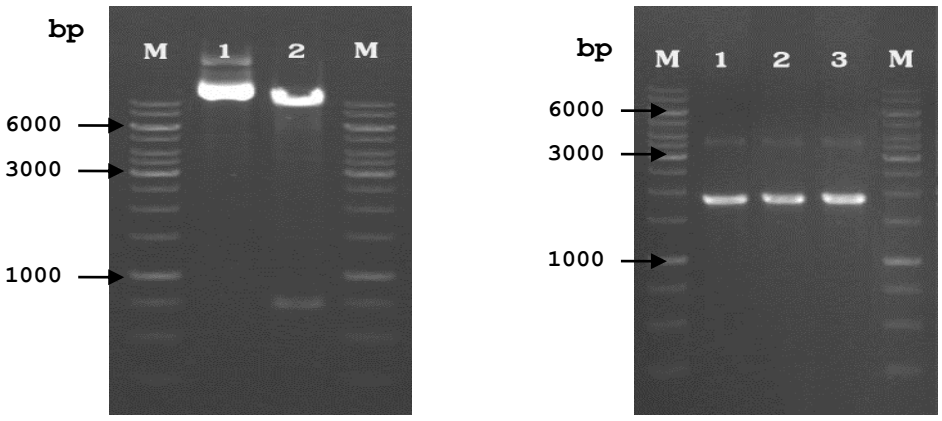
3. การสร้างชุด cassette ยีน และการตรวจสอบการปรากฏของยีน *SINAGS* ใน Plant Expression Vector

นำชิ้นยีน *SINAGS* ที่สังเคราะห์ได้ มีขนาด 1,812 คู่เบส มาเชื่อมต่อเข้ากับ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) **(ภาพที่ 8)** ขนาดประมาณ 9,640 คู่เบส ซึ่งผ่านการทำ double digestion ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I **(ภาพที่ 9ก และ 9ข)** โดยที่ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ (35SCaMV) และเทอร์มิเนเตอร์ (NOS) เป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีน และมียีน NPTII (kanamycin) เป็นยีนคัดเลือก จากนั้นตรวจสอบการปรากฏของยีน *SINAGS* ซึ่งมีด้วยกัน 2 วิธี วิธีแรกคือ การตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse) พบว่า สามารถทำปฏิกิริยาได้แถบดีเอ็นเอของยีน *SINAGS* ขนาดประมาณ 1.8 กิโลเบส **(ภาพที่ 10ก)** และวิธีที่สองคือ การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I พบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ถูกต้องจำนวน 2 แถบ ได้แก่ ขนาด 1.8 และ

9.6 กิโลเบส ตามลำดับ **(ภาพที่ 10ข)** โดยโครงสร้างของพลาสมิดสายผสมที่มีความสมบูรณ์สามารถเชื่อมต่อชิ้นยีน *SINAGS* เข้ากับ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300 – *SINAGS*) จะมีขนาดประมาณ 11.5 กิโลเบส **(ภาพที่ 11)**



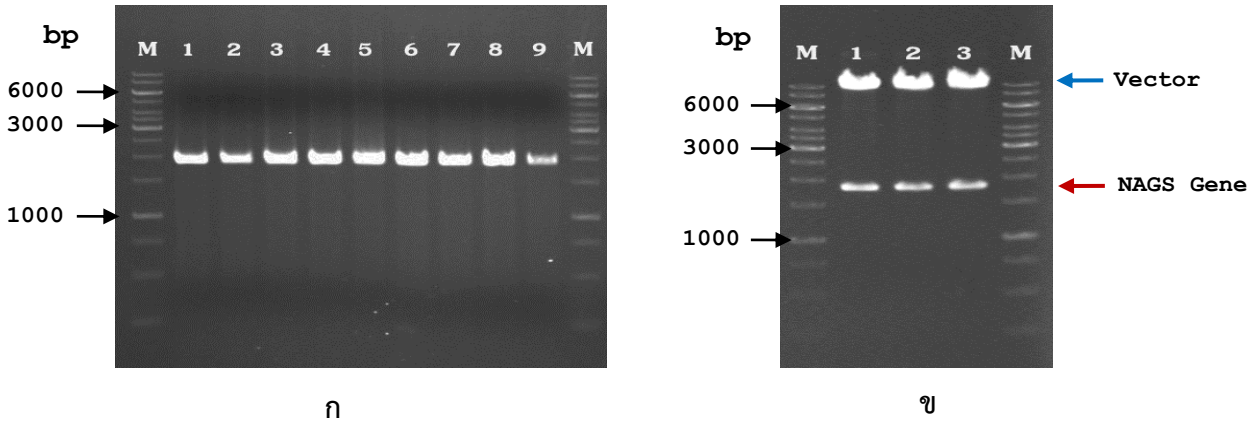
ภาพที่ 8 แผนที่ของ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) และตำแหน่งในการเชื่อมต่อชิ้นยีน *N-acetylglutamate synthase* (*NAGS*)



ก ข

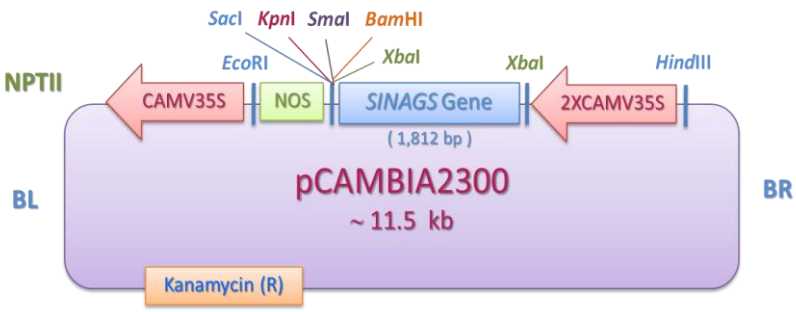
ภาพที่ 9 ก. แสดงแถบดีเอ็นเอของ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = แถบดีเอ็นเอของ pCAMBIA2300, Lane 2 = แถบดีเอ็นเอของ pCAMBIA2300 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I

ข. แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน *NAGS* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = แถบดีเอ็นเอของมะเขือเทศพันธุ์เชอรี่, Lane 2 = แถบดีเอ็นเอของมะเขือเทศพันธุ์ท้อ, Lane 3 = แถบดีเอ็นเอของมะเขือเทศพันธุ์สีดา



ภาพที่ 10 ก. แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR กับโคโลนีที่คาดว่ามีพลาสมิดสายผสม pCAMBIA2300 – *SINAGS* โดยใช้ไพรเมอร์ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse), Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-3 = แถบดีเอ็นเอของมะเขือเทศพันธุ์เชอรี่, Lane 4-6 = แถบดีเอ็นเอของมะเขือเทศพันธุ์ท้อ, Lane 7-9 = แถบดีเอ็นเอของมะเขือเทศพันธุ์สีดา

ข. แสดงรูปแบบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pCAMBIA2300 – *SINAGS* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = รูปแบบแถบดีเอ็นเอของมะเขือเทศพันธุ์เชอรี่, Lane 2 = รูปแบบแถบดีเอ็นเอของมะเขือเทศพันธุ์ท้อ, Lane 3 = รูปแบบแถบดีเอ็นเอของมะเขือเทศพันธุ์สีดา



ภาพที่ 11 แสดงโครงสร้างพลาสมิดสายผสม pCAMBIA2300 – *SINAGS*

สรุปผลการทดลอง

การโคลนยีน *N-acetylglutamate synthase* (*NAGS*) ในส่วนของยีนทั้งจีโนมจากจีโนมิกดีเอ็นเอของมะเขือเทศ จำนวน 3 พันธุ์ ได้แก่ เชอรี่ ท้อ และสีดา พบว่า ยีนที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาด 9,345 คู่เบส เมื่อนำไปวิเคราะห์โครงสร้างของยีนด้วยโปรแกรม Software GenScan บนอินเทอร์เน็ต พบว่า ยีน *SINAGS* มีส่วนประกอบครบทั้งยีน ซึ่งประกอบด้วย ลำดับเบสในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน Open Reading Frame (ORF) จำนวน 10 exons

การโคลนยีน *NAGS* ในส่วนของยีนที่มีการแสดงออกจากอาร์เอ็นเอรวมของมะเขือเทศทั้ง 3 พันธุ์ ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยนำข้อมูลยีนที่ได้มาออกแบบไพรเมอร์ในส่วนของยีนที่มีการแสดงออกทางปลาย 5’ และ 3’ พบว่า ยีนที่สังเคราะห์ได้มีขนาด 1,812 คู่เบส และสามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน (ORF) ของยีน *NAGS* จำนวน 604 amino acid เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ยีนที่ได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน *N-acetylglutamate synthase* (*NAGS*) ที่พบในมะเขือเทศ (*Solanum lycopersicum*) (FJ543466.1) และ มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) (XM_006350559.2) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 99% และ 98% ตามลำดับ

การสร้างพลาสมิดสายผสม โดยการเชื่อมต่อชิ้นยีน *SINAGS* เข้ากับ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ 35SCaMV และเทอร์มิเนเตอร์ NOS ได้พลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pCAMBIA2300– *SINAGS* มีขนาดประมาณ 11.5 กิโลเบส ตรวจสอบผลการปรากฏของยีน *SINAGS* โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และเทคนิค PCR พบว่า สามารถสร้างพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมที่มีความสมบูรณ์ ได้จำนวน 9 โคลน ซึ่งยีนชุดยีน pCAMBIA2300 – *SINAGS* ที่โคลนได้สามารถนำไปใช้ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืช เพื่อเพิ่มศักยภาพในการให้ผลผลิตและสามารถทนทานต่อสภาวะขาดน้ำได้ อีกทั้งยังเป็นพืชทางเลือกในการเร่งรัดกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชในอนาคตได้

การนำไปใช้ประโยชน์

การโคลนยีน *N-acetylglutamate synthase* (*NAGS*) ที่เกี่ยวข้องกับการทนต่อสภาวะขาดน้ำ และการสร้างชุด cassette ยีน ซึ่งชุดยีนที่ได้อยู่ในรูปของพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมที่มีความสมบูรณ์ (pCAMBIA2300 – *SINAGS*) สามารถนำชุดยีนที่นำไปศึกษาการแสดงออกของยีนในพืชต้นแบบ เพื่อศึกษาข้อมูลของยีนในด้านต่างๆ ก่อนที่จะนำไปถ่ายฝากเข้าสู่พืชเศรษฐกิจ เช่น อ้อย มันสำปะหลัง ข้าวโพด เป็นต้น เพื่อเพิ่มศักยภาพในการให้ผลผลิตและสามารถทนทานต่อสภาวะขาดน้ำได้ อีกทั้งยังเป็นพืชทางเลือกในการเร่งรัดกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชในอนาคตได้

เอกสารอ้างอิง

Akashi, K., C. Miyake adn A. Yokota. 2001. Citrulline, a novel compatible solute in drought-tolerant wild watermelon leaves, is an efficient hydroxyl radical scavenger. *FEBS Lett.* 508: 438 – 442.

Caldovic, L., H. Morizono, Y. Daikhin, I. Nissim, R. J. McCarter, M. Yudkoff and M. Tuchman. 2004. Restoration of ureagenesis in N-acetylglutamate synthase deficiency by N-carbamyl glutamate. *J. Ped.* 145(4): 552 – 554.

Kalamaki M. S., D. Alexandrou, D. Lazari., G. Merkouropoulos, V. Fotopoulos, I. Pateraki, A. Aggelis, A. Carrillo-Lopez, M. J. Rubio-Cabetas and A. K. Kanellis. 2009. Over-expression of a tomato *N*-acetyl-L-glutamate synthase gene (*SINAGS1*) in *Arabidopsis thaliana* results in high ornithine levels and increased tolerance in salt and drought stresses. *Journal of Experimental Botany*. 60(6): 1859 – 1871.

McCudden, C.R. and Powers-Lee, S.G. 1996. Required Allosteric Effector Site for N-Acetylglutamate on Carbamoyl-Phosphate Synthetase I. *J. Bio. Chem*. 271(30): 18285 – 18294.

Meijer, A.J., C. Lof, I.C. Ramos, A.J. Verhoeven. 1985. Control of ureagenesis. *Eur. J. Biochem*. 148: 189 – 196.

Shargool, P. D., J. C. Jain and G. McKay. 1988. Ornithine biosynthesis, and arginine biosynthesis and degradation in plant cells. *Phytochemistry*. 27: 1571 – 1574.

Slocum, R. D. 2005. Genes, enzymes and regulation of arginine biosynthesis in plants. Plant *Physiol Biochem*. 43: 729 – 745.

Yokota, A., S. Kawasaki, M. Iwano, C. Nakamura, C. Miyake and K. Akashi. 2002. Citrulline and DRIP-1 protein (ArgE homologue) in drought tolerance of wild watermelon. *Ann Bot.* 89: 825 – 832.

Solanum lycopersicum N-acetyl-glutamate synthase mRNA, complete cds

Sequence ID: FJ543466.1 **Length:** 2226 **Number of Matches:** 1

Range 1: 133 to 1944 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
3263 bits(3618)	0.0	1811/1812(99%)	0/1812(0%)	Plus/Plus

```
Query  1     ATGTCAGCTTCACCGGCAACGCCTTGTGCTCCAGTTATTAAACAATGTAAGCTACCAATT  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  133   ATGTCAGCTTCACCGGCAACGCCTTGTGCTCCAGTTATTAAACAATGTAAGCTACCAATT  192

Query  61    TTCGCTCGCAGCGATGTTTGGACAACTCCAGTTGAAAATAGTTTCCAAGGGAGGCGAAAG  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  193   TTCGCTCGCAGCGATGTTTGGACAACTCCAGTTGAAAATAGTTTCCAAGGGAGGCGAAAG  252

Query  121   TTGTTATCATTAAGGGTTAATTTTTCGAAGAGATTGTCAATTAGGTGCGGTGTTTATGGG  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  253   TTGTTATCATTAAGGGTTAATTTTTCGAAGAGATTGTCAATTAGGTGCGGTGTTTATGGG  312

Query  181   GAAACGGAAAGTGCAGCTGGTTTTTCCGACGTGAGCAGTGCAATAAAAGATGACTTATTC  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  313   GAAACGGAAAGTGCAGCTGGTTTTTCCGACGTGAGCAGTGCAATAAAAGATGACTTATTC  372

Query  241   ATTGGGTTTTTTCGAGAAGCTTGGCCTTATTTTCTTGCGCATAGAGGAAGCACTTTTGTT  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  373   ATTGGGTTTTTTCGAGAAGCTTGGCCTTATTTTCTTGCGCATAGAGGAAGCACTTTTGTT  432

Query  301   GTTTTAATCTCAGCTGAAATTGTTGATAGTCCTCATTTGGATCATCTTCTTATGGACATC  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||
Sbjct  433   GTTTTAATCTCAGCTGAAATTGTTGATAGTCCTCATTTGGATCATCTTCTTATGGATATC  492

Query  361   TCGCTCCTTCATGGCCTGGGAATCAAGTTTGTTCTTGTACCCGGAACTCATGTCCAAATT  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  493   TCGCTCCTTCATGGCCTGGGAATCAAGTTTGTTCTTGTACCCGGAACTCATGTCCAAATT  552

Query  421   GATAGGTTTCTGGCTGAAAGAGGAAGTGAGCCCAAGTATGTAGGCCGCTACAGAGTAACA  480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  553   GATAGGTTTCTGGCTGAAAGAGGAAGTGAGCCCAAGTATGTAGGCCGCTACAGAGTAACA  612

Query  481   GACCCTGATTCACTGATGGCTGCAATGGATGCAGCTGGAAGAATTCGTCTTATGATAGAG  540
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  613   GACCCTGATTCACTGATGGCTGCAATGGATGCAGCTGGAAGAATTCGTCTTATGATAGAG  672

Query  541   GCAAAGTTGTCTCCGGGGCCATCATTGACTGGTGTCCGCCGGCATGGAGAAAATAGTCGC  600
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  673   GCAAAGTTGTCTCCGGGGCCATCATTGACTGGTGTCCGCCGGCATGGAGAAAATAGTCGC  732

Query  601   TGGCATGATGGTGTTAGTGTTGCTAGCGGTAATTTTCTAGCAATGAAGAGAAGAGGAGTT  660
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  733   TGGCATGATGGTGTTAGTGTTGCTAGCGGTAATTTTCTAGCAATGAAGAGAAGAGGAGTT  792

Query  661   GTAGAAGGAACTGATTATGCAGCGACTGGTGAAGTAAAGAAGATAGACGTTTCTCGCATT  720
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  793   GTAGAAGGAACTGATTATGCAGCGACTGGTGAAGTAAAGAAGATAGACGTTTCTCGCATT  852

Query  721   CGTGAGAGACTTGATCAGGATAGCATTGTGTTATTAAGCAATCTTGGATATTCCAGCTCT  780
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  853   CGTGAGAGACTTGATCAGGATAGCATTGTGTTATTAAGCAATCTTGGATATTCCAGCTCT  912

Query  781   GGAGAAGTTTTGAACTGCAACACATATGAAGTTGCTACAGCTTGTGCCTTGGCTCTAGGA  840
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  913   GGAGAAGTTTTGAACTGCAACACATATGAAGTTGCTACAGCTTGTGCCTTGGCTCTAGGA  972

Query  841   GCAGAGAAACTGATTTGTATTATAGATGGTCCAATTCTGGATGAGTCTGGCCGTCTTATT  900
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  973   GCAGAGAAACTGATTTGTATTATAGATGGTCCAATTCTGGATGAGTCTGGCCGTCTTATT  1032

Query  901   CGTTTCTTGACTCTTCAAGATGCTGACATGCTGGTTCGCAAACGAGCAGAACAAAGTGAG  960
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1033  CGTTTCTTGACTCTTCAAGATGCTGACATGCTGGTTCGCAAACGAGCAGAACAAAGTGAG  1092

Query  961   GCAGCAGCTAATTATGTAAAAGCTGTCAGTCAAGAGGACTTCAATTGTTTAGGTCACAAT  1020
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1093  GCAGCAGCTAATTATGTAAAAGCTGTCAGTCAAGAGGACTTCAATTGTTTAGGTCACAAT  1152

Query  1021  GGTTCTAATGGATCAATCTCTTCCTACAATATGAATGGGTTTAGCCAAAAATACAGTGTT  1080
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1153  GGTTCTAATGGATCAATCTCTTCCTACAATATGAATGGGTTTAGCCAAAAATACAGTGTT  1212

Query  1081  TTTCAGAATGGTGTTGGTTTTGACAATGGGAATGGGCTTTGGTCTAGTGAGCAGGGTTTT  1140
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1213  TTTCAGAATGGTGTTGGTTTTGACAATGGGAATGGGCTTTGGTCTAGTGAGCAGGGTTTT  1272

Query  1141  GCCATTGGAGGACAAGAGAGGTTAAGTCGACTAAATGGTTATCTTTCAGAGTTAGCTGCA  1200
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1273  GCCATTGGAGGACAAGAGAGGTTAAGTCGACTAAATGGTTATCTTTCAGAGTTAGCTGCA  1332

Query  1201  GCTGCTTTCGTGTGCAGAGGAGGTGTTCAACGAGTTCACCTGCTGGATGGTACTATTGGT  1260
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1333  GCTGCTTTCGTGTGCAGAGGAGGTGTTCAACGAGTTCACCTGCTGGATGGTACTATTGGT  1392

Query  1261  GGAGTTTTACTAAAGGAATTGTTCCAAAGAGATGGAGTTGGGACAATGGTAGCTAGTGAT  1320
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1393  GGAGTTTTACTAAAGGAATTGTTCCAAAGAGATGGAGTTGGGACAATGGTAGCTAGTGAT  1452

Query  1321  CTTTATGAAGGAACACGAATGGCTCGGCTGTCAGATATTCCCGAGATCAAACAATTATTA  1380
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1453  CTTTATGAAGGAACACGAATGGCTCGGCTGTCAGATATTCCCGAGATCAAACAATTATTA  1512

Query  1381  CAACCTCTAGAAGAGTCTGGAACATTGATCAGAAGGAGCGAGGAAGAGCTTGTGGAGGCA  1440
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1513  CAACCTCTAGAAGAGTCTGGAACATTGATCAGAAGGAGCGAGGAAGAGCTTGTGGAGGCA  1572

Query  1441  CTGCATTCATTCATTGTTGTGGAGAGAGAAGGCCATGTTATAGCTTGTGCTGCTCTCTTT  1500
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1573  CTGCATTCATTCATTGTTGTGGAGAGAGAAGGCCATGTTATAGCTTGTGCTGCTCTCTTT  1632

Query  1501  CCTTACTTTGAAGAAAAATGTGGAGAGGTTGCTGCTATTGCCGTTTCTCCTGATTGTCGT  1560
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1633  CCTTACTTTGAAGAAAAATGTGGAGAGGTTGCTGCTATTGCCGTTTCTCCTGATTGTCGT  1692

Query  1561  GGCCAAGGACAAGGAGACAAATTACTAGATTACATCGAGAAGAAGGCATCATCCCTTGGA  1620
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1693  GGCCAAGGACAAGGAGACAAATTACTAGATTACATCGAGAAGAAGGCATCATCCCTTGGA  1752

Query  1621  TTGCAAATGTTGTTTCTGCTTACAACTCGCACAGCTGATTGGTTTGTGAGGCGCGGTTTT  1680
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1753  TTGCAAATGTTGTTTCTGCTTACAACTCGCACAGCTGATTGGTTTGTGAGGCGCGGTTTT  1812

Query  1681  TCTGAATGTTCTATCGACCGTATACCAGCTCaaaaaaggaaaaaGATCAATCTCTCTCGT  1740
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1813  TCTGAATGTTCTATCGACCGTATACCAGCTCAAAAAAGGAAAAAGATCAATCTCTCTCGT  1872

Query  1741  AGGTCAAAGTACTACATGAAGAAGCTGCTACCTGATAGAAGTGGTATACGCTTTGACAAC  1800
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1873  AGGTCAAAGTACTACATGAAGAAGCTGCTACCTGATAGAAGTGGTATACGCTTTGACAAC  1932

Query  1801  CCCTTTTCATAA  1812
             ||||||||||||
Sbjct  1933  CCCTTTTCATAA  1944
```

ภาพผนวกที่ 1 การวิเคราะห์ alignment ระหว่างลำดับเบสของยีน *N-acetylglutamate synthase* (*NAGS*) ของมะเขือเทศที่ accession number FJ543466.1 กับ ลำดับเบสของยีน *NAGS* ที่โคลนได้