แบบรายงานเรื่องเต็ม ผลการวิจัยที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2557

1. แผนงานวิจัย การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

2. โครงการวิจัย การค้นหาและศึกษาหน้าที่ของยีนฺมีประโยชน์ทางการเกษตร

3. กิจกรรม วิจัยชีวโมเลกุล(Molecular Biology)ในการปรับปรุงพันธุ์

กิจกรรมย่อย การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรม

ชื่อการทดลอง การโคลนยีน Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H)จากอัญชัน และ พิทูเนีย

Cloning of Flavonoid 3',5' hydroxylase Gene from Butterfly Pea and Pitunia.

การโคลนยีน Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H)จากอัญชัน และ พิทูเนีย

Cloning of Flavonoid 3',5' hydroxylase Gene from Butterfly Pea and Pitunia.

4. คณะผู้ดำเนินงาน

นางสาวกุหลาบ คงทอง นายประสาน สืบสุข นางสาวจีราพร แก่นทรัพย์

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อ.ธัญบุรี จ. ปทุมธานี โทร (02) 9046885-95

---

5. บทคัดย่อ

ยีน *Flavonoid 3',5' hydroxylase* (*F3'5'H*) เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มรงควัตถุแอนโทไซยานินสีน้ำเงินหรือสีม่วง ในงานวิจัยนี้ได้ทำการโคลนยีน *F3'5'H* ที่จากดอกอัญชันและพิทูเนียสีน้ำเงิน โดยทำการสืบค้นข้อมูลออกแบบไพรเมอร์และเพิ่มปริมาณยีน *F3'5'H* จากดอกอัญชันและพิทูเนีย พบว่ายีนที่โคลนได้มีขนาด 1,739 และ 1852 bp. ตามลำดับ สามารถสร้างชุดยีน pMDC32- *F3'5'H*. และโดยนำยีน *F3'5'H* ที่โคลนได้เข้าสู่เวคเตอร์ pDONR 221 เพื่อนำยีนเข้าสู่เวคเตอร์แบบไบนารี่ pMDC32 แล้วทำการถ่ายฝากเข้าสู่ยาสูบพันธุ์แซนเทียร์โดยใช้อะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ LBA4404 คัดเลือกต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนโดยเลี้ยงในอาหารที่เติม hygromycin และตรวจสอบต้นยาสูบที่ได้รับการคัดเลือกด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ พบว่าการถ่ายฝากยีน *F3'5'H* เข้าสู่ยาสูบประสบผลสำเร็จ ต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *F3'5'H* ดอกจะมีสีม่วงชมพู ส่วนต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายฝากยีนดอกจะมีสีขาวอมชมพู ยีน *F3'5'H* นี้สามารถนำมาใช้ถ่ายฝากสู่ไม้ดอกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเพื่อปรับแต่งสีดอกให้มีความหลากหลายมากขึ้นในโอกาสต่อไป

รหัสการทดลอง 03-07-54-03-00-00-02-54

ABSTRACT

Flavonoid 3',5' hydroxylase (*F3'5'H*) gene is involved in flavonoid pathway leading to the production of the blue or purple-colored anthocyanins. In this study, *F3'5'H* was cloned from *Clitoria ternatea* and *Pitunia hybrida* into binary vector, pMDC32, generating pMDC32- *F3'5'H*. The pMDC32- *F3'5'H* was introduced into the *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404. *Nicotiana tabacum cv. Xanthi* transformation was performed using the *A. tumefaciens*. The transformed *N. tabacum was selected* on media containing hygromycin. The transgenic *N. tabacum* plants were

subjected to PCR analysis using specific primers. The results showed that the transformation of *F3'5'H* into *N. tabacum* was successful. The transgenic *N. tabacum* flowers displayed light purple or pink color while non-transgenic *N. tabacum* flowers was pinky white. *F3'5'H* cloned in this study will be useful in modification of flower colors in economically important flowering-plants.

6. คำนำ

ประเทศไทยผลิตไม้ดอกเพื่อใช้ภายในประเทศ และการส่งออกทำรายได้เข้าประเทศเป็นจำนวนมากในแต่ละปี และมีแนวโน้มจะขยายตัวเพิ่มขึ้น เนื่องจากตลาดไม้ดอกเป็นตลาดที่มีผู้ค้าจำนวนมาก มีการแข่งขันสูง ดังนั้นการพัฒนาศักยภาพการผลิตไม้ดอกเพื่อส่งออกจึงเป็นสิ่งจำเป็น ผู้ผลิตต้องเอาใจใส่และตอบสนองความต้องการของลูกค้าในทุกรูปแบบ ปัจจุบันลูกค้าให้ความสำคัญกับสีสันของดอกไม้เป็นอันดับแรก ผู้ผลิตจึงต้องสร้างความแปลกใหม่ในตัวสินค้า เพื่อรักษาและเพิ่มส่วนแบ่งการตลาดให้ได้มากที่สุด ซึ่งวิธีสร้างความหลากหลายด้านสีดอกเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค แนวทางการสร้างสายพันธุ์ใหม่ให้มีดอกสีสรรโดดเด่น แปลกใหม่ สวยงาม มีความหลากหลายของสีดอก และมีโทนสีที่ไม่เคยปรากฏในธรรมชาตินั้น สามารถกระทำได้โดยใช้เทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรม ซึ่งเป็นการนำการวิจัยทางชีวโมเลกุลมาประยุกต์ใช้ร่วมกับงานด้านการปรับปรุงพันธุ์พืชสมัยใหม่ ที่สามารถนำยีนควบคุมการเกิดสีดอกจากไม้ดอกชนิดอื่นที่มีโทนสีตามต้องการ ส่งถ่ายเข้าไปสู่ไม้ดอกที่สำคัญหรือยับยั้งการแสดงออกของยีนที่มีอยู่ ในต่างประเทศมีการทำการวิจัยอย่างจริงจังเกี่ยวกับปัจจัยในการควบคุมสี โดยยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ควบคุมการเกิดสีในวัฏจักรการสังเคราะห์รงควัตถุ anthocyanin เป็นยีนที่ได้รับความสนใจมาก มีเอนไซม์ที่ควบคุมการสร้าง pelargonidin cyanidin และ delphinidin ซึ่งเป็นรงควัตถุให้สีส้ม แดง และสีน้ำเงินตามลำดับ (ปิยะศักดิ์ 2542, Brugliera *et al*.1999, Eric *et al*.2001) ยีนเหล่านี้สามารถแยกได้จากดอกไม้สีต่างๆ และถ่ายสู่พืชในวัฏจักรที่ขาดยีนในกลุ่มดังกล่าวได้โดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม บทบาทของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนสร้างรงควัตถุในวัฏจักร anthocyanin มีความสำคัญยิ่งกับสีของดอกไม้ การวิจัยเชิงลึกชี้ย้ำถึงบทบาทและหน้าที่ของยีนต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง และความสำคัญในการพัฒนาสีแต่ละสีของดอกไม้ ความรู้พื้นฐานนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในวงกว้างกับไม้ดอกหลายชนิด ทำให้ได้รับความสนใจศึกษากันมาก (Biolley *et a*l.1994; Holton and Cornish 1995; Mol *et al*.1988; Kaltenback *et al*. 1999) มีงานวิจัยเพื่อปรับปรุงพันธุ์ไม้ดอกให้มีสีสันสวยงามเป็นจำนวนมาก พบว่าสีของดอกไม้ส่วนใหญ่เกิดจากพืชสะสม anthocyanin (Katsumoto *et al*.,2007) เช่นTanaka and Ohmiya (2008) สามารถเปลี่ยนดอกกุหลาบสีแดง ให้เป็นสีม่วงได้ โดยเพิ่มการแสดงออกของยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ F3'5'H จากดอก Pansy เป็นต้น *Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H)* เป็นเอนไซม์หลักที่สำคัญในกระบวนสร้างรงควัตถุในวัฏจักร anthocyanin ในส่วนที่ควบคุมให้ดอกไม้เกิดสีน้ำเงินและม่วง โดยเปลี่ยน Dihydrokaempferol (DHK) เป็น Dihydromyricetin (DHM) และนำไปสู่การสร้างสารประกอบ Delphinidin ซึ่งทำให้ดอกไม้มีสีน้ำเงินและม่วง (Katsumoto et al.,2007,He *et al*.,2013)

อัญชันและพิทูเนียเป็นพืชที่มีดอกสีน้ำเงิน มีการสังเคราะห์สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มรงควัตถุแอนโทไซยานินสีน้ำเงินค่อนข้างสูง ซึ่งรงควัตถุดังกล่าวจะเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์จากยีน *F3′ 5′H* งานวิจัยนี้ได้โคลนยีน *F3′ 5′H* จาก cDNA ของดอกอัญชันและพิทูเนียสีน้ำเงิน และนำยีนที่โคลนได้เข้าสู่เวคเตอร์แบบไบนารี่ pMDC32 เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ไม้ดอกชนิดต่างๆ ซึ่งก่อนจะนำยีนที่โคลนได้ไปใช้นั้นจะต้องมีการตรวจสอบเพื่อให้ทราบผลของยีน *F3′ 5′H* ที่ทำให้สีของดอกเปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นจึงทำการถ่ายฝากยีน *Flavonoid 3′,5′ hydroxylase* จากอัญชันเข้าสู่ยาสูบดอกสีขาวอมชมพู เพื่อดูผลของยีน *F3′ 5′H* จากดอกอัญชันที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงสีดอกของยาสูบ และสามารถประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ โดยการนำมาใช้ถ่ายฝากยีนสู่ไม้ดอกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเพื่อปรับแต่งสีดอกให้มีความหลากหลายมากขึ้นในโอกาสต่อไป

7. วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

อุปกรณ์

สารเคมีสำหรับใช้ในงานเครื่องหมายโมเลกุล

1. อัญชันดอกสีน้ำเงิน และดอกพิทูเนีย
2. ยาสูบพันธุ์ แซนเทียร์ (ดอกสีขาวอมชมพู)
3. Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma)
4. DNase I Amplification Grade (Invitrogen life technology)
5. SuperScrip III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen life technology)
6. QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)
7. pGEM-T Easy Vector System (Promega)
8. BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Appliedbiosystems)
9. สารปฏิชีวนะ เช่น ampicillin cefotaxime hygromycin
10. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย
11. เชื้อแบคทีเรีย Escherichia coli สายพันธุ์ JM109
12. เวคเตอร์ pDONR 221 (invitrogen)
13. pMDC32 binary vector
14. เครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอนความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (SORVALL RC28C)
15. เครื่องมือวัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D.) เครื่อง spectrophotometer
16. ชุดถ่ายภาพเจลและประมวลผล Gel documentation (BIORAD)
17. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (GeneAmp PCR System 9700)
18. เครื่องวิเคราะห์ลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรม (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer)

19. เครื่องมือสำหรับงานถ่ายยีน BTX Electroporation System รุ่น ELECTRO CELL MANIPULATOR 600 ,Electroporation cuvette ขนาด 0.2 มิลลิลิตร
20. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย
21. เชื้อแบคทีเรีย Escherichia coli สายพันธุ์ JM109
22. เวคเตอร์ pDONR 221 (invitrogen)
23. pMDC32 binary vector
24. เครื่องมือ และสารเคมีอื่น ๆ สำหรับงานชีวโมเลกุล

วิธีการทดลอง

การโคลนยีน

1. การสืบค้นข้อมูลยีน และออกแบบไพรเมอร์

สืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์ *Flavonoid 3',5' hydroxylase* (*F3'5'H*) ของดอกอัญชันและดอกพิทูเนียสีน้ำเงิน ที่มีรายงานในฐานข้อมูลสาธารณะ NCBI นำข้อมูลลำดับเบสที่ได้มาวิเคราะห์หาตำแหน่งที่เหมาะสมในการออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้โปรแกรม Vector NTI (ชนิดระบุระยะเวลาการใช้งาน) เพื่อโคลนยีน *F3'5'H*

2. การโคลนชิ้นส่วนของยีน *F3'5'H* จากดอกอัญชันและพิทูเนีย

2.1 การสกัด Total RNA

นำตัวอย่างดอกหน้าอัญชันและพิทูเนียในระยะเริ่มเกิดสีน้ำเงิน มาตัดดอกเป็นชิ้นเล็ก ๆ น้ำหนัก 100 มิลลิกรัมด้วยมีดผ่าตัดที่ปลอดเชื้อ และนำมาสกัด Total RNA ตามวิธีการของ Spectrum Plant Total RNA Kit (Sigma) นำสารละลาย Total RNA ที่ได้ไปหาปริมาณและความบริสุทธิ์ของ RNA โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer และตรวจสอบดูแถบ RNA ด้วย 1.5% Agarose gel electrophoresis ที่ย้อมด้วย GelStar แล้วนำไปใช้หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –80 °C เพื่อนำไปใช้ต่อไป

2.2 การสังเคราะห์สาย cDNA และเพิ่มปริมาณยีน *F3'5'H* การสังเคราะห์สาย cDNA จาก mRNA ของยีน *F3'5'H* ด้วยเทคนิค RT-PCR นั้น จะต้องทำการกำจัดดีเอ็นเอที่อาจจะปะปนอยู่ใน Total RNA ก่อน โดยใช้ DNase I Amplification Grade (Invitrogen life technology)

ทำการสังเคราะห์สาย cDNA จาก Total RNA ของดอกอัญชันและพิทูเนียโดยใช้ SuperScrip III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen life technology) ที่มีการเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา RNA/primer mixture ในหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยTotal RNA 1 ไมโครลิตร, Oligo(dT)20 primer 1ไมโครลิตร, 10mM dNTP mix 1ไมโครลิตร, DEPC-treated water 7 ไมโครลิตร รวมปริมาตร10 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C นาน 5 นาที และนำไปไว้ในน้ำแข็งทันทีอย่างน้อยเป็นเวลานาน 1 นาที ในระหว่างนั้นให้เตรียมส่วนผสม cDNA

Synthesis mix ซึ่งส่วนผสมประกอบด้วย 10xRTbuffer 2 ไมโครลิตร, 25 mM $MgCl_2$ 4 ไมโครลิตร, 0.1M DTT 2 ไมโครลิตร, RNaseOUT (40 U/ul) 1 ไมโครลิตร, SuperScrip III RT (200 U/ul) 1 ไมโครลิตร

เติม cDNA Synthesis mix ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงใน RNA/primer mixture ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เวลานาน 50 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 85 °C นาน 5 นาที จากนั้นในไปแช่ในน้ำแข็งทันที เติม RNase H ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 20 นาที หลังจากนั้นสามารถนำปฏิกิริยา cDNA Synthesis ไปใช้ทันที หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ- 20 °C เพื่อไปใช้ทำพีซีอาร์ต่อไป

การเพิ่มปริมาณยีน *F3'5'H* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยการเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาในหลอดพีซีอาร์ ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย 10X PCR Buffer 2 ไมโครลิตร, 10mM dNTP 0.4 ไมโครลิตร, 50 mM $MgCl_2$ 0.6 ไมโครลิตร,5 uM Forward Primer (*F3'5'H*) 2 ไมโครลิตร, 5 uM Reverse Primer (*F3'5'H*) 2 ไมโครลิตร, cDNA Template 1ไมโครลิตร, 5 U/ul Platinum *Taq* DNA Polymerase 0.2 ไมโครลิตร, DEPC-treated water11.8 ไมโครลิตร รวมปริมาตร 20ไมโครลิตร

จากนั้นผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง ที่กำหนดสภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

94 °C 2 นาที 1 รอบ

94 °C 1 นาที
55 °C 1 นาที } 35 รอบ
72 °C 2 นาที

72 °C 10 นาที 1 รอบ

จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ผลโดยใช้ 2 % Agarose gel electrophoresis แล้วย้อมเจลด้วยสารละลาย Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel documentation พร้อมบันทึกภาพ

2.3 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

นำชิ้นดีเอ็นเอของยีน *F3'5'H* ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ มาแยกด้วย 1.5 % Agarose gel electrophoresis แล้วย้อมด้วย gel star (Cambrex) และตรวจดูแถบดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Dark Reader transilluminators และตัดแถบดีเอ็นเอเป้าหมายมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) แล้วนำสารละลายดีเอ็นเอไปตรวจสอบด้วย 1% Agarose gel electrophoresis เก็บชิ้นดีเอ็นเอที่แยกได้ที่ –20 °C เพื่อนำไปเชื่อมต่อกับเวคเตอร์พาหะต่อไป

2.4 การเชื่อมต่อชิ้นยีน *F3'5'H* เข้ากับเวคเตอร์ และถ่ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับเวคเตอร์ ใช้ pGEM-T Easy Vector System (Promega) โดยเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 2x Rapid ligation buffer, T4 DNA ligase 2.5ไมโครลิตร, pGEM-T Easy Vector (50ng) 0.5ไมโครลิตร, PCR product 1.5 ไมโครลิตร T4 DNA ligase 0.5 ไมโครลิตร

ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือนำปฏิกิริยาที่ได้ไปเก็บที่ 4 °C นานข้ามคืน นำสารละลายที่ได้ไปใช้ในขั้นตอนส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าสู่แบคทีเรีย โดยนำยีน *F3'5'H* ที่เชื่อมต่อกับเวคเตอร์เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย โดยการส่งถ่ายดีเอ็นเอเข้าเชื้อ *Escherichia coli* JM109 (Promega) มีขั้นตอนการดำเนินงานดังนี้

1. ดูดสารละลายในปฏิกิริยาการเชื่อมต่อชิ้นยีน *F3'5'H* เข้ากับเวคเตอร์ (ligation) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร ที่อยู่ในน้ำแข็ง

2. นำ competent cell JM109 ออกจากตู้ -80 °C มาไว้ในน้ำแข็งทำให้ละลายช้าๆ แล้วผสมให้เข้ากันโดยดีดหลอดเบาๆ

3. ดูดสารละลาย competent cell ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในปฏิกิริยา ligation ดีดหลอดเบาๆ และนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 นาที

4. นำไป Heat-shock cell โดยแช่ใน water- bath ที่มีอุณหภูมิ 42 °C เวลา 50 วินาที และรีบนำมาแช่ในน้ำแข็งทันที เป็นเวลานาน 2 นาที

5. เติมสารละลาย soc medium (อุณหภูมิห้อง) ปริมาตร 950 ไมโครลิตร

6. นำไปบ่มในตู้เลี้ยงเชื้อที่มีอุณหภูมิ 37 °C เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง 30 นาที

7. นำไป plate บนอาหารแข็ง LB ที่เติม 100 ug/ml ampicillin 0.5 mM IPTG และ 50 mg/ml X-Gal แล้วนำไปเลี้ยงที่อุณภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

2.5 การคัดเลือกโคลนเป้าหมาย

นำโคโลนีของแบคทีเรียที่มีสีขาวไปตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยวิธี Single colony PCR โดยใช้ไม้จิ้มฟันจิ้มโคโลนีที่มีสีขาว นำไปใส่ในหลอดที่มีปฏิกิริยาของพีซีอาร์ทีประกอบด้วย 10X PCR Buffer 2 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP 0.4 ไมโครลิตร, 50 mM $MgCl_2$ 0.6 ไมโครลิตร, 5 uM Forward Primer (M13F) 2 ไมโครลิตร, 5 uM Reverse Primer (M13R) 2 ไมโครลิตร, 5 U/ul Platinum *Taq* DNA Polymerase 0.2 ไมโครลิตร ,น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 12.8 ไมโครลิตร รวมปริมาตร20 ไมโครลิตร

จากนั้นผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง ที่กำหนดสภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

94 °C 2 นาที 1 รอบ

94 °C 1 นาที
55 °C 1 นาที } 35 รอบ

72 °C 2 นาที

72 °C 10 นาที 1 รอบ

นำตัวอย่างไปวิเคราะห์ผลโดยใช้ 1.5 % Agarose gel electrophoresis แล้วย้อมเจลด้วยสารละลาย Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel documentation พร้อมบันทึกภาพ

2.6 การสกัดพลาสมิด

เลี้ยงเชื้อโคโลนีที่ได้ผ่านการตรวจสอบว่ามียีนเป้าหมายปรากฏอยู่ นำไปสกัด พลาสมิดด้วย QIAprep Spin Miniprep Kit ตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดได้โดยใช้ 1% Agarose gel electrophoresis แล้วย้อมด้วย ethidium bromide นำสารละลายที่เหลือเก็บไว้ที่ –20 °C จนกว่าจะนำไปใช้หาลำดับเบส

2.7 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *F3'5'H*

นำพลาสมิดที่มีชิ้นดีเอ็นเอของยีน *F3'5'H* เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการหาลำดับเบสโดยใช้สารเคมีชุด ABI PRISM® BigDye®Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit โดยเตรียมส่วนผสมต่างๆ ในหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ดังนี้ 2.5X Sequencing Buffer 3ไมโครลิตร,Terminator Ready Reaction Mix 2ไมโครลิตร,3.2 uM primer (T7 or SP6) 1ไมโครลิตร, Plasmid Template200นาโนกรัม เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อจนครบ20ไมโครลิตร

นำไปใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองที่กำหนดสภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

94 °C 2 นาที 1 รอบ

94 °C 10 วินาที
55 °C 5 วินาที
60 °C 4 นาที
} 35 รอบ

60 °C 10 นาที 1 รอบ

นำสารละลายของปฏิกิริยาไปทำความสะอาดก่อนนำเข้าวิเคาะห์หาลำดับเบส นำไปวิเคราะห์หาลำดับเบสด้วยเครื่อง ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer นำลำดับเบสของยีน *F3'5'H* ที่โคลนได้จากดอกอัญชันและพิทูเนียไปเปรียบเทียบกับยีนในฐานข้อมูลสาธารณะ NCBI โดยใช้โปรแกรม Blast เพื่อตรวจสอบกับยีนที่มีผู้รายงานมาก่อน

3.การสร้างชุดยีน Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H)

นำยีน *F3'5'H* เข้าสู่ Plant Expression Vector โดยใช้เทคโนโลยี Gateway

เทคโนโลยี Gateway ที่ใช้ในการโคลนยีน เป็นการเคลื่อนย้ายชิ้นส่วนของยีนจากเวคเตอร์หนึ่ง ไปสู่อีกเวคเตอร์หนึ่ง โดยการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของยีนซึ่งกันและกัน ซึ่งไม่ต้องใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ ขั้นตอนการดำเนินงานประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ดังนี้

3.1 การนำยีน *F3'5'H* เข้าสู่ Entry Clones

3.1.1 นำยีน *F3'5'H* ที่อยู่ในเวคเตอร์ pGEM T easy และได้ตรวจสอบความถูกต้องแล้ว มาเตรียมให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมกับเทคโนโลยี Gateway โดยการเพิ่มปริมาณส่วนของยีน *F3'5'H* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ที่กำหนดให้มีการเติมลำดับเบสของไพรเมอร์ด้านปลาย 5' ให้มีลำดับที่เหมาะสมสำหรับการเคลื่อนย้ายชิ้นยีนซึ่งกันและกัน เรียกว่า attB-PCR product จากนั้นนำยีน *F3'5'H* attB-PCR product เข้าสู่เวคเตอร์ pDONR 221

3.1.2 นำสารละลายดีเอ็นเอที่มียีน *F3'5'H* attB-PCR product ปริมาตร 7 ไมโครลิตร ดูดใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมเวคเตอร์ pDONR (150 ng/ul) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร จากนั้นเติม BP Clonase II enzyme mix ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน โดยการ vortex นาน 2 วินาที แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม Proteinase K solution ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 10 นาที ได้สารละลายดีเอ็นเอ สำหรับใช้งานในขั้นตอนต่อไป

3.1.3 การนำเวคเตอร์เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

การนำยีน *F3'5'H* ที่เชื่อมต่ออยู่ในเวคเตอร์ pDONR 221 เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย One Shot Mach1 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen) โดยดูดสารละลายในข้อ 3.1.2 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร ที่มี Competent Cell 50 ไมโครลิตร นำไปแช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที จากนั้นนำเซลล์ไป Heat-shock โดยการนำไปแช่น้ำที่อุณหภูมิ 42 °C นาน 30 วินาที แล้วรีบนำไปแช่ในน้ำแข็งทันที นาน 2 นาที เติม S.O.C. medium ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ปิดฝาหลอด และนำไปบ่มในตู้เลี้ยงเชื้อที่เขย่าด้วยความเร็ว 225 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร ไป spread บนอาหารแข็ง LB ที่เติม 50 ug/ml kanamycin และนำไปเลี้ยงที่อุณภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำโคโลนีที่เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อไปตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยวิธี Single colony PCR และเลี้ยงเชื้อโคลนที่มียีนเป้าหมาย นำไปสกัดพลาสมิด ทำให้ได้ พลาสมิดสายผสมที่มียีน F35H เชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pDONR 221 เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.2 การส่งถ่ายยีน *F3'5'H* ที่เชื่อมต่อ pDONR 221 เข้าสู่ Plant Expression Vector

การนำยีน *F3'5'H* ที่เชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pDONR 221 เข้าสู่ Plant Expression Vector หรือ Binary vector (เวคเตอร์ pMDC32) โดยทำปฏิกิริยาในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลตร ที่ประกอบด้วย ยีน *F3'5'H* ที่เชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pDONR 221 (10 fmoles) จากข้อ 3.1.2 ปริมาตร 7 ไมโครลิตร และเติมเวคเตอร์ pMDC32 (20 fmoles) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติม LR Clonase II Plus enzyme mix ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน นำหลอดไปบ่มที่

อุณหภูมิ 25 °C นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นเติม Proteinase K solution ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 10 นาที

การนำยีน *F3'5'H* ที่เชื่อมต่ออยู่นในเวคเตอร์ pMDC32 เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย One Shot Mach1 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen) โดยปฏิบัติเช่นเดียวกันข้อ 3.1.3 นำโคโลนีที่เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อไปตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยวิธี Single colony PCR และเลี้ยงเชื้อโคลนที่มียีนเป้าหมาย นำไปสกัดพลาสมิด ทำให้ได้พลาสมิดสายผสมที่มียีน *F3'5'H* เชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pMDC32 เพื่อนำเข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens* ต่อไป

4. การนำพลาสมิด pMDC32- *F3'5'H* ถ่ายเข้าสู่ *Agrobecterium tumefaciens*

การนำเวคเตอร์ pMDC32 ที่ได้รับยีน *F3'5'H* เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 โดยวิธี electroporation มีขั้นตอนดังนี้

4.1 การเตรียม competent cell ของเชื้อ *A. tumefaciens*

4.1.1 นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 เลี้ยงในอาหารเหลว YEP ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่ผสมสารปฏิชีวนะ Rifampicin ความเข้มข้น 50 ug/ml นำไปเขย่าที่ 28 °C เขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ใช้เป็นเซลล์เริ่มต้น (starter) เพื่อเตรียม competent cell ต่อไป

4.1.2 นำเซลล์เริ่มต้น 2 มิลลิลิตร เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 4.1.1 ปริมาตร 200 ml นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 °C เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง จนได้ค่า OD. ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรประมาณ 0.2-0.3

4.1.3 แช่เชื้อในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ต่อจากนั้นนำไปตกตะกอนเซลโดยนำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วสารละลายส่วนบนทิ้ง

4.1.4 ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 10% glycerol ที่แช่เย็น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แช่ในน้ำแข็งต่อเป็นเวลา 10 นาที ตกตะกอนเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วสารละลายส่วนบนทิ้ง

4.1.5 ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 10% glycerol ที่แช่เย็น ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แช่ในน้ำแข็งต่อเป็นเวลา 10 นาที ตกตะกอนเซลล์โดยนำไปปั่นที่ความเร็ว 3500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วสารละลายส่วนบนทิ้ง

4.1.6 ละลายตะกอนเซลล์ด้วย 10% glycerol ที่แช่เย็น ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แบ่ง competent cell ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 50 ไมโครลิตร เก็บเซลล์ที่ได้ที่ อุณหภูมิ -80 °C หรือนำไปใช้ในขั้นตอนการเคลื่อนย้ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ *A. tumefaciens* ด้วยวิธี electroporation ต่อไป

4.2 การเคลื่อนย้ายพลาสมิด pMDC32 ที่ได้รับยีน *F3'5'H* เข้าสู่เซลล์ *A. tumefaciens* ด้วยวิธี electroporation

4.2.1 นำ competent cell ของเชื้อ *A. tumefaciens* จาก -80 °C มาละลายในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที

4.2.2 นำพลาสมิด pMDC32 ที่ได้รับยีน *F3'5'H* ปริมาตร 1 ไมโครลิตร มาใส่ในหลอด competent cell ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15-30 นาที ต่อจากนั้น นำส่วนผสมมาใส่ลงใน cuvette แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15-30 นาที

4.2.3 ทำการเคลื่อนย้ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ ด้วยวิธี electroporation โดยใช้เครื่อง BTX Electroporation System รุ่น ELECTRO CELL MANIPULATOR 600 โดยกำหนดสภาวะตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตดังนี้

cuvette Gap	0.1	cm
Voltage	2.0	Kv
Capacitor	25	μF
Resistor	200	Ω

4.2.4 เช็ด cuvette ให้แห้งก่อน pulse หลังจาก pulse ให้เติมอาหารเหลว YEP 1 มิลลิลิตรทันที

4.2.5 ย้ายส่วนผสมไปเลี้ยงในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28 °C เขย่าที่ความเร็ว 225 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4.2.5 ตกตะกอนเซลล์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เทอาหารออกแล้วเติมอาหารเหลวใหม่ลงไป 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ดูดสารละลาย 50 ไมโครลิตร ไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง YEP ที่เติม kanamycin 50 ug/ml เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 2-3 วัน นำโคโลนีที่เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อไปตรวจสอบการปรากฏของพลาสมิด pMDC32 ที่ได้รับยีน *F3'5'H* ด้วยเทคนิค PCR ต่อไป

4.3 การตรวจสอบการปรากฏของพลาสมิด pMDC32 ที่ได้รับยีน *F3'5'H* ในเซลล์ *Agrobecterium tumefaciens*

ตรวจสอบการปรากฏของพลาสมิด pMDC32 ที่ได้รับยีน *F3'5'H* ใน *Agrobacterium tumefaciens* ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยการนำโคโลนีที่เจริญได้บนอาหารไปคัดเลือกด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ใช้ไม้จิ้มฟันจิ้มเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวๆ แล้วนำเชื้อจุ่มลงในปฏิกิริยาพีซีอาร์ จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง ที่กำหนดสภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

94 ℃ 2 นาที 1 รอบ
94 ℃ 1 นาที
55 ℃ 1 นาที } 35 รอบ
72 ℃ 2 นาที
72 ℃ 10 นาที 1 รอบ

จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ผลโดยใช้ 1.5 % Agarose gel electrophoresis แล้วย้อมเจลด้วยสารละลาย Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel documentation พร้อมบันทึกภาพ

นำโคลนที่ตรวจพบพลาสมิด pMDC32 ที่ได้รับยีน *F3'5'H* มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว YEP ที่เติม 50 ug/ml Kanamycin เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28ºC เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมงเพื่อใช้ในขั้นตอนการถ่ายยีนต่อไป

5. การทดสอบถ่ายยีนเข้าสู่ยาสูบ

5.1 การถ่ายยีนโดยอะโกรแบคทีเรียม

การเตรียมต้นยาสูบสำหรับใช้ในการถ่ายยีน ทำการเพาะเมล็ดยาสูบพันธุ์แซนเทียร์ ในอาหารสังเคราะห์ MS เมื่อเมล็ดงอกและเจริญเติบโตเป็นต้นที่สมบูรณ์ ทำการตัดใบยาสูบเป็นรูป สี่เหลี่ยมขนาด 0.5-1 เซนติเมตร เลี้ยงในอาหารสูตร MS วาง 5 ชิ้น/plate

เตรียมเชื้ออะโกรแบคทีเรียม เลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียม LBA4404 ที่มีพลาสมิด pMDC32 ที่บรรจุยีน F3'5'H ที่โคลนได้จากอัญชันดอกสีน้ำเงิน (ที่ได้จากข้อ4.) มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว YEP (peptone 10 g/l +Yeast extract 10 g/l , NaCL 5 g/l pH7.0)ที่เติม Kanamycin 50 ug/ml เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28ºC เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง spindown และละลาย pellet bacteria ด้วย co-culture media ให้ได้ OD.600 ประมาณ0.6-1.0

ละลาย Agrobacterium LBA 4404 ในอาหารเหลว สูตรMS ที่เติม NAA 0.1 mg/l ร่วมกับ BA 1 mg/l sucrose 3 % pH 5.7 นำใบยาสูบที่ตัดเตรียมไว้มา เลี้ยงเขย่าร่วมกับ Agrobacterium 5 นาที เลี้ยงในอาหารแข็ง สูตรMS ที่อุณหภูมิห้องในสภาพมืดเป็นเวลา 2-3 วัน ล้างใบด้วย cefotaxime 100 mg/lg เลี้ยงในอาหารแข็ง สูตรMS ที่เติม cefotaxime 100 mg/l และ hygromycin 20 mg/l เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 7 วัน 3-5 ครั้ง จนมีแคลลัส แล้วเปลี่ยนอาหารทุก 2 สัปดาห์ จนกระทั่งแคลลัสพัฒนาเป็นยอด ตัดยอดไปเลี้ยงในอาหารแข็ง MS ที่เติม hygromycin 20 mg/l sucrose 3 % pH 5.7

5.2 การตรวจสอบต้นยาสูบได้รับยีนด้วยเทคนิค PCR

นำใบของต้นยาสูบที่ผ่านการคัดเลือกให้ต้านทานต่อ hygromycin มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด NucleoSpin® Plant II Kit ตามวิธีของบริษัท MACHEREY-NAGEL ตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้ agarose gel electrophoresis ย้อมเจลด้วย Ethidium Bromide ตรวจสอบและบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel Doc จากนั้นวัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง BioDrop และปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้ได้ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปการตรวจสอบการปรากฏของยีน F3' 5'H ในยาสูบที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชุด คือ 1) Nos.F1 และ CtF35H.R1 เป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะกับตำแหน่งของ Nos terminater และยีนF3' 5'H 2) CtF35H.F2 และ 2X35S.R2 เป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะกับตำแหน่งของยีน F3' 5'H และ 2X35S promoter จากนั้นตรวจสอบผลผลิตของ PCR ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis

5.3 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสีดอกของยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน

นำต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน F3' 5'H ที่ผ่านการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR นำมาเพาะเลี้ยงให้พัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ จากนั้นล้างวุ้นออกจากรากให้สะอาด แล้วนำต้นมาปลูกอนุบาลและออกปลูกในโรงเรือนความปลอดภัยทางชีวภาพ ดูการเปลี่ยนแปลงสีดอกของต้นยาสูบที่ได้รับและไม่ได้รับการถ่ายยีน

ระยะเวลา (เริ่มต้น - สิ้นสุด)

2554- 2557

สถานที่ดำเนินการ

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

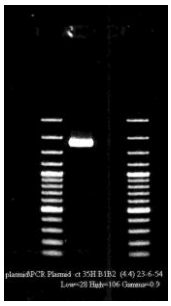
การโคลนชิ้นส่วนของยีน F3' 5'H

จากการสืบค้นข้อมูลออกแบบไพรเมอร์ในการโคลนยีน Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H) จาก cDNAของดอกอัญชันและพิทูเนียโดยการค้นหาข้อมูลลำดับเบสของยีน F3' 5'H จากฐานข้อมูล NCBI Sequence GeneBank ของพืชชนิดต่าง ๆ พบพืชที่มีรายงานยีน F3' 5'H ไว้ในฐานข้อมูล และเมื่อนำมาวิเคราะห์หาส่วนที่เหมือนกันโดยใช้โปรแกรม ClustalW Multiple Alignment พบลำดับเบส

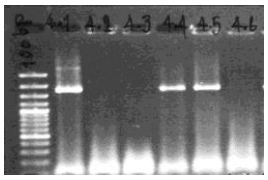
บางส่วนที่เหมือนกัน ได้ไพรเมอร์ F3' 5'H - F เพื่อใช้เป็น ไพรเมอร์ ด้าน 5’ ร่วมกับ ไพรเมอร์ F3' 5'H -R สำหรับเพิ่มปริมาณส่วนของยีน F3' 5'H จากดอกอัญชันและพิทูเนีย ผลจากการโคลนส่วนของยีน F3' 5'H ดอกอัญชัน และพิทูเนีย โดยใช้ ไพรเมอร์ F3' 5'H - F ร่วมกับ ไพรเมอร์ F3' 5'H -R ด้วยเทคนิค PCR พบว่าการใช้ ไพรเมอร์ ทั้งสองสามารถเพิ่มปริมาณหรือโคลนชิ้นส่วนของยีน F3' 5'H และเมื่อนำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ไปตรวจสอบขนาดด้วยวิธีอิเลกโตรโฟรีซีสโดยใช้อะกาโรสเจล 1% โดยเปรียบเทียบขนาดกับ Hyper Ladder I DNA markers พบว่าได้แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขนาดด้วยคู่ primer F3' 5'H - F ร่วมกับ primer F3' 5'H -R (ภาพที่1)

จากการนำชิ้นส่วนของยีน F3' 5'H ที่เพิ่มปริมาณได้มาแยกให้บริสุทธิ์โดยการแยกผ่านชิ้นวุ้น พบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่แยกได้มีดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว ซึ่งมีปริมาณเพียงพอสำหรับนำเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ และเมื่อนำชิ้นส่วนของยีน F3' 5'H ไปเชื่อมต่อกับ pGEM-T Easy เวคเตอร์ และถ่ายเข้าสู่ แบคทีเรีย *E. coli* JM 109 พบว่าประสบผลสำเร็จ โดยสามารถตรวจพบโคโลนีของแบคทีเรียที่มีชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งมีสีขาวเป็นจำนวนมาก โดยกลไกลการเกิดโคโลนีสีขาวนั้นเป็นผลมาจากการที่ชิ้นส่วนของยีน F3' 5'H ที่สอดแทรกอยู่ในเวคเตอร์ไปขัดขวางการถอดรหัสของยีน β-galactosidase แต่ถ้าไม่มีการสอดแทรกของยีน F3' 5'H ในเวคเตอร์จะเกิดเป็นโคโลนีสีฟ้า จากการตรวจสอบเพื่อยืนยันผลที่ได้ด้วยเทคนิค Single Colony PCR พบว่าทุกโคโลนีที่มีสีขาวได้มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมายไปแทรกอยู่ทุกโคโลนี (ดังภาพที่2) สามารถแยกสกัดพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมายได้ และพลาสมิดที่สกัดได้โดยวิธีนี้มีปริมาณเพียงพอสำหรับนำไปใช้ในปฏิกิริยาการหาลำดับเบสโดย BigDye®Terminator v3.1 Cycle Sequencing (ดังภาพที่3)

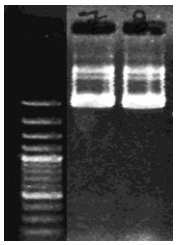
ผลจากการหาลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน F3' 5'H ที่แทรกตัวอยู่ใน pGEM-T Easy Vector ด้วย primer M13F และ M13R เมื่อนำลำดับเบสที่ได้มาตัดส่วนที่เป็นเวคเตอร์ออกและนำมาหาลำดับเบส พบว่าลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนที่โคลนได้จากดอกอัญชันและพิทูเนียมีขนาดเท่ากับ 1,739และ 1852 bp. ตามลำดับและจากการเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีน F3' 5'H ที่โคลนได้ กับข้อมูลที่อยู่ใน GenBank ด้วยโปรแกรม Blast-N พบว่า F3' 5'H ที่โคลนได้ มีลำดับเบสเหมือนกับยีน F3' 5'H ที่รายงานไว้ในฐานข้อมูล NCBI คิดเป็น100% กับ accession AB185900 ดังแสดงในภาพที่ 4,5และ6



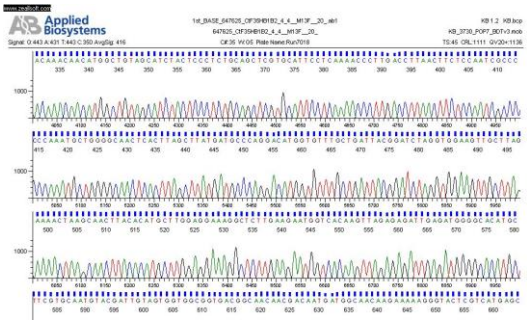
ภาพที่1. PCR ของยีน F3’5’H ที่เพิ่มปริมาณได้จากดอกอัญชัน



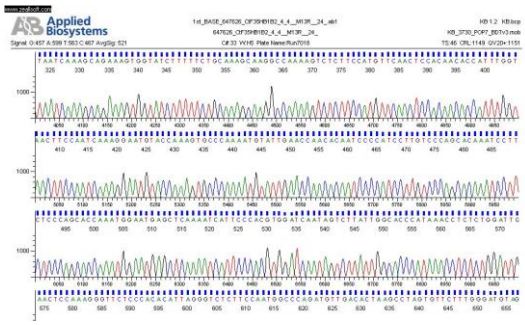
ภาพที่2. การตรวจสอบโคลนเป้าหมายที่ได้รับยีน F3’5’H ด้วยเทคนิค colony PCR



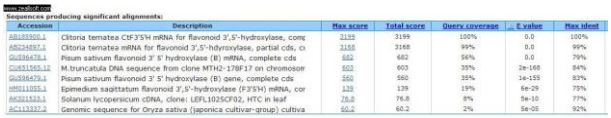
ภาพที่3. พลาสมิดทีสกัดได้เพื่อส่งหาลำดับเบส



ภาพที่4. ลำดับเบสของยีน CtF35H ที่หาโดยใช้ไพรเมอร์ M13F



ภาพที่5. ลำดับเบสของยีน CtF35H ที่หาโดยใช้ไพรเมอร์ M13R



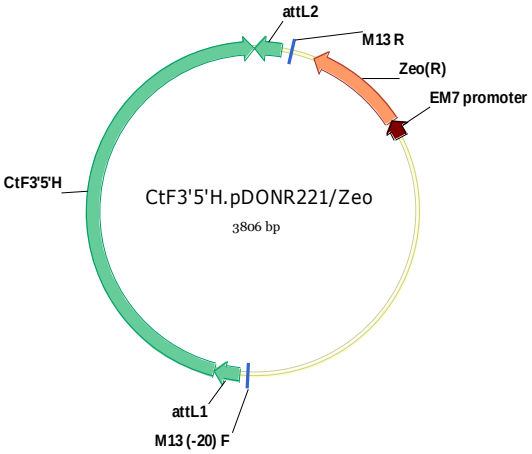
ภาพที่6. การเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน CtF35H ในฐานข้อมูล NCBI มีความเหมือนกัน 100% กับ accession AB185900

การสร้างชุดยีน

การสร้างชุดยีน Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H)

การนำยีนเข้าสู่ Entry Clones เป็นการเตรียมชิ้นดีเอ็นเอให้เหมาะสมสำหรับการโคลนยีนโดยใช้เทคโนโลยี Gateway จากการนำลำดับเบสของยีน F3’5’H มาออกแบบไพรเมอร์ใหม่ และดัดแปลงลำดับเบสของไพรเมอร์ Forward และ Reverse โดยเติมลำดับเบสที่ปลายด้าน 5’ จากการออกแบบไพรเมอร์ พบว่าได้ไพรเมอร์ด้าน Forward คือ F35HattB2 และได้ ไพรเมอร์ด้าน Reverse คือ F35HattB1 โดยไพรเมอร์ดังกล่าวจะไปจับบริเวณภายในของยีน F3’5’H ที่โคลนได้จากข้อ2 จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ attB1 และ attB2 เชื่อมติดอยู่ เมื่อ

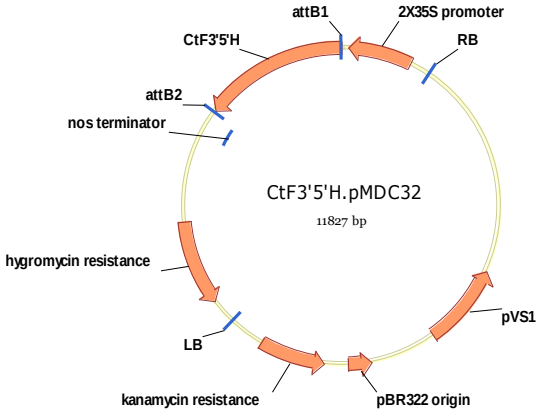
นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ PEG8000 พบว่าชิ้นดีเอ็นที่ได้มีความเข้มข้นมากกว่า 10 ng/ul และมีปริมาณเพียงพอในการนำยีนเข้าสู่เวคเตอร์ pDONR 221 ได้ประสบผลสำเร็จ ซึ่งจากการตรวจสอบโดยการนำโคโลนีของแบคทีเรียที่ได้รับโคลนเป้าหมายด้วยเทคนิค Single colony PCR โดยใช้ไพรเมอร์ M13F และ M13R พบว่าทุกโคโลนีที่ทำการตรวจสอบสามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอโดย จากอัญชันและพิทูเนียมีขนาด 2022 คู่เบส และ 2135 คู่เบส ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่าชิ้นยีน ได้ถูกนำเข้าไปอยู่ในเวคเตอร์ pDONR 221 แล้ว (ภาพที่7) และเมื่อนำโคโลนีเป้าหมายดังกล่าวไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณ และสกัดพลาสมิด พบว่าได้ พลาสมิดในปริมาณมาก และสามารถใช้ชิ้นยีนที่อยู่ในเวคเตอร์ pDONR 221 นำเข้าสู่ Plant Expression Vector ต่อไป



ภาพที่ 7. ชิ้นส่วนของยีน F3' 5'H จากดอกอัญชันที่อยู่ใน vector pDORN 221

การนำยีน F35H เข้าสู่ Plant Expression Vector

จากการใช้เทคโนโลยี Gateway นำยีน F3’5’H ที่เชื่อมต่ออยู่กับเวคเตอร์ pDONR 221 เข้าสู่ Plant Expression Vector ผลการทดลองพบว่าสามารถนำยีน เข้าสู่เวคเตอร์ pMDC32 ซึ่งเป็น Plant Expression Vector ได้สำเร็จ (ภาพที่8) และเมื่อนำโคลนเป้าหมายดังกล่าวไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณและสกัดพลาสมิด พบว่าได้พลาสมิดที่มีปริมาณมาก สามารถใช้ในขั้นตอนการนำชิ้นยีน ที่อยู่ในเวคเตอร์ pMDC 32 ไปถ่ายเข้าสู่ *Agrobecterium tumefaciens* ต่อไปได้



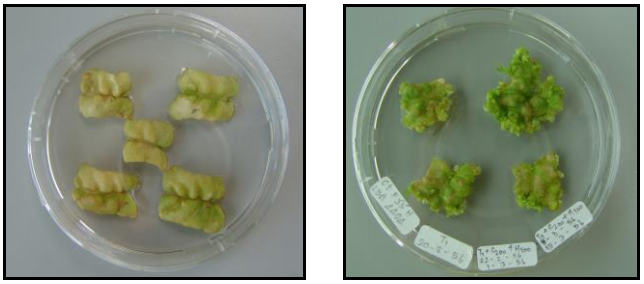
ภาพที่8. ชิ้นส่วนของยีน F3' 5'H จากดอกอัญชันที่อยู่ใน Binary vector pMDC32

การนำพลาสมิด pMDC32-DFRAS ถ่ายเข้าสู่ *Agrobecterium tumefaciens*

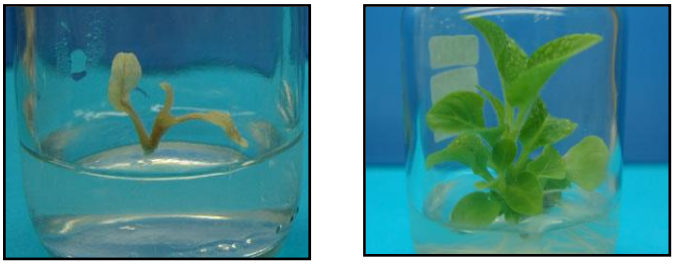
การเคลื่อนย้าย ctF35HpMDC32 ซึ่งเป็น Binary vector เข้าสู่เซลล์ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 พบว่า competent cell สามารถส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์โดยวิธี electroporation ได้สำเร็จ ผลที่ได้จากการนำเซลล์ไปคัดเลือกในอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ Kanamycin พบโคโลนีที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกได้

การถ่ายยีน *F3' 5'H* เข้าสู่ยาสูบโดยอะโกรแบคทีเรียม

จากการถ่ายยีน *F3' 5'H* ที่โคลนได้ที่อยู่ในพลาสมิด pMDC32 เข้าสู่ยาสูบโดยใช้ Agrobacterium พบว่าสามารถส่งถ่ายยีน *F3' 5'H* เข้าสู่ยาสูบได้สำเร็จ หลังจากเลี้ยงไปเป็นเวลา 3 สัปดาห์พบว่าชิ้นส่วนใบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะไม่พัฒนาและตายในที่สุด ส่วนที่ได้รับการถ่ายยีน เริ่มเจริญและพัฒนาเป็นแคลลัส (ภาพที่9) เมื่อตัดยอดที่พัฒนาจากแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก MS ที่เติม hygromycin 20 mg/l หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนเจริญเติบโตได้ เมื่อเพาะเลี้ยงต่อจนอายุ 45 วัน จะเจริญเป็นต้นที่สมบุรณ์และนำไปทดสอบต่อไป ส่วนต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะไม่เจริญเติบโตและตายไปในที่สุด (ภาพที่10)



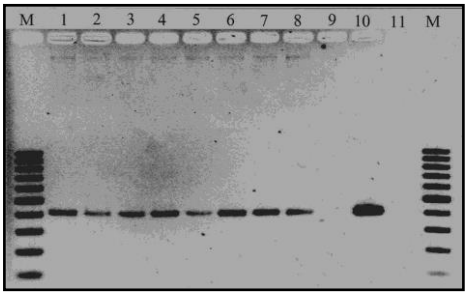
ภาพที่9. แคลลัสจากใบยาสูบหลังจากเลี้ยบนอาหารสูตรMS ที่เติมcefotaxime 100 mg/l และ hygromycin 20 mg/l เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (ซ้าย –ใบไม่ได้รับการถ่ายยีน ขวา-ใบที่ผ่านการถ่ายยีน)



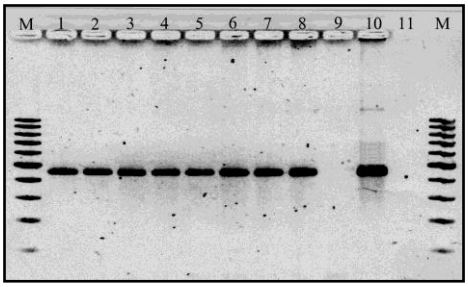
ภาพที่10 การเจริญเติบโตของยอดยาสูบหลังจากเลี้ยงบนอาหารคัดเลือกเป็นเวลา 45 วัน (ซ้าย-ต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ขวา- ต้นที่ได้รับการถ่ายยีน)

การตรวจสอบต้นยาสูบได้รับยีนด้วยเทคนิค PCR

ผลการตรวจสอบการปรากฏของยีน F3' 5'H ในยาสูบที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Nos.F1 และ CtF35H.R1 พบว่าสามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 405 คู่เบส เพียงแถบเดียวเท่านั้น (ภาพที่11) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มีความจำเพาะกับตำแหน่งของยีน F3' 5'H และ Nos terminater ซึ่งเป็นชุดยีนที่ถ่ายเข้าสู่ต้นยาสูบ จากการตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ CtF35H.F2 และ 2X35S.R2 พบว่าแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวขนาด 451 คู่เบส (ภาพที่12) และมีความจำเพาะกับตำแหน่งของยีน F3' 5'H และ 2X35S promoter ของชุดยีนที่ถ่ายเข้าสู่ต้นยาสูบเช่นเดียวกัน นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าไพรเมอร์ 2 ชุด ที่ใช้ตรวจสอบนั้นจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เฉพาะต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนเท่านั้น ไม่สามารถเพิ่มปริมาณจากดีเอ็นเอของต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ภาพที่11,12)



ภาพที่11 ผลการตรวจสอบต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน F3' 5'H ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CtF35H.Nos.F1, CtF35H.Nos.R1 (405bp) (Lane M : 100 bp DNA Ladder, 1-8: ต้นที่ได้รับการถ่ายยีน ,9: ต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน , 10: Plasmid pMDC32 ที่มียีน F3’5’H, 11: control)



ภาพที่12 ผลการตรวจสอบต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน F3' 5'H ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CtF35H.2X35S.F2 และ CtF35H.2X35S.R2 (415bp) (Lane M : 100 bp DNA Ladder, 1-8: ต้นที่ได้รับการถ่ายยีน ,9: ต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน , 10: Plasmid pMDC32 ที่มียีน F3’5’H, 11: control)

การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสีดอกของยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน

จากการนำต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน F3' 5'H ที่ผ่านการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR มาปลูกในโรงเรือนความปลอดภัยทางชีวภาพ ดูการเปลี่ยนแปลงสีดอกเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน พบว่าต้นที่ได้รับยีน F3' 5'H มีสีดอกเปลี่ยนแปลงไป จากดอกสีขาวอมชมพูเป็นสีม่วงชมพู (ภาพที่13) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ายีน *F3' 5'H* ที่ถ่ายเข้าสู่ยาสูบมีการแสดงออกในดอกยาสูบทำให้สีดอกเปลี่ยนแปลงไป ส่วนยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะไม่พบการแสดงออกของยีน ส่งผลให้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีดอก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Young park และ Kim (2000) ที่ได้ถ่ายยีน f3’5’h จากมะเขือยาวเข้าสู่ยาสูบด้วยวิธีอะโกรแบคทีเรียม พบว่ายาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนจะมีสีดอกเปลี่ยนไปจากต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน และในยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะไม่พบการแสดงออกของยีนนี้ในกลีบดอก

ภาพที่13 การเปลี่ยนแปลงสีของดอกยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน
แถวบน-ดอกยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน (ดอกมีสีม่วงชมพู) แถวล่าง-ดอกยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ดอกมีสีขาวอมชมพู)

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การโคลนยีน *Flavonoid 3',5' hydroxylase* (*F3'5'H*) เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารในกลุ่มฟลาโวนอยด์โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มรงควัตถุแอนโทไซยานินสีน้ำเงินหรือสีม่วง จากดอกอัญชันและพิทูเนียสีน้ำเงิน ได้ชิ้นยีนขนาด 1,739 และ1852 bp. ตามลำดับ แล้วนำยีนที่โคลนได้เข้าสู่เวคเตอร์แบบไบนารี่ pMDC32 และนำเข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 เมื่อทำการตรวจสอบยีน *F3'5'H* ที่โคลนได้โดยการถ่ายเข้าสู่ยาสูบพันธุ์แซนเทียร์ดอกสีขาวอมชมพู โดยเลี้ยงใบยาสูบร่วมกับอะโกรแบคทีเรียม นั้นพบว่าที่ต้นที่ได้รับยีน มีสีดอกเปลี่ยนแปลงไป จากดอกสีขาวอมชมพูเป็นสีม่วงชมพู ยีน *F3' 5'H* นี้สามารถนำมาใช้ถ่ายฝากสู่ไม้ดอกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเพื่อปรับแต่งสีดอกให้มีความหลากหลายมากขึ้นในโอกาสต่อไป

10. การนำไปใช้ประโยชน์

ได้ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H) จากอัญชัน และ พิทูเนีย ที่เป็นของกรมวิชาการเกษตรสำหรับนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับแต่งสีดอกไม้โดยวิธีการถ่ายยีนเพื่อสร้างความหลากหลายของสีดอก นอกจากนี้สามารถนำไปเผยแพร่ในวารสารทางวิชาการได้

หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ นักปรับปรุงพันธุ์ กรมวิชาการเกษตร สถาบันการศึกษา

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

ขอขอบคุณ คุณประทุมพร ยิ่งธงชัย สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่อนุเคราะห์พันธุ์ยาสูบที่ใช้ในการทดลอง และขอขอบคุณสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ที่สนับสนุนในการวิจัย

12. เอกสารอ้างอิง

ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 2542. เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมในการควบคุมสีและลักษณะของดอก. **วารสารข่าวศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง** 13(1): 9-13.

Biolley, J.P., M. Jay., G. Forkmann. 1994. Pigmentation patterns of modern rose mutants throw light on the flavonoid pathway in *Rosa x Hybrida*. **Phytochemisty** 36: 1189-1196.

Brugliera F., G. Barri-Reweell., T.A. Holton and J.G. Mason. 1999. Isolation and characterization of a flavonoid 3'-hydroxylase cDNA clone corresponding to the Ht1 locus of *Petunia hybrida*. **The Plant Journal** 19(4): 441-451.

He, H., H. Ke., H. Keting., X. Qiaoyan., D. Silan. 2013. Flower color modification of chrysanthemum by suppression of *F3'H* and overexpression of the exogenous Senecio cruentus F3'5'H gene. **PLOS ONE. Volume** 8(11). E74395.

Holton, T.A. and Cornish. E.C. 1995. Genetic and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. **Plant** Cell 7: 1071-1083.

Johnson, E.T., S. Ryu., H. Yi., B. Shin., H. Chong and G. Choi. 2001. Alteration of single amino acid changes the substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase. **The Plant Journal** 25(3): 325-333.

Kaltenbach. M, G. Scroder., E. Schmelzer., V. Lutz and J. Schroder. 1999. Flavonoid hydroxylase from *Catharanthus roseus*: cDNA, heterologous expression, enzyme properties and cell-type specific expression in plant. **The Plant Journal** 19(2): 183-192.

Katsumoto, Y., M. Fukuchi-Mizutani., Y. Fukui., F. Brugliera., T.A. Holton., M. Karan., N. Nakamura., K. Yonekura-Sakakibara., J. Togami., A. Pigeaire., G.Q. Tao., N.S. Nehra., C.Y. Lu., B.K. Dyson., S. Tsuda., T. Ashikari., T. Kusumi., J.G. Mason and Y. Tanaka. 2007. Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully

generated blue-hue flowers accumulation delphinidin. **Plant Cell Physiol** 48(11): 1589-1600.

Mol. J.N.M., E. Grotewold and R.E. Koes. 1998. How genes paint flowers and seeds**.** **Trends Plant Sci** 3: 212-217.

Tanaka, Y. and A. Ohmiya**.** 2008. Seeing is believing : Engineering anthocyanin and carotenoid biosynthetic pathways. **Current Opinion in Biotechnology** 19:190-197.

Young Park, S. and Y. Kim. 2000. The expression of egg plant flavonoid 3'5' hydroxylase gene in tobacco plant (Nicotiana tabacum cv. Xanthi). **Plant Biotech** 2(1):25-28.