# แบบรายงานเรื่องเต็ม ผลการวิจัยที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2557

1. **ชุดโครงการวิจัย** แผนงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

2. **โครงการวิจัย** เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อวิจัยพัฒนาพืชและจุลินทรีย์ในสภาวะโลกร้อน

3. **ชื่อการทดลองที่ 1** การค้นหายีนและการแสดงออกยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะเครียดในข้าวโพดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย

   **ชื่อการทดลอง** (ภาษาไทย) การโคลนยีนที่ทนต่อสภาวะขาดน้ำในข้าวโพดพันธุ์ทนแล้ง

   **ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ)** Cloning of Drought Stress Gene in *Zea mays* (L.)

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**


| | | | |
|---|---|---|---|
| **หัวหน้าการทดลอง** | นางสาวสุภาวดี ง้อเหรียญ | **สังกัด** | สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ |
| **ผู้ร่วมงาน** | นายพยุงศักดิ์ รวยอารี | **สังกัด** | สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ |
| | นางสาวอรุโณทัย ซาววา | **สังกัด** | สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ |
| | นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์ | **สังกัด** | สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ |

## Abstract

SINA3 and SINAT3 genes is an E3 ubiquitin ligase enzyme that plays a critical role in regulating plant responses to abiotic stresses such as drought, temperature fluctuations, high salinity, radiation and nutrient deprivation adversely affect growth, development and productivity. In this study, two full-length cDNA sequences of corn (*Zea mays* L.) encoding *Zm*SINA3 and *Zm*SINAT3 have been isolated from four corn variety names TAKFA 1, TAKFA 3, NAKORNSAWAN 3 and NAKORNSAWAN 1 via RT – PCR based method with SINA3 (forward) + SINA3 (reverse) and SINAT3 (forward) + SINAT3 (reverse). The SINA3 and SINAT3 gene sequence contains a fragment of 1026 and 1050 bp complete ORF, encoded for 341 and 349 amino acids polypeptide. The highly conserved region of the gene is E3 ubiquitin protein ligase which are also found in monocots *Zea mays* L. (EF434383.1, EU966994.1) and *Setaria italic*a (L.) Beauv. (XM003572636.1, XM004960614.1) with 99% and 90% of homology respectively. A 1026 bp and 1050 bp fragment of the *Zm*SINA3 and *Zm*SINAT3 gene was inserted into plant expression vector pCAMBIA2300 containing 35SCaMV promoter and NOS terminator, nptII as selectable marker with total size of 10.6 and 10.7 kb for pCAMBIA2300 – *Zm*SINA3 and pCAMBIA2300 – *Zm*SINAT3 over – expression cassette.

# บทคัดย่อ

การโคลนยีนที่ทนต่อสภาวะขาดน้ำในข้าวโพดพันธุ์ทนแล้ง มีวัตถุประสงค์เพื่อโคลนยีนและศึกษาคุณสมบัติของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการทนต่อสภาวะขาดน้ำในพืช สำหรับนำไปใช้ในการพัฒนาพันธุ์พืชให้มีศักยภาพในการให้ผลผลิตและสามารถทนต่อสภาวะเครียดอันเกิดจากภาวะขาดน้ำในพืชได้ ซึ่งยีนที่ทำการโคลนในครั้งนี้ได้แก่ ยีน SINA3 และ SINAT3 เป็นยีนที่อยู่ในกลุ่ม E3 ubiquitin ligase เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะเครียดของพืช โดยการควบคุมการเปลี่ยนแปลงกระบวนการถอดรหัส (responsive transcription factors) ที่จำเป็นสำหรับการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะเครียดและการควบคุมกิจกรรมของโปรตีนต่างๆ สำหรับนำไปใช้ภายในเซลล์พืช งานวิจัยนี้ได้ทำการโคลนยีน SINA3 และ SINAT3 จากข้าวโพดพันธุ์ทนแล้ง โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ในบริเวณที่มีความเหมือนของลำดับพันธุกรรมอย่างสูง (conserved region) จากยีน SINA3 และ SINAT3 ในพืชชนิดต่างๆ ที่ค้นหาได้จากฐานข้อมูล NCBI นำไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มาทำปฏิกิริยา RT–PCR กับอาร์เอ็นเอรวมของข้าวโพด 4 พันธุ์ ได้แก่ ตากฟ้า 1 (TF1), ตากฟ้า 3 (TF3), นครสวรรค์ 3 (NS3) และ นครสวรรค์ 1 (NS1) ได้ยีน SINA3 และ SINAT3 มีขนาดเท่ากับ 1,026 คู่เบส และ 1,050 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์โครงสร้างของยีนโดยใช้โปรแกรม EMBL-EBI database พบว่า ยีน SINA3 และ SINAT3 ที่ได้มีส่วนประกอบครบทั้งยีน ซึ่งประกอบด้วย ลำดับเบสในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน Open Reading Frame (ORF) จำนวน 1 exon สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนของยีน SINA3 และ SINAT3 เท่ากับ 341 และ 349 amino acids เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ยีน SINA3 ที่โคลนได้จากข้าวโพดมีความเหมือนอย่างสูงกับยีนในกลุ่ม E3 ubiquitin protein ligase ที่พบในข้าวโพด (*Zea mays* L.) (EF434383.1) และข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italic*a (L.) Beauv.) (XM003572636.1) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 99% และ 90% ตามลำดับ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน SINAT3 ที่ได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน E3 ubiquitin protein ligase ที่พบในข้าวโพด (*Zea mays* L.) (EU966994.1) และข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italic*a (L.) Beauv.) (XM004960614.1) โดยมีค่าความเหมือน (% Max Identities) เท่ากับ 99% และ 90% ตามลำดับ จากนั้นทำการสร้างชุด cassette ยีน โดยการเชื่อมต่อชิ้นยีน ZmSINA3 และ ZmSINAT3 เข้ากับ plant expression vector (pCAMBIA2300) ที่ประกอบด้วยโปรโมเตอร์ (35SCaMV) และเทอร์มิเนเตอร์ (NOS) ได้พลาสมิดสายผสม pCAMBIA2300 – ZmSINA3 และ pCAMBIA2300 – ZmSINAT3 มีขนาด 10.6 และ 10.7 กิโลเบส ตามลำดับ สามารถนำชุดยีนดังกล่าวไปศึกษาการแสดงออกของยีนโดยการถ่ายฝากยีนเข้าสู่พืชต้นแบบ เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับนำไปพัฒนาพันธุ์พืชเศรษฐกิจที่สนใจ เช่น ถั่วเหลือง ข้าวโพด อ้อย ฯลฯ เพื่อเพิ่มศักยภาพการทนต่อสภาวะขาดน้ำต่อไปในอนาคต

# คำนำ

สภาวะโลกร้อน (Global Warming) หรือ สภาวะภูมิอากาศเปลี่ยนแปลง (Climate Change) คือ การที่อุณหภูมิเฉลี่ยของโลกเพิ่มขึ้นประมาณ 0.5-1 องศาเซลเซียสต่อปี จากผลของภาวะเรือนกระจก (Greenhouse Effect) และปรากฏการณ์เอลนิโน (ELNINO) ซึ่งเป็นหนึ่งในวิกฤติการณ์ที่ส่งให้อากาศในโลกร้อนขึ้นเรื่อยๆ สภาวะอากาศเปลี่ยนแปลงไปอย่างไม่เคยพบมาก่อน เช่น ฤดูหนาวที่สั้นลง ฤดูร้อนที่ยาวนานขึ้น ภาวะภัยแล้ง และอุทกภัยที่ เกิดบ่อยครั้ง และรุนแรงขึ้น ส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิต ตลอดจนพืชผลทางการเกษตร ความรุนแรงของภัยแล้งขึ้นกับความชื้นในอากาศ ความชื้นในดินและระยะเวลาที่เกิดความแห้งแล้ง ในช่วงหลายปีที่ผ่านมานอกจากประเทศไทยจะประสบกับปัญหาอุทกภัยที่รุนแรงแล้ว ปัญหาการขาดน้ำทั้งด้านอุปโภคบริโภค และการเกษตร ซึ่งอาจทำให้พืชชะงักการเจริญเติบโต และพื้นที่การเกษตรเสียหาย ซึ่งมีต้นเหตุมาจากการที่มนุษย์ได้เพิ่มปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ไนตรัสออกไซด์ และคลอโรฟลูโรคาร์บอน (CFC) จากการเผาไหม้เชื้อเพลิงต่างๆ การขนส่ง การผลิตในโรงงานอุตสาหกรรม และที่สำคัญจากการตัดไม้ทำลายป่าจำนวนมหาศาล (http://www.baanjomyut.com/library/global_warming) ส่งผลกระทบต่อการดำรงอยู่ของสิ่งมีชีวิตทั้งคน สัตว์ และพืช ซึ่งในปัจจุบันไม่สามารถคาดการณ์ปริมาณน้ำฝนที่ตกในแต่ละปีได้ อาจเกิดสภาวะน้ำท่วมฉับพลันหรือแห้งแล้งอย่างรุนแรง ผลกระทบจากภาวะโลกร้อนที่เห็นได้ชัดเจนในระยะสั้นในประเทศไทยได้ก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตทางการเกษตรเป็นจำนวนมาก

การตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำของพืชในระดับยีน จากการศึกษาในพืชชนิดต่างๆ พบว่า มียีนจำนวนมากที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนแล้ง และการตอบสนองต่อสภาวะแล้งของพืชจะชักนำให้มีการแสดงออกของยีนต่างๆ การศึกษาการแสดงออกของยีนต่อสภาวะขาดน้ำ สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มสำคัญ คือ (1) กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับ signal transduction pathways (STPs) และการควบคุมการถอดรหัส (2) กลุ่มยีนที่ป้องกันเมมเบรนและฟังก์ชันของโปรตีน และ (3) กลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการดูดซึมน้ำ ไอออน และการขนส่ง (Vierling, 1991; Ingram and Bartels, 1996; Smirnoff, 1998; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2000) และพบว่ายีนที่ถูกชักนำให้แสดงออกในช่วงที่พืชเผชิญสภาวะขาดน้ำ มีหน้าที่หลัก 2 ด้านคือ ช่วยป้องกันเซลล์จากการขาดน้ำและช่วยควบคุมการแสดงออกของยีนระหว่างที่พืชอยู่ภายใต้ภาวะเครียดจากการขาดน้ำ

การปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีความทนทานต่อสภาวะขาดน้ำ ที่ผ่านมาต้องอาศัยระยะเวลา และการปรับปรุงพันธุ์โดยอาศัยการปรับปรุงแบบปกติ ที่ผ่านมาไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร นักวิจัยจึงพยายามหาหนทางหรือแนวทางการปรับปรุงพันธุ์ โดยอาศัยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วยในการพัฒนาสายพันธุ์พืชกันมากขึ้นทั้งในประเทศ และต่างประเทศ เพื่อช่วยเร่งรัดกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ทนต่อสภาวะขาดน้ำได้ ซึ่งกรมวิชาการเกษตร โดยสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพได้มีงานวิจัยเกี่ยวกับการค้นหาและศึกษากลุ่มยีน การแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำในข้าวโพดพันธุ์ทนแล้งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เป็นการศึกษาหน้าที่การทำงานของยีน และค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกทางสรีรวิทยาของพืชที่สามารถทนต่อสภาวะขาดน้ำ โดยนำยีนและข้อมูลยีนที่ได้มาใช้ในการพัฒนาสายพันธุ์พืชให้มีความทนทานต่อสภาวะขาดน้ำในพืชเศรษฐกิจอื่นๆ ที่ต้องการ

เพื่อให้สามารถนำมาใช้เป็นพืชทางเลือกในการลดปัญหาที่เกิดจากภาวะโลกร้อนได้ ซึ่งเป็นเรื่องที่นักวิจัยไทยต้องดำเนินการอย่างเร่งด่วน

ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงได้นำเทคโนโลยีด้านการโคลนยีนมาประยุกต์ใช้ในการค้นหาและศึกษาคุณสมบัติของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการทนต่อสภาวะขาดน้ำในข้าวโพด และสามารถนำยีนที่ได้ไปถ่ายฝากลงในพืชเศรษฐกิจอื่นๆ เพื่อให้ทนต่อสภาวะขาดน้ำต่อไป

## วิธีดำเนินการ

**อุปกรณ์**

1. ข้าวโพดพันธุ์ ตากฟ้า 1, ตากฟ้า 3, นครสวรรค์ 3 และ นครสวรรค์ 1 (ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์)

2. ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน SINA3 และ SINAT3 คือ SINA3 (forward) SINA3 (reverse) SINAT3 (forward) และ SINAT3 (reverse) ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน SINA3 และ SINAT3 คือ SINAXbaI (forward) SINAKpnI (reverse) SINATXbaI (forward) และ SINATKpnI (reverse) ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการเชื่อมต่อของชิ้นยีน SINA3 และ SINAT3 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. สารเคมีที่ใช้ในการทำ Electrophoresis และ Molecular Weight Marker

12. สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง HotStart Taq Master Mix Kit ของ QIAGEN

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

14. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit ของ QIAGEN
15. สารเคมีที่ใช้ในการโคลนยีน (T&A Cloning Kit) ของ Invitrogen
16. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit) ของ Fermentas
17. เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน (Competent Cells) *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5$\alpha$
18. สารเคมีสำหรับใช้กับเครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI Prism 310® DNA Sequencer
19. การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปและโปรแกรมบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต
    - โปรแกรม BLAST จากเว็บไซด์ 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**

ได้คัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดที่มีลักษณะทนแล้ง ได้แก่ พันธุ์ตากฟ้า 1, ตากฟ้า 3, นครสวรรค์ 3 และนครสวรรค์ 1 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดจากศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ โดยนำเมล็ดพันธุ์มาปลูกในกระถางที่เตรียมไว้ รดน้ำ 2 – 3 วัน/ครั้ง เมื่ออายุประมาณ 45 วัน งดให้น้ำ นำใบอ่อนมาสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อหาส่วนของยีนที่มีการแสดงออก

**2. ออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีน SINA3 และ SINAT3**

ทำการศึกษา และค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการทนต่อสภาวะขาดน้ำในข้าวโพด ได้แก่ ยีน SINA3 และ SINAT3 ที่มีรายงานในพืชชนิดต่างๆ จากฐานข้อมูลทางอินเทอร์เน็ต (www.ncbi.nim.nih.gov/) นำมาวิเคราะห์ลำดับเบสที่มีความเหมือนกันอย่างสูง (conserve region) โดยใช้โปรแกรม ClustalW2 Multiple Alignment (European Bioinformatics Institute, UK) ออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีน SINA3 และ SINAT3 คือ SINA3 (forward) SINA3 (reverse) SINAT3 (forward) และ SINAT3 (reverse) ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน SINA3 และ SINAT3 คือ SINAXbaI (forward) SINAKpnI (reverse) SINATXbaI (forward) และ SINATKpnI (reverse) ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการเชื่อมต่อของชิ้นยีน SINA3 และ SINAT3 เข้ากับ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) คือ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse) **(ตารางที่ 1)**

**3. การโคลนยีน SINA3 และ SINAT3 ในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน**

**3.1 การสกัดอาร์เอ็นเอรวม**

ตัวอย่างข้าวโพดที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ตากฟ้า 1, ตากฟ้า 3, นครสวรรค์ 3 และ นครสวรรค์ 1 เมื่ออายุได้ 45 วัน งดให้น้ำ นำมาสกัดอาร์เอ็นเอรวม โดยใช้ MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit (BIONEER Corporation) ตัดใบอ่อนของข้าวโพดประมาณ 5 มิลลิกรัม บดในโกร่งพร้อมกับไนโตรเจนเหลวจน

เป็นผงแป้ง 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.) ของสารละลายอาร์เอ็นเอที่ได้ โดยใช้เครื่อง spectrophotometer เก็บสารละลายอาร์เอ็นเอที่ -80°C จนกว่าจะใช้งาน

**3.2 การสังเคราะห์ cDNA จาก total RNA โดยวิธี RT–PCR**

ทำการสังเคราะห์ cDNA จากอาร์เอ็นเอรวมของข้าวโพดทั้ง 4 พันธุ์ โดยใช้ SuperScrip™ III One–Step RT–PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) ด้วยวิธี One–Step RT–PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน SINA3 คือ SINA3 (forward) และ SINA3 (reverse) และไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน SINAT3 คือ SINAT3 (forward) และ SINAT3 (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

**3.3 การเชื่อมต่อชิ้นยีน SINA3 และ SINAT3 เข้ากับเวกเตอร์ และการตรวจสอบการปรากฏของยีน**

**3.3.1 การเชื่อมต่อชิ้นยีน SINA3 และ SINAT3 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 T&A Cloning Kit (RBC Bioscience, Taiwan) ในปริมาตรของปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย Gel-purified PCR product 4 ไมโครลิตร, T&A Cloning vector 2 ไมโครลิตร, Ligation Buffer A 1 ไมโครลิตร, Ligation Buffer B 1 ไมโครลิตร, T4 DNA Ligase 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ ผสมปฏิกิริยาทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 22°C เป็นเวลา 15 – 30 นาที และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4°C นานข้ามคืน จากนั้นทำการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5$\alpha$ โดยนำปฏิกิริยา ligation จำนวน 2 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดคอมพิเทนต์เซลล์ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และแช่บนน้ำแข็ง เป็นเวลา 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

**3.3.2 การตรวจสอบการปรากฏของยีน SINA3 และ SINAT3 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 วางบน

หลอดทดลองขนาด 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 SINA3 และ SINAT3 โดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI 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 SINA3 และ SINAT3 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 ($\alpha$) 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

**4. การสร้างชุด cassette ยีน และการตรวจสอบการปรากฏของยีน SINA3 และ SINAT3**

**4.1 การสร้างชุด cassette ยีน**

**4.1.1 การเพิ่มปริมาณยีน SINA3 และ SINAT3 จากพลาสมิดดีเอ็นเอของข้าวโพด โดยวิธี PCR**

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่มียีน SINA3 และ SINAT3 ไปเพิ่มปริมาณส่วนที่ต้องการในหลอดทดลองกับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน SINA3 คือ SINAXbaI (forward) และ SINAKpnI (reverse) และยีน SINAT3 คือ

SINATXbaI (forward) และ SINATKpnI (reverse) ซึ่งได้เติมลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I เพื่อบังคับทิศทางของการเชื่อมต่อชิ้นยีน โดยใช้ Hot Start Taq Master Mix Kit (QIAGEN, USA) ในปริมาตรของปฏิกิริยาพอลิเมเรสทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม, 0.5U HotStart Taq Master Mix, 0.4 μM Gene Specific Primer (forward), 0.4 μM Gene Specific Primer (reverse) ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำโดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre–Denature 93°C 15 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denature 94°C 30 วินาที, Anneal 60°C 30 วินาที, Extend 68°C 1 นาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วยขั้นตอน 72°C 10 นาที อีก 1 รอบ หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาเก็บตัวอย่างไว้ที่ 4°C และตรวจวิเคราะห์ผล โดยนำผลผลิต PCR ที่ได้มาตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis นำไปย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transiluminators พร้อมบันทึกภาพ

**5.1.2 การเชื่อมต่อชิ้นยีน SINA3 และ SINAT3 เข้ากับ Plant Expression Vector**

นำพลาสมิด pCAMBIA2300 ที่มีส่วนประกอบของโปรโมเตอร์ (35SCaMV) และเทอร์มิเนเตอร์ (NOS) ซึ่งมีขนาด 9,648 คู่เบส มาใช้เป็น Plant Expression Vector มียีน nptII (kanamycin) เป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือก และชิ้นดีเอ็นเอของยีน SINA3 และ SINAT3 ขนาด 1,026 คู่เบส และ 1,050 คู่เบส นำแต่ละตัวอย่างมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* และ *KpnI* โดยในปฏิกิริยาทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอของยีน SINA3 และ SINAT3/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 *Xba*I และอีกข้างหนึ่งเป็นตำแหน่งของเอนไซม์ *Kpn*I นำชิ้นยีน SINA3 และ SINAT3 เชื่อมต่อเข้ากับ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) เพื่อสร้างพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมที่สมบูรณ์ ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยชิ้นดีเอ็นเอของยีน SINA3 / SINAT3 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 DH5$\alpha$ 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

**4.2 การตรวจสอบการปรากฏของยีน ใน Plant Expression Vector**

**4.2.1 การตรวจสอบการปรากฏของยีน SINA3 และ SINAT3 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 ($\alpha$) ตรวจวิเคราะห์ผลด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis เทียบขนาดแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker พร้อมบันทึกภาพ

**4.2.2 การตรวจสอบการปรากฏของยีน SINA3 และ SINAT3 ด้วยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ**

การตรวจสอบการปรากฏของยีน SINA3 และ SINAT3 ด้วยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I 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 2555 – เดือน กันยายน 2557

**สถานที่ทำการทดลอง** สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อ. ธัญบุรี จ. ปทุมธานี

## ผลการทดลองและวิจารณ์

**1. การโคลนยีน SINA3 และ SINAT3 จากข้าวโพดในส่วนของยีนที่มีการแสดงออก**

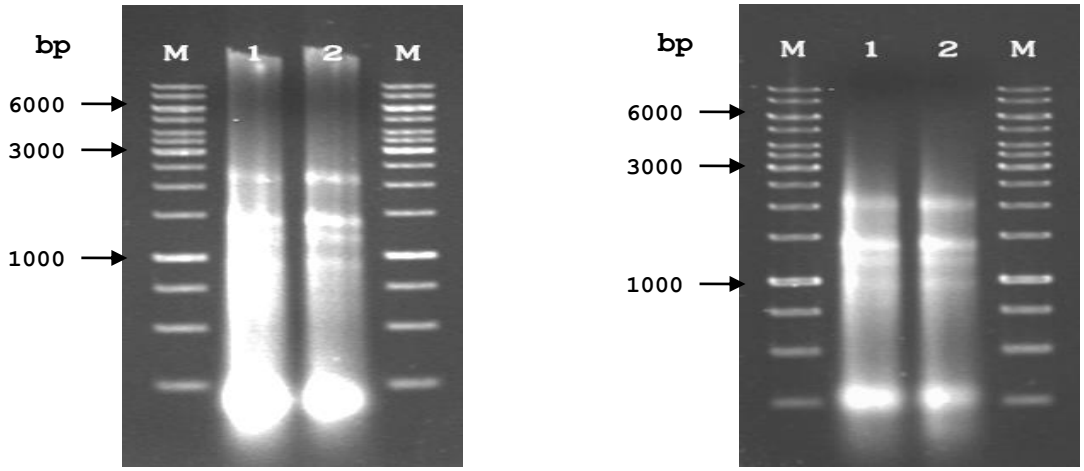
จากการโคลนยีน SINA3 และ SINAT3 ในส่วนของยีนที่มีการแสดงออก โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน SINA3 คือ SINA3 (forward) และ SINA3 (reverse) และไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน

SINAT3 คือ SINAT3 (forward) และ SINAT3 (reverse) **(ตารางที่ 1)** โดยนำไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ได้มาทำปฏิกิริยา RT – PCR กับอาร์เอ็นเอรวมของข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), ตากฟ้า 3 (TF3) **(ภาพที่ 1ก)**, นครสวรรค์ 3 (NS3) และ นครสวรรค์ 1 (NS1) **(ภาพที่ 1ข)** พบว่า สามารถสังเคราะห์ยีน SINA3 และ SINAT3 จากข้าวโพดทั้ง 4 พันธุ์ ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.0 กิโลเบส **(ภาพที่ 2ก และ 2ข)** นำดีเอ็นเอของยีน SINA3 และ SINAT3 ที่ได้ไปเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ T&A Cloning Vector Kit และถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย DH5$\alpha$ คัดเลือกโคโลนีที่คาดว่ามียีน SINA3 และ SINAT3 นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ **(ภาพที่ 3ก และ 3ข)** และตรวจสอบโคโลนีที่ได้รับการถ่ายยีนโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I พบว่า รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของยีน SINA3 และ SINAT3 ที่มีความถูกต้องจำนวน 2 แถบ ได้แก่ ขนาดประมาณ 2.7 กิโลเบส เป็นขนาดของเวกเตอร์ (Vector) และ 1.0 กิโลเบส เป็นขนาดของยีน SINA3 ตามลำดับ **(ภาพที่ 4ก และ 4ข)** นำพลาสมิดดีเอ็นเอโคลนที่มียีน SINA3 และ SINAT3 จากข้าวโพดทั้ง 4 พันธุ์ ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer พบว่า ยีน SINA3 จากข้าวโพดทั้ง 4 พันธุ์ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 1,026 คู่เบส และสามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนในส่วนที่มีการแสดงออก (ORF) ของยีน SINA3 จำนวน 341 amino acid **(ภาพที่ 5)** และ ยีน SINAT3 จากข้าวโพดทั้ง 4 พันธุ์ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 1,050 คู่เบส และสามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนในส่วนที่มีการแสดงออก (ORF) ของยีน SINAT3 จำนวน 349 amino acid **(ภาพที่ 6)**

**ตารางที่ 1** แสดงคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา RT – PCR ของยีน SINA3 และ SINAT3

| ชื่อไพรเมอร์ | ลำดับนิวคลีโอไทด์ ( 5' → 3' ) | ขนาด (bp.) | อุณหภูมิ Tm (°C) | GC content (%) |
|---|---|---|---|---|
| SINA3(forward) | ATG GAG CTG GAC AGC ATC GAG TGC ATG TCC TAC | 33 | 71.6(55) | 54.5 |
| SINA3(reverse) | TCA GCT GAA CAA ATT GGG AAT GCA GGC TCC TG | 32 | 69.4(55) | 50.0 |
| SINAT3(forward) | ATG GAC ATG GAC AGG GAC AGC GTG GAG TGC CTC | 33 | 73.2(55) | 60.6 |
| SINAT3(reverse) | TCA GCT GCA AAG GTT AGG AAT GCA GGC TCC | 30 | 70.4(55) | 53.3 |
| SINAXbaI(forward) | CAC TCT AGA ATG GAG CTG GAC AGC ATC GAG TGC ATG | 36 | 68.0(55) | 52.8 |
| SINAKpnI(reverse) | CAC GGT ACC TCA GCT GAA CAA ATT GGG AAT GCA GGC | 36 | 68.0(55) | 52.8 |
| SINATXbaI(forward) | CAC TCT AGA ATG GAC ATG GAC AGG GAC AGC GTG GAG | 36 | 69.0(55) | 55.6 |
| SINATKpnI(reverse) | CAC GGT ACC TCA GCT GCA AAG GTT AGG AAT GCA GGC | 36 | 69.0(55) | 55.6 |
| NOS(forward) | GTT TGA ACG ATC GGG GAA | 28 | 67.5(60) | 50.0 |

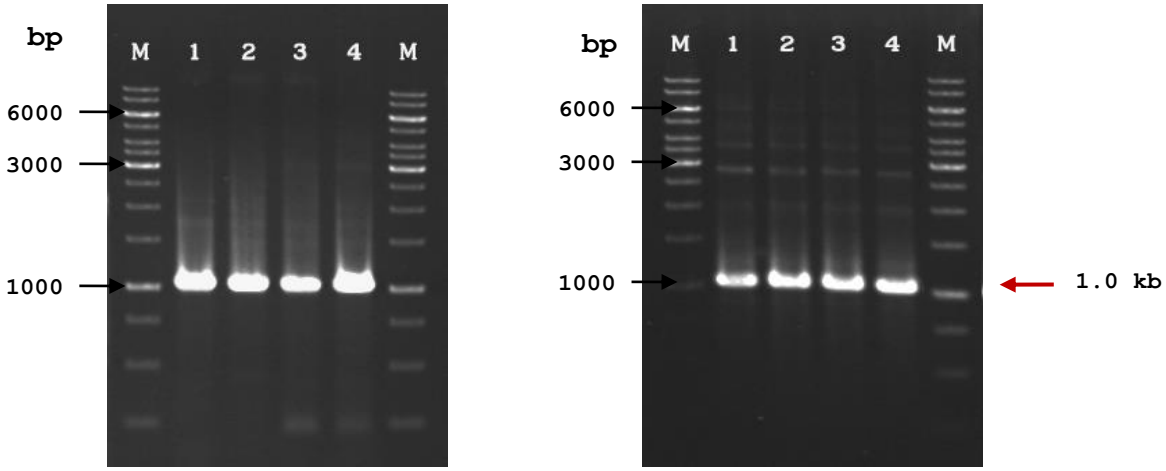
| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ATT CGA GCT C | | | |
| 35SCaMV(reverse) | CAT TTG GAG AGG ACA CGC TGA CAA GCT GAC | 30 | 70.1(60) | 53.3 |




ก ข

**ภาพที่ 1** **ก.** แสดงอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้จากข้าวโพด 2 พันธุ์, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = ข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1) และ Lane 2 = ข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3)

**ข.** แสดงอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้จากข้าวโพด 2 พันธุ์, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 2 = ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)

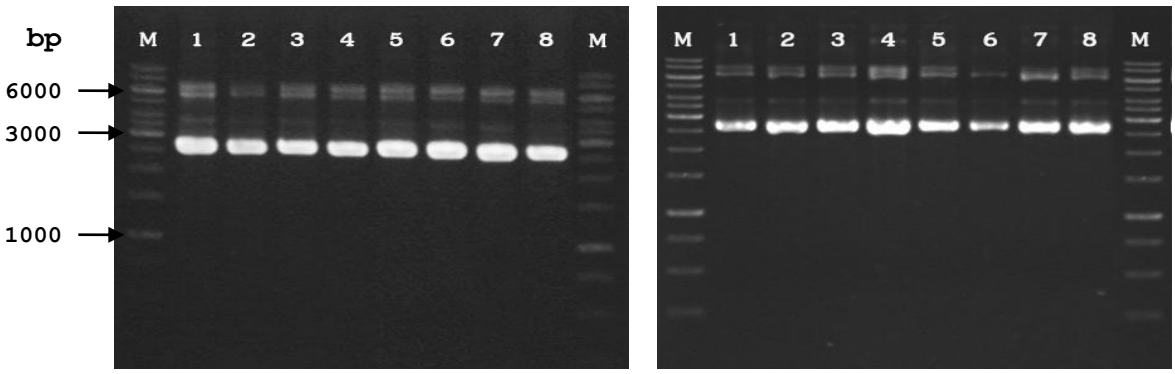



ก ข

**ภาพที่ 2** **ก.** แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน SINA3 ที่เพิ่มปริมาณได้จากข้าวโพด 4 พันธุ์ ร่วมกับคู่ไพรเมอร์ SINA3 (forward) และ SINA3 (reverse) ด้วยเทคนิค RT-PCR, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA

Ladder (Fermentas), Lane 1 = แถบดีเอ็นเอของยีน SINA3 ในข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1(TF1), Lane 2 = แถบดีเอ็นเอของยีน SINA3 ในข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 3 = แถบดีเอ็นเอของยีน SINA3 ในข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 4 = แถบดีเอ็นเอของยีน SINA3 ในข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)

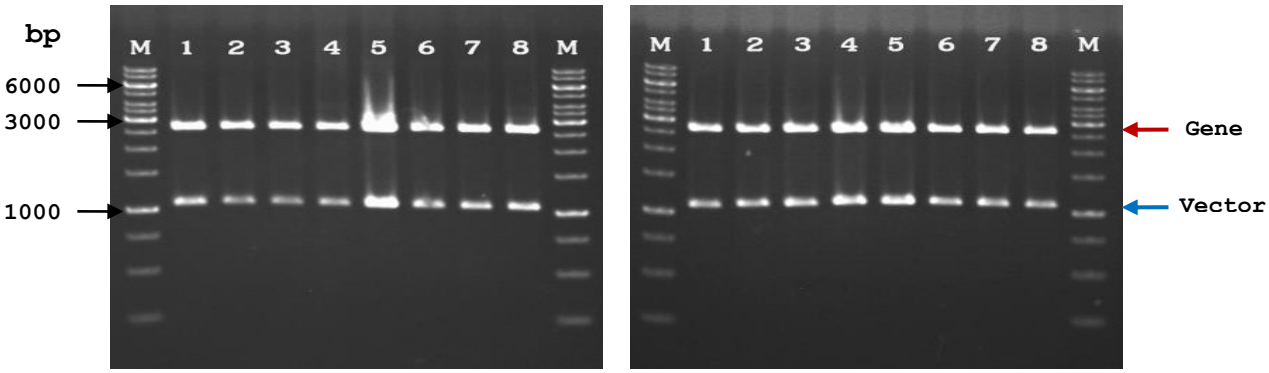
**ข.** แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน SINAT3 ที่เพิ่มปริมาณได้จากข้าวโพด 4 พันธุ์ ร่วมกับคู่ไพรเมอร์ SINAT3 (forward) และ SINAT3 (reverse) ด้วยเทคนิค RT-PCR, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = แถบดีเอ็นเอของยีน SINAT3 ในข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1(TF1), Lane 2 = แถบดีเอ็นเอของยีน SINAT3 ในข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 3 = แถบดีเอ็นเอของยีน SINAT3 ในข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 4 = แถบดีเอ็นเอของยีน SINAT3 ในข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)




**ก** **ข**

**ภาพที่ 3** **ก.** แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโคโลนีที่คาดว่ามียีน SINA3, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 3-4 = แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 5-6 = แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 7-8 = แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)

**ข.** แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอโคโลนีที่คาดว่ามียีน SINAT3, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 3-4 = แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 5-6 = แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 7-8 = แถบดีเอ็นเอของพลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)




ก ข

**ภาพที่ 4** **ก.** แสดงรูปแบบของพลาสมิดดีเอ็นเอของยีน SINA 3 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = รูปแบบของแถบ ดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 3-4 = รูปแบบของแถบดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 5-6 = รูปแบบของแถบดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 7-8 = รูปแบบของแถบดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)

**ข.** แสดงรูปแบบของพลาสมิดดีเอ็นเอของยีน SINAT 3 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = รูปแบบของแถบดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 3-4 = รูปแบบของแถบดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 5-6 = รูปแบบของแถบดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 7-8 = รูปแบบของแถบดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)

```
1     atggagctggacagcatcgagtgcatgtcctactccgacagcatgggggacgacgacacc
      M  E  L  D  S  I  E  C  M  S  Y  S  D  S  M  G  D  D  D  T
61    gacgccgtcacctcgtcccagctccctcgccccttcctcaaatcctcctccaccgccggt
      D  A  V  T  S  S  Q  L  P  R  P  F  L  K  S  S  S  T  A  G
121   actgccgccgtcaacgtggtcgtcgtctccgaccgcgtcggtgccgccgggccggtagcg
      T  A  A  V  N  V  V  V  V  S  D  R  V  G  A  A  G  P  V  A
181   ggagcgggttcgctggtgatttcgccagccacgggcgtgcacgagctgctcgagtgcccc
      G  A  G  S  L  V  I  S  P  A  T  G  V  H  E  L  L  E  C  P
241   gtctgcaccaattccatgtacccgcccatccaccagtgccaaaatggtcatactctatgt
      V  C  T  N  S  M  Y  P  P  I  H  Q  C  Q  N  G  H  T  L  C
301   tccacctgcaaaactcgggtgcacaaccgctgcccaacttgtcgacaagagctaggtgac
      S  T  C  K  T  R  V  H  N  R  C  P  T  C  R  Q  E  L  G  D
361   atcaggtgtctggcattagagaaggtggctgaatcacttgagctcccctgcaaatactac
      I  R  C  L  A  L  E  K  V  A  E  S  L  E  L  P  C  K  Y  Y
421   cctcttggatgttcagaagtcttcccatactacagcaaactcaagcatgaatcacagtgt
      P  L  G  C  S  E  V  F  P  Y  Y  S  K  L  K  H  E  S  Q  C
481   aattttaggccatacaattgcccttatgctggttctgaatgctcagttgttggggatatt
      N  F  R  P  Y  N  C  P  Y  A  G  S  E  C  S  V  V  G  D  I
541   tcttttcttgtggcacatctgcgagatgatcataaagtggacatgcactctggatgtaca
      S  F  L  V  A  H  L  R  D  D  H  K  V  D  M  H  S  G  C  T
601   tttaatcaccgctatgtcgagtccaacccaagagaggttgaaaatgcaacttggatgcta
      F  N  H  R  Y  V  E  S  N  P  R  E  V  E  N  A  T  W  M  L
661   actgtttttcattgttttgggaagtacttttgcttgcactttgaggcatttcagcttgga
      T  V  F  H  C  F  G  K  Y  F  C  L  H  F  E  A  F  Q  L  G
721   atggcaccagtatacatggctttcctccggtttatgggcgatgaaaatgatgctaggaac
      M  A  P  V  Y  M  A  F  L  R  F  M  G  D  E  N  D  A  R  N
781   tacagctatagtcttgaggttggtgcaaatggcaggaagatgatatgggagggaactccc
      Y  S  Y  S  L  E  V  G  A  N  G  R  K  M  I  W  E  G  T  P
841   cgcagcatccgggacagccacaggaaggttagggacagccatggtggtctaataattcag
      R  S  I  R  D  S  H  R  K  V  R  D  S  H  G  G  L  I  I  Q
901   cgcaacatggctctcttcttctcaggtggagaaaggaaagagctgaaactgcgagtcaca
      R  N  M  A  L  F  F  S  G  G  E  R  K  E  L  K  L  R  V  T
961   ggccgtatctggaaggagcagcagaatcctgactcaggagcctgcattcccaatttgttc
      G  R  I  W  K  E  Q  Q  N  P  D  S  G  A  C  I  P  N  L  F
1021  agctga
      S  -
```

**ภาพที่ 5** แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน SINA3 ที่โคลนได้จากข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) ในส่วนที่มีการแสดงออก

```
1     atggacatggacagggacagcgtggagtgcctctccctcccagacgctgccatggacgtg
      M  D  M  D  R  D  S  V  E  C  L  S  L  P  D  A  A  M  D  V
61    gacaacgtcgacggccacccgcaccacggccatctcggtctcccgctccaccccgcccac
      D  N  V  D  G  H  P  H  H  G  H  L  G  L  P  L  H  P  A  H
121   ctcccatcctctggtgccgggcgcgcgttccccaaggtgaatgccgggggcggcggagcg
      L  P  S  S  G  A  G  R  A  F  P  K  V  N  A  G  G  G  G  A
181   ggcccggctgtagcgggagcggcgggcgcagcaggagcaggcggagggccgccggcgacc
      G  P  A  V  A  G  A  A  G  A  A  G  A  G  G  G  P  P  A  T
241   agcgtgcacgagctgctcgagtgccccgtctgcactaactccatgttcccgcccatccat
      S  V  H  E  L  L  E  C  P  V  C  T  N  S  M  F  P  P  I  H
301   cagtgtcaaaatggacatactttgtgttcgacatgcaaggccagggtgcacaaccggtgc
      Q  C  Q  N  G  H  T  L  C  S  T  C  K  A  R  V  H  N  R  C
361   cctacatgcagacaagagcttggtgatatcaggtgcttagcattggaaaaagtagcagag
      P  T  C  R  Q  E  L  G  D  I  R  C  L  A  L  E  K  V  A  E
421   tcacttgagcttccatgtaagtactgctctttaggttgcccagagatcttcccgtactac
      S  L  E  L  P  C  K  Y  C  S  L  G  C  P  E  I  F  P  Y  Y
481   agcaagataaagcatgaagcacagtgcagcttcaggccatataactgcccctatgctggc
      S  K  I  K  H  E  A  Q  C  S  F  R  P  Y  N  C  P  Y  A  G
541   tctgaatgtgctgtggctggtgatattccattccttgttgcacatttgagggatgatcac
      S  E  C  A  V  A  G  D  I  P  F  L  V  A  H  L  R  D  D  H
601   aaagttgatatgcacagtggctgcacgttcaaccatagatacgtcaaatccaacccgcga
      K  V  D  M  H  S  G  C  T  F  N  H  R  Y  V  K  S  N  P  R
661   gaggttgaaaatgccacctggatgctaacagtattccattgttttgggcagtacttctgc
      E  V  E  N  A  T  W  M  L  T  V  F  H  C  F  G  Q  Y  F  C
721   ctgcacttcgaggcattccagctcggaatggctccagtctatatggctttcctccgattc
      L  H  F  E  A  F  Q  L  G  M  A  P  V  Y  M  A  F  L  R  F
781   atgggtgatgagaatgaagcaaggaactatacatatagcctagaggttggtggtaatggg
      M  G  D  E  N  E  A  R  N  Y  T  Y  S  L  E  V  G  G  N  G
841   aggaaaatggtatgggaaggtactcctagaagcatccgtgacagccaccgcaaggtccgt
      R  K  M  V  W  E  G  T  P  R  S  I  R  D  S  H  R  K  V  R
901   gacagccatgatggcctcatcatccagaggaatatggcgctgttcttctctggtggtgac
      D  S  H  D  G  L  I  I  Q  R  N  M  A  L  F  F  S  G  G  D
961   aggaaggagctgaagctgaaggtgactgggcggatctggaaagagcagacgaaccccgat
      R  K  E  L  K  L  K  V  T  G  R  I  W  K  E  Q  T  N  P  D
1021  ggagcctgcattcctaacctttgcagctga
      G  A  C  I  P  N  L  C  S  -
```

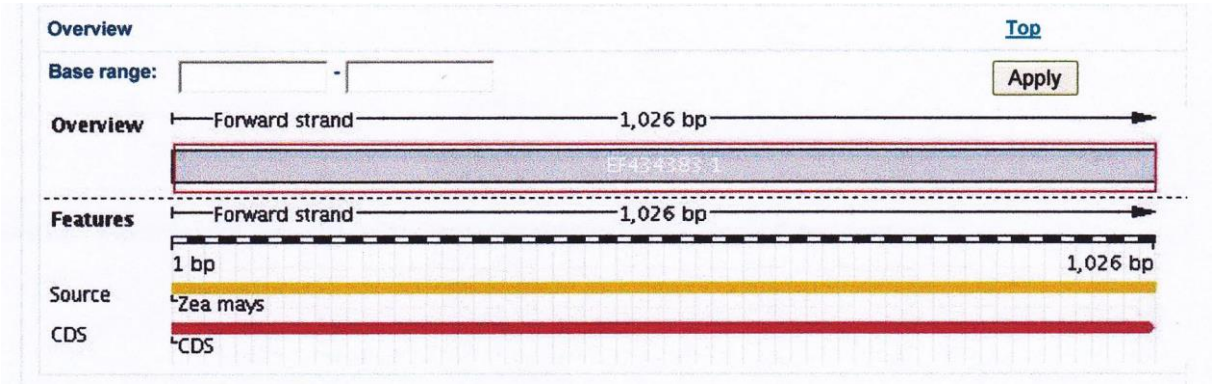
**ภาพที่ 6** แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน SINAT3 ที่โคลนได้จากข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) ในส่วนที่มีการแสดงออก

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของยีน SINA3 และ SINAT3 มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างยีน โดยใช้โปรแกรม ClustalW Multiple Alignment บนอินเทอร์เน็ต พบว่า ลำดับกรดอะมิโนของยีน SINA3 และ SINAT3 มีค่าความเหมือนกัน (% Identities) เท่ากับ 78 % **(ภาพที่ 7)** และพบว่ายีน SINA3 และ SINAT3 เป็นยีนที่อยู่ในกลุ่ม E3 ubiquitin ligase ซึ่งอยู่ในกระบวนการ ubiquitination คือ เป็นหนึ่งในกระบวนการ post-translational modification (กระบวนการดัดแปลงโปรตีนภายหลังการแปลรหัส เช่น การเติมหมู่ฟอสเฟต, การเติมหมู่น้ำตาล หรือโมเลกุลอื่นๆ ให้กับโปรตีน) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการพัฒนาทั้งหมดในเซลล์ eukaryotic เกิดการสร้างพันธะ covalent โดยอาศัยการเติม ubiquitin เข้าไปยังหมู่กรดอะมิโนไลซีน (lysine residue) ของโปรตีนเป้าหมาย เพื่อควบคุมความกระบวนการต่างๆ ในเซลล์พืช เช่น ความคงตัว, การเกิดกิจกรรม และการขนส่ง เป็นต้น โดยโปรตีน E3 ubiquitin ligase เป็นกลุ่มโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการทนต่อสภาวะเครียด ซึ่งเกี่ยวข้องโดยตรงระหว่างกระบวนการ ubiquitin proteosome system (UPS) กับกลไกการตอบสนองต่อสภาวะความเครียดต่างๆ โดย UPS อาจทำหน้าที่ในการรับรู้ต่อการกระตุ้นจากสิ่งเร้าภายนอกอย่างรวดเร็ว มีประสิทธิภาพ ซึ่งจะช่วยให้เซลล์ของพืชมีการปรับตัวเพื่อสามารถเจริญเติบโตและมีชีวิตรอดได้เมื่ออยู่ในสภาวะไม่เหมาะสม (Thomann *et al.,* 2005; Sonoda *et al*., 2009; Pokhilko *et al*., 2011.)

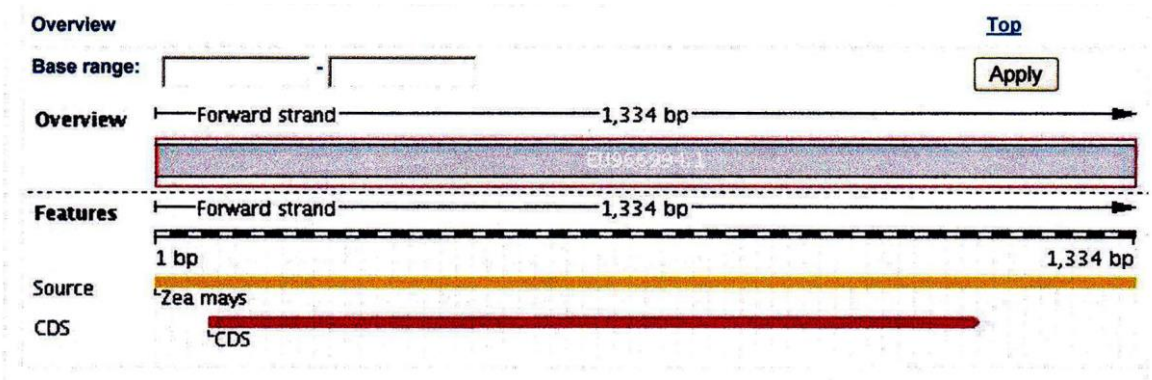
```
CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

SINA3_NS3     --MELDSIECMSYSDS-MGDDDTDAVTSS---QLP-RPFLKSSSTAGTAAVNVVVVSDRV 53
SINAT3_NS3    MDMDRDSVECLSLPDAAMDVDNVDGHPHHGHLGLPLHPAHLPSSGAGRAFPKVNAGGGGA 60
                *: **:**:* .*: *. *:.*. .       ** :*   .** ** *  :* . .. .
SINA3_NS3     G--AAGPVAGAGSLVISPATGVHELLECPVCTNSMYPPIHQCQNGHTLCSTCKTRVHNRC 111
SINAT3_NS3    GPAVAGAAGAAGAGGGPPATSVHELLECPVCTNSMFPPIHQCQNGHTLCSTCKARVHNRC 120
              *  .**....**:   .***.**************:*****************:******
SINA3_NS3     PTCRQELGDIRCLALEKVAESLELPCKYYPLGCSEVFPYYSKLKHESQCNFRPYNCPYAG 171
SINAT3_NS3    PTCRQELGDIRCLALEKVAESLELPCKYCSLGCPEIFPYYSKIKHEAQCSFRPYNCPYAG 180
              **************************** .***.*:******:***:**.**********
SINA3_NS3     SECSVVGDISFLVAHLRDDHKVDMHSGCTFNHRYVESNPREVENATWMLTVFHCFGKYFC 231
SINAT3_NS3    SECAVAGDIPFLVAHLRDDHKVDMHSGCTFNHRYVKSNPREVENATWMLTVFHCFGQYFC 240
              ***:*.***.************************:********************:***
SINA3_NS3     LHFEAFQLGMAPVYMAFLRFMGDENDARNYSYSLEVGANGRKMIWEGTPRSIRDSHRKVR 291
SINAT3_NS3    LHFEAFQLGMAPVYMAFLRFMGDENEARNYTYSLEVGGNGRKMVWEGTPRSIRDSHRKVR 300
              *************************:****:******.*****:****************
SINA3_NS3     DSHGGLIIQRNMALFFSGGERKELKLRVTGRIWKEQQNPDSGACIPNLFS 341
SINAT3_NS3    DSHDGLIIQRNMALFFSGGDRKELKLKVTGRIWKEQTNPD-GACIPNLCS 349
              ***.***************:******:********* *** ******* *
```

**ภาพที่ 7** แสดงการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนระหว่างยีน SINA3 และ SINAT3 ที่โคลนได้จากข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) วิเคราะห์โดยโปรแกรม ClustalW Multiple Alignment http://www.ebi.ac.uk/clustalw/

เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์โครงสร้างของยีน โดยใช้โปรแกรม EMBL – EBI database บนอินเทอร์เน็ต พบว่า ยีน SINA3 และ SINAT3 มีส่วนประกอบครบทั้งยีน ซึ่งประกอบด้วย ลำดับเบสส่วนที่มีการแสดงออกของยีน open reading frame (ORF) หรือ coding sequence (CDS) ของยีน SINA3 ขนาด 1,026 คู่เบส มีจำนวน 1 exon (ภาพที่ 8) และของยีน SINAT3 ขนาด 1,050 คู่เบส มีจำนวน 1 exon (ภาพที่ 9) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน SINA3 ที่ได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีนในกลุ่ม E3 ubiquitin protein ligase ที่พบในข้าวโพด (*Zea mays* L.) (EF434383.1) **(ภาพผนวกที่ 1)** และข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italic* (L.) Baeuv.) (XM004952220.1) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 99% และ 90% ตามลำดับ **(ตารางที่ 2)** และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน SINAT3 ที่ได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน E3 ubiquitin protein ligase ที่พบในข้าวโพด (*Zea mays* L.) (EU966994.1) (ภาพผนวกที่ 2) และข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italic* (L.) Baeuv.) (XM004960614.1) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 99% และ 90% ตามลำดับ **(ตารางที่ 3)**




**ภาพที่ 8** โครงสร้างของยีน SINA3 ในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน coding sequence (CDS) มีขนาด 1,026 คู่เบส (แถบลูกศรสีแดง) วิเคราะห์โดยโปรแกรม EMBL-EBI database.



**ภาพที่ 9** โครงสร้างของยีน SINAT3 ในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน coding sequence (CDS) มีขนาด 1,050 คู่เบส (แถบลูกศรสีแดง) วิเคราะห์โดยโปรแกรม EMBL-EBI database.

**ตารางที่ 2** การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน SINA3 ที่โคลนได้จากข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) กับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank บนอินเทอร์เน็ตโปรแกรม www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST

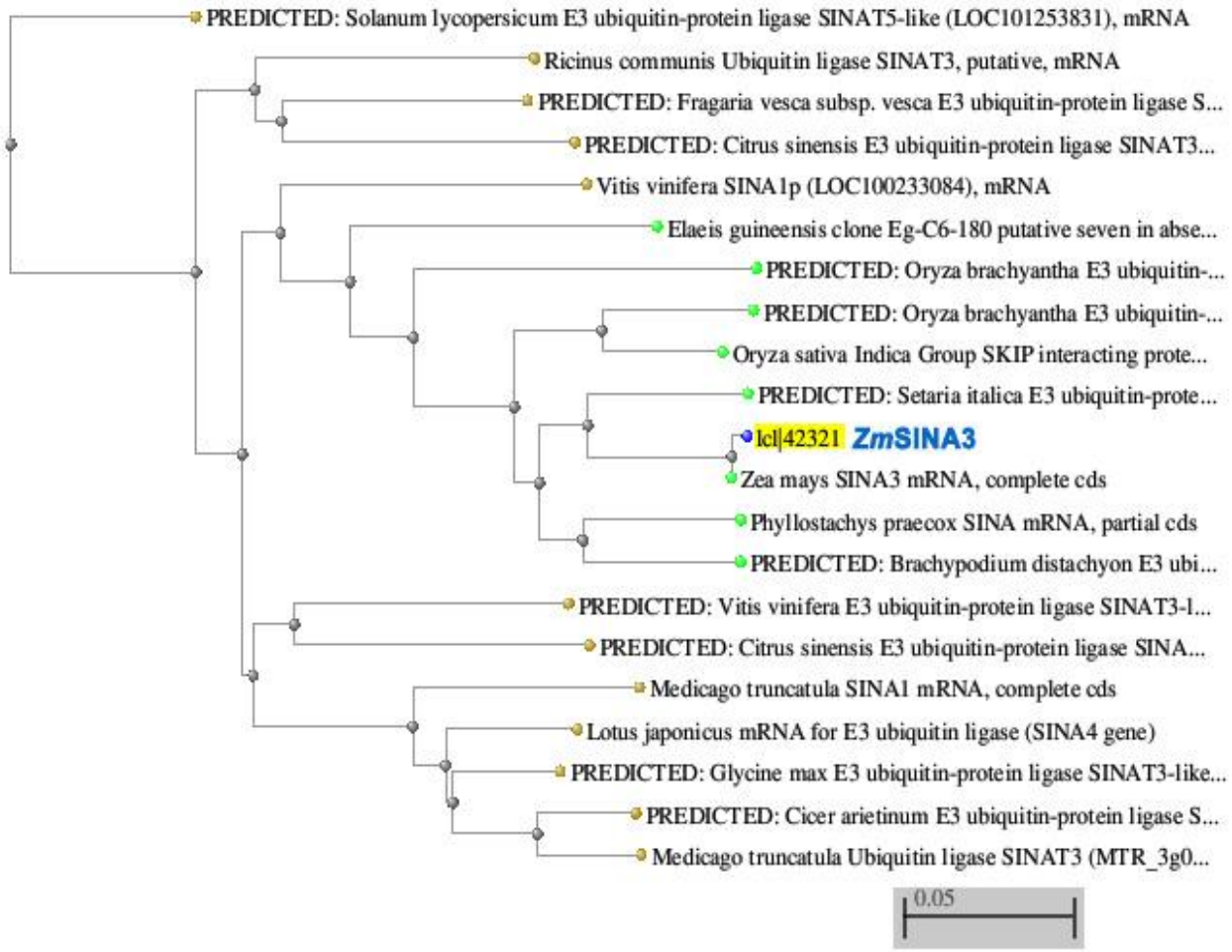
| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Identities | Accession |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Zea mays SINA3 mRNA, complete cds | 1950 | 1950 | 100% | 0.0 | 99% | EF434383.1 |
| Setaria italica E3 ubiquitin-protein ligase SINAT4-like (LOC101753703), mRNA | 1367 | 1367 | 100% | 0.0 | 90% | XM004952220.1 |
| Brachypodium distachyon E3 ubiquitin-protein ligase SINAT5-like (LOC100826252), mRNA | 1029 | 1106 | 90% | 0.0 | 89% | XM003572636.1 |
| Phyllostachys praecox SINA mRNA, partial cds | 1038 | 1038 | 79% | 0.0 | 89% | DQ013805.1 |
| Oryza brachyantha E3 ubiquitin-protein ligase SINAT3-like (LOC102707930), mRNA | 952 | 1030 | 94% | 0.0 | 87% | XM006647122.1 |

**ตารางที่ 3** การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน SINAT3 ที่โคลนได้จากข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) กับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank บนอินเทอร์เน็ตโปรแกรม www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST

| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Identities | Accession |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Zea mays clone 298706 ubiquitin ligase SINAT3 mRNA, complete cds | 1880 | 1880 | 100% | 0.0 | 99% | EU966994.1 |
| Setaria italica E3 ubiquitin-protein ligase SINAT3-like (LOC101763752), mRNA | 1385 | 1385 | 99% | 0.0 | 90% | XM004960614.1 |
| Brachypodium distachyon E3 ubiquitin-protein ligase SINAT3-like (LOC100822426), mRNA | 1148 | 1148 | 99% | 0.0 | 86% | XM003566357.1 |

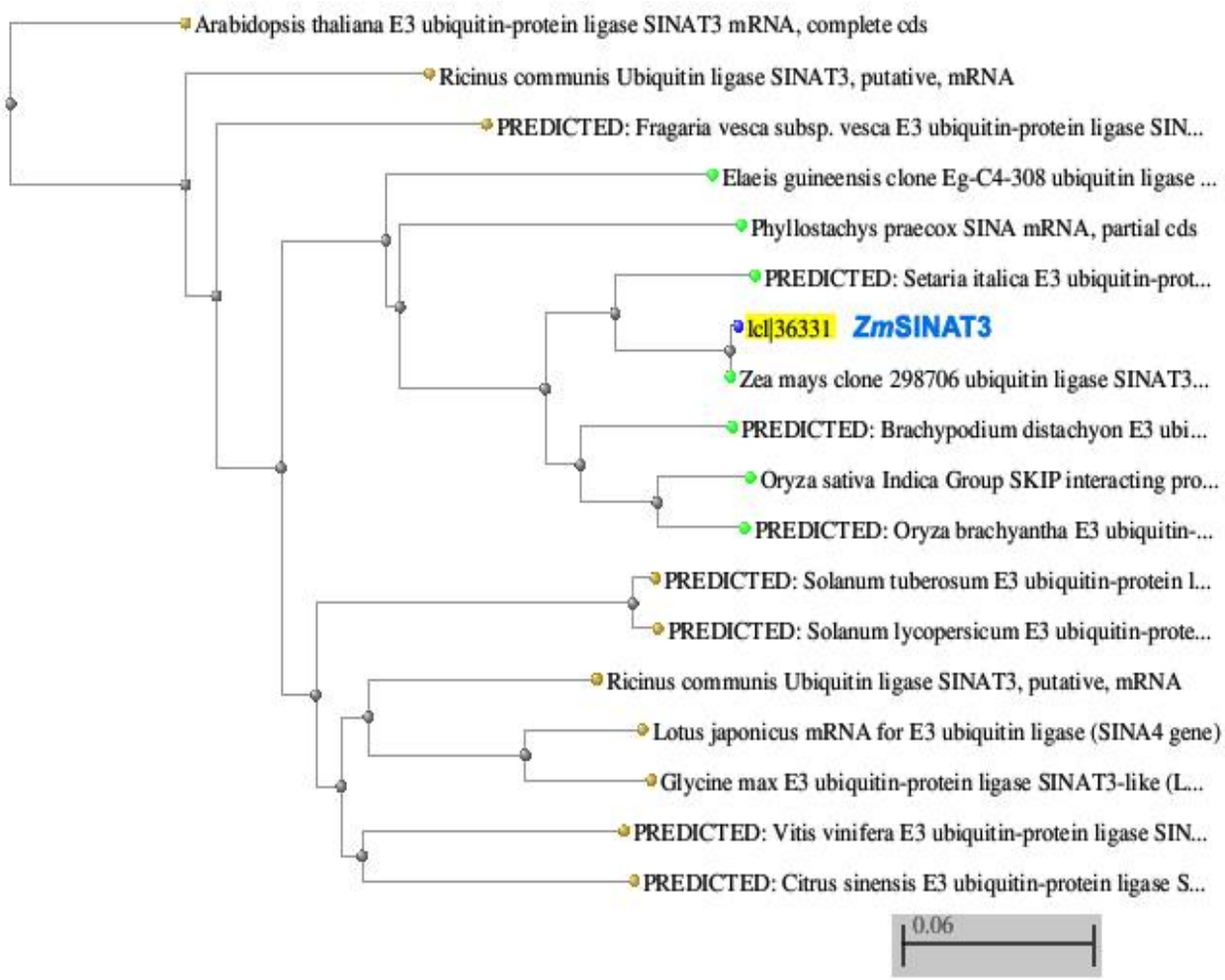
| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Oryza brachyantha E3 ubiquitin-protein ligase SINAT3-like (LOC102711436), partial | 1079 | 1079 | 79% | 0.0 | 89% | XM006655063.1 |
| Phyllostachys praecox SINA mRNA, partial cds | 687 | 687 | 77% | 0.0 | 81% | DQ013805.1 |

เมื่อนำข้อมูลยีน SINA3 และ SINAT3 จากข้าวโพดมาศึกษาความสัมพันธ์กับยีนชนิดเดียวกันในพืชชนิดต่างๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/ treeView.cgi) พบว่า ยีน SINA3 และ SINAT3 ที่สังเคราะห์ได้จากข้าวโพด (*Zea mays* L.) มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับพืชในกลุ่มใบเลี้ยงเดี่ยว คือ ข้าวโพด (*Zea may* L.) ข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italica* (L.) Beauv.) และพืชตระกูลหญ้า (*Brachypodium distachyon*) มากกว่าพืชในกลุ่มใบเลี้ยงคู่ **(ภาพที่ 10 และ ภาพที่ 11)**




**ภาพที่ 10** แสดงความสัมพันธ์ระหว่างยีน SINA3 ที่โคลนได้จากข้าวโพด เปรียบเทียบกับพืชชนิดต่างๆ

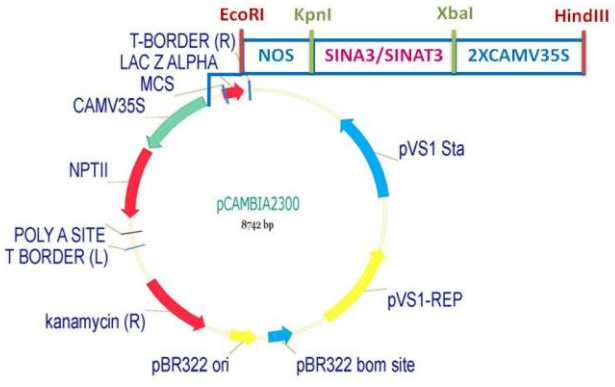
โดยใช้โปรแกรม www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/treeView.cgi



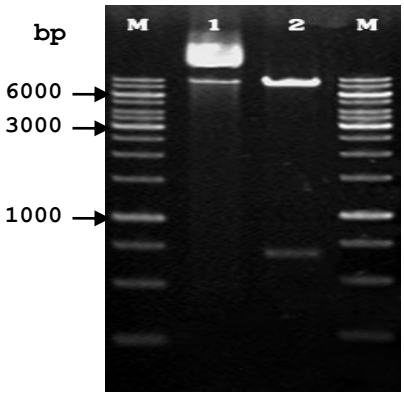

**ภาพที่ 11** แสดงความสัมพันธ์ระหว่างยีน SINAT3 ที่โคลนได้จากข้าวโพด เปรียบเทียบกับพืชชนิดต่างๆ โดยใช้โปรแกรม www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/treeView.cgi

**3. การสร้างชุด cassette ยีน และการตรวจสอบการปรากฏของยีน SINA3 และ SINAT3 ใน Plant Expression Vector**

การเพิ่มปริมาณยีน SINA3 และ SINAT3 ในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน โดยการทำปฏิกิริยา PCR กับพลาสมิดดีเอ็นเอของข้าวโพดทั้ง 4 พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน SINA3 คือ SINAXbaI (forward) และ SINAKpnI (reverse) และยีน SINAT3 คือ SINATXbaI (forward) และ SINATKpnI (reverse) ซึ่งได้เติมตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I ได้ชิ้นยีนขนาด 1,026 คู่เบส และ 1,050 คู่เบส ตามลำดับ นำมาเชื่อมต่อเข้ากับ plant expression vector (pCAMBIA2300) ที่มีขนาด 9,640 คู่เบส โดยที่ pCAMBIA2300 ประกอบด้วย โปรโมเตอร์ (35SCaMV) และเทอร์มิเนเตอร์ (NOS) ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีน มียีน neomycin phosphortransferase (nptII) ควบคุมลักษณะต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ kanamycin เป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือก **(ภาพที่ 12ก)** ซึ่งผ่านการทำ double digestion ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I **(ภาพที่ 12ข)** จากนั้นทำการเชื่อมต่อชิ้นยีน SINA3 และ SINAT3 เข้ากับ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) ในตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I ทำการถ่ายฝากชุด cassette ยีนทั้ง 2 ชุด เข้าสู่เซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ DH5$\alpha$ โดยวิธี heat – shock และตรวจสอบการปรากฏของยีน SINA3 และ SINAT3 ที่อยู่ใน pCAMBIA2300 ซึ่งมี 2 วิธีด้วยกัน วิธีแรกคือ การตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse) พบว่า สามารถทำปฏิกิริยาได้แถบดีเอ็นเอของยีน SINA3 และ SINAT3 ขนาดประมาณ 1.0 กิโลเบส **(ภาพที่ 13ก และ 13ข)** และวิธีที่สองคือ การตรวจสอบด้วยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I พบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ถูกต้องจำนวน 2 แถบ ได้แก่ ขนาดประมาณ 1.1 กิโลเบส (ยีน SINA3 และยีน SINAT3) และขนาดประมาณ 9 กิโลเบส (pCAMBIA2300) ตามลำดับ **(ภาพที่ 14ก และ 14ข)** เมื่อนำพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมที่มีชิ้นส่วนของยีน SINA3 และ SINAT3 สอดแทรกอยู่ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด พบว่า ตำแหน่งในการเชื่อมต่อของยีน SINA3 และ SINAT3 ที่อยู่ภายในเวกเตอร์ pCAMBIA2300 มีความถูกต้อง โดยโครงสร้างของพลาสมิดสายผสมที่มีความสมบูรณ์สามารถเชื่อมต่อชิ้นยีน SINA3 และ SINAT3 เข้ากับ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300 – *Zm*SINA3 และ pCAMBIA2300 – *Zm*SINA3) จะมีขนาดประมาณ 10.6 กิโลเบส และ 10.7 กิโลเบส ตามลำดับ **(ภาพที่ 15)**



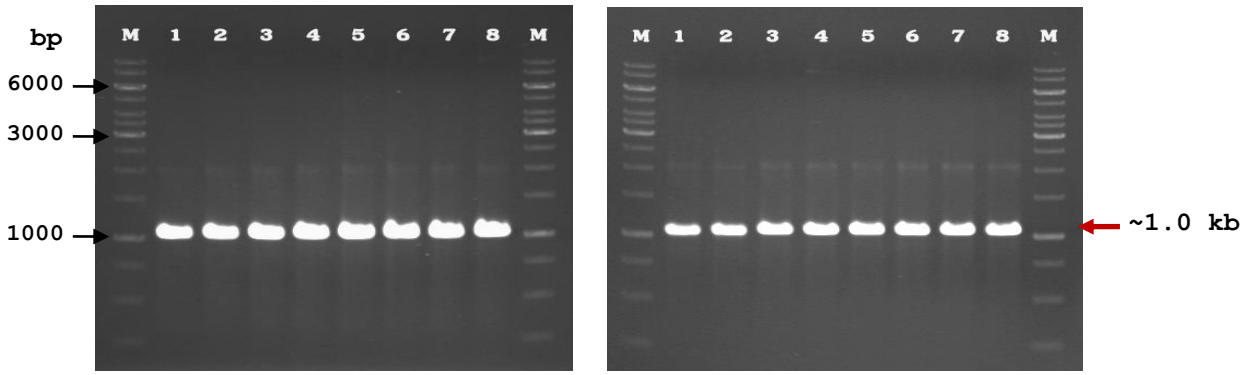

ก




ข

**ภาพที่ 12** **ก.** แผนที่ของ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) และตำแหน่งในการเชื่อมต่อชิ้นยีน SINA3 และยีน SINAT3

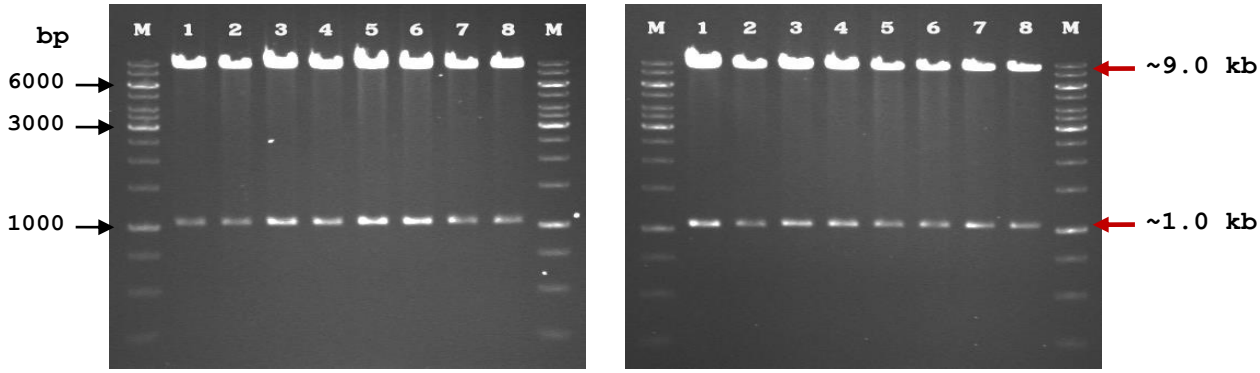
**ข.** แสดงแถบดีเอ็นเอของ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = แถบดีเอ็นเอของ pCAMBIA2300, Lane 2 = แถบดีเอ็นเอของ pCAMBIA2300 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I




ก ข

**ภาพที่ 13** **ก.** แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR กับพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pCAMBIA2300 – *Zm*SINA3 โดยใช้ไพรเมอร์ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse), Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1–2 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 3–4 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 5–6 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 7–8 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)

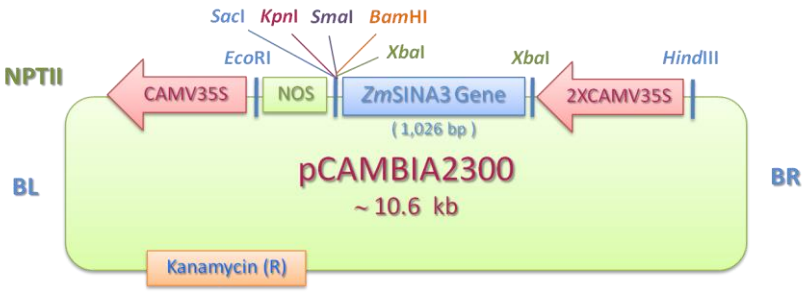
**ข.** แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR กับพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pCAMBIA2300 – *Zm*SINAT3 โดยใช้ไพรเมอร์ NOS (forward) และ 35SCaMV (reverse), Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1–2 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 3–4 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 5–6 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 7–8 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)

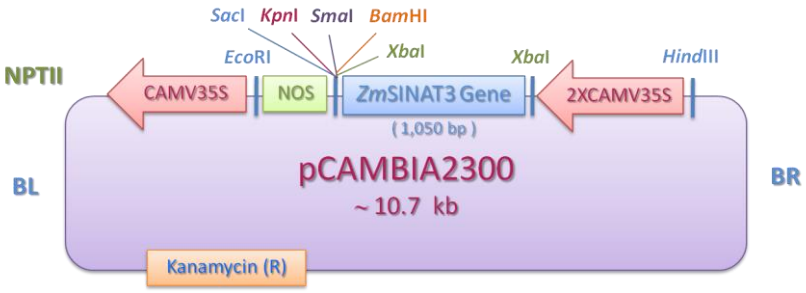



ก ข

**ภาพที่ 14** **ก.** แสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pCAMBIA2300 – *Zm*SINA3 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1–2 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 3–4 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 5–6 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 7–8 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)

**ข.** แสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pCAMBIA2300 – *Zm*SINAT3 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1–2 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 3–4 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 5–6 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 7–8 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)



**ภาพที่ 15** แสดงโครงสร้างพลาสมิดสายผสม pCAMBIA2300 – ZmSINA3 และ pCAMBIA2300 – ZmSINAT3 ที่มีความสมบูรณ์

## สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การโคลนยีน SINA3 และ SINAT3 ในส่วนของยีนที่มีการแสดงออกจากอาร์เอ็นเอรวมของข้าวโพดทั้ง 4 พันธุ์ ด้วยเทคนิค RT – PCR พบว่า ยีน SINA3 ที่สังเคราะห์ได้มีขนาด 1,026 คู่เบส และยีน SINAT3 ที่สังเคราะห์ได้มีขนาด 1,050 คู่เบส เมื่อนำไปวิเคราะห์โครงสร้างของยีนด้วยโปรแกรม EMBL-EBI database บนอินเทอร์เน็ต พบว่า ยีนที่โคลนได้มีส่วนประกอบครบทั้งยีน และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปแปลรหัสเป็นโปรตีน พบว่า ยีน SINA3 สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนได้จำนวน 341 amino acid และ ยีน SINAT3 สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนได้จำนวน 349 amino acid

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน SINA3 และ SINAT3 ไปเปรียบเทียบกับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ยีน SINA3 มีความเหมือนอย่างสูงกับยีนในกลุ่ม E3 ubiquitin protein ligase ที่พบในข้าวโพด และข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italic* (L.) Baeuv.) (XM004952220.1) โดยมีค่าความเหมือน (% Max Identities) เท่ากับ 99% และ 90% ตามลำดับ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน SINAT3 ที่ได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน E3 ubiquitin protein ligase ที่พบในข้าวโพด และข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italic* (L.) Baeuv.) (XM004960614.1) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 99% และ 90% ตามลำดับ

การสร้างชุด cassette ยีน โดยการเชื่อมต่อชิ้นยีน SINA3 และ SINAT3 เข้ากับ Plant Expression Vector (pCAMBIA2300) ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ 35SCaMV และเทอร์มิเนเตอร์ NOS ได้พลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pCAMBIA2300 – ZmSINA3 และ pCAMBIA2300 – ZmSINAT3 มีขนาดประมาณ 10.6 และ 10.7 กิโลเบส ตามลำดับ

## การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

การโคลนยีนที่ทนต่อสภาวะขาดน้ำในข้าวโพดพันธุ์ทนแล้ง ได้แก่ ยีน SINA3 และ SINAT3 และการสร้างชุด cassette ยีน ที่อยู่ในรูปแบบของพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมที่มีความสมบูรณ์ (pCAMBIA2300 – *Zm*SINA3 และ pCAMBIA2300 – *Zm*SINAT3) ซึ่งขณะนี้ได้มีการนำชุดยีนดังกล่าวไปถ่ายฝากเข้าสู่พืชต้นแบบเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน และศึกษาข้อมูลของยีนในด้านต่างๆ ก่อนที่จะนำไปถ่ายฝากเข้าสู่พืชเศรษฐกิจ เช่น ถั่วเหลือง ข้าวโพด อ้อย และมันสำปะหลัง เป็นต้น เพื่อเพิ่มศักยภาพในการให้ผลผลิตและสามารถทนทานต่อสภาวะขาดน้ำได้ อีกทั้งยังเป็นพืชทางเลือกในการเร่งรัดกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชต่อไปในอนาคต

## เอกสารอ้างอิง

ภาวะโลกร้อน. 2555. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: http://www.baanjomyut.com/library/global_warming. 9 มีนาคม 2555.

Ingram, J. and D. Bartels. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Biol*. 47: 377 – 403.

Pokhilko, A., J.A. Ramos, H. Holtan, D.R. Maszle, R. Khanna and A.J. Millar. 2011. Ubiquitin ligase switch in plant photomorphogenesis: a hypothesis. *Journal of Theoretical Biology*. 270: 31 – 41.

Shinozaki, K. and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2000. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol*. 3: 217 – 223.

Smirnoff, N. 1998. Plant resistance to environmental stress. *Curr Opin Biotech.* 9: 214 – 219.

Sonoda, Y., K. Sako, Y. Maki, N. Yamazaki, H. Yamamoto, A. Ikeda and J. Yamaguchi. 2009. Regulation of leaf organ size by the Arabidopsis RPT2a 19S proteasome subunit. *The Plant Journal*. 60: 68 – 78.

Thomann, A., V. Brukhin, M. Dieterle, J. Gheyeselinck, M. Vantard, U. Grossniklaus and P. Genschik. 2005. Arabidopsis CUL3A and CUL3B genes are essential for normal embryogenesis. *The Plant Journal*. 43: 437 – 448.

Vierling, E. 1991. The roles of heat – shock proteins in plants. *Annu Rev Plant Biol*. 42: 579 – 620.

Zea mays SINA3 mRNA, complete cds

Sequence ID: gb|EF434383.1| Length: 1026 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 1026 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---|---|---|---|---|
| 1833 bits(2032) | 0.0 | 1022/1026(99%) | 0/1026(0%) | Plus/Plus |

```
Query  1     ATGGAGCTGGACAGCATCGAGTGCATGTCCTACTCCGACAGCATGGGGGACGACGACACC  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1     ATGGAGCTGGACAGCATCGAGTGCATGTCCTACTCCGACAGCATGGGGGACGACGACACC  60

Query  61    GACGCCGTCACCTCGTCCCAGCTCCCTCGCCCCTTCCTCAAATCCTCCTCCACCGCCGGT  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  61    GACGCCGTCACCTCGTCCCAGCTCCCTCGCCCCTTCCTCAAATCCTCCTCCACCGCCGGT  120

Query  121   ACTGCCGCCGTCAACGTGGTCGTCGTCTCCGACCGCGTCGGTGCCGCCGGGCCGGTAGCG  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  121   ACTGCCGCCGTCAACGTGGTCGTCGTCTCCGACCGCGTCGGTGCCGCCGGGCCGGTAGCG  180

Query  181   GGAGCGGGTTCGCTGGTGATTTCGCCAGCCACGGGCGTGCACGAGCTGCTCGAGTGCCCC  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  181   GGAGCGGGTTCGCTGGTGATTTCGCCAGCCACGGGCGTGCACGAGCTGCTCGAGTGCCCC  240

Query  241   GTCTGCACCAATTCCATGTACCCGCCCATCCACCAGTGCCAAAATGGTCATACTCTATGT  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  241   GTCTGCACCAATTCCATGTACCCGCCCATCCACCAGTGCCAAAATGGTCATACTCTATGT  300

Query  301   TCCACCTGCAAAACTCGGGTGCACAACCGCTGCCCAACTTGTCGACAAGAGCTAGGTGAC  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  301   TCCACCTGCAAAACTCGGGTGCACAACCGCTGCCCAACTTGTCGACAAGAGCTAGGTGAC  360

Query  421   CCTCTTGGATGTTCAGAAGTCTTCCCATACTACAGCAAACTCAAGCATGAATCACAGTGT  480
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  421   TCTCTTGGATGTTCAGAAGTCTTCCCATACTACAGCAAACTCAAGCATGAATCACAGTGT  480

Query  481   AATTTTAGGCCATACAATTGCCCTTATGCTGGTTCTGAATGCTCAGTTGTTGGGGATATT  540
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  481   AATTTTAGGCCATACAATTGCCCTTATGCTGGTTCTGAATGCTCAGTTGTTGGGGATATT  540

Query  541   TCTTTTCTTGTGGCACATCTGCGAGATGATCATAAAGTGGACATGCACTCTGGATGTACA  600
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  541   TCTTTTCTTGTGGCACATCTGCGAGATGATCATAAAGTGGACATGCACTCTGGATGTACA  600

Query  601   TTTAATCACCGCTATGTCGAGTCCAACCCAAGAGAGGTTGAAAATGCAACTTGGATGCTA  660
             |||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  601   TTTAATCACCGCTATGTCAAGTCCAACCCAAGAGAGGTTGAAAATGCAACTTGGATGCTA  660

Query  661   ACTGTTTTTCATTGTTTTGGGAAGTACTTTTGCTTGCACTTTGAGGCATTTCAGCTTGGA  720
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  661   ACTGTTTTTCATTGTTTTGGGAAGTACTTTTGCTTGCACTTTGAGGCATTTCAGCTTGGA  720

Query  721   ATGGCACCAGTATACATGGCTTTCCTCCGGTTTATGGGCGATGAAAATGATGCTAGGAAC  780
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  721   ATGGCACCAGTATACATGGCTTTCCTCCGGTTTATGGGCGATGAAAATGATGCTAGGAAC  780

Query  781   TACAGCTATAGTCTTGAGGTTGGTGCAAATGGCAGGAAGATGATATGGGAGGGAACTCCC  840
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  781   TACAGCTATAGTCTTGAGGTTGGTGCAAATGGCAGGAAGATGATATGGGAGGGAACTCCC  840

Query  841   CGCAGCATCCGGGACAGCCACAGGAAGGTTAGGGACAGCCATGGTGGTCTAATAATTCAG  900
             |||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||| |||||||||||||||||
Sbjct  841   CGCAGCATCCGGGACAGCCACCGGAAGGTTAGGGACAGCCATGATGGTCTAATAATTCAG  900

Query  901   CGCAACATGGCTCTCTTCTTCTCAGGTGGAGAAAGGAAAGAGCTGAAACTGCGAGTCACA  960
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  901   CGCAACATGGCTCTCTTCTTCTCAGGTGGAGAAAGGAAAGAGCTGAAACTGCGAGTCACA  960

Query  961   GGCCGTATCTGGAAGGAGCAGCAGAATCCTGACTCAGGAGCCTGCATTCCCAATTTGTTC  1020
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  961   GGCCGTATCTGGAAGGAGCAGCAGAATCCTGACTCAGGAGCCTGCATTCCCAATTTGTTC  1020

Query  1021  AGCTGA  1026
             ||||||
Sbjct  1021  AGCTGA  1026
```

**ภาพผนวกที่ 1** การวิเคราะห์ alignment ระหว่างลำดับเบสของยีน SINA3 ของข้าวโพดที่ accession number EF434383.1 กับ ลำดับเบสของยีน SINA3 ที่โคลนได้จากข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3)

Zea mays clone 298706 ubiquitin ligase SINAT3 mRNA, complete cds

Sequence ID: gb|EU966994.1| Length: 1334 Number of Matches: 1

Range 1: 75 to 1124 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---|---|---|---|---|
| 1880 bits(2084) | 0.0 | 1047/1050(99%) | 0/1050(0%) | Plus/Plus |

```
Query  1     ATGGACATGGACAGGGACAGCGTGGAGTGCCTCTCCCTCCCAGACGCTGCCATGGACGTG  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  75    ATGGACATGGACAGGGACAGCGTGGAGTGCCTCTCCCTCCCAGACGCTGCCATGGACGTG  134

Query  61    GACAACGTCGACGGCCACCCGCACCACGGCCATCTCGGTCTCCCGCTCCACCCCGCCCAC  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  135   GACAACGTCGACGGCCACCCGCACCACGGCCATCTCGGTCTCCCGCTCCACCCCGCCCAC  194

Query  121   CTCCCATCCTCTGGTGCCGGGCGCGCGTTCCCCAAGGTGAATGCcgggggcggcggagcg  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||
Sbjct  195   CTCCCATCCTCTGGTGCCGGGCGCGCGTTCCCCAAGGTGAATGCCGGGGGCGGCGTAGCG  254

Query  181   ggcccggctgtagcgggagcggcgggcgcagcaggagcaggcggagggcCGCCGGCGACC  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  255   GGCCCGGCTGTAGCGGGAGCGGCGGGCGCAGCAGGAGCAGGCGGAGGGCCGCCGGCGACC  314

Query  241   AGCGTGCACGAGCTGCTCGAGTGCCCCGTCTGCACTAACTCCATGTTCCCGCCCATCCAT  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  315   AGCGTGCACGAGCTGCTCGAGTGCCCCGTCTGCACTAACTCCATGTTCCCGCCCATCCAT  374

Query  301   CGGTGTCAAAATGGACATACTTTGTGTTCGACATGCAAGGCCAGGGTGCACAACCGGTGC  360
             | ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  375   CAGTGTCAAAATGGACATACTTTGTGTTCGACATGCAAGGCCAGGGTGCACAACCGGTGC  434

Query  361   CCTACATGCAGACAAGAGCTTGGTGATATCAGGTGCTTAGCATTGGAAAAAGTAGCAGAG  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  435   CCTACATGCAGACAAGAGCTTGGTGATATCAGGTGCTTAGCATTGGAAAAAGTAGCAGAG  494

Query  421   TCACTTGAGCTTCCATGTAAGTACTGCTCTTTAGGTTGCCCAGAGATCTTCCCGTACTAC  480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  495   TCACTTGAGCTTCCATGTAAGTACTGCTCTTTAGGTTGCCCAGAGATCTTCCCGTACTAC  554

Query  481   AGCAAGATAAAGCATGAAGCACAGTGCAGCTTCAGGCCATATAACTGCCCCTATGCTGGC  540
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  555   AGCAAGATAAAGCATGAAGCACAGTGCAGCTTCAGGCCATATAACTGCCCCTATGCTGGC  614

Query  541   TCTGAATGTGCTGTGGCTGGTGATATTCCATTCCTTGTTGCACATTTGAGGGATGATCAC  600
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  615   TCTGAATGTGCTGTGGCTGGTGATATTCCATTCCTTGTTGCACATTTGAGGGATGATCAC  674

Query  601   AAAGTTGATATGCACAGTGGCTGCACGTTCAACCATAGATACGTCAAATCCAACCCGCGA  660
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  675   AAAGTTGATATGCACAGTGGCTGCACGTTCAACCATAGATACGTCAAATCCAACCCGCGA  734

Query  661   GAGGTTGAAAATGCCACCTGGATGCTAACAGTATTCCATTGTTTTGGGCAGTACTTCTGC  720
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  735   GAGGTTGAAAATGCCACCTGGATGCTAACAGTATTCCATTGTTTTGGGCAGTACTTCTGC  794

Query  721   CTGCACTTCGAGGCATTCCAGCTCGGAATGGCTCCAGTCTATATGGCTTTCCTCCGATTC  780
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  795   CTGCACTTCGAGGCATTCCAGCTCGGAATGGCTCCAGTCTATATGGCTTTCCTCCGATTC  854

Query  781   ATGGGTGATGAGAATGAAGCAAGGAACTATACATATAGCCTAGAGGTTGGTGGTAATGGG  840
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  855   ATGGGTGATGAGAATGAAGCAAGGAACTATACATATAGCCTAGAGGTTGGTGGTAATGGG  914

Query  841   AGGAAAATGGTGTGGGAAGGTACTCCTAGAAGCATCCGTGACAGCCACCGCAAGGTCCGT  900
             |||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  915   AGGAAAATGGTATGGGAAGGTACTCCTAGAAGCATCCGTGACAGCCACCGCAAGGTCCGT  974

Query  901   GACAGCCATGATGGCCTCATCATCCAGAGGAATATGGCGCTGTTCTTCTCTGGTGGTGAC  960
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  975   GACAGCCATGATGGCCTCATCATCCAGAGGAATATGGCGCTGTTCTTCTCTGGTGGTGAC  1034

Query  961   AGGAAGGAGCTGAAGCTGAGGGTGACTGGGCGGATCTGGAAAGAGCAGACGAACCCCGAT  1020
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1035  AGGAAGGAGCTGAAGCTGAGGGTGACTGGGCGGATCTGGAAAGAGCAGACGAACCCCGAT  1094

Query  1021  GGAGCCTGCATTCCTAACCTTTGCAGCTGA  1050
             ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1095  GGAGCCTGCATTCCTAACCTTTGCAGCTGA  1124
```

**ภาพผนวกที่ 2** การวิเคราะห์ alignment ระหว่างลำดับเบสของยีน SINAT3 ของข้าวโพดที่ accession number EU966994.1 กับ ลำดับเบสของยีน SINAT3 ที่โคลนได้จากข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3)