

แบบรายงานเรื่องเต็ม ผลการวิจัยที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2558

แผนงานวิจัย การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

โครงการวิจัย วิจัยชีวโมเลกุลในการสร้างเอกลักษณ์พันธุ์กรรมพืชและจุลินทรีย์ การ ปรับปรุง

พันธุ์ และการตรวจสอบพืชและจุลินทรีย์

กิจกรรมวิจัยชีวโมเลกุล(Molecular Biology)ในการปรับปรุงพันธุ์

กิจกรรมย่อย การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรม

ชื่อการทดลอง การควบคุมการแสดงออกของยีน dihydroflavonol 4-reductase (DFR) ในรูป antisense เพื่อสร้างความหลากหลายของสีดอกหน้าวัว

Gene Regulation of Dihydroflavonol 4-reductase (DFR) Antisense on Flower color control in Anthurium.

การควบคุมการแสดงออกของยีน *dihydroflavonol 4-reductase (DFR)* ในรูป antisense
เพื่อสร้างความหลากหลายของสีดอกหน้าวัว

Gene Regulation of *Dihydroflavonol 4-reductase (DFR)* Antisense on Flower
color control in *Anthurium* .

กุหลาบ คงทอง ประสาน สืบสุข กัลยา เกษะกากลาง¹ จีราพร แก่นทรัพย์
กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

บทคัดย่อ

ยีน *dihydroflavonol 4-reductase (DFR)* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีในวัฏจักรการสังเคราะห์รงควัตถุ anthocyanin ซึ่งจัดเป็นฟลาโวนอยชนิดหนึ่งที่ประกอบเป็นสีของดอกไม้หลากหลายตั้งแต่สีส้ม สีแดงจนถึงสีม่วง และสีน้ำเงิน ในงานวิจัยนี้ได้ทำการสร้างชุดยีน *pMDC32-DFRAS* จากยีน *DFR* ที่โคลนได้จาก cDNA ของดอกหน้าวัวให้อยู่ในรูปควบคุมการแสดงออกของยีนแบบกลับทิศ (*DFRAS*) โดยการนำยีน *DFR* ที่โคลนได้เข้าสู่ระบบการตัดต่อยีนแบบ Gateway โดยใช้เวกเตอร์ pDONR 221 เป็นตัวรับยีนและย้ายยีนต่อไปยัง ไบนารีเวกเตอร์ pMDC32 และสามารถนำไบนารีเวกเตอร์ที่มียีน *DFR* เข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ทำให้ได้ชุดยีน *pMDC32-DFRAS* ที่อยู่ใน *Agrobacterium tumefaciens* ที่สามารถนำไปถ่ายฝากสู่หน้าวัวพันธุ์ไซเน็ตและพันธุ์ราปิโต จากการคัดเลือกต้นหน้าวัวที่ได้รับการถ่ายยีนในอาหารที่เติม hygromycin และนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ พบว่าการถ่ายฝากยีน *DFRAS* เข้าสู่หน้าวัวประสบผลสำเร็จ ต้นที่ได้รับการถ่ายยีน *DFRAS* จะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเทคนิค PCR ส่วนต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายฝากจะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ซึ่งต้นหน้าวัวที่ได้รับการถ่ายยีนนี้สามารถนำออกปลูกเพื่อตรวจสอบผลต่อการเปลี่ยนแปลงสีของดอกหน้าวัวในโอกาสต่อไป

¹ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรลำปาง
รหัสการทดลอง 03-07-54-01-02-00-01-54

Abstract

dihydroflavonol 4-reductase (DFR) gene is involved in flavonoid pathway leading to the production of the orange , red , blue or purple-colored anthocyanins. In this study, antisense *DFR* (*DFRAS*.) was cloned from *Anthurium* into binary vector, pMDC32, generating pMDC32- *DFRAS*. The pMDC32- *DFRAS*. was introduced into the *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105. *Anthurium* spp. cv. Sonate and cv. Rahpido transformation were performed using the *A. tumefaciens*. The transformed *Anthurium* spp. were selected on media containing hygromycin. The transgenic *Anthurium* plants were subjected to PCR analysis using specific primers. The results showed that the transformation of *DFRAS* into *Anthurium* spp was successful

คำนำ

ในแต่ละปีประเทศไทยได้ผลิตไม้ดอกสำหรับใช้ทั้งภายในประเทศ และส่งออก แม้การผลิตเพื่อป้อนตลาดภายในประเทศจะมีอยู่มาก แต่การผลิตเพื่อส่งออกให้มูลค่าที่สูงกว่า ทำรายได้เข้าประเทศเป็นจำนวนมาก และมีแนวโน้มจะขยายตัวเพิ่มขึ้น เนื่องจากตลาดไม้ดอกเป็นตลาดที่มีผู้ค้าจำนวนมาก มีการแข่งขันสูง ดังนั้นการพัฒนาศักยภาพเพื่อการผลิตไม้ดอกเพื่อส่งออกเป็นความจำเป็นที่ผู้ผลิตต้องเอาใจใส่ และตอบสนองความต้องการของลูกค้าในทุกรูปแบบ ปัจจุบันลูกค้าให้ความสำคัญกับสีสันของดอกไม้เป็นอันดับแรก ผู้ผลิตจึงต้องสร้างความแปลกใหม่ในตัวสินค้า เพื่อรักษาและเพิ่มส่วนแบ่งการตลาดให้ได้มากที่สุด ซึ่งวิธีสร้างความหลากหลายด้านสีดอกเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคได้ เป็นการเพิ่มศักยภาพการผลิต และการส่งออกได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ในฐานะที่ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกไม้ดอกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจหลากหลายชนิด การเร่งรัดศึกษาพัฒนาเทคนิคและวิธีการเพิ่มความหลากหลายของดอกโดยเฉพาะเรื่องสี ด้วยการปรับปรุงพันธุ์โดยอาศัยความก้าวหน้าทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วย เป็นปัจจัยสำคัญในการเพิ่มศักยภาพให้กับไม้ดอกส่งออก ในธรรมชาติไม้ดอกบางชนิดจะมีโทนสีจำกัด ไม่สามารถผสมพันธุ์ให้เกิดสีสรรที่นอกเหนือจากโทนสีเดิมที่มีอยู่ได้ แต่การนำเอาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาประยุกต์ร่วมกับเทคนิคการถ่ายยีนสู่พืช โดยถ่ายยีนควบคุมการเกิดสีจากไม้ดอกชนิดหนึ่งไปสู่ไม้ดอกอีกชนิดหนึ่ง จึงเป็นการพัฒนาให้เกิดความแปลกใหม่ด้านสีของดอกไม้

หน้าวัวเป็นไม้ดอกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ได้รับความนิยมเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ประเทศไทยมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการผลิตดอกหน้าวัว ปัจจุบันมีพื้นที่การปลูกประมาณ 120 ไร่ กระจายไปทั่วประเทศ ได้แก่ กรุงเทพฯ นนทบุรี ปทุมธานี เลย กระบี่ ภูเก็ต ลำปาง เชียงใหม่ เชียงราย มีผลผลิตทั่วประเทศ ประมาณ 4,800,000 ดอกต่อปี และเพิ่มปริมาณขึ้นทุกปี แต่ประเทศไทยมี

เทคโนโลยีการขยายพันธุ์หน้าวัวต่ำ จึงมีการส่งต้นพันธุ์หน้าวัวเข้ามาจากต่างประเทศ โดยเฉพาะประเทศ เนเธอร์แลนด์ เมื่อปี 2544 ส่งเข้ามา ประมาณ 140,000 ต้น

ในอนาคตหน้าวัวจะมีศักยภาพในการพัฒนาไปสู่อุตสาหกรรมไม้ดอกเพื่อการส่งออกต่างประเทศ ปัจจุบันภาคธุรกิจให้ความสำคัญกับการผลิตหน้าวัว ซึ่งได้พัฒนาสายพันธุ์ใหม่ๆ เพื่อตอบสนองความต้องการของลูกค้าที่ต้องการความแปลกใหม่ของสีดอกอยู่ตลอดเวลา แนวทางการสร้างหน้าวัวสายพันธุ์ใหม่ให้มีดอกสีสรรโดดเด่น แปลกใหม่ สวยงาม มีความหลากหลายของสีดอก และมีโทนสีที่ไม่เคยปรากฏในธรรมชาตินั้น สามารถกระทำได้โดยใช้เทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรม ซึ่งเป็นวิธีการปรับปรุงพันธุ์พืชสมัยใหม่ ที่สามารถนำยีนควบคุมการเกิดสีดอกจากไม้ดอกชนิดอื่นที่มีโทนสีตามต้องการ ส่งถ่ายเข้าไปสู่หน้าวัว หรือยับยั้งการแสดงออกของยีนที่มีอยู่แล้ว เพื่อสร้างหน้าวัวพันธุ์ใหม่ให้มีสีสรรโดดเด่น สวยงาม และเกิดความแปลกใหม่ของโทนสีที่ไม่เคยมีอยู่ในธรรมชาติ ซึ่งจะนำไปสู่การเพิ่มศักยภาพการส่งออกไม้ดอกในอนาคต ยีน *dihydroflavonol 4-reductase (DFR)* เป็นยีนยีนหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีในวัฏจักรการสังเคราะห์รงควัตถุ anthocyanin ซึ่งจัดเป็นฟลาโวนอยชนิดหนึ่งที่ประกอบเป็นสีของดอกไม้หลากหลายตั้งแต่สีส้ม สีแดงจนถึงสีม่วง และสีน้ำเงิน(ปิยะศักดิ์ 2542, Brugliera *et al.*1999, Eric *et al.*2001)

ดังนั้นการควบคุมการแสดงออกของยีน *dihydroflavonol 4-reductase (DFR)* ในรูป antisense เพื่อสร้างความหลากหลายของสีดอกหน้าวัวจึงเป็นสิ่งที่มีความสำคัญและมีความจำเป็น เพื่อปรับปรุงพันธุ์หน้าวัว ให้มีสีสรรหลากหลาย ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาอุตสาหกรรมไม้ดอกเพื่อการส่งออกในอนาคต

วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

อุปกรณ์

1. หน้าวัวพันธุ์ราปีโต้ และพันธุ์โซเนต (ดอกชมพู)
2. QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)
3. QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)
4. BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Appliedbiosystems)
5. สารปฏิชีวนะ เช่น ampicillin cefotaxime hygromycin
6. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย
7. เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM109
8. เวกเตอร์ pDONR 221 (invitrogen)
9. pMDC32 binary vector
10. เครื่องหมุนเหวี่ยงตกตะกอนความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (SORVALL RC28C)
11. เครื่องมือวัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D.) เครื่อง spectrophotometer

12. ชุดถ่ายภาพเจลและประมวลผล Gel documentation (BIORAD)
13. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง (GeneAmp PCR System 9700)
14. เครื่องวิเคราะห์ลำดับการเรียงตัวของสารพันธุกรรม (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer)
15. เครื่องมือสำหรับงานถ่ายยีน BTX Electroporation System รุ่น ELECTRO CELL MANIPULATOR 600 ,Electroporation cuvette ขนาด 0.2 มิลลิลิตร
16. เครื่องมือ และสารเคมีอื่น ๆ สำหรับงานชีวโมเลกุล

วิธีการทดลอง

การสร้างชุดยีน *DFR* .ในรูป antisense (*pMDC32-DFRAS*).

โดยการนำยีน *DFR* ที่โคลนโดย กุหลาบและคณะ (2553) มาสร้างชุดยีน มีขั้นตอนดังนี้

1. นำยีน *DFRAS* เข้าสู่ Plant Expression Vector โดยใช้เทคโนโลยี Gateway

เทคโนโลยี Gateway ที่ใช้ในการโคลนยีน เป็นการเคลื่อนย้ายชิ้นส่วนของยีนจากเวกเตอร์หนึ่ง ไปสู่อีกเวกเตอร์หนึ่ง โดยการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของยีนซึ่งกันและกัน ซึ่งไม่ต้องใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ ขั้นตอนการดำเนินงานประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ดังนี้

1.1 การนำยีน *DFR* เข้าสู่ Entry Clones

1.1.1 นำยีน *DFR* ที่อยู่ในเวกเตอร์ pGEM T easy และได้ตรวจสอบความถูกต้องแล้ว (ภาพที่1) มาเตรียมให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมกับเทคโนโลยี Gateway โดยการเพิ่มปริมาณส่วนของยีน *DFR* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ที่กำหนดให้มีการเติมลำดับเบสของไพรเมอร์ด้านปลาย 5' ให้มีลำดับที่เหมาะสมสำหรับการเคลื่อนย้ายชิ้นยีนซึ่งกันและกัน เรียกว่า attB-PCR product โดยออกแบบไพรเมอร์สำหรับยีน *DFRAS* โดย ที่ ด้าน Forward เติ ม ลำ ำ ด ำ บ เบ ส ที่ ป ล าย ด ำ น 5 ' ด้วย GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT ส่วนไพรเมอร์ Reverse ให้เติมลำดับเบสที่ปลายด้าน 5' ด้วย GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT

1.1.2 เพิ่มปริมาณยีน *DFR* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ Pfu DNA polymerase (RBC Bioscience) โดยเตรียมปฏิกิริยาของพีซีอาร์บนน้ำแข็งที่ประกอบด้วย 10X Reaction Buffer 5 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP 0.5 ไมโครลิตร, 50 mM MgCl₂ 0.6 ไมโครลิตร, 5 uM Forward Primer 2 ไมโครลิตร, 5 uM Reverse Primer 2 ไมโครลิตร, Plasmid pGEM easy- *DFR* 1 ไมโครลิตร, 5 U/ul RBC Pfu DNA Polymerase 0.5 ไมโครลิตร, น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 38.4 ไมโครลิตร รวมปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง ที่กำหนดสภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

94 °C 1 นาที 1 รอบ

94 °C 1 นาที	}	35 รอบ
55 °C 1 นาที		
68 °C 2 นาที		
68 °C 7 นาที 1 รอบ		

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

1.1.3 การเตรียมชิ้น attB-PCR product ให้บริสุทธิ์

นำชิ้นยีน attB-PCR product ปริมาตร 25 ไมโครลิตร มาทำให้บริสุทธิ์ โดยเติมสารละลาย 1X TBE, pH8.0 ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลาย 30% PEG8000/30 mM MgCl₂ ผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เวลา 15 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง และละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย 1X TBE, pH 8.0 ปริมาตร 25 ไมโครลิตร โดยให้ดีเอ็นเอมีความเข้มข้นมากกว่า 10 ng/ul ตรวจสอบผลโดยใช้ 1.5 % Agarose gel electrophoresis นำสารละลายดีเอ็นเอ attB-PCR product ไปใช้งานในขั้นตอนต่อไป

1.1.4 การนำยีน DFRAS attB-PCR product เข้าสู่เวกเตอร์ pDONR 221

นำสารละลายดีเอ็นเอที่มียีน DFR attB-PCR product ปริมาตร 7 ไมโครลิตร ผสมในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมเวกเตอร์ 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

1.1.5 การนำเวกเตอร์เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

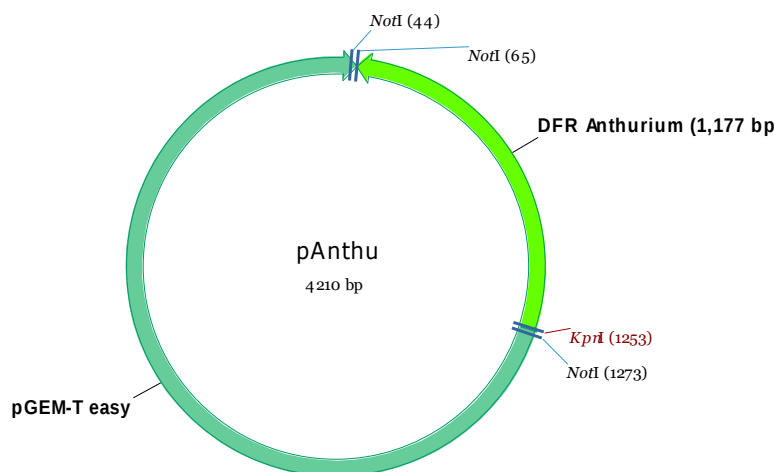
การนำยีน DFRAS ที่เชื่อมต่ออยู่ในเวกเตอร์ pDONR 221 เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย One Shot Mach1 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen) โดยดูดสารละลายในข้อ 1.1.4 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร ที่มี Competent Cell 50 ไมโครลิตร นำไปแช่ในน้ำแข็งนาน 30 นาที จากนั้นนำเซลล์ไป Heat-shock โดยการนำไปแช่น้ำที่อุณหภูมิ 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 นำเชื้อปริมาณ 50 ไมโครลิตร ไป spread บนอาหารแข็ง LB ที่เติม 50 ug/ml kanamycin และนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำโคโลนีที่เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อไปตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย

ด้วยวิธี Single colony PCR และเลี้ยงเชื้อโคลนที่มียีนเป้าหมาย นำไปสกัดพลาสมิด ทำให้ได้พลาสมิดสายผสมที่มียีน DFR เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pDONR 221 เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

1.2 การส่งถ่ายยีน DFRAS ที่เชื่อมต่อกับ pDONR 221 เข้าสู่ Plant Expression Vector

การนำยีน DFR ที่เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pDONR 221 เข้าสู่ Plant Expression Vector หรือ Binary vector (เวกเตอร์ pMDC32) โดยทำปฏิกิริยาในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย ยีน DFRAS ที่เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pDONR 221 (10 fmoles) จากข้อ 1.1.5 ปริมาตร 7 ไมโครลิตร และ เติมเวกเตอร์ pMDC32 (20 fmoles) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติม LR Clonase II Plus enzyme mix ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน นำหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 16 ชั่วโมง จากนั้นเติม Proteinase K solution ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 10 นาที

การนำยีน DFRAS ที่เชื่อมต่ออยู่ในเวกเตอร์ pMDC32 เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย One Shot Mach1 Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen) โดยปฏิบัติเช่นเดียวกันข้อ 1.1.5 นำโคโลนีที่เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อไปตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยวิธี Single colony PCR และเลี้ยงเชื้อโคลนที่มียีนเป้าหมาย นำไปสกัดพลาสมิด ทำให้ได้พลาสมิดสายผสมที่มียีน DFRAS เชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pMDC32 เพื่อนำเข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens* ต่อไป



ภาพที่ 1 แสดงชิ้นส่วนของยีน DFR จากดอกหน้าวัวที่อยู่ใน เวกเตอร์ pGEM-T easy (กุหลาบและคณะ, 2553)

2. การนำพลาสมิด pMDC32-DFRAS ถ่ายเข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens*

การนำเวกเตอร์ pMDC32 ที่ได้รับยีน DFRAS เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 โดยวิธี electroporation มีขั้นตอนดังนี้

2.1 การเตรียม competent cell ของเชื้อ *A. tumefaciens*

2.1.1 นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 เลี้ยงในอาหารเหลว YEP ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ที่ผสมสารปฏิชีวนะ Rifampicin ความเข้มข้น 50 ug/ml นำไปเขย่าที่ 28 °C เขย่าด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ใช้เป็นเซลล์เริ่มต้น (starter) เพื่อเตรียม competent cell ต่อไป

2.1.2 นำเซลล์เริ่มต้น 2 มิลลิลิตร เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 2.1.1 ปริมาตร 200 ml นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 °C เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง จนได้ค่า OD. ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรประมาณ 0.2-0.3

2.1.3 แช่เชื้อในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ต่อจากนั้นนำไปตกตะกอนเซลล์โดยนำไปปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วสารละลายส่วนบนทิ้ง

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

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

2.1.6 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

2.2 การเคลื่อนย้ายพลาสมิด pMDC32 ที่ได้รับยีน DFRAS เข้าสู่เซลล์ *A. tumefaciens* ด้วยวิธี electroporation

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

2.2.2 นำพลาสมิด pMDC32 ที่ได้รับยีน DFR ปริมาตร 1 ไมโครลิตร มาใส่ในหลอด competent cell ผสมเบาๆ ให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15-30 นาที ต่อจากนั้น นำส่วนผสมมาใส่ลงใน cuvette แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15-30 นาที

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

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

2.2.4 เช็ด cuvette ให้แห้งก่อน pulse หลังจาก pulse ให้เติมอาหารเหลว YEP 1 มิลลิลิตรทันที

2.2.5 ย้ายส่วนผสมไปเลี้ยงในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28 °C เขย่าด้วยความเร็ว 225 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.2.5 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 DFR ด้วยเทคนิค PCR ต่อไป

2.3 การตรวจสอบการปรากฏของพลาสมิด pMDC32 ที่ได้รับยีน DFRAS ในเซลล์ *Agrobacterium tumefaciens*

ตรวจสอบการปรากฏของพลาสมิด pMDC32 ที่ได้รับยีน DFR ใน *Agrobacterium tumefaciens* ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยการนำโคโลนีที่เจริญได้บนอาหารไปคัดเลือกด้วยเทคนิคพีซีอาร์ มีการเตรียมปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 10X PCR Buffer 2 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP 0.4 ไมโครลิตร, 50 mM MgCl₂ 0.6 ไมโครลิตร, 5 uM Forward Primer (...F) 2 ไมโครลิตร, 5 uM Reverse Primer (...R) 2 ไมโครลิตร, 5 U/ul Platinum Taq DNA Polymerase 0.2 ไมโครลิตร, น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 12.8 ไมโครลิตร รวมปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน ใช้ไม้จิ้มฟันจิ้มเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวๆ แล้วนำเชื้อจุ่มลงในปฏิกิริยาพีซีอาร์ แล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง ที่กำหนดสภาวะการทำปฏิกิริยา PCR ดังนี้

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

72 °C 10 นาที 1 รอบ

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

นำโคลนที่ตรวจพบพลาสมิด pMDC32 ที่ได้รับยีน DFRAS มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว YEP ที่เติม 50 ug/ml Kanamycin เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมงเพื่อใช้ในการขั้นตอนการถ่ายยีนต่อไป

การถ่ายยีน AaDFRAS เข้าสู่หนั้ว

1. การถ่ายยีนโดยอะโกรแบคทีเรียม

เตรียมแคลลัสหนั้วสำหรับการถ่ายยีน โดยทำการเลี้ยงใบอ่อนหนั้วพันธุ์ราปีโต้ และพันธุ์ไซเนต ในอาหารสังเคราะห์ MS ทำการตัดใบหนั้วเป็นรูป สี่เหลี่ยมขนาด 0.5-1 เซนติเมตร เลี้ยงในอาหารสูตร MS วาง 5 ชิ้น/plate เลี้ยงจนกระทั่งเกิดเป็นแคลลัส และเพิ่มแคลลัสให้ได้ปริมาณมากเพียงพอสำหรับนำไปใช้ในการถ่ายยีนต่อไป

เตรียมเชื้ออะโกรแบคทีเรียม โดยเลี้ยงเชื้ออะโกรแบคทีเรียม EHA 105 ที่มีพลาสมิด pMDC32 ที่บรรจุยีน AaDFRAS ที่โคลนได้จากดอกหนั้ว (ที่ได้จากข้อ2.) มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว YEP (peptone 10 g/l +Yeast extract 10 g/l , NaCl 5 g/l pH7.0)ที่เติม Kanamycin 50 ug/ml เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง spindown และละลาย pellet bacteria ด้วย co-culture media ให้ได้ OD.600 ประมาณ 0.6-1.0

ละลาย Agrobacterium EHA 105 ในอาหารเหลว สูตรMS ที่เติม NAA 0.1 mg/l ร่วมกับ BA 2 mg/l sucrose 3 % pH 5.7 นำแคลลัสหนั้วเตรียมไว้ มาเลี้ยงเขยาร่วมกับ Agrobacterium 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อ แล้วซับเนื้อเยื่อให้แห้งด้วยกระดาษกรอง เลี้ยงในอาหารแข็ง สูตรMS ที่อุณหภูมิห้องในสภาพมืดเป็นเวลา 3 วัน ล้างใบด้วย cefotaxime 500 mg/lg เลี้ยงในอาหารแข็ง สูตรMS ที่เติม cefotaxime 200 mg/l เปลี่ยนอาหารใหม่ทุก 10 วัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์ จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติม hygromycin 50 mg/l เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ย้ายไปเลี้ยงในอาหารที่ไม่มี antibiotic จนกระทั่งแคลลัสพัฒนาเป็นยอด ตัดยอดไปเลี้ยงในอาหารแข็ง MS ที่เติม sucrose 3 % pH 5.7 นำไปตรวจสอบการได้รับยีนด้วยเทคนิค PCR

2. การตรวจสอบต้นหนั้วที่ได้รับยีนด้วยเทคนิค PCR

นำใบของต้นหนั้วที่ผ่านการคัดเลือกให้ต้านทานต่อ hygromycin มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด NucleoSpin® Plant II Kit ตามวิธีของบริษัท MACHEREY-NAGEL ตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้ agarose gel electrophoresis ย้อมเจลด้วย Ethidium Bromide ตรวจสอบและบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel Doc จากนั้นวัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง BioDrop และปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้ได้ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบการปรากฏของยีน AaDFRAS ในหนั้วที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ คือ NOster204.F, NOster204.R (204bp) เป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะกับตำแหน่งของ Nos terminator และยีน AaDFRAS จากนั้นตรวจสอบผลผลิตของ PCR ด้วยเทคนิค Agarose gel electrophoresis

ระยะเวลา (เริ่มต้น - สิ้นสุด)

2554- 2558

สถานที่ดำเนินการ

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

การสร้างชุดยีน

การสร้างชุดยีน *pMDC32-DFRAS*

1.การนำยีน DFRAS เข้าสู่ Expression Vector โดยใช้เทคโนโลยี Gateway

1.1 การนำยีน DFRAS เข้าสู่ Entry Clones

การนำยีนเข้าสู่ Entry Clones เป็นการเตรียมชิ้นดีเอ็นเอของ DFR ให้อยู่ในรูปของ Antisense และให้เหมาะสมสำหรับการโคลนยีนโดยใช้เทคโนโลยี Gateway จากการนำลำดับเบสของยีน DFR ที่โคลนได้ (กุหลาบและคณะ, 2553) มาออกแบบไพรเมอร์ใหม่ และดัดแปลงลำดับเบสของไพรเมอร์ Forward และ Reverse โดยเติมลำดับเบสที่ปลายด้าน 5' จากการออกแบบไพรเมอร์ พบว่าได้ไพรเมอร์ ดังนี้ Forward คือ AaDFRattB2 AS มี ลำดับเบส GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGTCCCCGTGCTAT CACTGTTC และได้ไพรเมอร์ด้าน Reverse คือ AaDFRattB1 AS มี ลำดับเบส

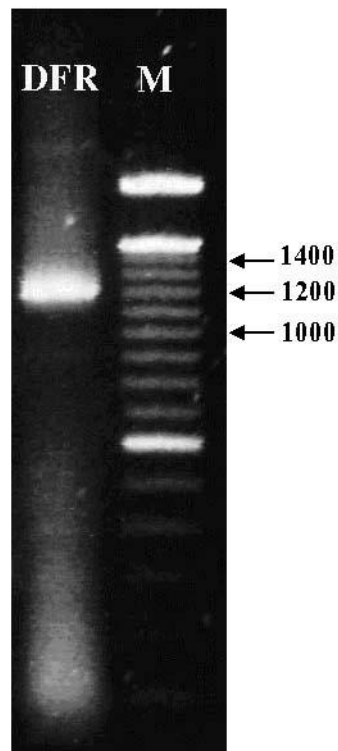
GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTATCAGTTTCTGCCTCTATA โดยไพรเมอร์ดังกล่าวจะไปจับบริเวณภายในของยีน DFR ที่โคลนได้ (ภาพที่2) จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน DFRAS ได้ขึ้นดีเอ็นเอขนาด 1,120 คู่เบส และมีขึ้นดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวเท่านั้น (ภาพที่ 3) แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบได้นั้นสามารถเพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอได้อย่างมีความจำเพาะกับยีน DFR เพียงอย่างเดียว อีกทั้งในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอครั้งนี้ได้ใช้ Pfu DNA polymerase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีกิจกรรม 3'-5' exonuclease ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เอนไซม์มี fidelity ที่สูง เหมาะสำหรับการเพิ่มปริมาณขึ้นของยีน DFR ที่ใช้ในงานวิจัยนี้เนื่องจากผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีการต้องการความถูกต้องของลำดับเบสสูง (วีระพงศ์, 2012)

1	CACACACACA CACACATATA TATATATATA TAGAGAGAGA GAGAGAGAGA GCGCTTTTAT CAGTTTCTGC CTCTATAAAC AACAGCTGGT TATATATAAT
101	CTGCGAGGAT GATGCACAAG GGCACCGTGT GCGTGACGGG CGCTGCCGGG TTCGTTGGCT CATGGCTGAT CATGAGGCTC CTCGAGCAGG GTTACTCTGT
201	CAAGGCCACC GTCCGCGACC CCAGCAACAT GAAGAAGGTG AAGCACTGCG TCGACCTTCC AGGGGCCGCG AACCGCCTGA CCCTCTGGAA GGCCGACCTC
301	GTCGATGAGG ACAGCTTCGA CGAGCCCATC CAAGGCTGCA CCGGCGTCTT CCACGTCGCG ACGCCCATGG ACTTCGAATC CAAGGACCCA GAGAGTGAGA
401	TGATCAAGCC GACGATCGAG GGGATGCTGA ACCTGTTGCG GTCTGTGCG AGGGCGAGCA GCACCGTCCG GCGAGTCGTC TTCACATCCT CGGCCGCGAC
501	GGTCTCCATA CACGAGGGCC GCAGACACCT CTACGACGAG ACCTCTCGGA GCGACGTCGA CTTCTGCAGG GCCAAGAAGA TGACCGGATG GATGTAATTT
601	GTGTCGAAGA CGTTGGCCGA GAAGGCCGCG TGGGACTTTG CGGAGAAGAA CAACATCGAC TTCATCAGCA TTATCCCCAC CCTAGTCAAC GGCCCTTCG
701	TCATGCCAC CATGCCGCC AGCATGCTCT CCGCCCTCGC CCTCATCACA AGGAACGAGC CGCACTATTC GATCCTGAAC CCGGTGCGAT TCGTCCACCT
801	CGATGACCTC TGCAACGCC ACATCTTCCT GTTCGAGTGC CCCGACGCCA AGGGAAGGTA CATCTGCTCC TCCCACGACG TCACCATCGC CGGCCCTGCC
901	CAGATACTCC GGCAGCGCTA CCCTGAGTTC GACGTCGCCA CCGAGTTTGG AGACATGGAG GTCTTCGACA TCATAAGCTA CTCGTCCAAG AAGCTCACGG
1001	ACCTAGGCTT TGAGTTCAA TACAGCTTAG AGGATATGTT TGATGGGGCG ATTCAGTCCT GCAGAGAGAA GGGCTTGCTG CCGCCGCCA CCAAGGAGCC
1101	ATCATATGCC ACTGAACAAT TAATTGCCAC CGGGCAAGAC AACGGCCATT GAGAACAGTG ATAGCACGGG GACCCAA

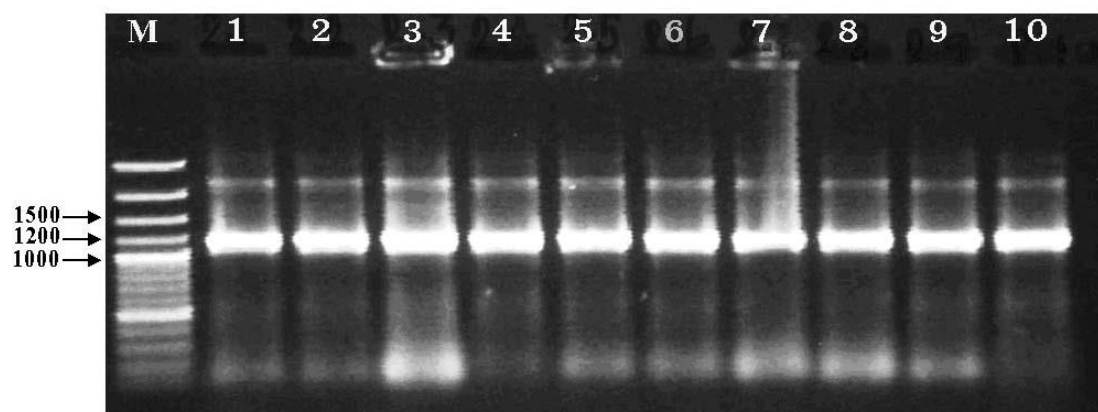
ภาพที่ 2 ตำแหน่งไพรเมอร์ที่ต่อด้วย attB1 (ตัวอักษรสีเขียว) (บน) และ attB2 (ตัวอักษรสีแดง) (ล่าง) ที่ใช้เพิ่มปริมาณยีน DFRAS

Antisense เป็นลำดับ oligonucleotides สายสั้นๆ ของ DNA หรือ RNA ที่ออกแบบมาให้เป็นคู่สมและมีความจำเพาะกับลำดับเบสของยีนที่สนใจ เพื่อเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนนั้นให้มีความแตกต่างไปจากเดิม ซึ่งเป็นผลมาจากการจับคู่กันของ Antisense oligonucleotides กับยีน โดยอาศัยหลักการ คือการป้องกันหรือขัดขวางไม่ให้มีการสังเคราะห์โปรตีนจากยีนเป้าหมาย แต่ยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด (Christine Antler.2003.),(<http://cmbi.bjmu.edu.cn/cmbidata>.) antisense strand หรือ DNA template คือ ดีเอ็นเอสายเดี่ยว (ssDNA) หรือสายโพลีนิวคลีโอไทด์ (polynucleotide) ที่ทำหน้าที่เป็นแม่แบบสำหรับกระบวนการการลอกรหัสโดยให้ RNA polymerase เข้าเกาะแล้วเริ่มต้นการลอกรหัสในทิศทาง 5'→3' ดังนั้น ssDNA template คือสายดีเอ็นเอที่มีทิศทาง 3'→5' ซึ่งสายใดสายหนึ่งของ DNA อาจเป็นทั้ง antisense strand ของยีนหนึ่ง แต่เป็น sense strand ของอีกยีนหนึ่งก็ได้ ทั้งนี้ ขึ้นอยู่กับตำแหน่ง promoter gene ซึ่งเป็นตัวกำหนดทิศทางการลอกรหัส (<http://cpe.rsu.ac.th/ut/courses>) ได้มีการนำเทคโนโลยี antisense ไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางสำหรับในพืชได้ประสบผลสำเร็จใน การสร้างมะเขือเทศ :The Flavr Savr tomato โดยใช้ antisense RNA ไปควบคุม การ สุก ของ มะเขือเทศ โดยไปจับกับ mRNA ที่เกี่ยวกับการสร้างเอนไซม์ จึงส่งผลให้มะเขือสุกช้าลง นอกจากนี้ เทคนิค antisense ของยีน ACC oxidase ได้ถูกนำมาใช้ในการลดความสุก

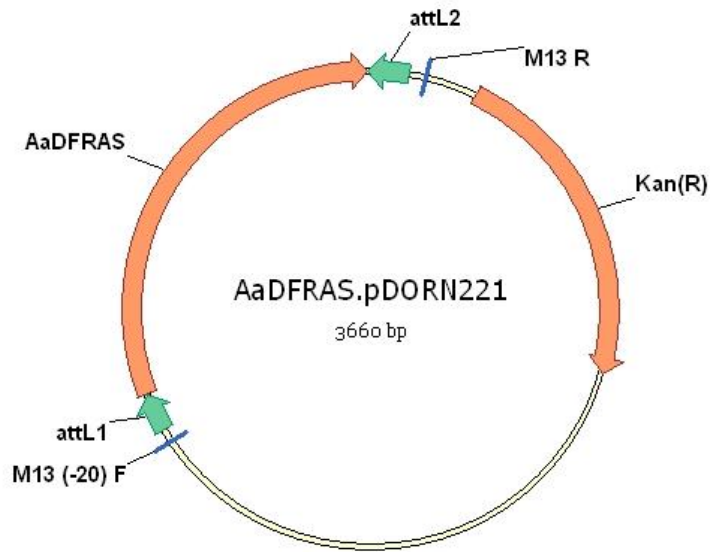
ในขั้นตอนการนำชิ้นยีน DFRAS ที่มีส่วนของ attB1 และ attB2 เข้าสู่เวกเตอร์ pDONR 221 เป็นการใช้เทคโนโลยี Gateway ซึ่งเป็นระบบที่ออกแบบมาให้มีความง่ายในการ cloning และ subcloning ชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจเข้าเวกเตอร์ได้ โดยรวมอยู่ในขั้นตอนเพียงไม่กี่ขั้นตอน คือเราสามารถที่จะทำการ clone ดีเอ็นเอที่สนใจเข้าเวกเตอร์ที่เรียกว่า Gateway entry vector และทำการย้ายชิ้นดีเอ็นเอจากเวกเตอร์นี้ไปสู่เวกเตอร์ตัวอื่นๆ ที่เป็นระบบ Gateway เหมือนกันได้ โดยอาศัย bacteriophage lamda-based site-specific recombinant ที่เรียกว่า att site ดังนั้นในกระบวนการทำ cloning จึงไม่ต้องการขั้นตอนการใช้ restriction enzyme และ ligase enzyme ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้นำชิ้นยีน DFR ที่มีส่วนของ attB1 และ attB2 เชื่อมต่ออยู่ทางด้านปลาย 5' และปลาย 3' นั้น จะมีการแลกเปลี่ยนชิ้นดีเอ็นเอซึ่งกันและกัน โดยเกิดที่ตำแหน่ง attB1, attB2 ของชิ้นยีน DFRAS กับตำแหน่ง attP1, attP2 ที่อยู่บนเวกเตอร์ pDONR 221 จึงทำให้ได้ Entry Clones คือ pDONR 221 ที่มีชิ้นดีเอ็นเอ DFRAS (ภาพที่ 5) สำหรับใช้งานในขั้นตอนต่อไป



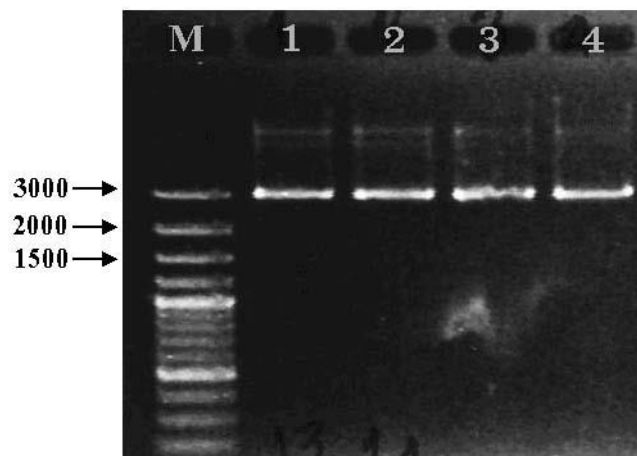
ภาพที่ 3 แอบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน DFR ที่อยู่ในเวกเตอร์ pGEM easy (Pfu DNA polymerase) ด้วยไพรเมอร์ AaDFRASB1B2 M = 100 bp DNA Ladder (Invitrogen)



ภาพที่ 4 แอบดีเอ็นเอที่ได้จากการตรวจสอบชิ้นยีน DFR จากโคลนแบคทีเรียที่ได้รับเวกเตอร์ pDONR 221 โดยวิธี colony PCR M = 100 bp DNA Ladder (Fermentus)



ภาพที่ 5 แสดงชิ้นส่วนของยีน DFR_AS จากดอกหน้าวัวที่อยู่ใน เวกเตอร์ pDORN 221

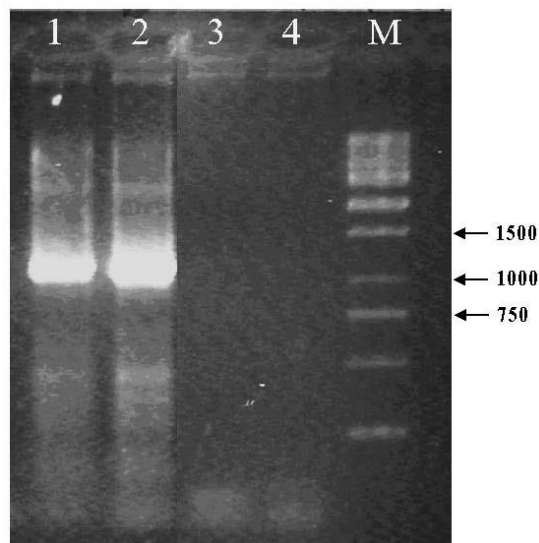


ภาพที่ 6 พลาสมิดที่สกัดจาก pDONR221 ที่ได้รับยีน DFRAS M = 100 bp DNA Ladder

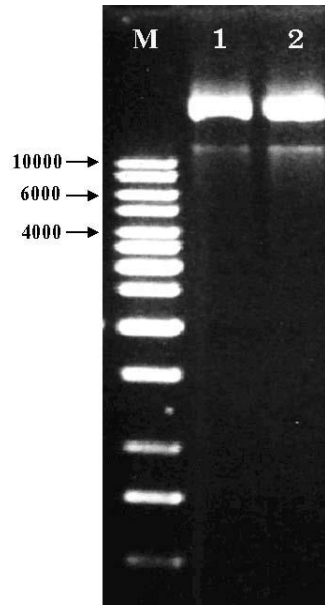
1.2 การนำยีน DFRAS เข้าสู่ Plant Expression Vector

จากการใช้เทคโนโลยี Gateway นำยีน DFRAS ที่เชื่อมต่ออยู่กับเวกเตอร์ pDONR 221 เข้าสู่ Plant Expression Vector ผลการทดลองพบว่าสามารถนำยีน DFRAS เข้าสู่เวกเตอร์ pMDC32 ซึ่งเป็น Plant Expression Vector ได้สำเร็จ โดยผลจากการนำโคลนของแบคทีเรียที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยง

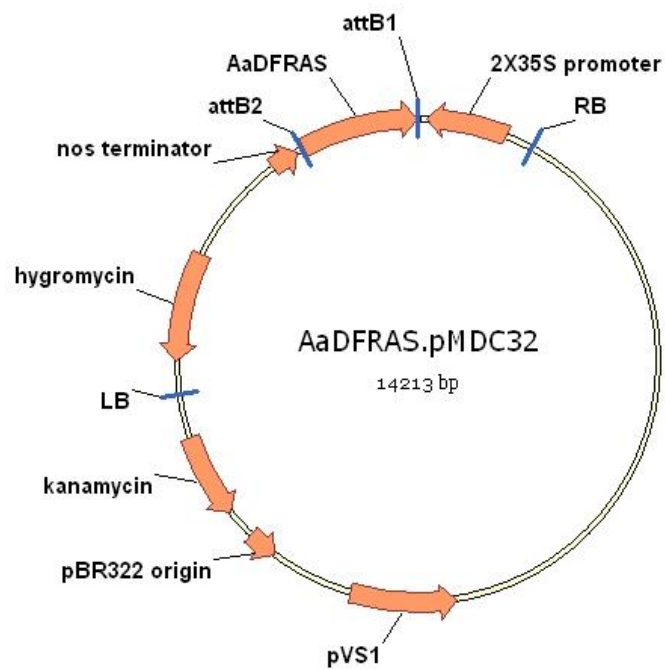
คัดเลือก ไปตรวจสอบด้วยเทคนิค Single colony PCR พบว่าโคลนที่ได้รับชิ้นยีน DFRAS สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 1,120 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดที่ตรงกับค่าคาดหวังที่กำหนดไว้ แต่โคลนที่ไม่ได้รับชิ้นยีน DFRAS จะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 1,120 คู่เบส (ภาพที่ 7) จึงสรุปได้ว่าชิ้นยีน DFRAS ได้ถูกนำเข้าไปอยู่ในเวกเตอร์ pMDC 32 แล้ว และเมื่อนำโคลนเป้าหมายดังกล่าวไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณ และสกัดพลาสมิด พบว่าได้พลาสมิดที่มีปริมาณมาก (ภาพที่ 8,9) สามารถใช้ในขั้นตอนการนำชิ้นยีน DFRAS ที่อยู่ในเวกเตอร์ pMDC 32 ไปถ่ายเข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens* ต่อไปได้



ภาพที่ 7 แสดงผลการตรวจสอบโคลนที่ได้รับยีน AaDFRAS ซึ่งอยู่ใน binary vector pMDC32 ด้วยไพรเมอร์ AaDFRAS ช่อง 1-2 = โคลนที่ได้รับยีน AaDFRAS ช่อง 3-4 = โคลนที่ไม่ได้รับ AaDFRAS
M = 1 Kb DNA Ladder



ภาพที่ 8 แอบัติเอ็นเอของพลาสมิดที่สกัดได้จากโคลนของแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิด AaDFRAS.pMDC32 ที่ผ่านการตรวจสอบพลาสมิดด้วยเทคนิค PCR ตามภาพที่ 7 (ช่องที่ 1-2)
M= 1Kb DNA Ladder



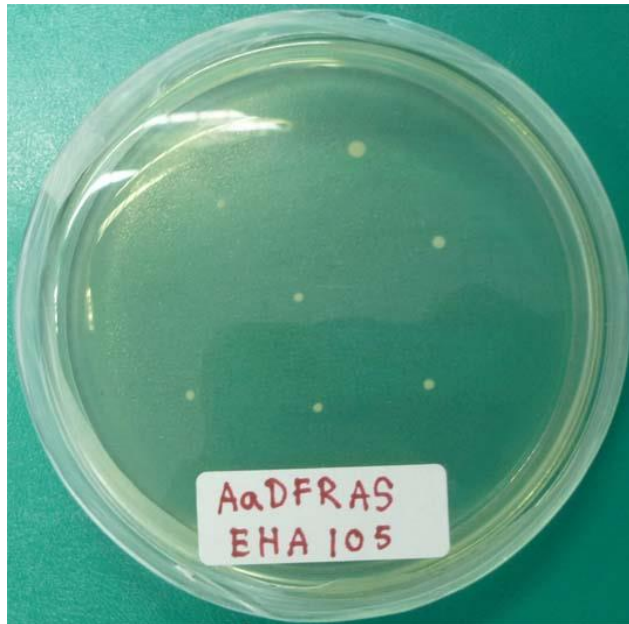
ภาพที่ 9 แสดงชิ้นส่วนของยีน DFR AS จากดอกหน้าวัวที่อยู่ใน เวกเตอร์ pMDC32

เวกเตอร์ pMDC 32 ซึ่งเป็น Plant expression vector หรือ Binary vector ซึ่งมีขนาด 11,752 คู่เบส ที่ประกอบด้วยโครงสร้างที่สำคัญ 2 ชุด คือ ชุดโครงสร้างยีนที่เกี่ยวกับการทำงานของยีนเป้าหมายตลอดจนยีนประกอบอื่นๆ ที่ใช้ในการคัดเลือก และการตรวจสอบพืชที่ได้รับการถ่ายยีน ซึ่งต้องจัดทำให้เป็นโครงสร้างที่เหมาะสมในการแสดงออกในพืช โดยจะต้องประกอบด้วย 2X35S Promoter ที่ควบคุมการถอดรหัสจากยีนเป็น mRNA และ nos terminator เป็นที่ควบคุมการหยุดการถอดรหัส Left border (LB) และ Right border (RB) เป็นตำแหน่งที่ใช้ในการนำยีนเป้าหมายเข้าไปในพืช มีความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ Kanamycin เพื่อช่วยคัดเลือกในอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ Hygromycin เพื่อใช้ในการคัดเลือกเฉพาะเซลล์ของต้นพืชที่ได้รับยีนเป้าหมาย

2. การนำพลาสมิด pMDC32-DFRAS ถ่ายเข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens*

การเคลื่อนย้าย pMDC32-DFRAS ซึ่งเป็น Binary vector เข้าสู่เซลล์ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 พบว่า competent cell ที่เตรียมได้นั้น สามารถนำไปใช้ในการส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์โดยวิธี electroporation ได้สำเร็จ ผลที่ได้จากการนำเซลล์ไปคัดเลือกในอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะ Kanamycin พบโคโลนีที่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกได้ (ภาพที่ 10) ซึ่งต้องใช้เวลาในการเลี้ยงนาน 2-3 วัน จึงจะสังเกตเห็นเซลล์ *Agrobacterium tumefaciens* เจริญเป็นโคโลนี

การเตรียม competent cell ของแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 เพื่อใช้ในการส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ electroporation นั้น พบว่าวิธีการนำเชื้อที่เก็บไว้เป็นเวลานานมาเลี้ยงในอาหารเหลว เพื่อใช้เป็นเซลล์เริ่มต้น (starter) ก่อนที่จะนำไปเลี้ยงในอาหารเพื่อปริมาณมากๆ นั้น เป็นการกระตุ้นให้เซลล์ที่เก็บไว้นานมีการแบ่งตัว ให้ได้เซลล์ใหม่ๆ เมื่อนำไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารจำนวนมาก ก็จะมีการแบ่งตัวได้อย่างรวดเร็ว ในขั้นตอนการทำความสะอาดเซลล์และทำให้เซลล์เข้มข้น การล้างเซลล์โดยใช้ 10% glycerol และปั่นตกตะกอนในเครื่องปั่นเหวี่ยงที่มีอุณหภูมิ 4 °C เป็นการรักษาเซลล์ให้สูญเสียสภาพน้อยที่สุด เพื่อให้การส่งถ่าย พลาสมิดเข้าสู่เซลล์มีประสิทธิภาพ



ภาพที่ 10 แสดงโคโลนีของแบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่ได้รับพลาสมิด pMDC32-DFRAS

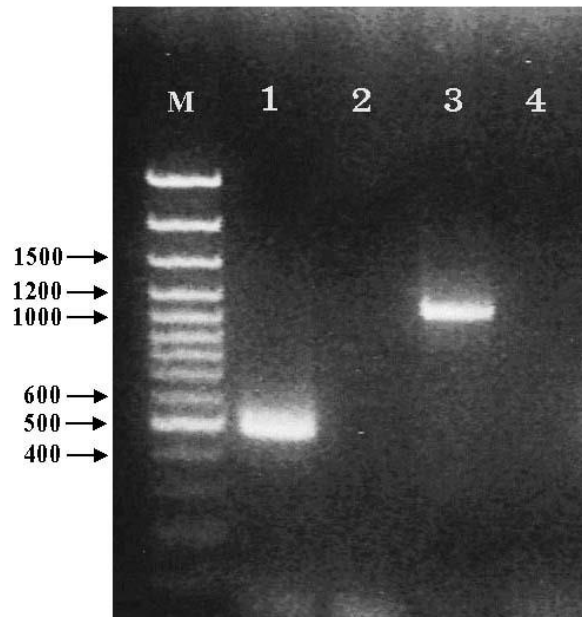
การตรวจสอบ *Agrobacterium tumefaciens* ที่ได้รับพลาสมิด pMDC32-DFRAS พบว่าการตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ AaDFRASp32F (GGACTTCGAATCCAAGGACC) และ AaDFRASp32R (AGCAGATGTACCTTCCCTTG) ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสอยู่ภายในยีน AaDFRAS สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 500 คู่เบส (ภาพที่ 11,12) ซึ่งเป็นขนาดที่ตรงกับค่าคาดหมายนอกจากนี้ได้ตรวจสอบโดยใช้ไพรเมอร์ AaDFRASf (GGTACTAGTGTCCCCGTGCTATCACTGTTC) และ AaDFRASr (GGTGGTCACCTATCAGTTTCTGCCTCTATA) ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสอยู่ที่จุดเริ่มต้นและจุดสิ้นสุดของยีน AaDFRAS สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 1,120 คู่เบส (ภาพที่ 11,12) ซึ่งเป็นขนาดที่ตรงกับค่าคาดหมาย และเป็นชิ้นดีเอ็นเอทั้งหมดของยีนที่อยู่ในพลาสมิด pMDC32 จึงสรุปได้ว่าโคโลนีของเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือกที่เติม Kanamycin นั้น ได้รับพลาสมิด pMDC32-DFRAS ซึ่งเป็นยีนเป้าหมายที่ได้ถูกถ่ายเข้าไปแทรกอยู่

1	CACACACACA CACACATATA TATATATATA TAGAGAGAGA GAGAGAGAGA GCGCTTTTAT CAGTTTCTGC CTCTATAAAC AACAGCTGGT TATATATAAT
101	CTGCGAGGAT GATGCACAAG GGCACCGTGT GCGTGACGGG CGCTGCCGGG TTCGTTGGCT CATGGCTGAT CATGAGGCTC CTCGAGCAGG GTTACTCTGT
201	CAAGGCCACC GTCCGCGACC CCAGCAACAT GAAGAAGGTG AAGCACTCTG TCGACCTTCC AGGGGCCGCG AACCCGCTGA CCTCTGGAA GGCCGACCTC
301	GTCGATGAGG ACAGCTTCGA CGAGCCCATC CAAGGCTGCA CCGCGTCTT CCACGTCGCG ACGCCCATGG ACTTCGAATC CAAGGACCA GAGAGTGAGA
401	TGATCAAGCC GACGATCGAG GGGATGCTGA ACGTGTTCG GTCGTGTGCG AGGGCGAGCA GCACCGTCCG GCGAGTCGTC TTCACATCCT CGGCCGGCAC
501	GGTCTCCATA CACGAGGGCC GCAGACACCT CTACGACGAG ACCTCCTGGA GCGACGTCGA CTTCTGCAGG GCCAAGAAGA TGACCGGATG GATGTATTTT
601	GTGTCGAAGA CGTTGGCCGA GAAGGCCGCG TGGGACTTTG CGGAGAAGAA CAACATCGAC TTCATCAGCA TTATCCCCAC CCTAGTCAAC GGCCCTTCG
701	TCATGCCAC CATGCCGCC AGCATGCTCT CCGCCCTCGC CCTCATACA AGGAACGAGC CGCACTATTC GATCCTGAAC CCGGTGCAGT TCGTCCACCT
801	CGATGACCTC TGCAACGCC ACATCTTCTT GTTCGAGTGC CCCGACGCA AGGGAGGTA CATCTGCTCC TCCACGAGC TCACCATCGC CGGCCTCGCC
901	CAGATACTCC GGCAGCGCTA CCCTGAGTTC GACGTCCCA CCGAGTTGG AGACATGGAG GTCTTCGACA TCATAAGCTA CTCGTCCAAG AAGCTCACGG
1001	ACCTAGGCTT TGAGTTCAAG TACAGCTTAG AGGATATGTT TGATGGGGCG ATTCACTCTT GCAGAGAGAA GGGCTTCTGT CCGCCCGCCA CCAAGGAGCC
1101	ATCATATGCC ACTGAACAAT TAATTGCCAC CGGGCAAGAC AACGGCCATT GAGAACAGTG ATAGCACGGG GACCCAA

ภาพที่ 11 แสดงตำแหน่งไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจสอบยีนใน pMDC32

สีดำ : ไพรเมอร์ AaDFRASp32F , AaDFRASp32R ให้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 500 คู่เบส

สีฟ้า : ไพรเมอร์ AaDFRASf , AaDFRASr ให้ผลผลิตพีซีอาร์ขนาด 1120 คู่เบส



ภาพที่ 12 แสดงแถบดีเอ็นเอของการตรวจสอบเชื้อ *A. tumefaciens* EHA105 ที่ได้รับเวกเตอร์

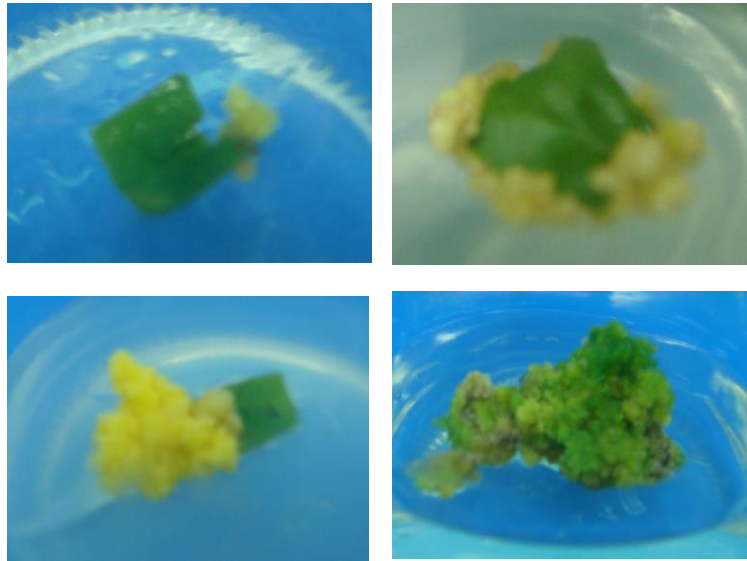
pMDC32-AaDFRAS (ช่องที่ 1 คือแถบดีเอ็นเอ ขนาด 500 bp จากการตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ AaDFRASp32F+ AaDFRASp32R , ช่องที่ 3 คือแถบดีเอ็นเอ ขนาด 1120 bp จากการตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ AaDFRASf+AaDFRASr) และ (ช่องที่ 2,4 คือ *A. tumefaciens* EHA105 ที่ไม่ได้รับ pMDC32-AaDFRAS จากการตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ AaDFRASp32F+ AaDFRASp32R และ AaDFRASf+AaDFRASr ตามลำดับโดยมี 100 bp. DNA Ladder เป็นตัวเปรียบเทียบขนาดขึ้นดีเอ็นเอ

2. การถ่ายยีน AaDFR-AS เข้าสู่หน้วว

2.1 การเตรียมพืชสำหรับใช้ถ่ายยีนและทดสอบวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

จากการนำใบอ่อนมาฟอกฆ่าเชื้อที่ผิว แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ทำให้ได้ชิ้นส่วนของหน้ววในสภาพปลอดเชื้อ สามารถนำมาชักนำให้เกิดแคลลัส และเพิ่มปริมาณแคลลัสให้ได้ปริมาณเพิ่มมากขึ้น (ภาพที่ 13) สามารถทดสอบระดับ cefotaxime ที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต และระดับ

Hygromycinที่เหมาะสมในการคัดเลือกหน้าวัว สามารถชักนำให้แคลลัสพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ (ภาพที่ 14)



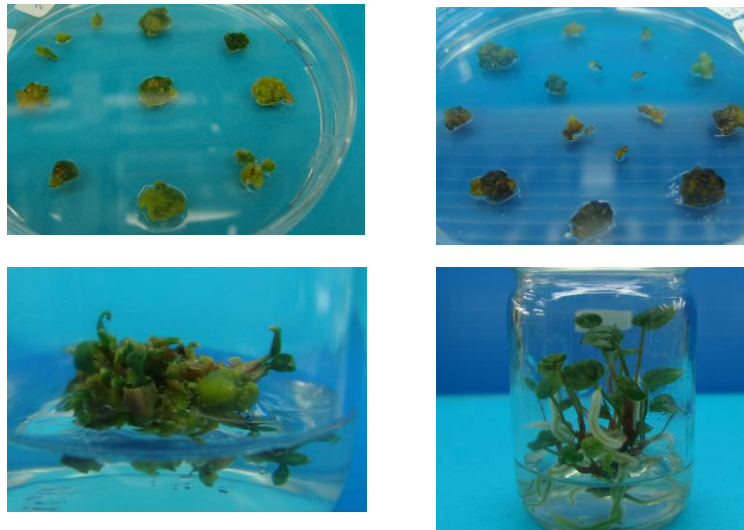
ภาพที่ 13. การเกิดแคลลัสจากการเลี้ยงใบอ่อนของหน้าวัว ในอาหารสูตร MS (บนซ้าย=แคลลัสจากการเลี้ยงใบอ่อนเป็นเวลา 4 เดือน บนขวา=แคลลัสจากการเลี้ยงใบอ่อนเป็นเวลา 6 เดือน ล่างซ้าย= แคลลัสจากการเลี้ยงใบอ่อนเป็นเวลา 8 เดือน ล่างขวา= แคลลัสจากการเลี้ยงใบอ่อนเป็นเวลา 12 เดือน



ภาพที่14. การพัฒนาของต้นจากแคลลัสที่ได้จากการเลี้ยงใบอ่อนของหน้าวัวพันธุ์ไซเน็ต ในอาหารสูตร MS (ซ้าย = ยอดอ่อน อายุ 6 เดือน กลาง= ต้นที่สมบูรณ์พร้อมออกปลูก ขวา = ต้นที่ย้ายออกปลูก 1 เดือน

2.2 การถ่ายยีนโดยใช้อะโกรแบคทีเรีย

จากการถ่ายยีน DFR ในรูป antisense อยู่ในพลาสมิด pMDC32 (pMDC32-DFRAS) เข้าสู่แคลลัสของหน่ว้าว โดยใช้ *Agrobacterium* พบว่าสามารถส่งถ่ายยีน DFRAS เข้าสู่หน่ว้าวได้สำเร็จ เมื่อทำการตรวจสอบชิ้นแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนในอาหารคัดเลือก โดยนำแคลลัสไปเลี้ยงบนอาหารคัดเลือก MS ที่เติม hygromycin 50 mg/l หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน พบว่าแคลลัสหน่ว้าวที่ได้รับการถ่ายยีนจะเจริญเติบโตและพัฒนาต่อไปได้ ส่วนแคลลัสหน่ว้าวที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะกลายเป็นสีน้ำตาลและตายในที่สุด เมื่อชักนำแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนให้พัฒนาเป็นยอด สามารถนำไปตรวจสอบการได้รับการถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR เมื่อเพาะเลี้ยงต้นที่ผ่านการตรวจสอบต่อเป็นระยะเวลา 12 เดือนก็สามารถจะเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์พร้อมที่จะออกปลูกได้ (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 15. การพัฒนาของแคลลัสหน่ว้าวพันธุ์ราบิด ที่ได้จากการถ่ายยีน DFR ในรูป antisense (บนซ้าย= แคลลัส หลังได้รับการถ่ายยีน 7 วัน บนขวา=แคลลัสที่เลี้ยงในอาหารคัดเลือกที่เติม hygromycin 50 mg/l เป็นเวลา 30 วัน ล่างซ้าย= แคลลัสที่ผ่านการคัดเลือก หลังจากนำมาเลี้ยงเป็นเวลา 60 วัน ล่างขวา = ต้นที่เกิดจากการพัฒนาของแคลลัสที่ผ่านการคัดเลือก เมื่อนำมาเลี้ยงต่อเป็นเวลา 12 เดือน

3.การตรวจสอบต้นหน่ว้าวที่ได้รับยีนด้วยเทคนิค PCR

ผลการตรวจสอบการปรากฏของยีน DFR ในรูป antisense (DFRAS) ในต้นหน่ว้าวที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ NOster204.F และ NOster204.R พบว่าสามารถตรวจพบ

แถบดีเอ็นเอขนาด 204 คู่เบส เพียงแถบเดียวเท่านั้น (ภาพที่16) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ มีความจำเพาะกับตำแหน่งของยีน DFR และ Nos terminator ซึ่งเป็นชุดยีนที่ถ่ายเข้าสู่หน่วว จะเห็นได้ว่าไพรเมอร์ ที่ใช้ตรวจสอบนั้นจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เฉพาะต้นหน่ววที่ได้รับการถ่ายยีนเท่านั้น ไม่สามารถเพิ่มปริมาณจากดีเอ็นเอของต้นหน่ววที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ภาพที่16)



ภาพที่16. ผลการตรวจสอบต้นหน่ววที่ได้รับการถ่ายยีน DFR ในรูป antisense ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ NOSt204.F, NOSt204.R (204bp) (1-4 = ต้นที่ได้รับการถ่ายยีน ,5 = ต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน , 6 = AaDFRAS_PMD32, 7=control, M=100bp marker)

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การสร้างชุดยีน *dihydroflavonol 4-reductase (DFR)* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสีในวัฏจักรการสังเคราะห์รงควัตถุ anthocyanin ที่โคลนได้จาก cDNA ของดอกหน่ววให้อยู่ในรูปควบคุมการแสดงออกของยีนแบบกลับทิศ ได้เป็น *pMDC32-DFRAS*. และนำเข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ทำให้ได้ชุดยีน *pMDC32-DFRAS* ที่อยู่ใน *Agrobacterium tumefaciens* สามารถถ่ายฝากสู่หน่ววประสบความสำเร็จ เมื่อนำต้นมาตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ พบว่าต้นที่ได้รับการถ่ายยีน จะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ ส่วนต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายฝากจะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ซึ่งต้นหน่ววที่ได้รับการถ่ายยีนนี้สามารถนำออกปลูกเพื่อตรวจสอบผลต่อการเปลี่ยนแปลงสีของดอกหน่ววในโอกาสต่อไป

การนำไปใช้ประโยชน์

ได้ชุดยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ *dihydroflavonol 4-reductase (DFR)* จากดอกหน้าวัวที่อยู่ในรูปควบคุมการแสดงออกของยีนแบบกลับทิศ ที่เป็นของกรมวิชาการเกษตรสำหรับนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับแต่งสีหน้าวัวโดยวิธีการถ่ายยีน เพื่อสร้างความหลากหลายของสีดอก ได้วิธีการถ่ายยีนสู่หน้าวัว ได้หน้าวัวที่มีสีดอกเปลี่ยนไป นอกจากนี้สามารถนำไปเผยแพร่ในวารสารทางวิชาการได้

หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ นักปรับปรุงพันธุ์ กรมวิชาการเกษตร สถาบันการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

- กุหลาบ คงทอง ประสาน สืบสุข. และกิ่งกาญจน์ พิษณุกุล 2553. การโคลนยีน *dihydroflavonol 4-reductase (DFR)* จากดอกหน้าวัว. หน้า186-195 ใน รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2553 เล่ม1. สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร.
- ปิยะศักดิ์ ช่อมพฤษ. 2542. เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมในการควบคุมสีและลักษณะของดอก. วารสารข่าว ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง 13(1): 9-13.
- วีระพงศ์ ลุฬิตานนท์ และนิภาภรณ์ แสนคุณท้าว. 2012. พื้นฐานเทคนิค Polymerase Chain Reaction. Avarible : www.microbio.md.kku.ac.th/site_data/mykku.../Basic_PCR_June_08.pdf. Access : 11-06-2012.
- Antisense technology. Available from : <http://cmbi.bjmu.edu.cn/cmbidata>. Accessed : 14 June 2012.
- Brugliera F., Gina Barri-Reweell, Timothy A. Holton and John 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.
- Christine Antler.2003. Antisense RNA. Available from : <http://www.scq.ubc.ca>. Accessed : 14 June 2012.
- Eric T. Johnson, Sunhyo Ryu, Hankuil Yi, Byongchul Shin, Hyeonsook Chong and Giltso Choi. 2001. Alteration of single amino acid changes the substrate specificity of *dihydroflavonol 4-reductase*. The Plant Journal 25(3): 325-333.
- QIAGEN. 2003. QIAprep miniprep handbook. pp. 1-23.
- [.http://cpe.rsu.ac.th/ut/courses](http://cpe.rsu.ac.th/ut/courses)

http://www.gibthai.com/services/faq_detail.php?page=2&type_id=1

<http://www.med.upenn.edu/lamitinalab/documents/GatewayBPreaction.pdf>