สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ค
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	4
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
ตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	20
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล	39
สรุปผลการวิจัย	65
เอกสารอ้างอิง	67

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	องค์ประกอบของการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	23
ตารางที่ 2	องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ในการเพิ่มปริมาณชิ้นยีน *pap1*	24
ตารางที่ 3	องค์ประกอบของการตัด PCR product ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	25
ตารางที่ 4	องค์ประกอบของปฏิกิริยาการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ (ligation)	26
ตารางที่ 5	องค์ประกอบของปฏิกิริยาพีซีอาร์ สำหรับใช้ตรวจสอบต้นข้าวที่ได้รับการถ่ายยีน	32
ตารางที่ 6	องค์ประกอบของพีซีอาร์ ในการวิเคราะห์ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *pap1* โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1*	35
ตารางที่ 7	การทดสอบ competent cell บนอาหารแข็ง LB ที่เติมแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร	38
ตารางที่ 8	การถ่ายฝากพลาสมิดสายผสม (pKL1) เข้าสู่ competent cell และคัดเลือกโคลนบนอาหารแข็ง LB ที่เติม แอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร	43
ตารางที่ 9	ประสิทธิภาพการถ่ายยีน *pap1* เข้าสู่แคลลัสข้าวพันธุ์ Kitaake แสดงกลุ่มแคลลัสที่รอดบนอาหารคัดเลือก และการเกิดต้น	48
ตารางที่ 10	สรุปผลการทำพีซีอาร์ของต้นข้าวที่ผ่านการถ่ายยีน เพื่อตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมข้าว	52
ตารางที่ 11	ประสิทธิภาพการถ่ายยีนเข้าสู่ชิ้นส่วนใบยาสูบด้วยอะโกรแบคทีเรียมสายพันธุ์ AGL1 ที่มีพลาสมิด pPAP1	54
ตารางที่ 12	สรุปผลการทำพีซีอาร์ของต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน เพื่อตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมยาสูบ	60-61

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	ลักษณะของต้นและรวง ของข้าวเจ้าหอมนิล (ก.) และลักษณะเมล็ดข้าว (ข.)	7
ภาพที่ 2	กระบวนการสังเคราะห์ฟลาโวลนอยด์	8
ภาพที่ 3	ลักษณะของต้นข้าวเหนียวดำ และเมล็ด	9
ภาพที่ 4	ตัวอย่างโครงสร้างและโมเลกุลของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)	10
ภาพที่ 5	รูปภาพทั่วไปของต้นยาสูบ	16
ภาพที่ 6	วิถีการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานิน	
ภาพที่ 7	แผนที่พลาสมิด pRTL2 แสดง 35S promoter with dual enhancer ต่อกับ TEV Leader coding sequence และ 35S terminator เพื่อใช้สำหรับโคลนยีน *pap1* เข้าที่ *Nco*I/*Sac*I sites โดยแทนที่ coding sequence นอกจากนี้ยังมียีนต้านยาแอมพิซิลิน (Ap^R) เพื่อใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิด	19
ภาพที่ 8	แผนที่พลาสมิด 3PAP-Red	20
ภาพที่ 9	แผนที่พลาสมิด pCAMBIA 1390	27
ภาพที่ 10	แผนที่ T – DNA ของพลาสมิด pCAMBIA 1390	28
ภาพที่ 11	การวิเคราะห์พลาสมิด pRTL2 ที่สกัดด้วยวิธี Alkaline lysis method	38
ภาพที่ 12	การวิเคราะห์พลาสมิด pRTL2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I และ *Sac*I เปรียบเทียบกับพลาสมิด pRTL2 ที่ยังไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (uncut pRTL2) ก) ก่อนตัดเจล และ ข) หลังตัดเจลที่มีแถบดีเอ็นเอ	39
ภาพที่ 13	การวิเคราะห์พลาสมิด pRTL2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I และ *Sac*I แล้วทำการแยกบริสุทธิ์โดยใช้ชุด PCR clean-up Gel extraction	39
ภาพที่ 14	การวิเคราะห์ชิ้นยีน *pap1* ที่ได้จากเทคนิค PCR	40
ภาพที่ 15	การวิเคราะห์ยีน *pap1* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I และ *Sac*I เปรียบเทียบกับยีน *pap1* ที่ยังไม่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (uncut *pap1*) ก) ก่อนตัดเจล และ ข) หลังตัดเจลที่มีแถบดีเอ็นเอ	41
ภาพที่ 16	การวิเคราะห์ชิ้นยีน *pap1* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I และ *Sac*I แล้วทำการการแยกบริสุทธิ์โดยใช้ชุด PCR clean-up Gel extraction	41
ภาพที่ 17	แผนที่พลาสมิด pKLI	42
ภาพที่ 18	การวิเคราะห์พลาสมิดที่สกัดได้จาก I:5 โคโลนีที่ I, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 1:3	44

หน้า

	โคโลนีที่ 1 โดยเปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb Ladder Plus ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอริซิส	
ภาพที่ 19	การวิเคราะห์โคลนที่มีพลาสมิดสายผสม pKL1 โดยตัดพลาสมิดที่สกัดได้จาก 1:5 โคโลนีที่ 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 1:3 โคโลนีที่ 1 ด้วยเอนไซม์ *Nco*1 และ *Sac*I โดยเปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb Ladder Plus ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอริซิส	44
ภาพที่ 20	การวิเคราะห์พลาสมิด pKL1 ที่ได้จากโคลน A1, A2, B1 และ B2 โดยตัดด้วยเอนไซม์ *Nco*I และ *Sac*I เปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb Ladder Plus ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอริซิส	45
ภาพที่ 21	การวิเคราะห์พลาสมิด pKL1 โคลน A1 Elute 1, A1 Elute 2, B1 Elute 1 และ B1 Elute 2 ที่ได้จากการสกัดด้วยชุดkit โดยเปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb Ladder Plus ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอริซิส	46
ภาพที่ 22	ลักษณะการเกิดแคลลัสของเมล็ดข้าวพันธุ์ Kitaake ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร N6D ระยะเวลา 4 สัปดาห์	48
ภาพที่ 23	ลักษณะของแคลลัสภายหลังการปลูกถ่ายเชื้อและเพาะเลี้ยงร่วมเป็นระยะเวลา 3 วัน	48
ภาพที่ 24	ลักษณะแคลลัสที่รอดตายบนอาหารคัดเลือกสูตร N6D ดัดแปลง ครั้งที่ 2 หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์	49
ภาพที่ 25	**25** ลักษณะกลุ่มแคลลัสที่เกิดเป็นตายอดบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นครั้งที่ 2 หลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ (ก) ลักษณะของแคลลัสที่ต้านทานสารปฏิชีวนะและเกิดการแบ่งตัว (ข) ลักษณะของแคลลัสที่เกิดตายอดสีเขียว (ค) ลักษณะของแคลลัสที่เกิดตายอดสีขาว	49
ภาพที่ 26	ลักษณะของแคลลัสที่เจริญเป็นต้นบนอาหารสูตรชักนำให้เกิดต้นครั้งที่ 3 หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์	49
ภาพที่ 27	ลักษณะของต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ผ่านการถ่ายยีนและเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ระยะเวลา 3 สัปดาห์ (ก) ต้นข้าวปกติ (ข) ต้นข้าวสีขาว	50
ภาพที่ 28	ลักษณะของต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ผ่านการถ่ายยีน เพาะเลี้ยงในโรงเรือนกระจก (ก) เพาะลงดินอายุ 2 สัปดาห์ (ข) เพาะลงดินอายุ 5 สัปดาห์	50

หน้า

ภาพที่ 29 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ได้รับการถ่ายยีน *pap1* ครั้งที่ 1จำนวน 9 ต้น M คือ Lambda DNA/*Eco*Rl+*Hin*dlll Marker, C คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน (Control) และ 1 – 9 คือต้นข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนและด้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ได้แก่ ต้นที่ 3.1(1.1), 3.1(1.2), 3.1(1.3), 3.1(2.1), 3.1(3.1), 5.1(1.1), 5.1(1.1w), 3.1(1.4) และ 3.1(1.4w) ตามลำดับ 51

ภาพที่ 30 การตรวจสอบการแทรกตัวของยีน *pap1* ในจีโนมข้าวด้วยเทคนิคพีซีอาร์ครั้งที่ 1 โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *pap1* โดย M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder, N คือ ต้นข้าวพันธุ์ Kitaake ที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน (Negative control), P คือ พลาสมิด pPAP1 (Positive control), 1 – 9 คือ ต้นข้าวที่ผ่านการถ่ายยีนและต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ได้แก่ ต้นที่ 3.1(1.1), 3.1(1.2), 3.1(1.3), 3.1(2.1), 3.1(3.1), 5.1(1.1), 5.1(1.1w), 3.1(1.4) และ 3.1(1.4w) ตามลำดับ และ W คือ น้ำกลั่น 52

ภาพที่ 31 ลักษณะของชิ้นส่วนใบยาสูบที่ผ่านการถ่ายยีน แล้วนำไปวางบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ดัดแปลง ที่ประกอบด้วย BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีโฟแทคซิม 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซิน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จะสังเกตเห็นว่า ชิ้นส่วนของใบยาสูบมีลักษณะสีเขียว 55

ภาพที่ 32 ลักษณะชิ้นส่วนใบยาสูบบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ดัดแปลง ที่ประกอบด้วย BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีโฟแทกซิม 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซิน 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

(ก) ลักษณะชิ้นส่วนของใบยาสูบที่สามารถด้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินได้ ซึ่งจะมีลักษณะเป็นสีเขียว

(ข) ลักษณะชิ้นส่วนของใบยาสูบที่รอดและตายบนอาหารคัดเลือก 55

ภาพที่ 33 ลักษณะชิ้นส่วนใบยาสูบบนอาหารคัดเลือกสูตร MS ดัดแปลง ที่ประกอบด้วย BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีโฟแทกซิม 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซิน 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 สัปดาห์

(ก) ลักษณะการเกิดตายอดจากชิ้นส่วนของใบยาสูบ ซึ่งจะมีลักษณะเป็นตุ่มเล็กๆ สีเขียว ตามขอบของชิ้นส่วนใบยาสูบ

(ข) ลักษณะการเกิดตายอดสีแดงจากชิ้นส่วนของใบยาสูบ ซึ่งจะมีลักษณะเป็นตุ่มเล็กๆ สีแดงตามขอบของชิ้นส่วนใบยาสูบ 56

หน้า

ภาพที่ 34 ลักษณะของต้นยาสูบที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียมที่มีพลาสมิด pPAP1 เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในขวดที่มีอาหารคัดเลือกสูตร MS ดัดแปลง ที่ประกอบด้วย BA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร NAA 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ซีโฟแทคซิม 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซิน 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ 56

(ก) ต้นยาสูบที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน (ต้นควบคุม)

(ข) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน แสดงต้นที่มีสีเขียว

(ค) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน แสดงต้นที่มีสีเขียวปนแดง

(ง) ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน แสดงต้นที่มีสีแดง

ภาพที่ 35 ลักษณะของต้นยาสูบที่ผ่านการถ่ายยีนด้วยอะโกรแบคทีเรียมที่มีพลาสมิด pPAP1 แต่ต้นไม่สมบูรณ์ เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในขวดที่มีอาหารคัดเลือกสูตร MS ดัดแปลง ที่ประกอบด้วย ซีโฟแทคซิม 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และไฮโกรมัยซิน 30 มิลลิกรัมต่อลิตร 57

(ก) ต้นยาสูบที่ไม่ผ่านการถ่ายยีน (ต้นควบคุม) เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 เดือน

(ข) ต้นยาสูบสีเขียวที่ได้รับการถ่ายยีน แสดงต้นที่ปกติ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

(ค) ต้นยาสูบสีแดงที่ได้รับการถ่ายยีน แสดงต้นที่ผิดปกติ เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์

(ง) ต้นยาสูบสีแดงที่ได้รับการถ่ายยีนและพัฒนาเป็นต้นสีเขียว เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 10 – 12 สัปดาห์ แสดงต้นที่ปกติ

ภาพที่ 36 การเกิดต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *pap1* แสดงการเกิดต้นสีเขียว ต้นสีเขียวปนแดง และต้นสีแดง จากการถ่ายยีน 5 ครั้ง 58

ภาพที่ 37 ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ/ *Eco*RI + *Hin*dIII ช่อง C คือ ต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ช่องที่ 1 - 5 คือ ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน ต้น 7.1.11, 7.1.14, 7.2.9, 7.1.3 และ 7.4.5 ตามลำดับ 59

ภาพที่ 38 ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder ช่อง P คือ พลาสมิด pPAP1 (Positive control) ช่อง N คือต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (Negative control) ช่องที่ 1-5 คือ ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน *pap1* ต้นที่ 7.1.11, 7.1.14, 7.2.9, 7.1.3 และ 7.4.5ตามลำดับ และช่อง H คือ น้ำกลั่น 59