

สัญญาเลขที่ MRG5380194

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาการแสดงออกและผลการเปลี่ยนแปลงของยีน
Agamous ในสบู่ดำ

คณะผู้วิจัย

สมพิศ สามิภักดิ์

สังกัด

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

บทคัดย่อ

สบู่ดำเป็นพืชที่สามารถทำการสร้างน้ำมันในเมล็ดและนำมาใช้น้ำมันจากฟอสซิลได้ แต่พืชชนิดนี้ไม่ได้รับความนิยมในการนำมาเป็นพืชน้ำมันเพราะปริมาณผลผลิตที่น้อย ทำให้ไม่คุ้มทุน อันเนื่องมาจากจำนวนดอกตัวเมียที่น้อยกว่าดอกตัวผู้ ในงานวิจัยนี้ผู้ทดลองได้มุ่งเน้นในการสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรมให้มีการแสดงออกของยีน *Agamous* ที่มากขึ้น ยีนนี้เป็นยีนที่ควบคุมการสร้างดอกตัวเมีย โดยลำดับเบสของยีนนี้ได้มีการศึกษาไว้แล้วในห้องปฏิบัติการ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบลำดับโปรตีนพบว่ามีความใกล้เคียงกับโปรตีนนี้ในต้นโกโก้มากที่สุด ในด้านการแสดงออกของยีนในสบู่ดำและพบการแสดงออกสูงในดอกตูม รังไข่ และอับละอองเกสร ในขณะที่มีการแสดงออกต่ำในใบและยอดอ่อน และในการทดลองนี้จะทำการสร้างโครงสร้างดีเอ็นเอที่มี cDNA ของยีน *Agamous* อยู่ภายใต้การควบคุมของ 35S promoter และเมื่อได้โครงสร้างดีเอ็นเอแล้วจะทำการถ่ายฝากเข้าไปในเนื้อเยื่อสบู่ดำด้วย *Agrobacterium tumefaciens* และจากการทดลองได้ทำการถ่ายฝากเข้าไปและได้ transgenic shoots แต่ไม่สามารถสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรมได้เพราะเมื่อย้ายลงในอาหารชักนำรากปรากฏว่าต้นพืชเริ่มเหี่ยวและเน่าตายในที่สุด

คำหลัก : สบู่ดำ *Agamous* ผลผลิต

Abstract

Jatropha curcas is a biofuel plant with good quality oil but has not been grown commercially due to its main limitation of low yield. *J. curcas* oil is squeezed out directly from seed bearing fruit developing on female flowers that are typically outnumbered by male flowers. The AGAMOUS is a floral organ identity gene in C class of ABC model which specifies stamen and carpel development. In this study, the protein sequence of *Jatropha curcas* AGAMOUS (*JcAG*) was found to be closely similar to the sequence in *Theobroma cacao*. Expression study revealed high expression levels in floral bud, ovary and stamen; and low expression levels in young leaf and shoot. To alter the expression of this gene, full cDNA was first cloned into pENTR-D TOPO® and then the gene was transferred into an over-expression vector pH2GW7 using LP clonase enzyme to obtain pHAgJC. This pHAgJC was transformed into *Agrobacterium tumefaciens* by using freeze-thaw method and then the T-DNA containing full *JcAG* sequence was transferred into *J. curcas* newly emerged leaf tissue by *Agrobacterium* co-cultivation. Transgenic shoots were obtained however, after no root was obtained. Thus from this research, AG overexpression in *Jatropha* plants was not successful.

Keyword : *Jatropha curcas*, *Agamous*, Yield

Executive summary

ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน Agamous ในสับูด้าโดยแสดงให้เห่นถึงความสำคัญของยีนนี้ในการควบคุมเพศของดอก โดยพบการแสดงออกในปริมาณสูงในดอกตูม ในเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย ในขณะเดียวกัน พบการแสดงออกในปริมาณต่ำในใบ และในยอดอ่อนและเมื่อนำลำดับโปรตีนมาเปรียบเทียบกัน พบว่า AG โปรตีนของสับูด้ามีความใกล้เคียงกับโปรตีนนี้ในต้นโกโก้ และต้น Populus และต้นมะเขือเทศตามลำดับมากที่สุด

นอกจากนี้ได้ทำโครงสร้างดีเอ็นเอเพื่อเพิ่มปริมาณการแสดงออกของยีนนี้ในสับูด้า ได้ทำการถ่ายฝากเข้าไปใน Agrobacterium และได้ทำการถ่ายฝากเข้าไปในเนื้อเยื่อสับูด้า ทำให้ได้ยอดของต้น putative transgenic แต่ไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ ทำให้ไม่ได้ต้นที่จะนำมาศึกษาลักษณะของดอกและเพศของดอกได้ ในส่วนของการตีพิมพ์ ได้มีการตีพิมพ์ข้อมูลวิจัยบางส่วนใน proceeding ดังที่เขียนรายละเอียดไว้ในภาคผนวก

สารบัญ

หัวข้อ	เลขหน้า
ความสัมพันธ์ของยีน Agamous ในสับูดำกับพืชอื่น	5
การแสดงออกของยีน Agamous ในสับูดำ	6
การโคลนยีน <i>Agamous</i> ในสับูดำ	6
การสร้าง AG overexpression vector	9
การถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดยใช้ <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	19
สรุปงานวิจัย	23
ภาคผนวก	23

ขั้นตอนงานวิจัยและผล

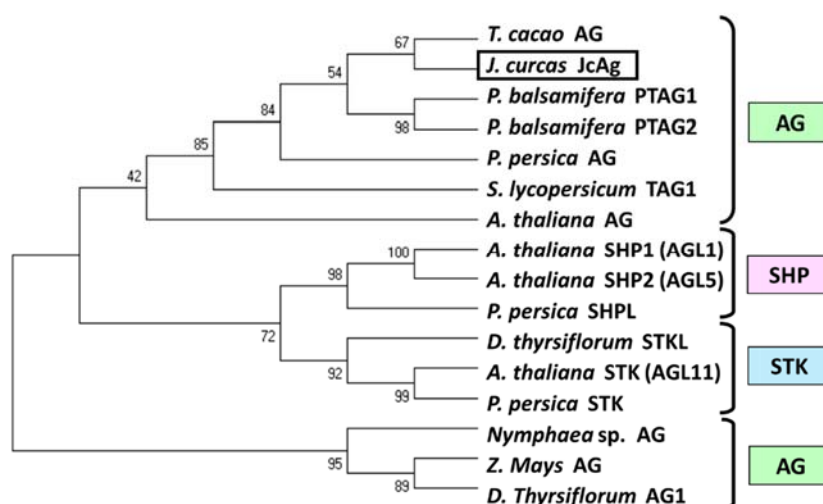
ความสัมพันธ์ของยีน Agamous ในสับดูดากับพืชอื่น

ข้อมูลลำดับเบสของยีน Agamous ได้ทำการศึกษาในห้องปฏิบัติการและตีพิมพ์ไว้แล้ว (Samipak and Borivetanan, 2011) ในที่นี้ได้ทำการเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างกรดอะมิโนกับยีนที่มีรายงานในพืชชนิดอื่นโดยค้นหาจากฐานข้อมูล GenBank และนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของโปรตีนโดยการสร้าง phylogenetic tree ของโปรตีน AGAMOUS ที่แปลรหัสจากยีนในต้นสับดูดากับพืชอื่นๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูลของ GenBank ได้แก่ ยีน SHATTERPROOF (SHP) 1 and 2 และยีน SEEDSTICK (STK) จาก *Arabidopsis thaliana* ดังตารางด้านล่าง

Organism	Name
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AG, SHP1 (AGL1), SHP2 (AGL5), STK (AGL11)
<i>Dendrobium thyrsiflorum</i>	AG1, SEEDSTICK-like protein (STKL)
<i>Nymphaea sp.</i>	AG
<i>Populus balsamifera subsp. trichocarpa</i>	PTAG1, PTAG2
<i>Prunus persica</i>	AG, SEEDSTICK-like protein (STKL), SHATTERPROOF-like protein (SHPL)
<i>Solanum lycopersicum</i>	TAG1
<i>Theobroma cacao</i>	AG
<i>Zea mays</i>	AG

ตารางที่ 1 แสดงชื่อยีนที่นำมาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ด้วยโปรแกรม MEGA 4 โดยใช้วิธี Neighbor-joining และวิเคราะห์ทั้งหมด 5,000 ซ้ำ



รูปที่ 1 ผลการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ของยีน AGAMOUS

ผลการเปรียบเทียบ พบว่า Agamous โปรตีนมีความใกล้เคียงมากที่สุดกับโปรตีนในต้นโกโก้ *T. cacao* ต้น *Populus* และต้นมะเขือเทศ *S. lycopersicum*

การแสดงออกของยีน *Agamous* ในสับูด้า

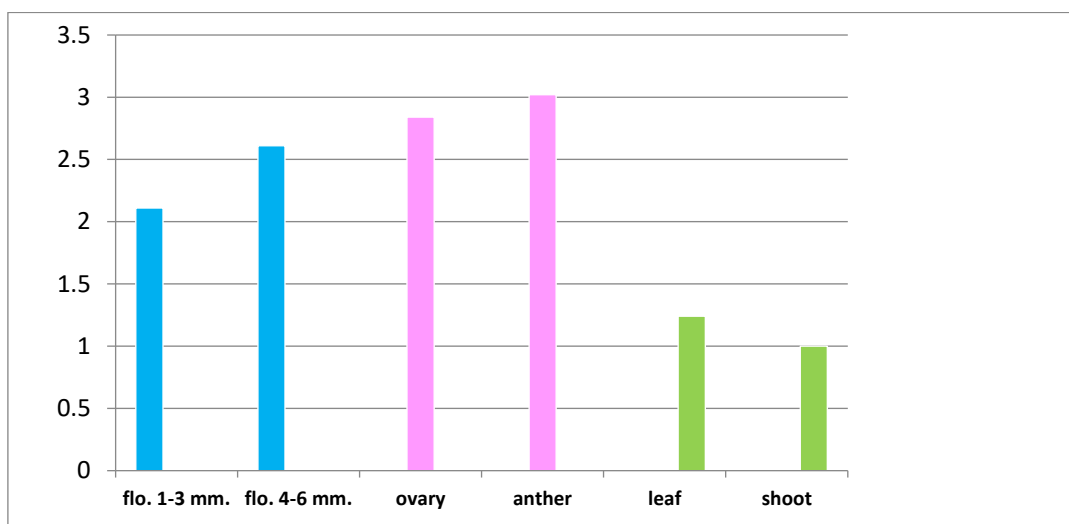
เนื่องจากได้มีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *AGAMOUS* ในสับูด้าไว้เรียบร้อยแล้ว ดังนั้นจึงใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว ในการออกแบบ primer เพื่อให้ได้ primer ที่มีความจำเพาะต่อยีน *AGAMOUS*

โดย primer ที่ใช้สำหรับยีน *AGAMOUS* คือ

- nJcAgF : 5'- AAT CTC TCG GAG GCA TTA AT -3'
- Ag2F : 5'- GAT CTC TGC AAA CAA CAG CTC A -3'
- สำหรับ Reference ยีนซึ่งได้แก่ ACTIN
- JcActinF : 5'- GGT AAC ATT GTG CTC AGT GGT GG -3'
- JcActinR : 5'- AAC CAC CTT AAT CTT CAT ACT GC -3'

โดยทำ quantitative realtime PCR โดยใช้ Quantimix Easy SYG Kit (Biotools, Spain)

โดยได้ทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนนี้ในเนื้อเยื่อของสับูด้าได้แก่ ดอกตูม 1-3 mm, ดอกตูม 4-6 mm, ดอกบาน, รังไข่, อับละอองเกสร, ใบอ่อน และยอดอ่อน ได้ผลดังภาพด้านล่าง



รูปที่ 2 การแสดงออกของยีน *AGAMOUS* ในส่วนต่าง ๆ ของสับูด้า

พบการแสดงออกของยีนสับูด้าเป็นระดับสูงในดอกตูม รังไข่และอับละอองเกสร แต่พบในปริมาณน้อยในใบและยอดอ่อน แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของยีนนี้ในการควบคุมเพศของสับูด้า

การโคลนยีน *Agamous* ในสับูด้า

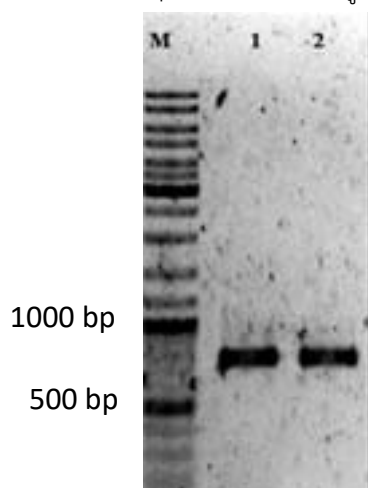
จากข้อมูลลำดับเบสของยีน *Agamous* (AG) ที่ได้ค้นหาไว้ในห้องปฏิบัติการ ได้ออกแบบไพรเมอร์จำนวน 3 ไพรเมอร์ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ในส่วนที่เป็นยีนที่ต้องการเริ่มจาก start codon ถึง stop codon ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการโคลนยีน AG

Primer	Sequence Name	Sequence (5' → 3')
Forward No.1	Ag-JCg	CAC CGC CGC CTA TGG CAT ACC CCA GCG ATT

Forward No. 2	Ag-JCa	CAC CGC CAC CTA TGG CAT ACC CCA GCG ATT
Reverse	Ag-JC	CGC GCA GCA TTA AAC TAA CTG GAG GGC CAT

และได้ทำ PCR โดยใช้ primers ที่ออกแบบไว้ในตาราง กับ DNA จากใบอ่อนสับดำ พบว่าได้ชิ้นส่วนของ DNA ที่มีขนาดประมาณ 700 bp ตามที่คาดหวังดังรูปที่ 1



PCR Product No.	Primer
1	Forward No.1 + Reverse No.3
2	Forward No.2 + Reverse

รูปที่ 3 ผลการทำ PCR

Lane M คือ DNA ladder mix

Lane 2 คือ PCR product No.1

Lane 3 คือ PCR product No.2

ไพรเมอร์ที่ออกแบบมามีคุณภาพดี เพราะเพิ่มชิ้นยีนที่ต้องการได้

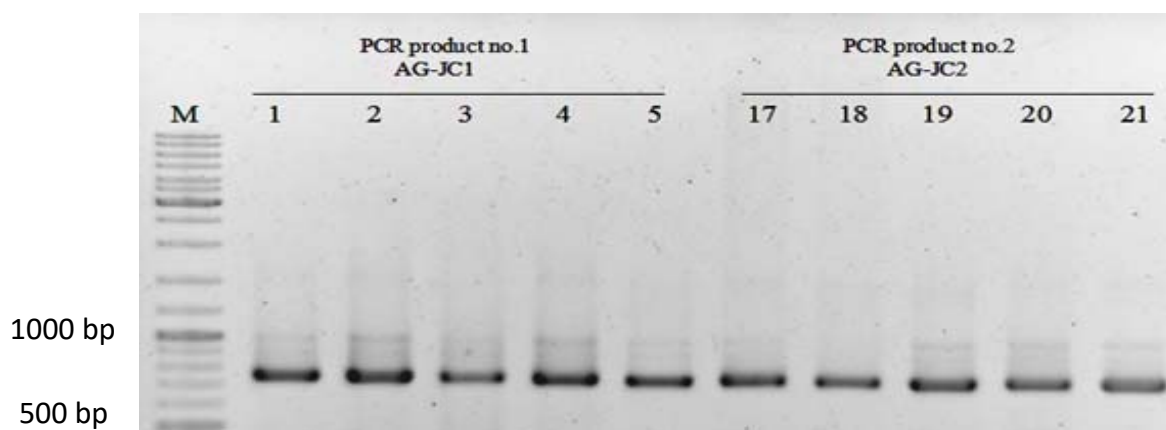
จากนั้นจึงทำ PCR เพื่อเตรียมยีนสำหรับต่อเข้ากับเวกเตอร์คือ pGEM-Teasy

โดยนำ PCR product ที่ได้จาก 2 ปฏิกริยาทั้งสองด้านบนมาต่อกับ pGEM-Teasy โดยใช้ชุด Kit เติมสารดังนี้

2X Rapid ligation	2.5	μl
pGEM-Teasy	0.5	μl
T4 DNA ligase	0.5	μl
PCR product	1.5	μl

ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เกิดการ ligation 3 ชั่วโมง จากนั้น transform เข้าไปใน competent cell ของ *Escherichia coli* strain DH5 alpha โดยวิธี heat shock ทำการเกลี่ยบนอาหารแข็ง LA ที่เติม Ampicilin ที่ได้มีการเกลี่ย IPTG และ X-Gal บนอาหารแข็งเพื่อคัดเลือกเฉพาะโคโลนีที่มีสีขาวซึ่งแสดงการแทรกเข้าไปของชิ้นดีเอ็นเอ

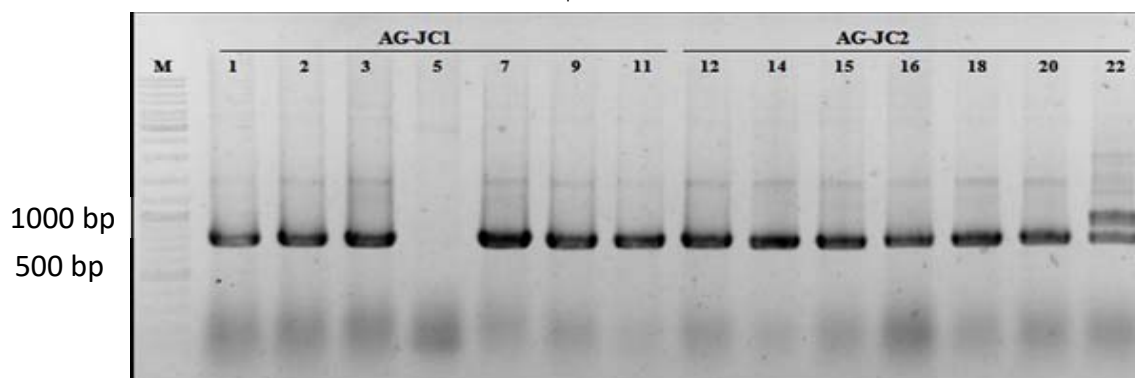
เลือกโคโลนีสีขาว และทำเป็น Master plate no.1 เก็บไว้ โดยโคลนที่ 1-16 เป็นโคโลนีที่ได้จาก PCR product no.1 และโคลนที่ 17-32 เป็นโคโลนีที่ได้จาก PCR product no.2 จากนั้นเลือกมา ทำ PCR เพื่อตรวจดูว่าแต่ละโคโลนี มีชิ้นยีนหรือไม่ พบว่าได้ชิ้นส่วนของ DNA ที่มีขนาดประมาณ 700 bp ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 ผลการทำ PCR M คือ DNA ladder mix ตัวเลขด้านบนคือหมายเลขโคโลนีที่ทำการตรวจสอบ

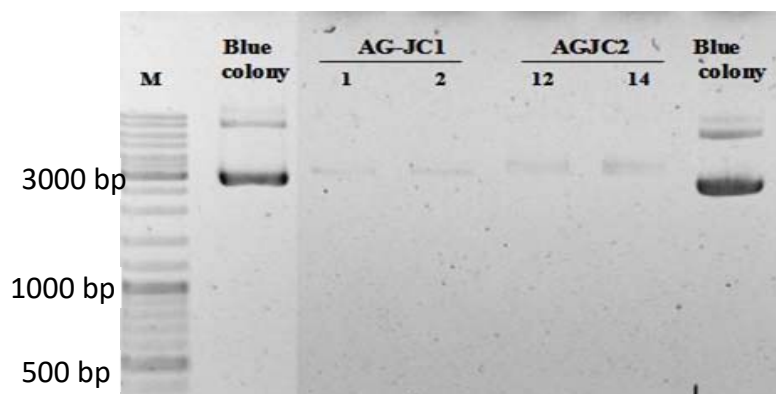
เจียเชื้อจากโคโลนีที่ได้รับมาเลี้ยงใน LB ทำการบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง แล้วสกัดพลาสมิดจากโดยใช้ชุด Kit ของ Axygen พบว่าในโคโลนีที่เลือกไปไม่มีชิ้นยีนที่ต้อง

จึงได้ทำ ligation ครั้งที่สองและถ่ายฝากเข้าไปใน competent cell ของ *E.coli* strain DH5 alpha ทำการเลี้ยงบนอาหารแข็ง LA และมีการคัดเลือกเฉพาะโคโลนีที่มีสีขาวเพื่อนำมาทดสอบด้วยการทำ PCR เช่นเดิมเพื่อดูว่าแต่ละโคโลนีมีชิ้นยีนหรือไม่ โดยใช้ Primer no. 1, Primer no. 2 และ no. 3 (Reverse primer) ได้ผลดังภาพที่ 5



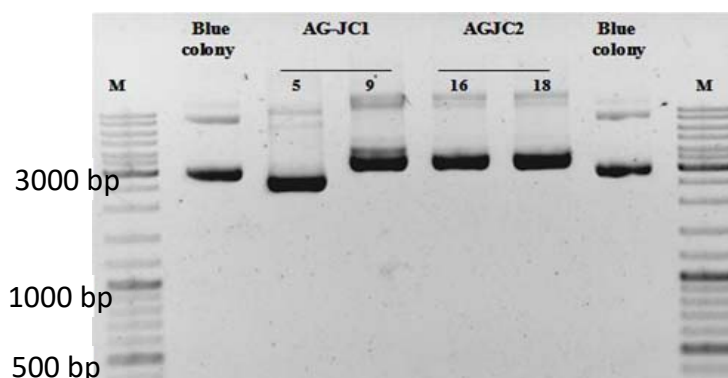
รูปที่ 5 ผลการทำ PCR Lane 1 คือ (M) DNA ladder mix และเลขด้านบนคือ colony number ที่ได้รับ PCR product no.1 (AG-JC1) หรือ no. 2 (AG-JC2)

เลือกโคโลนี 1, 2, 12 และ 14 ไปเลี้ยงบนอาหาร LB ที่มีการเติม Ampicilin ทำการบ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง แล้วทำการสกัดพลาสมิด โดยใช้ชุด Kit ของ Axygen พบว่าในโคโลนีที่เลือกไปมีชิ้นยีนที่ต้องการ (จะได้ขนาดพลาสมิดประมาณ 3000 bp) ดังภาพที่ 6



รูปที่ 6 พลาสมิดที่สกัดได้ Lane 1 คือ (M) DNA ladder mix พลาสมิดจากโคลนที่ 1, 2, 12, 14 Blue colony มีไว้เพื่อเปรียบเทียบ

จากการสกัดด้านบนได้ปริมาณพลาสมิดน้อย จึงทำการเลือกโคลนไปเลี้ยงบนอาหารเหลวแล้วสกัดพลาสมิดเพิ่มเติมโดยใช้ชุด Kit ของ Axygen และได้ผลดังภาพที่ 7



รูปที่ 7 พลาสมิดที่สกัดได้ Lane 1 คือ (M) DNA ladder mix พลาสมิดจากโคลนที่ 5, 9, 16, 18 Blue colony มีไว้เพื่อเปรียบเทียบ

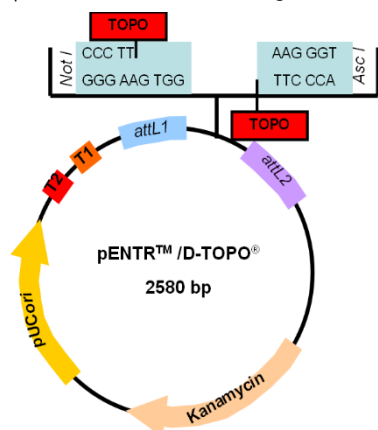
เพื่อเลือกชิ้นพลาสมิดที่มียีน AG ที่มีลำดับเบสถูกต้อง ได้ทำการส่งพลาสมิดจากโคลนที่ 9 และ 18 และส่งไปทำ sequencing และเมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีน AG ในสมุดดำ พบว่ายังมีบางเบสที่เปลี่ยนไป และได้ทำการส่งพลาสมิดไปหาลำดับเบสอีกจนพบโคลนที่ 15 มีลำดับเบสถูกต้อง เรียกพลาสมิดนี้ว่า pAgJC 2.15 ที่มียีน AG อยู่ใน pGEM T-easy

การสร้าง AG overexpression vector

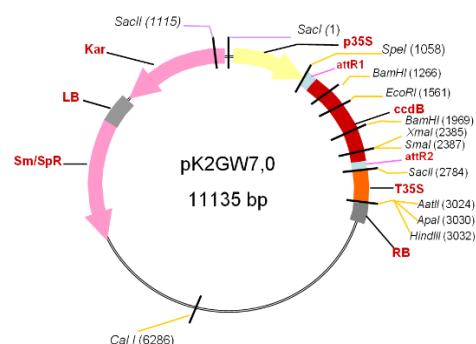
มีสองขั้นตอน ได้แก่

1. ย้ายชิ้นยีน AG จาก pGEM T-easy เข้าไปในพลาสมิด pENTR-DTOPO® ที่มีส่วนของ *attL1* และ *attL2* อยู่
2. ทำการถ่ายฝากชิ้นยีน AG จากข้อที่ 1 เข้าสู่ Destination vector คือ pK2GW7 ด้วย LR clonase เพื่อใช้สร้าง overexpression vector (pK2GW7)

Donor vector (pENTR-DTOPO® -Invitrogen)



Destination vector



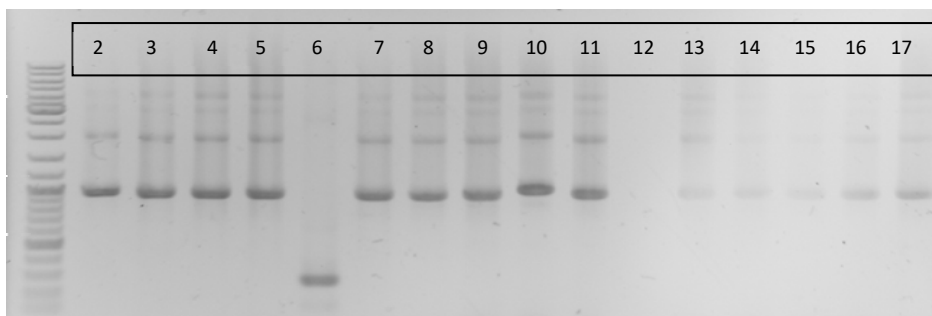
รูปที่ 8 แสดงแผนที่และองค์ประกอบสำคัญของพลาสมิดที่ใช้

ขั้นที่ 1. การย้ายยีน AG เข้าไปใน pENTR-DTOPO®

เริ่มจากการทำ PCR ใช้ reverse primer (5' CGC GCA GCA TTA AAC TAA CTG GAG GGC CAT 3') และ primer no. 2 (5' CAC CGC CAC CTA TGG CAT ACC CCA GCG ATT 3') และใช้ pAgJC 2.15 (pGEM-Teasy) เป็น PCR โดยต่อเข้ากับ pENTR-DTOPO® โดยใช้ pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kit (Invitrogen) ทำการเติมสารดังนี้

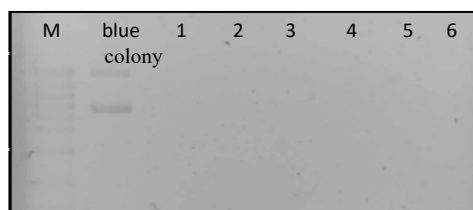
1. Salt solution	1	μl
2. Dilute salt solution	0.5	μl
3. Sterile water (add to final)	1	μl
4. Fresh PCR product pAgJC 2.15	1	μl
5. TOPO®vector	0.5	μl

ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เกิดการ ligation 10-15 นาที ถ่ายยีนลงใน one shot competent ปริมาตร 25 μl และแช่น้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการ heat shock ที่อุณหภูมิ 42°C นาน 30 วินาที และตามด้วยแช่น้ำแข็งทันที 2 นาที เติมหอาหารเหลว S.O.C. ปริมาตร 145 μl ทำการบ่มและเขย่านาน 1.30 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนแล้วจึงนำมา spread บนอาหารแข็ง LA (LB (1% w/v tryptone, 1% w/v yeast extract, 0.5% w/v NaCl และ วุ้น 1.5% w/v) ที่เติม Kanamycin บ่มที่ 37 °C นาน 16-17 ชั่วโมง คัดเลือกเฉพาะโคโลนีที่มีสีขาวมาทำ PCR เพื่อตรวจสอบการเข้าไปของยีนโดยใช้ Primer M13F และ M13R พบขึ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1000 bp ตามที่ต้องการ ดังรูปที่ 9



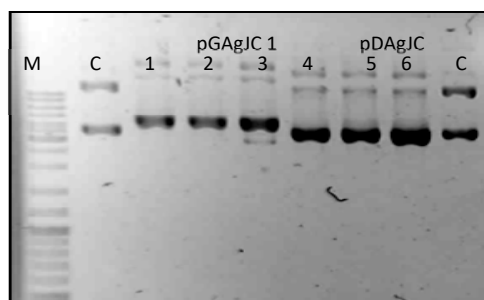
รูปที่ 9 ผลการทำ PCR ด้วยไพรเมอร์ M13F และ M13R, Lane M คือ DNA ladder mix, ตัวเลขแสดงโคโลนี number

ได้ทำการเลือก โคโลนีที่ 2, 4, 33 จาก plate pDAgJC 2.15 และเลี้ยงใน LB ที่ผสม Kanamycin และโคโลนีที่ 30, 31, 33 จาก plate pGAgJC 1 เลี้ยงใน LB ที่ผสม Ampicilin บ่มที่ 37 °C นาน 16-17 ชั่วโมง สกัด พลาสมิดจากเชื้อด้วยชุด Axygen kit แล้วตรวจสอบขนาด ขึ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วย Gel electrophoresis ได้ผลคือไม่พบ ขึ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ ดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 ผลการสกัดพลาสมิด เพื่อตรวจการเข้าไปของชิ้นยีน AG, Marker และ blue colony เป็นตัวเปรียบเทียบขนาด

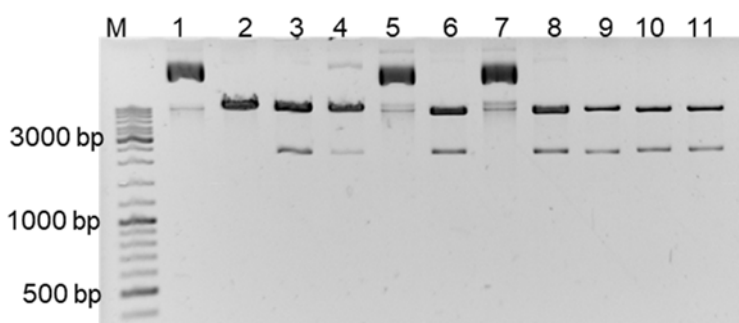
ทำการเลี้ยงโคโลนีเพิ่มเติม และทำการสกัดพลาสมิด และตรวจดูด้วย gel electrophoresis และพบพลาสมิดในขนาดที่ต้องการ (ประมาณ 3000 bp) ดังรูปที่ 11



รูปที่ 11 M คือ DNA ladder และ C คือ พลาสมิดจาก blue colony เพื่อเปรียบเทียบ ตัวเลขคือ colony number

จากรูปพบว่าได้โคโลนีที่มีชิ้นยีน AG เข้าไปใน pENTR-DTOPO® เรียบร้อยแล้ว และได้ทำการส่งพลาสมิดเพื่อไปหาลำดับเบสและได้พบลำดับเบสที่ถูกต้อง จึงพร้อมนำไปย้ายสู่ destination vector, pK2GW7

ขั้นที่ 2. การย้ายชิ้นยีน AG เข้าสู่ Destination vector คือ pK2GW7 ด้วย LR clonase

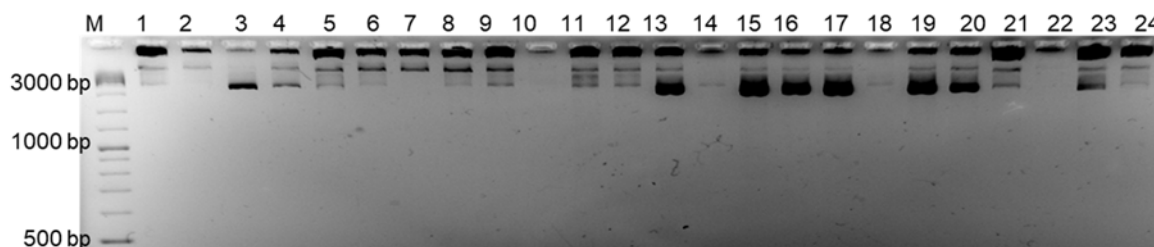


รูปที่ 14 ผลการตัดพลาสมิดตัวอย่างด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

M คือ Ladder, เลข 1 คือ pK2GW7, เลข 2 คือ pK2GW7 ตัดด้วย *EcoRI*, เลข 3 คือ pK2GW7 ตัดด้วย *EcoRI*+*HindIII*, เลข 4 คือ pK2GW7 ตัดด้วย *HindIII*, เลข 5 คือ pKAgJC2.15.2.2, เลข 6 คือ pKAgJC2.15.2.2 ตัดด้วย *EcoRI*+*HindIII*, เลข 7 คือ pKAgJC2.15.2.8, เลข 8 คือ pKAgJC2.15.2.8 ตัดด้วย *EcoRI*+*HindIII*, เลข 9 คือ pK2GW7 ตัดด้วย *EcoRI*+*HindIII*, เลข 10 คือ pKAgJC2.15.2.2 ตัดด้วย *EcoRI*+*HindIII*, เลข 11 คือ pKAgJC2.15.2.8 ตัดด้วย *EcoRI*+*HindIII*

จากผลในรูปที่ 11 พบว่าไม่ได้แถบ DNA ที่คาดหวัง เพราะจากข้อมูลของเวกเตอร์ หากตัด empty vector pK2GW7 ด้วย *EcoRI* และ *HindIII* ควรได้ชิ้น DNA ขนาด 1516 bp และขนาด 9619 bp และในกรณีของเวกเตอร์ที่มีชิ้นยีน AG ถ้าตัดด้วย *EcoRI* และ *HindIII* ควรได้ชิ้น DNA ขนาดประมาณ 520 bp และขนาด 9615 bp เพราะชิ้นยีน AG จะเข้าไปแทนที่บริเวณยีน *ccdB* ในเวกเตอร์และ เมื่อลองตัดโคลนอื่นๆ ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *HindIII* ก็ได้ผลคล้ายกันและไม่ตรงตามที่คาดหวัง

นอกจากนี้ได้ทำการทดลองตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดอื่นคือใช้เอนไซม์ *Clal* และ *Clal* ตัดร่วมกับ *HindIII* ผลแสดงดังรูปที่ 15

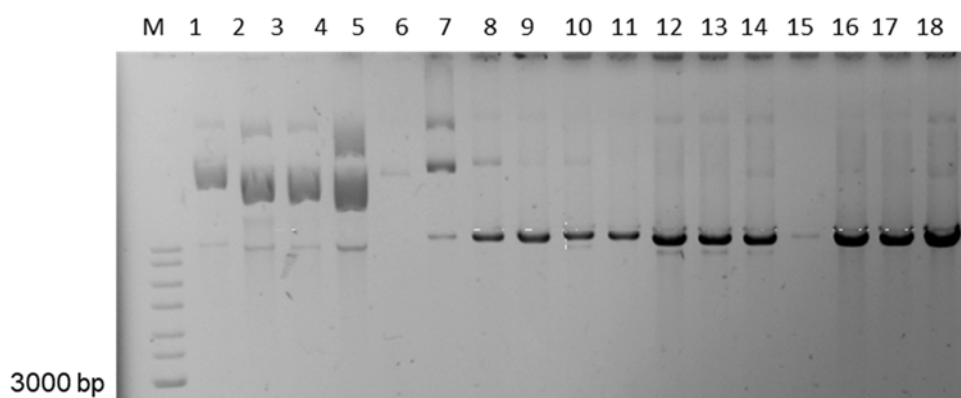


รูปที่ 15 เจลแสดงผลการตัดพลาสมิดด้วย ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะข้ามคีนดังนี้ (M คือ Ladder)

เลข 1 คือ pK2GW7	เลข 13 คือ pKAgJC2.15.2.10 ตัดด้วย <i>HindIII</i>
เลข 2 คือ pK2GW7 ตัดด้วย <i>Clal</i>	เลข 14 คือ pKAgJC2.15.2.32 ตัดด้วย <i>HindIII</i>
เลข 3 คือ pK2GW7 ตัดด้วย <i>HindIII</i>	เลข 15 คือ pKAgJC1.31.6.5 ตัดด้วย <i>HindIII</i>
เลข 4 คือ pK2GW7 ตัดด้วย <i>Clal</i> และ <i>HindIII</i>	เลข 16 คือ pKAgJC1.31.6.8 ตัดด้วย <i>HindIII</i>
เลข 5 คือ pH2GW7	เลข 17 คือ pKAgJC2.15.2.10 ตัดด้วย <i>Clal</i> และ <i>HindIII</i>
เลข 6 คือ pH2GW7 ตัดด้วย <i>Clal</i>	เลข 18 คือ pKAgJC2.15.2.32 ตัดด้วย <i>Clal</i> และ <i>HindIII</i>
เลข 7 คือ pH2GW7 ตัดด้วย <i>HindIII</i>	เลข 19 คือ pKAgJC1.31.6.5 ตัดด้วย <i>Clal</i> และ <i>HindIII</i>
เลข 8 คือ pH2GW7 ตัดด้วย <i>Clal</i> และ <i>HindIII</i>	เลข 20 คือ pKAgJC1.31.6.8 ตัดด้วย <i>Clal</i> และ <i>HindIII</i>
เลข 9 คือ pKAgJC2.15.2.10 ตัดด้วย <i>Clal</i>	เลข 21 คือ pKAgJC2.15.2.10
เลข 10 คือ pKAgJC2.15.2.32 ตัดด้วย <i>Clal</i>	เลข 22 คือ pKAgJC2.15.2.32
เลข 11 คือ pKAgJC1.31.6.5 ตัดด้วย <i>Clal</i>	เลข 23 คือ pKAgJC1.31.6.5
เลข 12 คือ pKAgJC1.31.6.8 ตัดด้วย <i>Clal</i>	เลข 24 คือ pKAgJC1.31.6.8

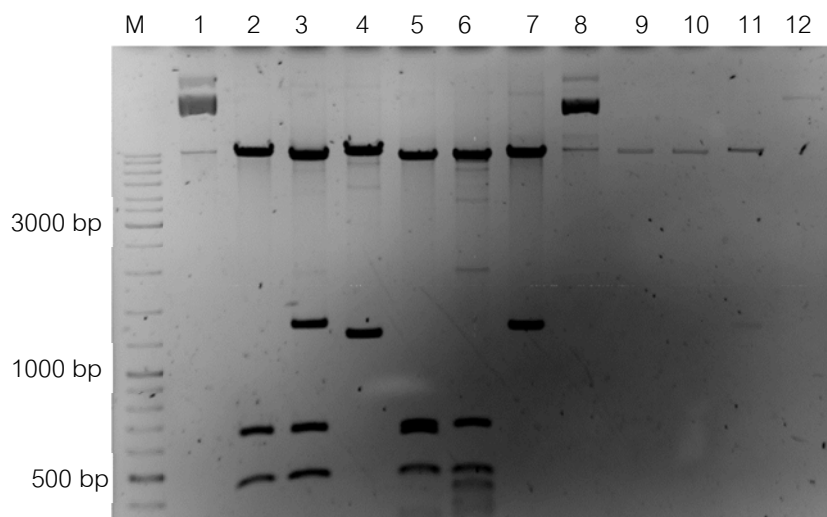
จากรูปที่ 15 พบว่าไม่มีชิ้นของแถบ DNA ที่ต้องการ เพราะในกรณีของ empty vector pK2GW7 ถ้าตัดด้วย *Clal* และ *HindIII* ควรได้ชิ้น DNA ขนาด 3245 bp และขนาด 7890 bp และกรณีของเวกเตอร์ที่มีชิ้นยีนเข้าไปแทนที่บริเวณยีน *ccdB* ในเวกเตอร์ ถ้าตัดด้วย *Clal* และ *HindIII* ควรได้ชิ้น DNA ขนาดประมาณ 3245 bp และขนาด 6890 bp แต่ผลที่ได้พบชิ้น DNA ขนาด 2500 bp และชิ้นขนาดใหญ่ที่ไม่ทราบขนาดแน่ชัด เพราะแถบ DNA แยกไม่ชัดเจนแทน

จากนั้นตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดอื่นคือ *SacI* โดยตัด *SacI* ตัดร่วมกับ *HindIII* และ *SacI* ตัดร่วมกับ *EcoRI* นอกจากนี้ยังตัดด้วย *SacII* โดยใช้ *SacII* ตัดร่วมกับ *EcoRI* และ *SpeI* ตัดร่วมกับ *EcoRI* ผลคือไม่พบชิ้น DNA ที่ต้องการ ดังแสดงในรูปที่ 13 และ 14 เพราะในกรณีของ empty vector pK2GW7 ถ้าตัดด้วย *SacI* และ *HindIII* ควรได้ชิ้น DNA ขนาด 3032 bp และขนาด 8103 bp ถ้า *SacI* ตัดร่วมกับ *EcoRI* ควรได้ชิ้น DNA ขนาด 1561 bp และขนาด 9574 bp ส่วนตัดด้วย *SacII* ควรได้ชิ้น DNA ขนาด 3899 bp และขนาด 7236 bp หรือ *SacII* ตัดร่วมกับ *EcoRI* ควรได้ชิ้น DNA ขนาด 1223 bp, 2676 bp และขนาด 8459 bp และ *SpeI* ตัดร่วมกับ *EcoRI* ควรได้ชิ้น DNA ขนาด 503 bp และขนาด 10632 bp และในกรณีของเวกเตอร์ที่มีชิ้นยีน *AG* เข้าไปจะมีขนาดเล็กลงจากเดิม ถ้าตัด *SacI* และ *HindIII* ควรได้ชิ้น DNA ขนาด 2032 bp และขนาด 8003 bp ถ้า *SacI* ตัดร่วมกับ *EcoRI* ควรได้ชิ้น DNA ขนาด 1401 bp และขนาด 8735 bp ส่วนตัดด้วย *SacII* ควรได้ชิ้น DNA ขนาด 2899 bp และขนาด 7236 bp หรือ *SacII* ตัดร่วมกับ *EcoRI* ควรได้ชิ้น DNA ขนาด 250 bp, 300 bp, 1200 bp และขนาด 8400 bp และ *SpeI* ตัดร่วมกับ *EcoRI* ควรได้ชิ้น DNA ขนาด 400 bp และขนาด 9632 bp



รูปที่ 16 : เจลแสดงผลการตัดพลาสมิดด้วย ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ดังนี้ (M คือ Ladder)

- | | |
|---|---|
| เลข 1 คือ pK2GW7 | เลข10 คือ pK2GW7 ตัดด้วย <i>SacI</i> และ <i>HindIII</i> |
| เลข 2 คือ pKAgJC1.31.6.5 | เลข 11 คือ pKAgJC1.31.6.5 ตัดด้วย <i>SacI</i> และ <i>EcoRI</i> |
| เลข 3 คือ pKAgJC1.31.6.8 | เลข 12 คือ pKAgJC1.31.6.8 ตัดด้วย <i>SacI</i> และ <i>EcoRI</i> |
| เลข 4 คือ pKAgJC2.15.2.10 | เลข 13 คือ pKAgJC2.15.2.10 ตัดด้วย <i>SacI</i> และ <i>EcoRI</i> |
| เลข 5 คือ pKAgJC2.15.2.32 | เลข 14 คือ pKAgJC2.15.2.32 ตัดด้วย <i>SacI</i> และ <i>EcoRI</i> |
| เลข 6 คือ pK2GW7 ตัดด้วย <i>SacI</i> | เลข 15 คือ pKAgJC1.31.6.5 ตัดด้วย <i>SacI</i> และ <i>HindIII</i> |
| เลข 7 คือ pK2GW7 ตัดด้วย <i>EcoRI</i> | เลข 16 คือ pKAgJC1.31.6.8 ตัดด้วย <i>SacI</i> และ <i>HindIII</i> |
| เลข 8 คือ pK2GW7 ตัดด้วย <i>HindIII</i> | เลข 17 คือ pKAgJC2.15.2.10 ตัดด้วย <i>SacI</i> และ <i>HindIII</i> |
| เลข 9 คือ pK2GW7 ตัดด้วย <i>SacI</i> และ <i>EcoRI</i> | เลข 18 คือ pKAgJC2.15.2.32 ตัดด้วย <i>SacI</i> และ <i>HindIII</i> |



รูปที่ 17 : เจลแสดงผลการตัดพลาสมิดด้วย ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ(M คือ Ladder)

เลข 1 คือ pK2GW7

เลข 7 คือ pKAgJC1.31.6.6 ตัดด้วย *SpeI* และ *EcoRI*

เลข 2 คือ pK2GW7 ตัดด้วย *SacII*

เลข 8 คือ pKAgJC1.31.6.6

เลข 3 คือ pK2GW7 ตัดด้วย *SacII* และ *EcoRI*

เลข 9 คือ pKAgJC2.15.2.32 ตัดด้วย *SacII*

เลข 4 คือ pK2GW7 ตัดด้วย *SpeI* และ *EcoRI*

เลข 10 คือ pKAgJC2.15.2.32 ตัดด้วย *SacII* และ *EcoRI*

เลข 5 คือ pKAgJC1.31.6.6 ตัดด้วย *SacII*

เลข 11 คือ pKAgJC2.15.2.32 ตัดด้วย *SpeI* และ *EcoRI*

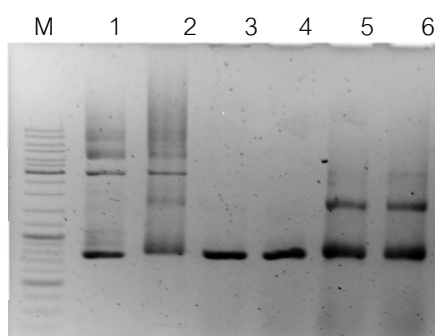
เลข 6 คือ pKAgJC1.31.6.6 ตัดด้วย *SacII* และ *EcoRI*

เลข 12 คือ pKAgJC2.15.2.32

จากผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ไม่พบชิ้น DNA ที่ต้องการ ดังนั้นมีความเป็นไปได้ว่า Destination vector ที่ได้รับจากอาจารย์ ศุภชัย วุฒิพงษ์ชัยกิจ นั้นไม่ใช่ pK2GW7 และนอกจากนี้จากผลการตัด ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะพบว่าขนาดของชิ้น DNA ที่ได้ไปตรงกับ Destination vector ตัวอื่นที่ไม่ถูกต้อง

ทำการสร้างโครงสร้างดีเอ็นเอใหม่ด้วย pH2GW7

ด้วยผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าพลาสมิดที่ได้รับมาและนำมาใช้ ไม่ถูกต้อง ผู้วิจัยจึงต้องทำการทดลองใหม่ด้วยการ recombination ระหว่าง pENTR-DTOPO®(Invitrogen) คือ pDAgJC 1.31.6 และ pDAgJC 2.15.2 กับ Destination vector ตัวใหม่ ได้แก่ pH2GW7 (overexpression vector – pH2GW7) โดยใช้ LR clonase เช่นเดิม เมื่อได้โคลนินของแบคทีเรียเจริญเติบโตบนจานที่มียาปฏิชีวนะที่มี Spectinomycin เข้มข้น 50 mg/ml เลือกโคลนินมาทำ PCR ที่ condition เดิมเพื่อดูว่าแต่ละโคลนินมียื่น AG หรือไม่ โดยใช้ colony ที่ได้จากการทำ recombination ของ pH2GW7 ไพรมเมอร์ที่ใช้ดังตารางที่ 2 และพบแถบ DNA ที่ต้องการ แสดงในรูปที่ 18



รูปที่ 18: แสดงผล colony PCR หลังจากทำ recombination

กับ pH2GW7 (M = Ladder)

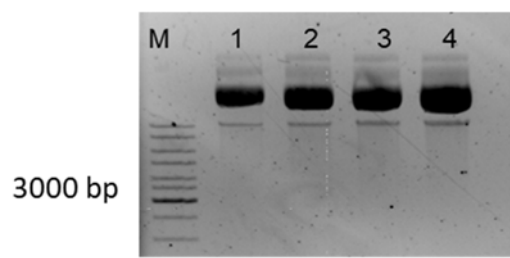
Lane 3 = pHAgJC 1.31.6.2

Lane 4 = pHAgJC 1.31.6.15

Lane 5 = pHAgJC 2.15.2.2

Lane 6 = pHAgJC 2.15.2.20

ได้ทำการสกัดพลาสมิดจาก pHAgJC 1.31.6.2, 1.31.6.15, 2.15.2.2 และ 2.15.2.20 ผลดังรูปที่ 19



รูปที่ 19 แสดงพลาสมิดที่สกัดได้จาก pHAgJC 1.31.6.2, 1.31.6.15, 2.15.2.2 และ 2.15.2.20 (M = Ladder)

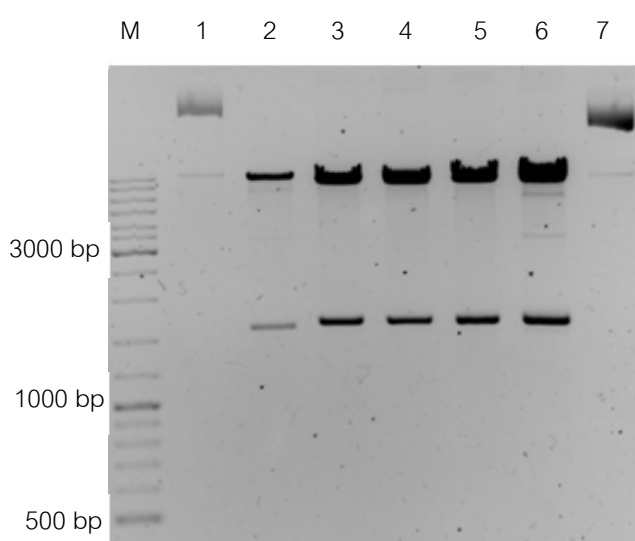
เลข 1 = pHAgJC 1.31.6.2

เลข 2 = pHAgJC 1.31.6.15

เลข 3 = pHAgJC 2.15.2.2

เลข 4 = pHAgJC 2.15.2.20

และเพื่อตรวจสอบการเข้าไปของยีน ได้ทำการทดสอบด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อดูขนาดของแถบ DNA ที่ได้ มีผลดังนี้



รูปที่ 20 เจลแสดงผล empty vector pH2GW7 ใช้เอนไซม์ *SacI* ตัดร่วมกับ *EcoRI* (M = Ladder)

เลข 1 = pH2GW7

เลข 2 = pH2GW7

เลข 3 = pHAgJC 1.31.6.2

เลข 4 = pHAgJC 1.31.6.15

เลข 5 = pHAgJC 2.15.2.2

เลข 6 = pHAgJC 2.15.2.20

เลข 7 = pHAgJC 1.31.6.15

จากรูปที่ 20 ในกรณีของ empty vector pH2GW7 ถ้าใช้เอนไซม์ *SacI* ตัดร่วมกับ *EcoRI* ควรได้ชิ้น DNA ขนาด 1561 bp และขนาด 9574 bp และในกรณีเมื่อมียีน AG แทรกในเวกเตอร์ เมื่อใช้เอนไซม์ทั้งสองนี้ตัดร่วมกันก็จะได้ชิ้น DNA ที่มีขนาดเท่ากับของเวกเตอร์เปล่า ดังนั้นทำให้ไม่สามารถทราบได้ว่าในเวกเตอร์ที่ผ่านการทำ LR clonase แล้วมีการแทรกของยีน AG เข้าไปใน Destination vector ดังกล่าวหรือไม่ (ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่าง Empty vector กับ vector ที่มียีน AG แทรกอยู่ได้) จึงได้ลองใช้เอนไซม์ตัวอื่น ได้แก่ *BamHI*, *HindIII*, *SpeI* และ double digestion ด้วย *HindIII* กับ *SpeI* ในการตรวจสอบ ว่า Destination vector ที่ใช้นั้นเป็น pH2GW7

รูปที่ 21 pH2GW7 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (M = Ladder)

เลข 1 = pH2GW7

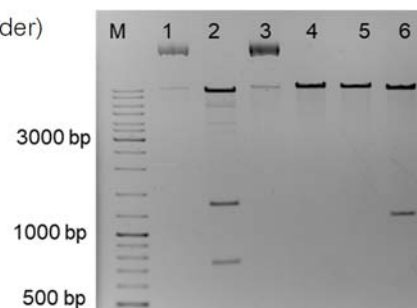
เลข 2 = pH2GW7 ตัดด้วย *BamHI*

เลข 3 = pH2GW7 ตัดด้วย *HindIII*

เลข 4 = pH2GW7 ตัดด้วย *SpeI*

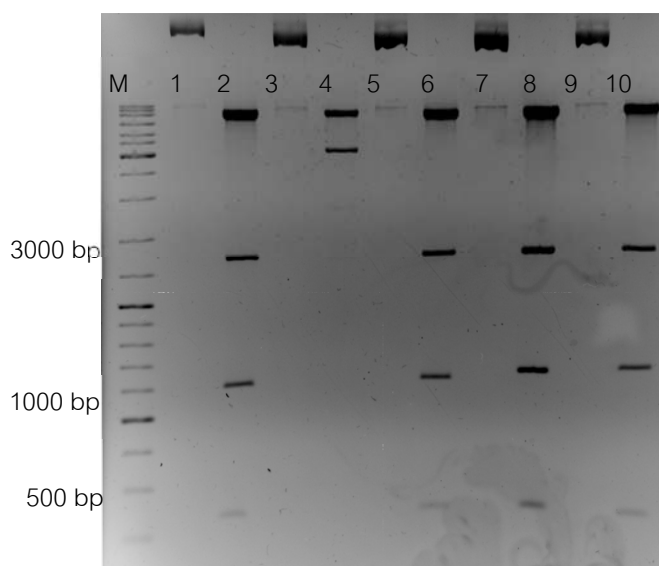
เลข 5 = pH2GW7 ตัดด้วย *HindIII* และ *SpeI*

เลข 6 = pH2GW7 ตัดด้วย *SacI* และ *SpeI*



จากรูปที่ 21 ในกรณีของ empty vector pH2GW7 ถ้าตัดด้วย *BamHI* ควรได้ชิ้น DNA ขนาด 703 bp และขนาด 10400 bp (แต่พบมีชิ้น DNA ขนาดประมาณ 1200 bp ที่ไม่พบว่ามิตำแหน่งบริเวณนี้) ใน Lane 6 ถ้าใช้ *SacI* ตัดร่วมกับ *SpeI* ควรได้ชิ้น DNA ขนาด 1058 bp และขนาด 9574 bp และจากผลการตัดด้วยเอนไซม์ทั้งสองพบชิ้น DNA ขนาดดังกล่าว และถ้าใช้ *HindIII* ตัดร่วมกับ *SpeI* ควรได้ชิ้น DNA ขนาด 974 bp และขนาด 10671 bp พบว่าใน Lane 3 เป็น empty vector pH2GW7 ตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* ไม่ได้ ดังนั้นเมื่อตัดพลาสมิด DNA ด้วย *HindIII* กับ *SpeI* จะไม่ได้ชิ้น DNA ที่ต้องการ

ในกรณีที่ empty vector pH2GW7 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *HindIII* ไม่ได้ เนื่องจาก เมื่อนำลำดับเบสของ pH2GW7 ไปหาตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยโปรแกรม APE (A Plasmid Editor) ไม่พบตำแหน่งตัดของ *HindIII* อยู่ หลังจากนั้นได้ทดลองตัดพลาสมิด pH2GW7 และตัวอย่างพลาสมิดที่ได้จากการทำ recombination กับ pH2GW7 คือ pHA_gJC 1.31.6.2, 1.31.6.15, 2.15.2.2 และ 2.15.2.20 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac II* ได้ผลดังรูปที่ 22



รูปที่ 22 แสดงผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของพลาสมิด pH2GW7 และตัวอย่างพลาสมิดที่ได้จากการทำ recombination กับ pH2GW7 คือ pHA_gJC 1.31.6.2, 1.31.6.15, 2.15.2.2 และ 2.15.2.20 (M = Ladder)

เลข 1 = pH2GW7

เลข 2 = pHA_gJC1.31.6.2 ตัดด้วย *SacII*

เลข 3 = pHA_gJC1.31.6.2

เลข 4 = pH2GW7 ตัดด้วย *SacII*

เลข 5 = pHA_gJC1.31.6.15

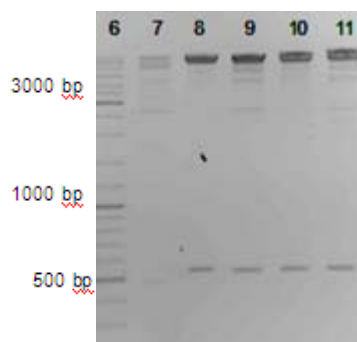
เลข 6 = pHA_gJC1.31.6.15 ตัดด้วย *SacII*

เลข 7 = pHA_gJC2.15.2.20

เลข 8 = pHA_gJC2.15.2.20 ตัดด้วย *SacII*

จากรูปที่ 22 ในกรณีของ empty vector pH2GW7 (Lane no.4) ถ้าตัดด้วย *SacII* ควรได้ชิ้น DNA ขนาด 2946 bp และขนาด 8560 bp และจากผลการตัดด้วยเอนไซม์พบแถบ DNA ดังกล่าว เช่นในกรณีที่ pHA_gJC1.31.6.2 ตัดด้วย *SacII* และมีชิ้น AG ถ้าตัดด้วย *SacII* ควรได้ชิ้น DNA ขนาด 520 bp, 1300 bp และ 9300 bp พบแถบ DNA ที่มีขนาดใกล้เคียง และแถบ DNA ขนาดเล็ก

ประมาณ 200 bp เป็นไปได้ว่าอาจมีตำแหน่งตัดเกิดขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากการแทรกของชิ้นยีน AG ในเวกเตอร์ และควรเพิ่มขนาดของเจลให้มีระยะทางมากขึ้นหรือให้กระแสไฟฟ้ามากขึ้นเพื่อให้แถบ DNA แยกขนาดได้ชัดเจนขึ้น



รูปที่ 23 แสดงผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของพลาสมิด pH2GW7 และตัวอย่างพลาสมิดที่ได้จากการทำ recombination กับ pH2GW7 คือ pHA_gJC 1.31.6.2, 1.31.6.15, 2.15.2.2 และ 2.15.2.20

เลข 6 = DNA Ladder

เลข 7 = pH2GW7 ตัดด้วย *SpeI*+*EcoRI*

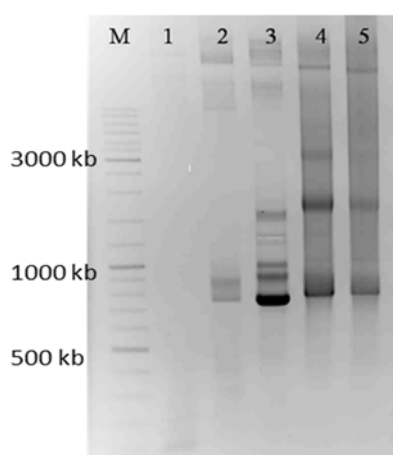
เลข 8 = pHA_gJC 1.31.6.2 ตัดด้วย *SpeI*+*EcoRI*

เลข 9 = pHA_gJC 1.31.6.15 ตัดด้วย *SpeI*+*EcoRI*

เลข 10 = pHA_gJC 2.15.2.2 ตัดด้วย *SpeI*+*EcoRI*

จากรูปที่ 23 ในกรณีของ empty vector pH2GW7 ถ้าตัดด้วย *SpeI* และ *EcoRI* ควรได้ชิ้น DNA ขนาดประมาณ 458 bp และขนาด 11048 bp พบแถบขนาดใกล้เคียงใน Lane no.7 ส่วนในกรณีที่เวกเตอร์เกิด recombination และมียีน AG ถ้าตัดด้วย *SpeI* และ *EcoRI* ควรได้ชิ้น DNA ขนาด 555 bp และ 10951 bp พบแถบ DNA ที่มีขนาดใกล้เคียงใน Lane ที่ 8, 9, 10 และ 11

ได้ลองทำ PCR เพื่อตรวจสอบการมียีน *Agamous* ในพลาสมิด pHAgJC 1.31.6.2, 1.31.6.15, 2.15.2.2 และ 2.15.2.20 ได้ผลดังรูปที่ 24



รูปที่ 24 แสดงผลจากการทำ PCR ตรวจสอบการมียีน *Agamous* ในพลาสมิด pHAgJC 1.31.6.2, 1.31.6.15, 2.15.2.2 และ 2.15.2.20 (M = Ladder)

เลข 1 = PCR product ของ pH2GW7

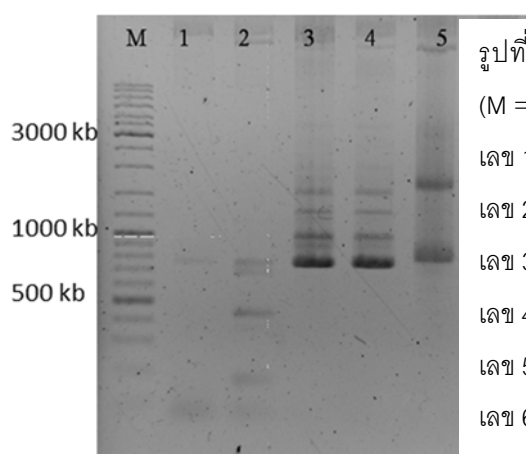
เลข 2 = PCR product ของ pHAgJC 1.31.6.2

เลข 3 = PCR product ของ pHAgJC 1.31.6.15

เลข 4 = PCR product ของ pHAgJC 2.15.2.2

เลข 5 = PCR product ของ pHAgJC 2.15.2.20

จากรูปที่ 24 ผลจากการทำ PCR พบแถบ DNA ของยีน AG ในเวกเตอร์ที่ผ่านการทำ recombination ใน Lane ที่ 2, 3, 4 และ 5 เมื่อลองตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะคือ *SpeI* และ *EcoRI* พบให้ผลเช่นเดิมดังรูปที่ 20 และในโคโลนีอื่น เมื่อสกัดพลาสมิด มาทำ PCR และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SpeI* และ *EcoRI* ก็ให้ผลเหมือนกัน ดังรูปที่ 22 ใน empty vector pH2GW7 จะไม่พบชิ้นยีน AG อยู่ แต่ในตัวอย่างที่ผ่านการทำ LR clonase แล้วจะพบชิ้น DNA ขนาดประมาณ 745 bp (AG gene)



รูปที่ 25 แสดงผลจากการทำ PCR ตรวจสอบการมียีน *Agamous* (M = Ladder)

เลข 1 = PCR product ของ pH2GW7

เลข 2 = PCR product ของ pH2GW7

เลข 3 = PCR product ของ pHAgJC 1.31.6.7

เลข 4 = PCR product ของ pHAgJC 1.31.6.8

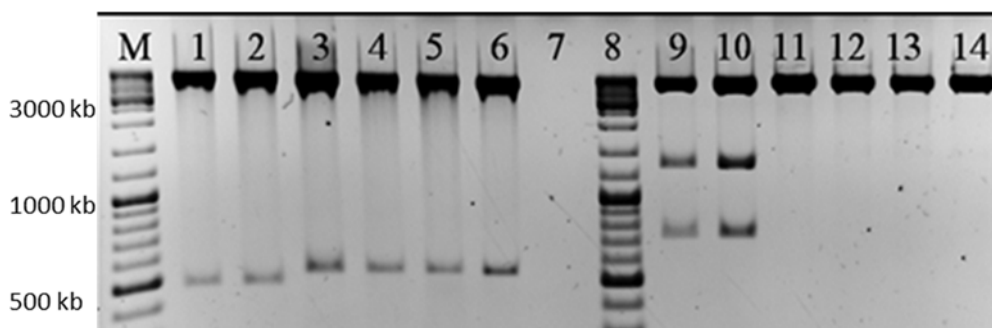
เลข 5 = PCR product ของ pHAgJC 2.15.2.12

เลข 6 = PCR product ของ pHAgJC 2.15.2.13

ในกรณีที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SpeI* และ *EcoRI* ในเวกเตอร์เปล่าและเวกเตอร์ที่มีชิ้นยีนแล้วจะมีขนาดต่างกันประมาณ 100 bp เพื่อยืนยันว่าในเวกเตอร์มีชิ้นยีนแทรกเข้าไปจริง จึงสกัดพลาสมิดแล้วใช้เอนไซม์ *BamHI* ตัดพลาสมิดตัวอย่างโดยในพลาสมิดตัวอย่างที่มียีน AG แทรกแทนยีน *ccdb* จะไม่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ดังกล่าว เพราะ *BamHI* มีตำแหน่งตัดที่

บริเวณยีน *ccdb* ทำให้ได้ชิ้น DNA ขนาดประมาณ 700 bp แต่ในเวกเตอร์ที่มียีน AG แทรกจะไม่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์จึงตัดไม่ได้ ผลแสดงดังรูปที่ 26

และจากผลการทดลองนี้ ทำให้ได้ AG overexpression vector ที่พร้อมในการถ่ายฝากเข้าไปในเนื้อเยื่อพืช



รูปที่ 26 แสดงผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของพลาสมิด pH2GW7 และตัวอย่างพลาสมิดที่ได้จากการทำ recombination กับ pH2GW7 (M = Ladder)

เลข 1 = pH2GW7 ตัดด้วย *SpeI*+*EcoRI*

เลข 8 = Ladder

เลข 2 = pH2GW7 ตัดด้วย *SpeI*+*EcoRI*

เลข 9 = pH2GW7 ตัดด้วย *BamHI*

เลข 3 = pHAgJC 1.31.6.7 ตัดด้วย *SpeI*+*EcoRI*

เลข 10 = pH2GW7 ตัดด้วย *BamHI*

เลข 4 = pHAgJC 2.15.2.10 ตัดด้วย *SpeI*+*EcoRI*

เลข 11 = pHAgJC 1.31.6.7 ตัดด้วย *BamHI*

เลข 5 = pHAgJC 1.31.6.8 ตัดด้วย *SpeI*+*EcoRI*

เลข 12 = pHAgJC 2.15.2.10 ตัดด้วย *BamHI*

เลข 6 = pHAgJC 2.15.2.13 ตัดด้วย *SpeI*+*EcoRI*

เลข 13 = pHAgJC 1.31.6.8 ตัดด้วย *BamHI*

เลข 7 = ไม่มีตัวอย่าง

เลข 14 = pHAgJC 2.15.2.13 ตัดด้วย *BamHI*

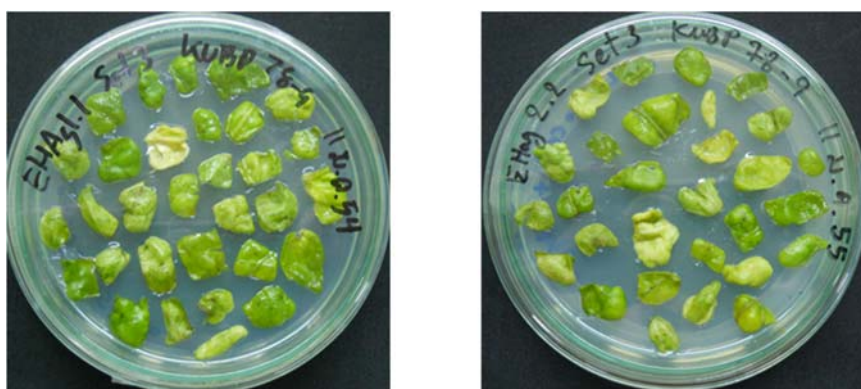
การถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens*

ได้รับ Destination vector ที่มียีน AG แทรกในพลาสมิดแล้ว ซึ่งได้แก่ pHAgJC 1.31.6.8 และ pHAgJC 2.15.2.13 จากนั้นใส่พลาสมิดดังกล่าวใน *Agrobacterium* สายพันธุ์ LBA4404 ด้วยวิธี Freeze thaw โดยเริ่มจากการผสมพลาสมิดตัวอย่างกับ competent cells บ่มในน้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นแช่ในโตรเจนเหลว 50 วินาที บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 15 นาที แล้วเติมอาหาร LB 400 µl บ่มเขย่า 200 rpm. ที่ 28 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง และบ่มในที่มืด 2 วัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ได้ *Agrobacterium* ที่มี Binary vector สำหรับถ่ายยีนเข้าสู่พืชคือ EHag 1.1 (pHAgJC 1.31.6.8) และ EHag 2.2 (pHAgJC 2.15.2.13)

ในการถ่ายยีนใช้วิธีการ Leaf disc-cocultivation โดยเริ่มจากการเตรียมหัวเชื้อ *Agrobacterium* นำตัวอย่างมา streak ให้เป็นโคโลนีเดี่ยวบนจานอาหาร LA ที่มียาปฏิชีวนะ Spectinomycin เข้มข้น 50 mg/l และ Rifamphicin เข้มข้น 50 mg/l บ่ม 28 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน จากนั้นแยกโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงใน LB ที่มียาปฏิชีวนะ Spectinomycin เข้มข้น 50 mg/l และ

Rifampicin เข้มข้น 50 mg/l บ่มเขย่าที่ 200 rpm 28 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน แล้วแบ่งเชื้อจากหลอดมา 150 μ l เลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml ที่มีอาหาร LB 50 ml เติมนยาปฏิชีวนะ Spectinomycin เข้มข้น 50 mg/l และ Rifampicin เข้มข้น 50 mg/l บ่มเขย่า 200 rpm ที่ 28 องศาเซลเซียส 16-17 ชั่วโมง แบ่งเชื้อใส่หลอด ปั่นเหวี่ยงที่ 4000 rpm 7 นาที ละลายตะกอนด้วยอาหารเหลว (MS + 3 mg/l BA + 0.1 mg/l IBA ที่มี Acetosyringone เข้มข้น 20 mg/l) วัดความเข้มข้นของเชื้อที่ OD₆₀₀ ให้อยู่ระหว่าง 0.4 จากนั้นทำให้เชื้อ active ด้วยการบ่มเขย่า 100 rpm 28 องศาเซลเซียส และเตรียมเนื้อเยื่อใบเลี้ยง (cotyledon) โดยตัดให้มีขนาดประมาณ 0.25 ตารางมิลลิเมตร แล้วใส่ใบเลี้ยงลงในเชื้อที่เตรียม แช่ไว้ 15 นาที เทสารละลายออก ซับสารละลายส่วนเกินออกจากเนื้อเยื่อ ให่วางเนื้อเยื่อบนจานอาหาร MS + 3 mg/l BA + 0.1 mg/l IBA + Acetosyringone เข้มข้น 20 mg/l ห่อฟอยด์แล้วทิ้ง co-cultivation ในที่มืด 3 คืน ที่ 25 องศาเซลเซียส

ขั้นต่อไปฟอกเนื้อเยื่อที่ผ่านการ co-cultivation ในน้ำกลั่นและ Cefotaxime เข้มข้น 500 mg/l จำนวน 3 ครั้ง หลังจากนั้นทำการซับด้วยกระดาษทิชชูปลอดเชื้อ โดยใน 6 สัปดาห์แรก เลี้ยงในอาหารชักนำยอด ที่ยังไม่ใส่ยาคัดเลือก Hygromycin B (MS + 3 mg/l BA + 0.1 mg/l IBA + 500 mg/l Cefotaxime) โดย sub culture ทุก 3 สัปดาห์



รูปที่ 27 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นสนุ่นดำจากส่วนของใบเลี้ยง
(รูปซ้าย) เนื้อเยื่อที่ผ่านการถ่ายยีนด้วย **construct EHA 1.1**
(รูปขวา) เนื้อเยื่อที่ผ่านการถ่ายยีนด้วย **construct EHA 2.2**

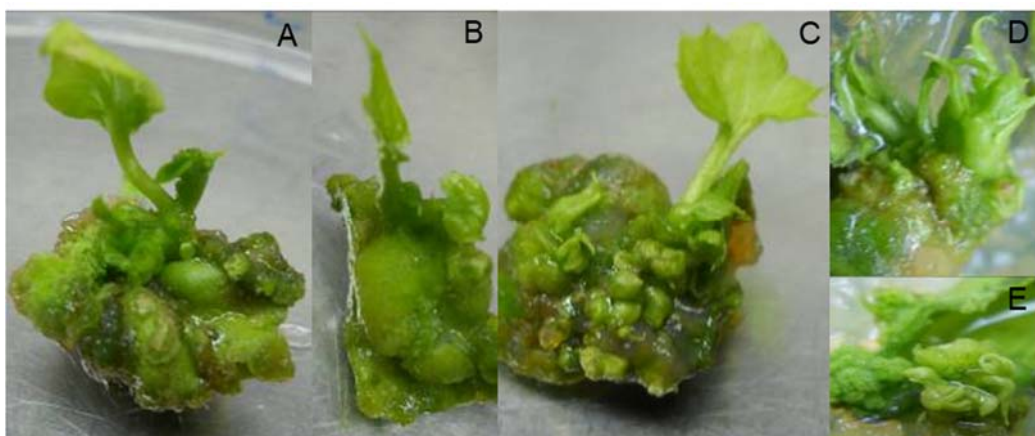
หลังจากนั้นย้ายเนื้อเยื่อไปเลี้ยงใน อาหาร induce ยอด ที่ใส่ยา Hygromycin B (MS + 3 mg/l BA + 0.1 mg/l IBA + 500 mg/l Cefotaxime + 0.5 mg/l Hygromycin B) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ เมื่อครบเวลาแล้ว ทำการย้ายลงในอาหารยัดลำต้น MS + 0.23 mg/l BA + 0.1 IBA จนได้ยอดที่มีขนาดอย่างน้อย 1 cm และทำการตัดเพื่อไปใส่ในอาหารเร่งรากต่อไป

ตารางด้านล่างแสดงจำนวนชิ้นเนื้อเยื่อในชั้นต่าง ๆ ดังตาราง

จำนวน ยอด Construct	สูตรอาหาร		
	Induce ยอด	ยัดลำต้น*	เร่งราก**
EHA 1.8	3	1	0
EHA 2.13	10	3	1

หมายเหตุ * สูตรอาหารยี้ดต้น คือ MS + 0.23 mg/l BA + 0.1 IBA

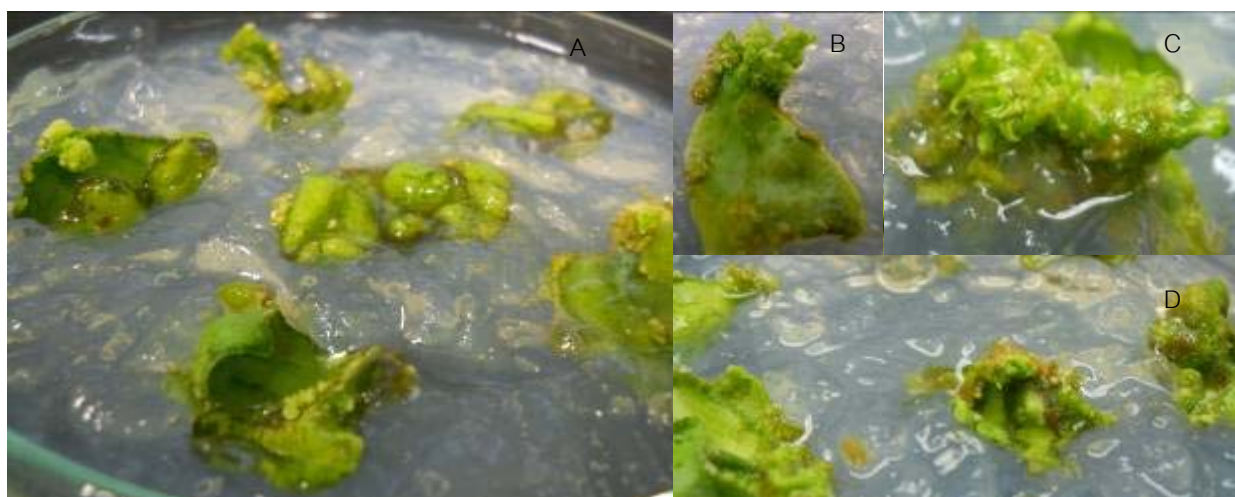
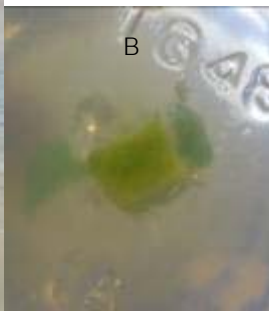
** สูตรอาหารเร่งราก คือ MS + 1 mg/l IAA



รูปที่ 28_รูปตัวอย่างยอดของ construct EHag 2.13 (ก่อนย้ายไปในอาหารที่มี Hygromycin)



รูปที่ 29 (A) ต้นของ construct EHag 2.13 ในอาหารเร่งราก
(B) ภาพถ่ายจากด้านล่าง ของต้น construct EHag 2.13 ใน
อาหารเร่งราก (ทำการย้ายลงในวันที่ 26 มีนาคม 2556)



รูปที่ 29 (A-D) รูปตัวอย่างชิ้นเนื้อเยื่อที่ถ่ายฝากด้วย construct EHag 1.8 และ 2.13 (ถ่ายภาพก่อนย้ายไปในอาหารที่มี Hygromycin)

จากผลการถ่ายฝากยีนได้ยอดที่เจริญเติบโต แต่เมื่อทำการย้ายไปอาหารเร่งราก ปรากฏว่าไม่มีการงอกของรากออกมา และยอด
ที่ได้เริ่มมีใบร่วงและเน่าลงไปในที่สุด

สรุปผลงานวิจัย

ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน Agamous ในสับดูต้าโดยแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของยีนนี้ในการควบคุมเพศของดอก โดยพบการแสดงออกในปริมาณสูงในดอกตูม ในเกสรตัวผู้และเกสรตัวเมีย ในขณะเดียวกัน พบการแสดงออกในปริมาณต่ำในใบและในยอดอ่อนและเมื่อนำลำดับโปรตีนมาเปรียบเทียบกับ พบว่า AG โปรตีนของสับดูต้ามีความใกล้เคียงกับโปรตีนในต้นโกโก้และต้น Populus และต้นมะเขือเทศตามลำดับมากที่สุด

นอกจากนี้ได้ทำโครงสร้างดีเอ็นเอเพื่อเพิ่มปริมาณการแสดงออกของยีนนี้ในสับดูต้า ได้ทำการถ่ายฝากเข้าไปใน Agrobacterium และได้ทำการถ่ายฝากเข้าไปในเนื้อเยื่อสับดูต้า ทำให้ได้ยอดของต้น putative transgenic แต่ไม่สามารถชักนำให้เกิดรากได้ ทำให้ไม่ได้ต้นที่จะนำมาศึกษาลักษณะของดอกและเพศของดอกได้

ภาคผนวก

ผลงานวิจัยนี้ได้มีการตีพิมพ์ตาม reference ด้านล่าง

Borivetanan P., Samipak S. 2011. Isolation of an *Agamous* Homologue from *Jatropha curcas*. In Proceedings of the 2011th International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics. pp 331-333.