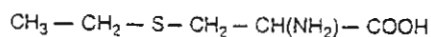
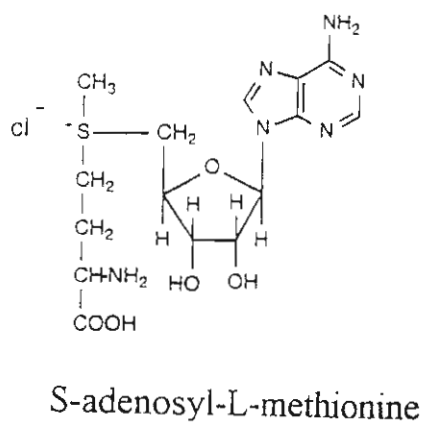
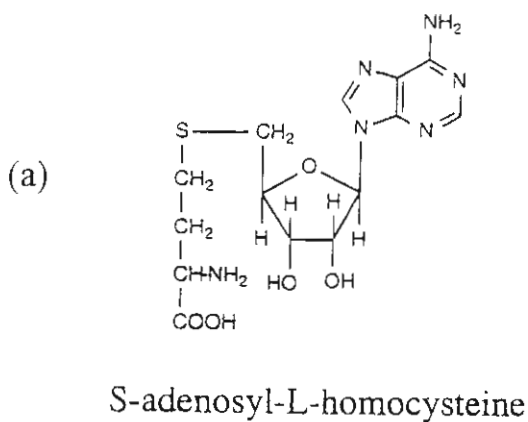


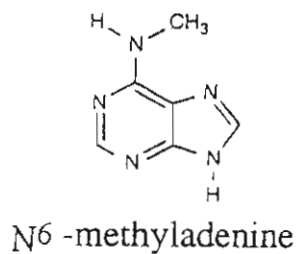
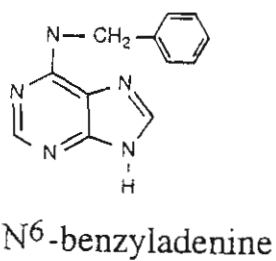
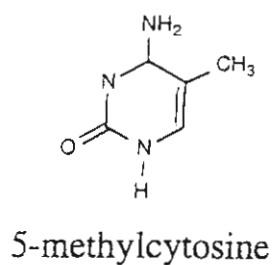
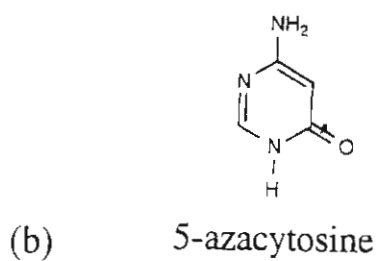
Figure 11 Structure of inhibitors for DNA methylation.

(a) Methyl donor and substrate analog.

(b) Methylated base and its analog.



DL-ethionine



(6-Benzylaminopurine : BA)

Figure 12 The influence of substrate analogs on rice DNA MTase activity.
(●) S-adenosylhomocysteine
(■) DL-ethionine

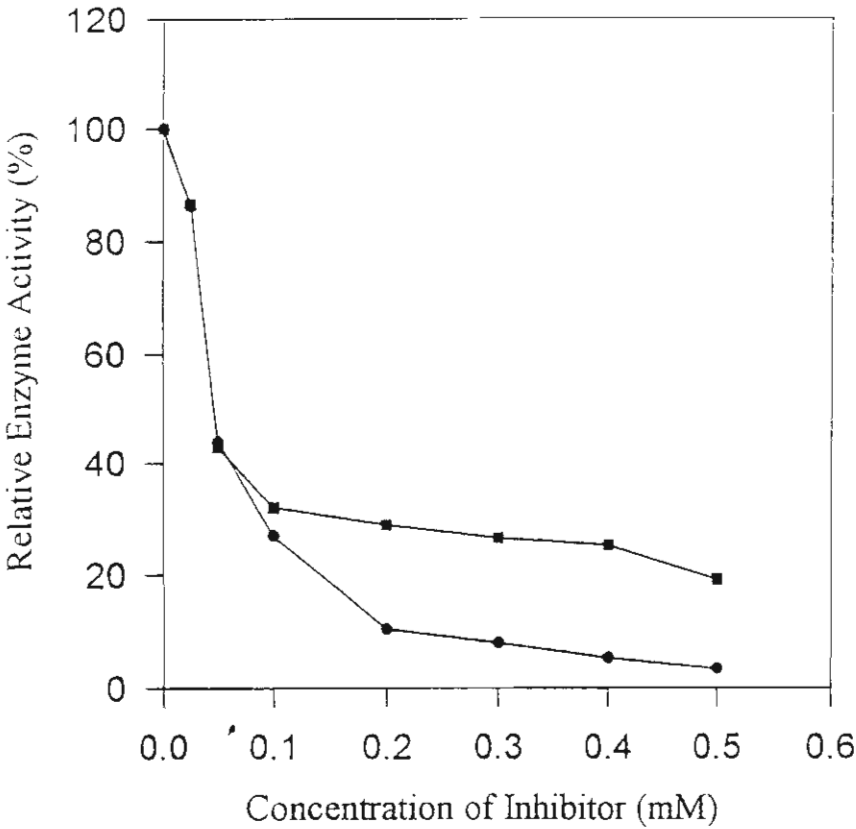
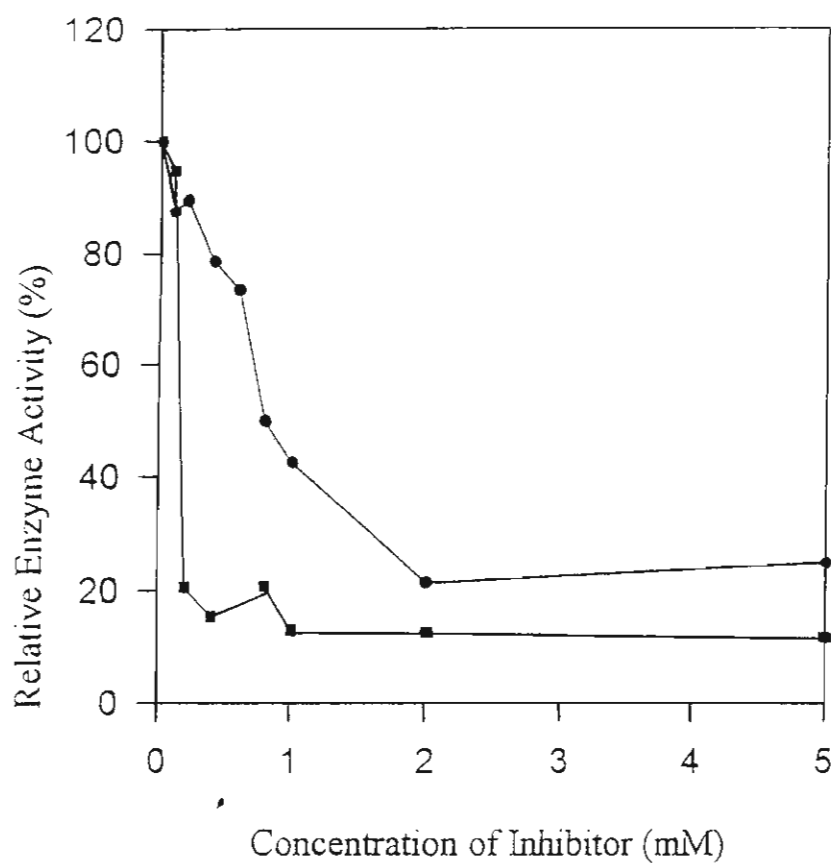


Figure 13 The influence of de-methylating agents on rice DNA MTase activity.

- (●) 5-azacytosine
(■) N⁶-benzyladenine



จากผลการทดลองใน Figure 14 จะเห็นว่า NaCl และ KCl ที่ความเข้มข้นมากกว่า 100 mM จะ inhibit activity ของ DNA MTase ลงถึง 50 % โดยที่ KCl มีผลในการ inhibit มากกว่า NaCl ที่ความเข้มข้นเดียวกัน

Figure 15 แสดงให้เห็นว่า Ca^{2+} ion สามารถ inhibit activity ของ rice DNA MTase ได้ดีกว่า Mg^{2+} ion ที่ความเข้มข้นเดียวกัน โดย CaCl_2 และ MgCl_2 ที่ความเข้มข้น 2 และ 4 mM, ตามลำดับ จะ inhibit activity ของ DNA MTase ลงถึง 50 %

Figure 16 แสดงให้เห็นว่า tri-cationic amine (spermidine) และ tetra-cationic amine (spermine) สามารถ inhibit activity ของ rice DNA MTase ได้ดีเช่นเดียวกัน โดยที่ความเข้มข้นเพียง 8 mM จะสามารถ inhibit activity ของ DNA MTase ได้ถึง 100 %

จากผลการทดลองข้างต้น แสดงว่า rice DNA MTase อาจไม่ต้องการ co-factor ซึ่งคล้าย DNA MTase ของ *Chlamydomonas sp.* (17) ผู้วิจัยพบว่า จำเป็นต้องใส่ EDTA ใน assay buffer เสมอ นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาผลของ dithiothreitol ต่อ activity ของ rice DNA MTase พบว่า หากไม่ใส่ dithiothreitol ใน assay buffer จะทำให้ activity ของ DNA MTase ลดลง 20 %

2.2.4) Optimal pH

ได้ทำการศึกษา optimal pH ของการทำงานของเอนไซม์ DNA MTase พบว่า rice DNA MTase มี optimal pH ที่จำเพาะ โดย activity สูงสุด อยู่ระหว่าง pH 7.6 - 8.0 และ activity ต่ำลง 50 % ที่ pH 7.4 และ 8.2 (Figure 17)

Figure 14 The effect of salt concentration (monovalent cation) on rice DNA MTase activity.
(■) NaCl
(●) KCl

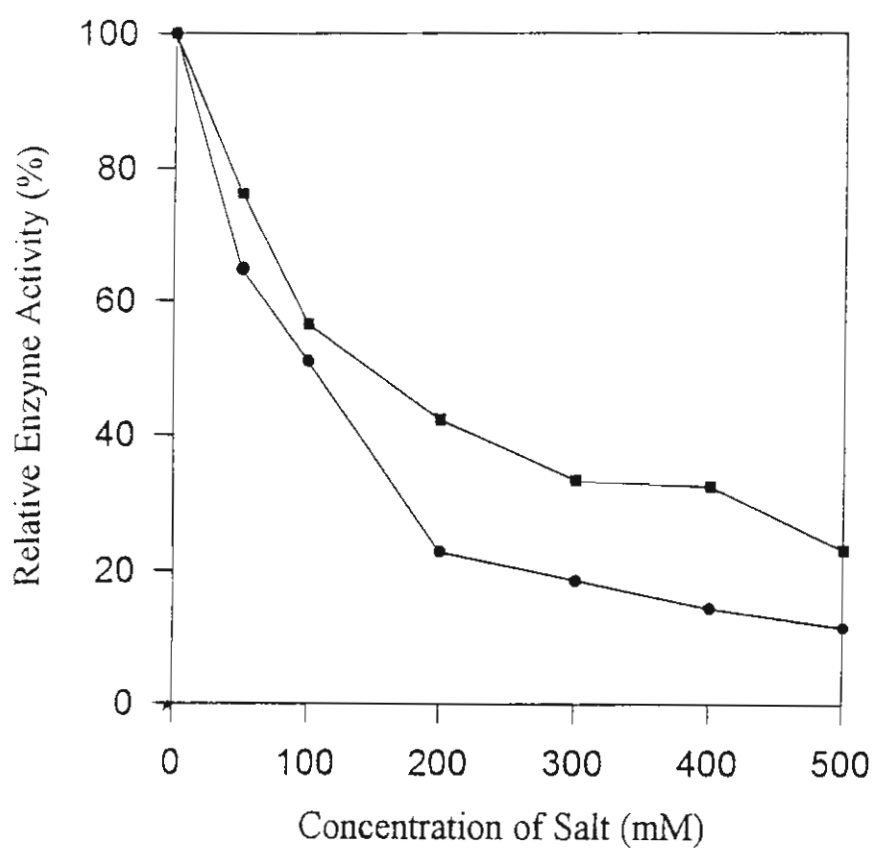


Figure 15 The effect of salt concentration (divalent cation) on rice DNA MTase activity.

(●) MgCl_2
(■) CaCl_2

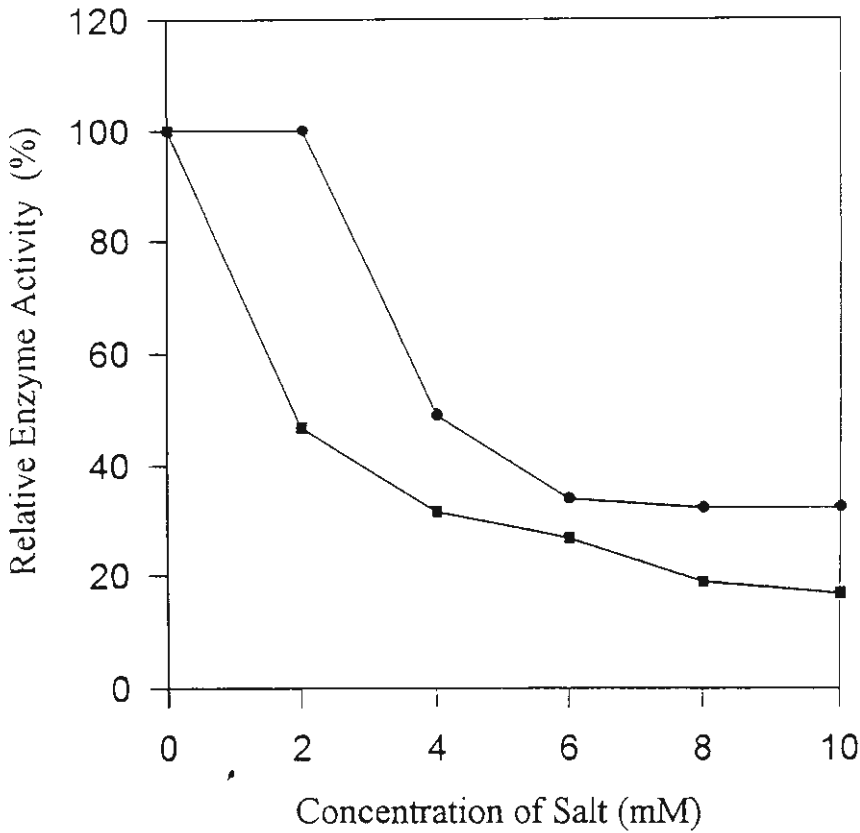
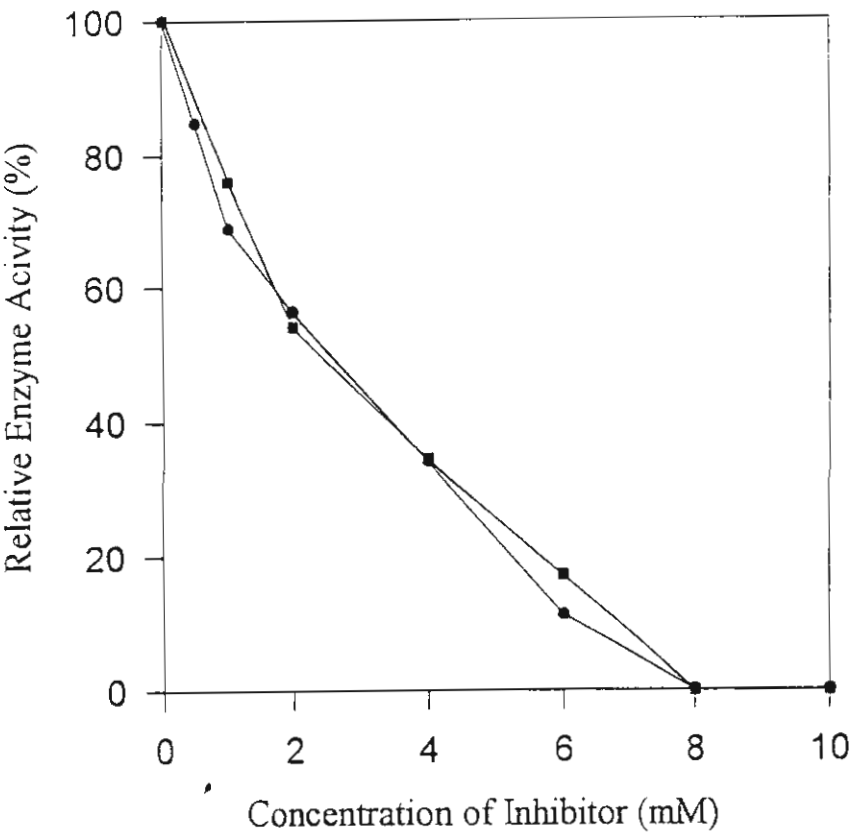


Figure 16 The effect of cationic amine compounds on rice DNA MTase activity.
(■) Spermidine
(●) Spermine



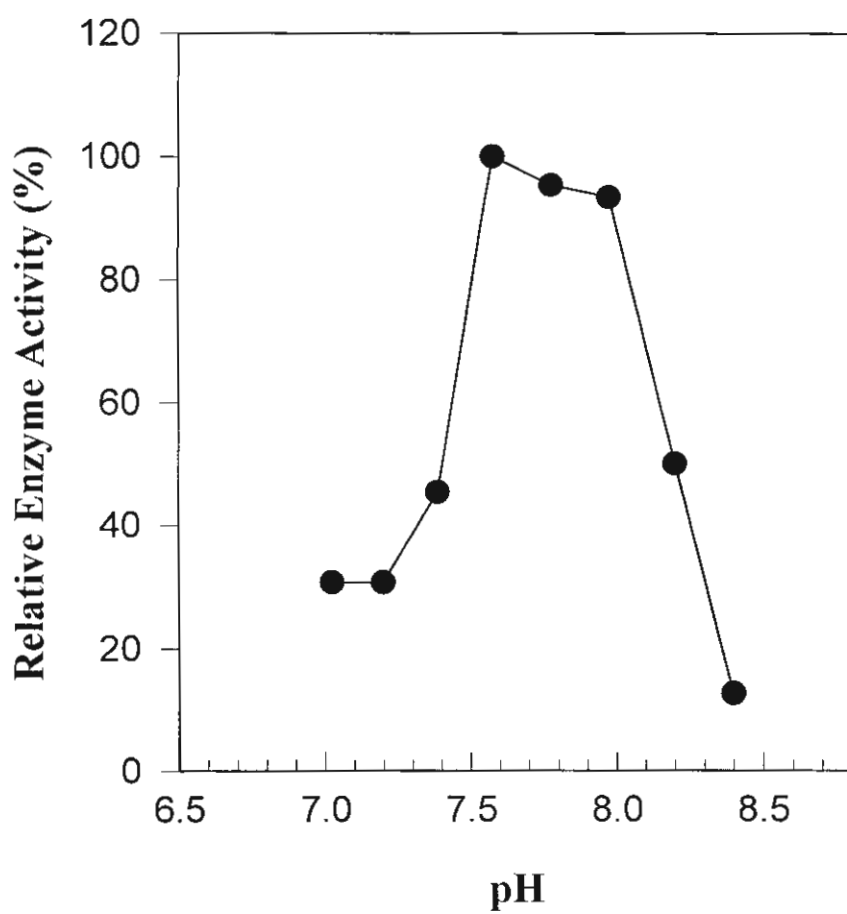


Figure 17 The pH dependence of rice DNA MTase activity.

2.2.5) Optimal temperature

ได้ทำการศึกษา optimal temperature ของการทำงานของเอนไซม์ DNA MTase พบว่า rice DNA MTase มี optimal temperature ที่ 25 °C (Table 15)

2.2.6) Enzyme kinetic

DNA substrate concentration

จากผลการทดลองซึ่งแสดงใน Figure 18 พบว่า Km value ของ rice DNA MTase ต่อ DNA substrate ที่เป็น rice DNA คือ 50 µg/ml และจากผลการทดลองซึ่งแสดงใน Figure 19 พบว่า Km value ของ rice DNA MTase ต่อ DNA substrate ที่เป็น poly (dI-mdC).poly (dI-dC) คือ 16.67 µg/ml

Methyl donor concentration

จากผลการทดลองซึ่งแสดงใน Figure 20 พบว่า Km value ของ rice DNA MTase ต่อ S-adenosylmethionine ซึ่งเป็น methyl donor คือ 2.63 µM

2.2.7) De-methylation activity

ได้ทำการตรวจสอบ de-methylating activity ของ rice DNA MTase โดยใช้ ³H-methylated DNA เป็น DNA substrate และ S-adenosylhomocysteine เป็น methyl acceptor โดย vary pH ของ assay reaction ระหว่าง 6.5 - 8.5 ผลปรากฏว่าไม่พบ de-methylating activity ใน purified rice DNA MTase

2.2.8) Enzyme stability

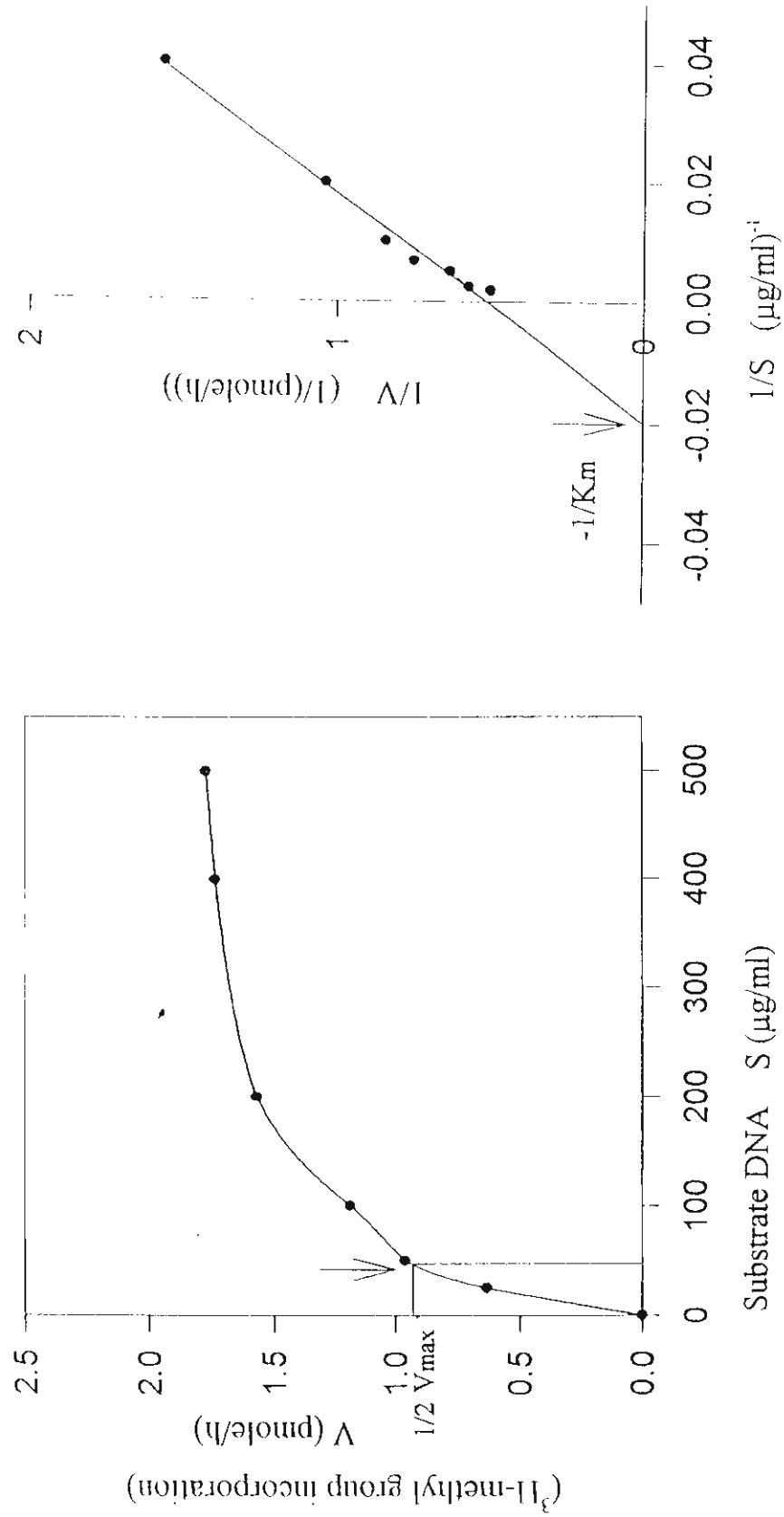
ผู้วิจัยพบว่า DNA MTase ที่ purify ได้ ไม่มีความ stable จึงได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง storage temperature และ storage time ที่มีต่อ

Table 15 Effect of assay temperature on rice DNA MTase activity^a

Temperature (°C)	Relative activity (%)
20	48
25	100
30	62
37	45

^aThe purified DNA MTase was extracted from 10-day-old shoot of rice and further assay under standard assay condition at the different temperature.

Figure 18 DNA substrate concentration (10 days-old shoot-rice DNA) dependence for rice DNAMTase activity



The kinetic data showed a hyperbolic relationship between [V] & [S] obey the Michaelis-Menten equation.

$K_m = 50 \mu\text{g/ml}$ DNA (rice DNA substrate)

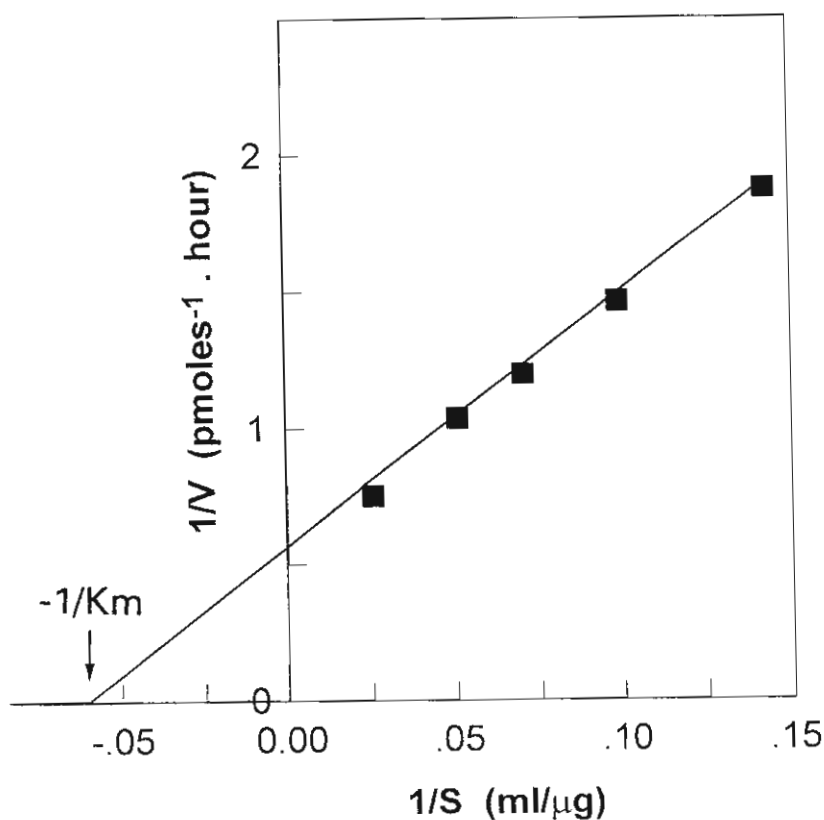


Figure 19 DNA substrate concentration (poly (dI-mdC).poly (dI-dC)) dependence for rice DNA MTase activity.

The kinetic data showed a hyperbolic relationship between $[V]$ & $[S]$ obey the Michaelis-Menten equation.
(Lineweaver-Burk plot)

$K_m = 16.67 \mu\text{g/ml}$ DNA (poly (dI-mdC).poly (dI-dC))

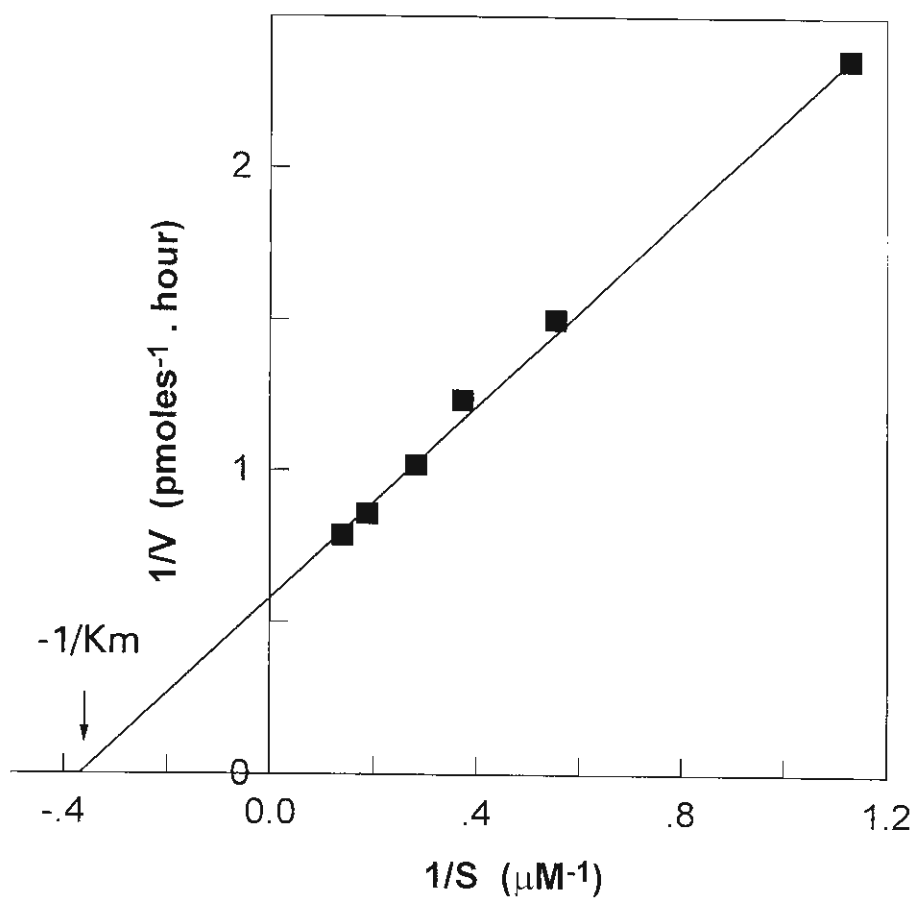


Figure 20 Methyl donor substrate concentration (S-adenosylmethionine) dependence for rice DNA MTase activity.

$K_m = 2.63 \mu\text{M}$ Methyl donor (S-adenosylmethionine)

activity ของ purified rice DNA MTase ผลการทดลองพบว่า activity ของ DNA MTase จะลดลงอย่างรวดเร็วและหมด activity ไปภายใน 3 วัน ที่ 4 °C และ 2 เดือน ที่ -20 °C อย่างไรก็ตามเมื่อเก็บ purified rice DNA MTase ไว้ที่ -80 °C เป็นเวลา 5 เดือน สามารถ maintain activity ไว้ได้ 82 % (Table 16)

จากการทดลองจะเห็นได้ว่า rice DNA MTase มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับ DNA MTase จากพืชที่มีรายงาน ได้แก่ ข้าวสาลี ถั่ว และ *Chlamydomonas* มากกว่าเอ็นไซม์นี้จากสัตว์ ซึ่งชี้ให้เห็นว่า พืชอาจมี DNA MTase จำเพาะในการทำ DNA methylation ในรูปแบบจำเพาะของพืช อย่างไรก็ตามพืชใบเลี้ยงเดี่ยว กับพืชใบเลี้ยงคู่ก็มีการกระจายตัวของ methylated base ที่แตกต่างกันใน genome จึงควรมีการศึกษาการทำงาน และการควบคุมเอ็นไซม์นี้ ให้ลึกซึ้งขึ้น

2.3) การวิเคราะห์ amino acid sequence ของ เอ็นไซม์ DNA MTase บริสุทธิ์

ผู้วิจัยได้ทำการเตรียม purified rice DNA MTase ให้บริสุทธิ์ใหม่ และมีปริมาณมากเพียงพอสำหรับส่งไปทำ amino acid sequencing เพื่อทราบข้อมูลของ N-terminal ต่อไป แต่ปรากฏว่าจากการส่ง purified rice DNA MTase ไปทำ N-terminal amino acid sequencing ที่ Pastuer Institute ประเทศฝรั่งเศส ทั้ง 2 ครั้ง มีการเกิด blocking ของ N-terminal amino acid sequencing reaction ทำให้ไม่สามารถได้ข้อมูลในส่วนนี้

Table 16 Stability of purified rice DNA MTase activity at various storage temperature

Storage Temperature (°C)	Storage time	Relative activity (%)
Newly purified enzyme	0	100
4 °C	24 hrs	89
	48 hrs	48
	72 hrs	0
-20 °C	7 days	51
	1 months	22
	2 months	0
-80 °C	1 months	98
	2 months	98
	3 months	95
	4 months	88
	5 months	82

^aThe purified DNA MTase was extracted from 10-day-old shoot of rice and stored in various temperature. The assay was done under standard assay condition at different times.

3) การแยกยีน DNA MTase และ วิเคราะห์ลำดับเบส

3.1) การ clone cDNA ของ DNA MTase

3.1.1) การสร้าง cDNA library ของข้าว

ผู้วิจัยเริ่มจากการเลือกเตรียม total RNA จากยอดอ่อนของข้าวอายุ 10 วัน เนื่องจากผลการทดลองเบื้องต้นพบว่า ยอดอ่อนของข้าวอายุ 10 วัน มี specific activity ของเอนไซม์ DNA MTase สูงสุด จึงคาดว่าควรมี mRNA ของ DNA MTase ถูก transcribe ออกมามากด้วย จากนั้นทำการเตรียม polyA-mRNA โดยใช้ oligo (dT) cellulose column ของ Poly(A)Quik mRNA isolation kit (Stratagene)

cDNA ถูกเตรียมจาก polyA-mRNA โดยใช้ cDNA synthesis kit ของ Stratagene (Figure 21) ซึ่ง cDNA ที่เตรียมได้นี้ ส่วนหนึ่งของ cDNA ถูกใช้สำหรับเตรียม cDNA library โดยใช้ λ -ZAPII vector และ packaging kit (Gigapack II Gold) ของ Stratagene (Figure 22) ซึ่งเตรียมได้ titer 1×10^8 pfu/ μ g of vector

3.1.2) การเตรียม probe สำหรับคัดเลือก rice putative DNA MTase clone

cDNA อีกส่วนหนึ่งถูกใช้สำหรับเป็น template เพื่อทำ PCR โดยใช้ primer ที่ design จาก specific และ conserved region ของ SAM binding site และ active site ของ DNA MTase จากข้อมูลของ *Arabidopsis* DNA MTase cDNA ซึ่งในการทดลองนี้ ผู้วิจัยทำการ design 4 non-degenerated primers และ 2 degenerated primers ดังแสดงใน Figure 23 เพื่อใช้ทำ PCR โดยใช้ rice cDNA เป็น template ผลปรากฏว่า degenerated primers F2.2* และ R2.2* ให้ expected size ของ PCR product ที่วางแผนไว้ ขนาดประมาณ 0.3 kbp (Figure 24) ซึ่ง PCR product ที่ได้นี้ ได้ถูก subclone เข้า pGEM T-easy vector (Promega) ทำการตรวจสอบ sequence เปรียบเทียบกับข้อมูลใน database พบว่า มีส่วนที่ homology กับ DNA MTase cDNA ของ

Figure 21 cDNA synthesis flow chart.

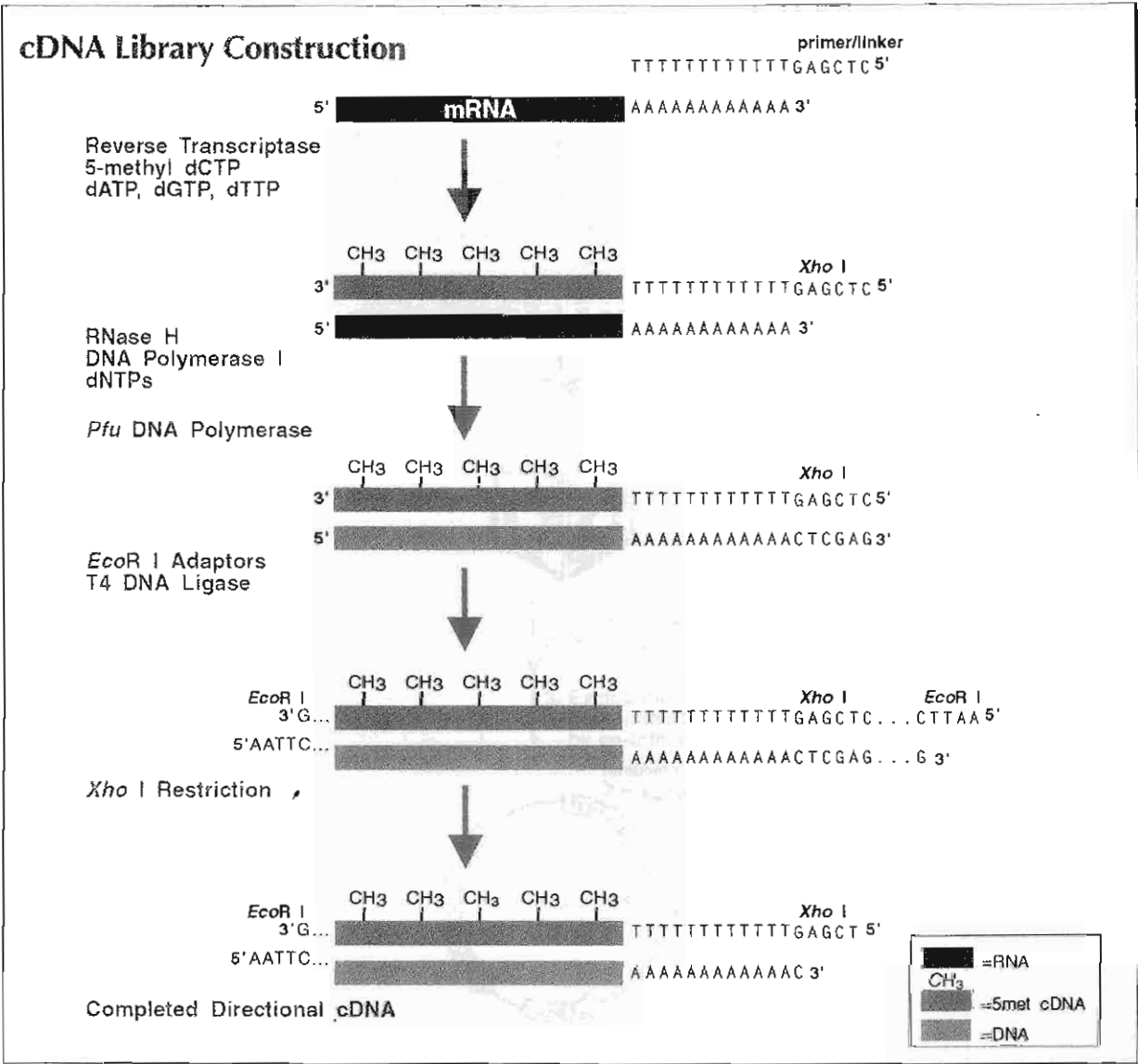


Figure 22 cDNA library construction using Lambda ZAP II cloning vector with Gigapak II packaging extract (Stratagene).

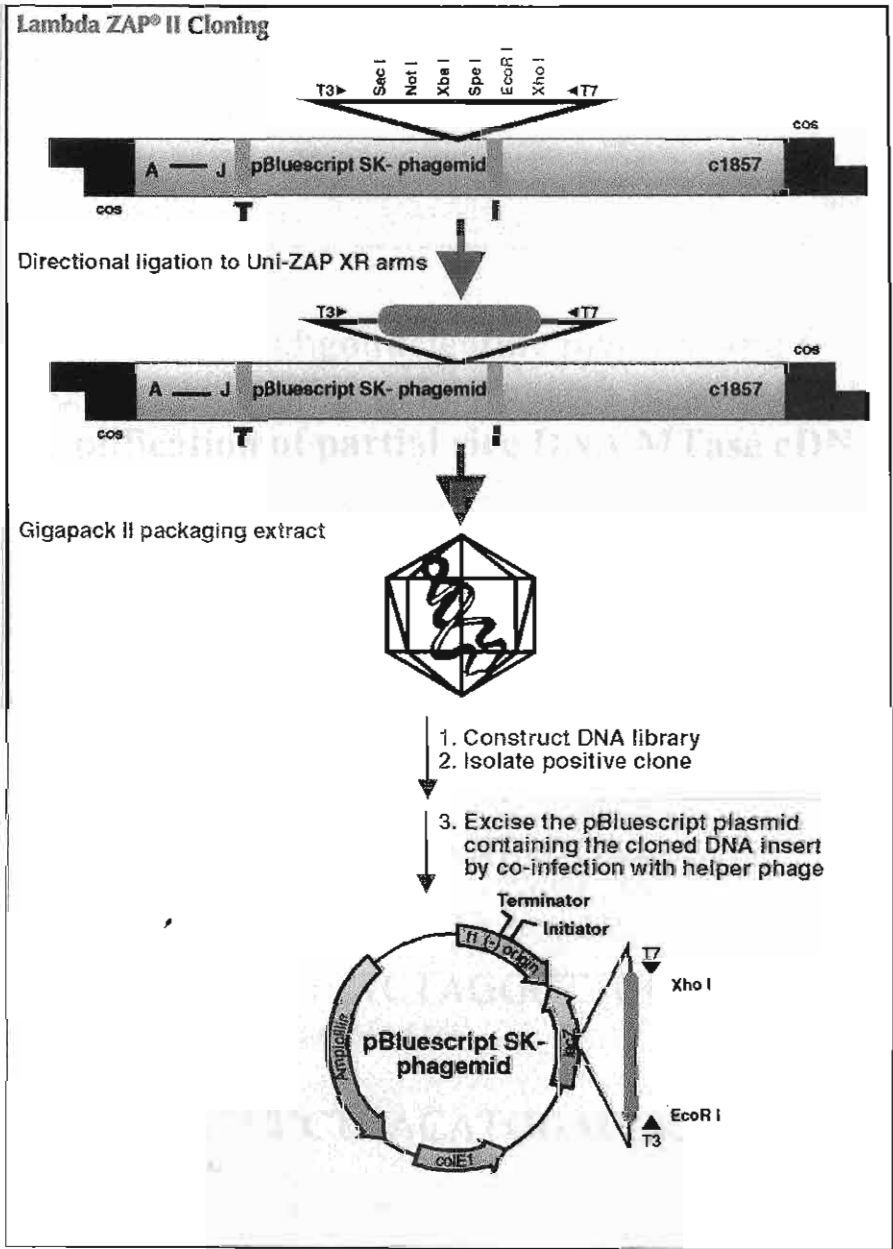
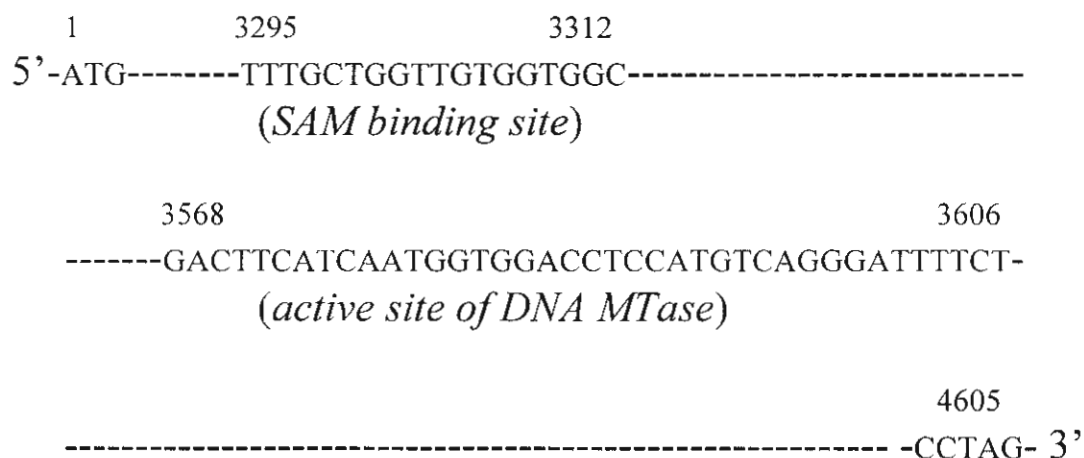


Figure 23 Primer design from conserved regions based on *Arabidopsis thaliana* DNA MTase cDNA.



Four non-degenerated oligonucleotide primers and two degenerated oligonucleotide primers were designed to be used for PCR amplification of partial rice DNA MTase cDNA region.

- F1 : 5'-GGGATGGTGAGAGTCTAGG-3'
primer specific to Arabidopsis
- F2.1 : 5'-TTTGCTGGTTGTGGTGGC-3'
SAM binding site
- F2.2*: 5'-TTYGCNNGGNTGYGGNNGN-3'
SAM binding site
- R1 : 5'-TTTTTTTTTTTCTAGGGTTGGTGT-3'
primer specific to poly A tail
- R2.1 : 5'-AAAATCCCTGACATGGAGG-3'
active site
- R2.2*: 5'-WRAANCCYTGRCANGGNGG-3'
active site

* degenerated oligonucleotide primers
R: A/G, W: A/T, N: A/T/G/C, Y: C/T

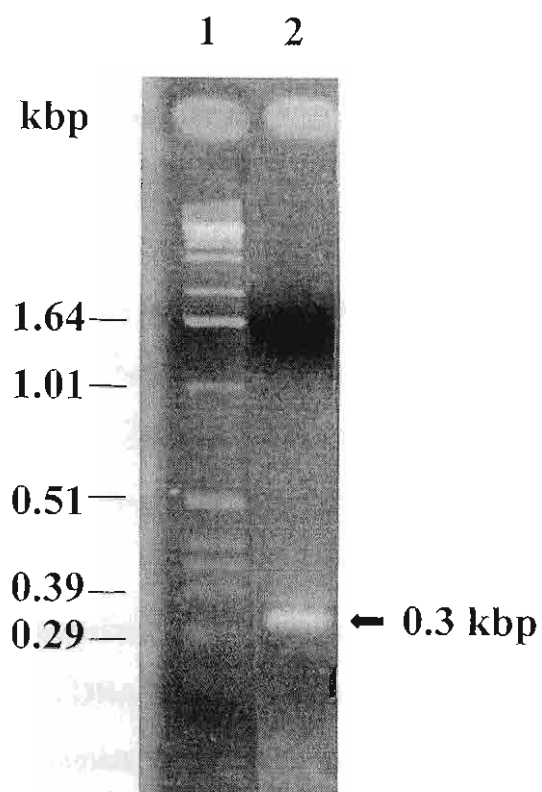


Figure 24 Expected PCR product of 0.3 kbp was obtained by using F2.2* and R2.2* primers with rice cDNA as template.

Arabidopsis จึงตั้งชื่อว่า pPM1 (partial rice DNA MTase cDNA) คาดว่าจะสามารถนำไปใช้เป็น probe ในการ screen หา putative clone ของ rice DNA MTase ต่อไปได้

3.1.3) การตรวจหา putative cDNA clone ของ rice DNA MTase จาก cDNA library

ผู้วิจัยทำการ screen หา putative cDNA clone ของ rice DNA MTase จาก cDNA library ที่เตรียมได้ โดยวิธี Plaque hybridization ด้วย 0.3 kbp fragment ของ PCR product clone pPM1 ที่เตรียมได้จากข้อ 3.1.2 ปรากฏว่า จากการ screen 1×10^6 pfu พบ 3 positive clones

เมื่อทำการ excision โดย helper phage co-infection ทำให้ได้ pBluescript SK ที่มี cloned cDNA insert อยู่ ทำการตรวจสอบขนาดของ insert โดยทำ PCR ด้วย T3 และ T7 primers และ EcoRI digestion แยก insert ออก ดังแสดงใน Figure 25 ปรากฏว่าพบ insert ที่มีขนาดประมาณ 4.7 kbp อยู่เพียง 1 clone เท่านั้น จึงตั้งชื่อว่า pRM1 (rice DNA MTase clone #1) ซึ่งขนาด cDNA 4.7 kbp เป็นขนาดที่คาดว่าจะจะเป็น เมื่อคำนวณจากขนาดของ purified rice DNA MTase enzyme (ประมาณ 130 kDa) จึงได้ทำการ sequence เพื่อตรวจสอบต่อไป

3.2) การวิเคราะห์ลำดับเบสของ putative cloned cDNA ของ rice

DNA MTase

ผู้วิจัยทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของ putative cloned cDNA ของ rice DNA MTase ใน pRM1 โดยวิธี primer walk sequencing ซึ่งเป็นการ sequence แล้ว design primer ให้ overlap กับ sequence ที่ทราบข้อมูลแล้ว เพื่อ sequence ต่อไปใน direction เดียวกัน แล้ว sequence กลับจนกระทั่งมีปลายที่ overlap กัน โดยวิธีนี้ทำให้ได้ข้อมูล sequence แบบ full length ครบ 4.7 kbp (Figure 26)

Figure 25 Putative lambda clone was excised to be pBluescriptSK containing the cloned cDNA insert by co-infection with helper phage. The putative cloned cDNA insert in pRM1 was checked by PCR using T3/T7 primers (left) and *EcoRI* digestion (right). The result indicated the 4.7 kbp cloned cDNA insert in pRM1.

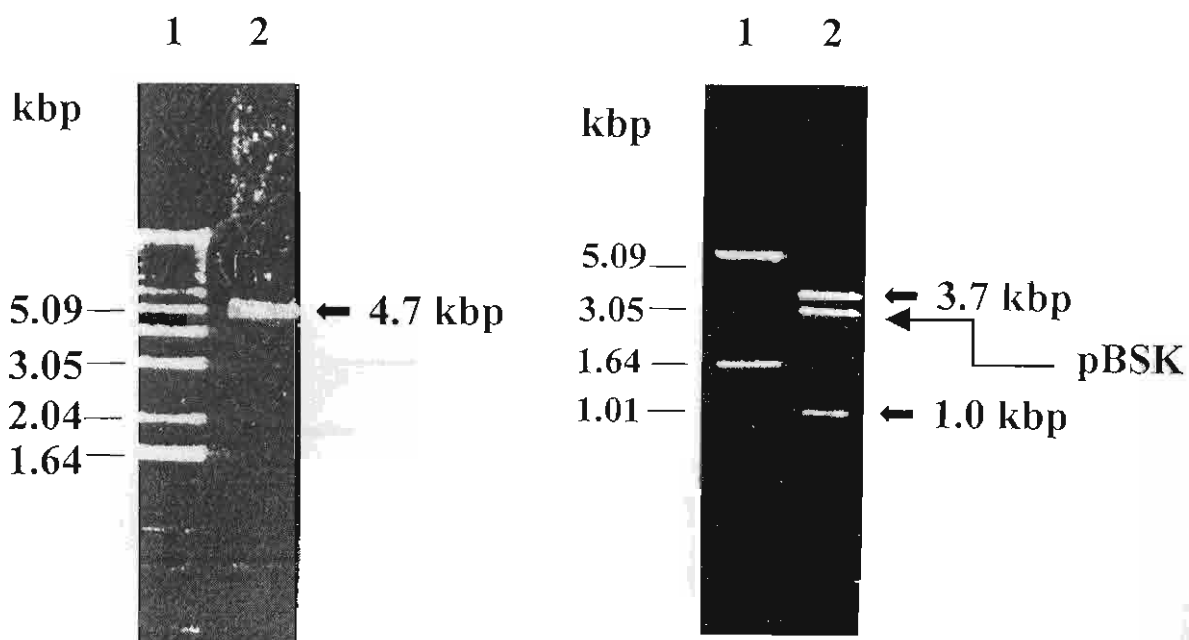
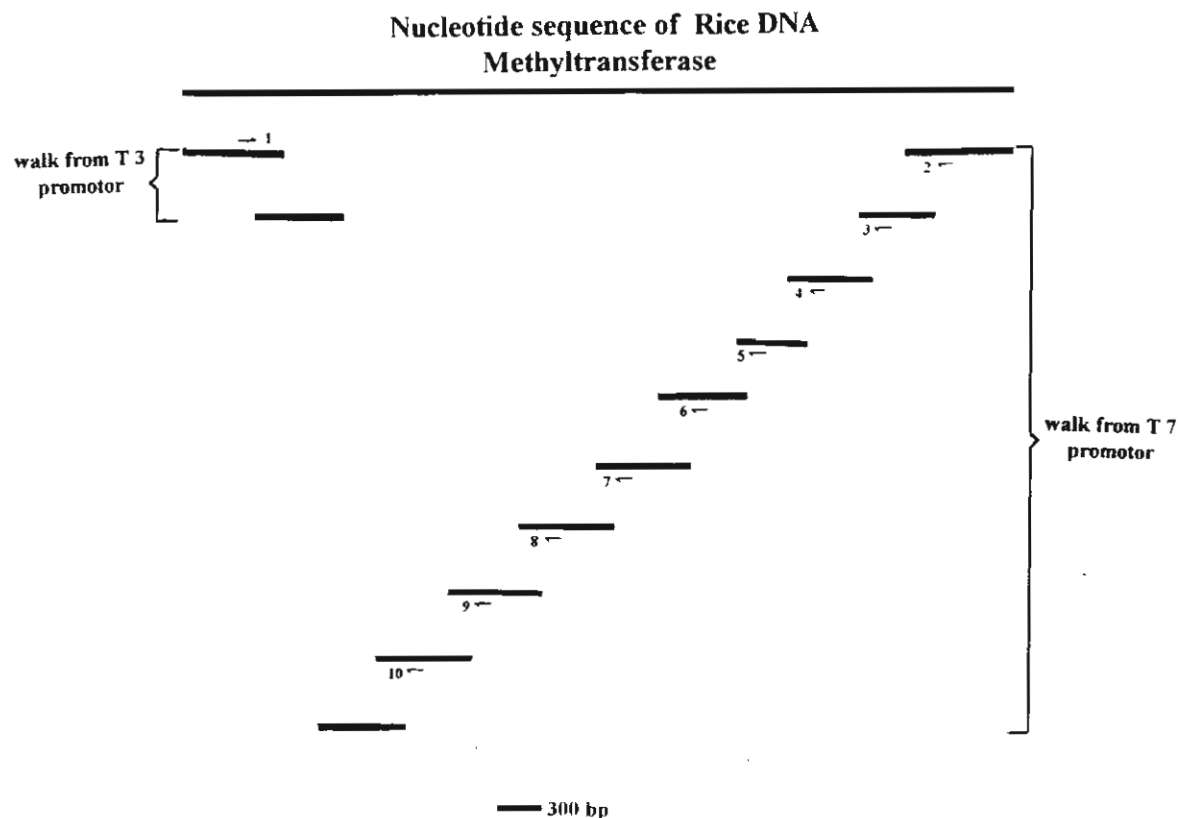


Figure 26 Primer walk sequencing was employed to assemble the full length sequence of 4.7 kbp putative rice DNA MTase cDNA cloned in pRM1.



Primers	Sequences
1	5' TGCTGTGGAGAAACTGG 3'
2	5' CCGAACACTCACGACCC 3'
3	5' CGCATGCGGGCAGCCAC 3'
4	5' CGGACCAGGCAGCGCAGT 3'
5	5' TGCCTGGGCTGCCGGGT 3'
6	5' GCTTCCTCGTCGCTCCA 3'
7	5' GCCATCCACCTCCTCAA 3'
8	5' GAATGACCGAGACCCAG 3'
9	5' TTTCGTGGGTGGTTTGT 3'
10	5' AGCCACTGAGCCACCAC 3'

Total nucleotide sequence ที่ clone ได้ คือ 4,712 nucleotides และ พบ Kozak sequence ทาง ปลาย 5' ต่อด้วย start codon ATG พบ stop codon และ poly A tail ทาง ปลาย 3' แสดง ว่าสามารถ clone ได้ full length ของ putative cDNA clone ของ rice DNA MTase Figure 27 แสดง open reading frame ของ nucleotide sequence ทั้ง 4,506 nucleotides และ แสดง inferred amino acid sequence ทั้ง 1,502 amino acids ของ putative cDNA clone ของ rice DNA MTase ซึ่งเมื่อคำนวณตาม molecular mass ควรจะให้ rice DNA MTase enzyme ขนาดประมาณ 167 kDa

3.3) การวิเคราะห์ **functional domains** และ **conserved motifs** ของ **rice DNA MTase sequence** เมื่อเปรียบเทียบกับ **known sequence**

ผลการวิเคราะห์ functional domains ของ rice DNA MTase inferred amino acid sequence เมื่อเปรียบเทียบกับ known sequence แสดงใน Figure 28 พบว่า rice DNA MTase amino acid sequence มี linker (GKKKGKVN) ซึ่งเป็นจุดแบ่ง N-terminal region (2/3 ส่วนของ sequence ทั้งหมดทางปลาย 5') ที่ค่อนข้างแตกต่างกันระหว่างเอ็นไชน์นี้จากสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด กับ C-terminal region (1/3 ส่วนของ sequence ทั้งหมดทางปลาย 3') ที่ค่อนข้างเหมือนกันระหว่างเอ็นไชน์นี้จากสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด

พบ Lys-Gly repeats (KGKGKGKGKGKGK), conserved motif I (SAM binding site), conserved motif IV (Active site), conserved motif VI, VIII, IX และ X ในบริเวณ C-terminal region ที่ทำให้ทราบว่า เป็น DNA MTase เมื่อทำ alignment ส่วน conserved motifs ของ rice DNA MTase amino acid sequence เปรียบเทียบกับ known DNA MTase amino acid sequence ของพืชอื่นได้แก่ ข้าวโพด แครอท มะเขือเทศ ถั่ว และ *Arabidopsis* ดังแสดงใน Figure 29 พบว่า DNA MTase amino acid sequence ส่วน conserved motifs ของ ข้าว ข้าวโพด แครอท มะเขือเทศ ถั่ว และ *Arabidopsis* มี identity สูง อย่างไรก็ตามผู้วิจัยจะวิเคราะห์รายละเอียดอื่นๆเพิ่มเติมต่อไป

Figure 27 Nucleotide and inferred amino acid sequence of rice DNA MTase cDNA

5' ATG GCA GAC TCA AAT AGA TCC CCA AGA TCC AGG CCC AAG CCT CGG GGA CCC AGG
 M A D S N R S P R S R P K P R G P R
 AGA AGC AAG TCG GAC AGT GAC ACC CTT TTT GAA ACT TCA CCT AGT TCC GTG GCT
 R S K S D S D T L F E T S P S S V A
 ACG AGG AGA ACC ACC AGG CAG ACC ACC ATC ACG GCT CAC TTC ACG AAG GGC CCC
 T R R T T R Q T T I T A H F T K G P
 ACT AAA CGG AAA CCC AAG GAA GAG TCG GAA GAG GGG AAC TCG GCT GAG TCG GCT
 T K R K P K E E S E E G N S A E S A
 GCA GAG GAG AGA GAC CAG GAT AAG AAA CGC AGA GTT GTA GAC ACA GAG AGT GGT
 A E E R D Q D K K R R V V D T E S G
 GCT GCA GCT GCT GTG GAG AAA CTG GAA GAG GTA ACA GCG GGA ACC CAG CTG GGT
 A A A A V E K L E E V T A G T Q L G
 CCG GAA GAG CCA TGT GAA CAG GAA GAT GAC AAC AGG AGT CTT CGA CGT CAC ACC
 P E E P C E Q E D D N R S L R R H T
 AGA GAG CTG TCA TTG AGG CGG AAA TCA AAG GAG GAT CCA GAC AGA GAA GCA AGA
 R E L S L R R K S K E D P D R E A R
 CCG GAA ACT CAC TTG GAC GAG GAC GAG GAC GGA AAA AAG GAT AAA AGA AGT TCC
 P E T H L D E D E D G K K D K R S S
 AGA CCC AGG AGC CAG CCC AGA GAT CCA GCT GCC AAA CGG AGA CCC CAG GAA GCA
 R P R S Q P R D P A A K R R P Q E A
 GAG CCA GAG CAG GTA GCT CCC AGA GAC TCC GAG GAC AGA GAC GAG GAT GAG AGG
 E P E Q V A P R D S E D R D E D E R
 GAG GAG AAG AGA CGA AAA ACG ACA CGT TTA AAA CTG GAG TCA CAC ACC GTT CCC
 E E K R R K T T R L K L E S H T V P
 GTT CAG AGC AGA TCG GAG AGA AAA GCC GCT CCA AGC AAA AGT GTG ATC CCG AAG
 V Q S R S E R K A A P S K S V I P K
 ATC AAC TCA CCA AAG TGC CCC GAG TGT GGC CAG CAC CTA GAC GAC CCT AAC CTG
 I N S P K C P E C G Q H L D D P N L
 AAG TAC CAG CAG CAC CCT GAG GAT GCT GTG GAT GAA CCC CAG ATG TTG ACC AGT
 K Y Q Q H P E D A V D E P Q M L T S
 GAG AAA CTG TCC ATC TAC GAC TCC ACC TCG ACC TGG TTT GAT ACT TAT GAA GAT
 E K L S I Y D S T S T W F D T Y E D
 TCT CCC ATG CAT AGG TTC ACT TCC TTC AGT GTG TAC TGC AGT CGC GGG CAC CTG
 S P M H R F T S F S V Y C S R G H L

TGT CCT GTC GAC ACC GGT CTC ATT GAG AAG AAT GTA GAG CTC TAC TTT TCT GGG
 C P V D T G L I E K N V E L Y F S G
 TGT GCC AAA GCA ATT CAT GAC GAG AAT CCA TCT ATG GAA GGT GGT ATT AAT GGC
 C A K A I H D E N P S M E G G I N G
 AAA AAC CTC GGG CCA ATC AAT CAG TGG TGG CTC AGT GGC TTT GAT GGT GGC GAG
 K N L G P I N Q W W L S G F D G G E
 AAG GTG CTC ATT GGC TTC TCC ACT GCA TTT GCT GAA TAC ATT TTG ATG GAG CCC
 K V L I G F S T A F A E Y I L M E P
 AGC AAA GAG TAT GAG CCA ATA TTT GGG CTG ATG CAG GAG AAA ATT TAC ATC AGC
 S K E Y E P I F G L M Q E K I Y I S
 AAG ATT GTT GTT GAG TTC CTG CAA AAC AAT CCT GAT GCT GTA TAT GAA GAC CTG
 K I V V E F L Q N N P D A V Y E D L
 ATC AAT AAG ATT GAG ACC ACT GTT CCT CCT TCT ACC ATT AAT GTG AAC CGG TTC
 I N K I E T T V P P S T I N V N R F
 ACA GAG GAC TCC CTC TTA CGC CAC GCC CAG TTT GTA GTG AGC CAG GTA GAG AGT
 T E D S L L R H A Q F V V S Q V E S
 TAC GAC GAA CCC AAG GAC GAT GAT GAG ACC CCC ATC TTC TTG TCT CCC TGT ATG
 Y D L A K D D D E T P I F L S P C M
 AGA GCC CTG ATC CAT TTG GCT GGT GTC TCC CTG GGA CAG AGG CGA GCA ACA AGG
 R A L I H L A G V S L G Q R R A T R
 CGC GTC ATG GGT GCT ACC AAG GAG AAG GAC AAA GCA CCC ACG AAA GCC ACC ACC
 R V M G A T K E K D K A P T K A T T
 ACC AAG CTG GTC TAT CAG ATC TTT GAC ACT TTC TTC TCA GAG CAG ATT GAG AAG
 T K L V Y Q I F D T F F S E Q I E K
 TAT GAT AAG GAG GAC AAG GAG AAT GCC ATG AAG CGC CGC CGC TGT GGT GTC TGT
 Y D K E D K E N A M K R R R C G V C
 GAG GTC TGT CAG CAG CCT GAG TGT GGG AAG TGC AAG GCG TGC AAA GAT ATG GTG
 E V C Q Q P E C G K C K A C K D M V
 AAG TTT GGT GGC ACT GGA CGG AGT AAG CAG GCT TGC CTC AAG AGG AGG TGT CCT
 K F G G T G R S K Q A C L K R R C P
 AAC TTG GCG GTG AAG GAG GCA GAC GAC GAT GAA GAG GCT GAT GAT GAT GTG TCA
 N L A V K E A D D D E E A D D D V S
 GAG ATG CCA TCA CCC AAA AAG CTG CAT CAG GGG AAG AAG AAG AAG CAG AAC AAG
 E M P S P K K L H Q G K K K K Q N K
 GAC CGC ATC TCC TGG CTT GGG CAG CCT ATG AAG ATT GAA GAG AAT AGA ACT TAC
 D R I S W L G Q P M K I E E N R T Y
 TAT CAG AAG GTG AGC ATC GAT GAG GAG ATG CTA GAG TGG GCG ACT GGG TCT CGG
 Y Q K V S I D E E M L E W A T G S R

TCA TTT CCA GAT GAT TCC TCC AAA CCA CTC TAT CTA GCC AGG GTC ACA GCT CTG
S F P D D S S K P L Y L A R V T A L
TGG GAA GAC AAA AAT GGT CAG ATG ATG TTC CAT GCG CAC TGG TTC TGC GCT GGG
W E D K N G Q M M F H A H W F C A G
ACA GAC ACA GTC CTG GGA GCC ACC TCC GAC CCC CTG GAA CTG TTC CTG GTG GGC
T D T V L G A T S D P L E L F L V G
GAG TGC GAA AAC ATG CAG CTT TCC TAC ATC CAC AGC AAG GTC AAG GTC ATC TAC
E C E N M Q L S Y I H S K V K V I Y
AAA GCC CCT TCT GAA AAC TGG GCC ATG GAG GGA GGC ACA GAC CCT GAG ACC ACA
K A P S E N W A M E G G T D P E T T
CTG CCT GGG GCT GAG GAT GGC AAG ACT TAC TTC TTC CAG CTC TGG TAC AAC CAG
L P G A E D G K T Y F F Q L W Y N Q
GAG TAC GCA AGG TTT GAA TCC CCA CCC AAG ACC CAG CCG ACC GAG GAC AAC AAG
E Y A R F E S P P K T Q P T E D N K
CAC AAG TTC TGC CTA TCT TGT ATC CGG CTG GCT GAG CTG AGA CAA AAA GAG ATG
H K F C L S C I R L A E L R Q K E M
CCC AAG GTC CTG GAA CAA ATT GAG GAG GTG GAT GGC CGG GTC TAC TGC AGT TCC
P K V L E Q I E E V D G R V Y C S S
ATC ACC AAG AAT GGT GTT GTC TAC CGA CTG GGT GAC AGT GTG TAC CTT CCT CCC
I T K N G V V Y R L G D S V Y L P P
GAG GCC TTT ACT TTC AAC ATC AAA GTG GCT AGC CCC GTG AAA CGC CCA AAG AAG
E A F T F N I K V A S P V K R P K K
GAT CCT GTG AAC GAG ACC CTG TAC CCT GAG CAC TAC CGC AAG TAT TCT GAC TAC
D P V N E T L Y P E H Y R K Y S D Y
ATC AAG GGG AGC AAC CTG GAT GCT CCA GAG CCC TAT CGC ATC GGT CGG ATA AAA
I K G S N L D A P E P Y R I G R I K
GAG ATC CAC TGT GGC AAG AAG AAA GGC AAG GTC AAC GAG GCA GAC ATC AAG CTG
E I H C G K K K G K V N E A D I K L
AGG CTC TAC AAG TTC TAC AGG CCT GAG AAT ACC CAC AGG TCC TAC AAC GGA TCC
R L Y K F Y R P E N T H R S Y N G S
TAT CAC ACT GAC ATC AAC ATG CTT TAC TGG AGC GAC GAG GAA GCT GTG CTG AAC
Y H F D I N M L Y W S D E E A V V I
TTC AGC GAC GTG CAG GGC CGC TGT ACC GTG GAG TAC GGG GAA GAC CTA CTT GAG
F S D V Q G R C T V E Y G E D L L E
AGC ATC CAG GAT TAT TCA CAA GGG GGC CCT GAC CGC TTC TAC TTC CTC GAG GCC
S I Q D Y S Q G G P D R F Y F L E A
TAC AAT TCA AAG ACC AAG AAC TTT GAA GAC CCA CCA AAC CAT GCC CGC AGC CCT
Y N S K T K N F E D P P N H A R S P

GGG AAC AAA GGG AAA GGG AAG GGG AAA GGG AAG GGG AAG GGG AAG CAT CAG GTG
 G N K G K G K G K G K G K G K H Q V
 TCA GAG CCC AAA GAG CCT GAG GCA GCC ATC AAA CTG CCC AAG CTC CGG ACC CTG
 S E P K E P E A A I K L P K L R T L
 GAT GTG TTT TCC GGC TGT GGA GGG TTA TCG GAA GGA TTC CAC CAA GCA GGC ATC
D V F S G C G G L S E G F H Q A G I
 TCG GAA ACG CTG TGG GCC ATC GAG ATG TGG GAC CCG GCA GCC CAG GCA TTT CGG
 S E T L W A I E M W D P A A Q A F R
 CTG AAC AAC CCC GGC ACC ACA GTG TTC ACA GAG GAC TGC AAC GTG CTT CTT AAG
 L N N P G T T V F T E D C N V I L L K
 CTG GTC ATG GCT GGG GAG GTG ACC AAC TCT GTG GGC CAA AGG CTG CCA CAG AAG
 L V M A G E V T N S V G Q R L P Q K
 GGC GAT GTG GAG ATG CTG TGT GGT GGG CCA CCC TGC CAG GGC TTC AGT GGC ATG
G D V E M L C G G P P C Q G F S G M
 AAC CGC TTC ACA CTC CCG CAC TTA TCT CCA AGT TCA AAG AAC TCC CTA GTG GTC
N R F T L P H L S P S S K N S L V V
 TCC TTC CTC AGC TAC TGT GAC TAC TAC CGG CCT CGG TTC TTC CTT CTG GAG AAC
 S F L S Y C D Y Y R P R F F L L E N
 GTC AGG AAC TTC GTG TCC TAC AGA CGC TCC ATG GTG CTG AAG CTC ACA CTG CGC
 V R N F V S Y R R S M V L K L T L R
 TGC CTG GTC CGC ATG GGC TAC CAG TGC ACC TTT GGT GTG CTC CAG GCT GGA CAG
 C L V R M G Y Q C T F G V L Q A G Q
 TAT GGC GTG GCC CAG ACA CGA AGG AGG GCC ATC ATC TTG GCT GCA GCC CCA GGA
 Y G V A Q T R R R A I I L A A A P G
 GAA AAG CTG CCT CTG TTC CCA GAG CCT CTG CAT GTG TTT GCG CCC CGT GCC TGC
 E K L P L F P E P L H V F A P R A C
 CAG CTG AGC GTT GTG GTG GAT GAC AAG AAG TTT GTT AGC AAC ATA ACG AGG CTG
 Q L S V V V D D K K F V S N I T R L
 AGC TCG GGG CCC TTC CGA ACC ATC ACC GTG CGA GAC ACC ATG TCT GAC CTC CCC
 S S G P F R T I T V R D T M S D L P
 GAG ATC CAG AAT GGA GCC TCG AAT TCT GAG ATC CCC TAC AAT GGA GAG CCA CTG
 E I Q N G A S N S E I P Y N G E P L
 TCC TGG TTC CAG AGG CAG CTG CGA GGA TCA CAG TAC CAG CCC ATC CTT CAG GGA
 S W F Q R Q L R G S Q Y Q P I L Q G
 CCG GCT CTG CAA GGA CAT GGC CCA CTG GTG GCT GCC CGC ATG CCG CAC ATC CCA
 P A L C G H G P L V A A R M P H I P
 CTG TTC CCA GGA TCA GAT TGG CGT GAC CTG CCC AAC ATA CAG GTG CGG CTG GGA
 L F P G S D W R D L P N I Q V R L G

SAM

binding site

active site

GAT GGC GTC ATA GCC CAT AAG CTA CAG TAC ACC TTT CAT GAT GTG AAA AAT GGT
 D G V I A H K L Q Y T F H D V K N G
 TAC AGC AGC ACC GGT GCC CTG CGT GGA GTC TGT TCC TGT GCA GAA GGC AAG GCT
 Y S S T G A L R G V C S C A E G K A
 TGC GAC CCT GAG TCC AGG CAA TTC AGC ACC CTC ATC CCC TGG TGC CTG CCG CAC
 C D P E S R Q F S T L I P W C L P H
 ACT GGG AAC CGG CAC AAC CAC TGG GCT GGC TTC TAC GGG CGT CTG GAG TGG GAT
 T G N R H N H W A G F Y G R L E W D
 GGT TTC TTC AGC ACC ACT GTC ACC AAC CCT GAG CCC ATG GGC AAG CAG GGT CGG
 G F F S T T V T N P E P M G K Q G R
 GTG CTC CAC CCG GAG CAG CAC CGG GTC GTG AGT GTT CGG GAA TGT GCC CGC TCC
 V L H P E Q H R V V S V R E C A R S
 CAG GGC TTT CCA GAT AGC TAC CGG TTG TTC GGC AAC ATC CTG GAC AGA CAC CGG
 Q G F P D S Y R L F G N I L D R H R
 CAG GTG GGT AAT GCT GTG CCA CCA CCC CTG GCC AAA GCC ATT GGC CTG GAG ATT
 Q V G N A V P P P L A K A I G L E I
 AAG CTC TGC CTG CTG TCC AGT GCT CGG GAG AGC GCA TCA GCT GCA GTT AAA GCA
 K L C L L S S A R E S A S A A V K A
 AAA GAG GAG GCT GCT ACC AAG GAA 3'
 K E E A A T K E

Figure 28 Identification of several functional domains based on homology with other known sequences in the inferred amino acid sequence of rice DNA MTase cDNA.

MADSNRSPRSRPKPRGPRRSKSDSDTLFETSPSSVATRRTTRQTTITAHFTKGPTKRKPKE
 ESEEGNSAESAAEERDQDKKRRVVDTESGAAA AVEKLEEV TAGTQLGPEEPCEQEDDN
 RSLRRHTRELSLRRKSKEDPDREARPETHLDEDEDGKKDKRSSRPRSQPRDPAKRRPQE
 AEPEQVAPRDSERDEDEREEKRRKTTRLKLESHTVPVQSRSEKAAPSKSVIPKINSPKC
 PECGQHLLDDPNLKYQQHPEDA VDEPQMLTSEKLSIYDSTSTWFDTYEDSPMHRFTSFSVY
 CSRGHLCPVDTGLIEKNVELYFSGCAKAHNDENPSMEGGINGKNLGPINQWWLSGFDGGE
 KVLIGFSTAF AEYILMEPSKEYEPIFGLMQEKIYISKIVVEFLQNNPDAVYEDLINKIETT VPP
 STINVNRFTEDSLLRHAQFVVSQVESYDEAKDDDETPIFLSPCMRALIHLAGVSLGQRRAT
 RRVMGATKEKDKAPTKATTTKL VYQIFD TFFSEQIEKYDKEDKENAMKRRRCGVCEVCQ
 QPEC GKCKACKDMVKFGGTGRSKQACLKRRCPNLAVKEADDDEEADDDVSEMPSPKKL
 HQGKKKKQNKDRISWLQQPMKIEENRTYYQKVSIDEEMLEWATGSRSPDDSSKPLYLAR
 VTALWEDKNGQMMFHAHWFCAGTDTVLGATSDPLELFLVGECEENMQLSYHISKVKVIYK
 APSENWAMEGGTDPETTLPGAEDGKTYFFQLWYNQEYARFESPPKTQPTEDNKHKFCCLSC
 IRLAELRQKEMPKVLEQIEEVDGRVYCSSITKNGVVYRLGDSVYLPPEAFTFNIVASPVKR
 PKKDPVNETLYPEHYRKYS DYIKGSNLDAPEPYRIGRIKEIHC GKKGKGVNEADIKRLRYKF
 YRPENTHRSYNGSYHTDINMLYWSDEEAVVNFSVDVQGRCTVEYGEDLLESIQDYSQGGPD
 RFYFLEAYNSKTKNFEDPPNHARSPGN KGKGKKGKKGKKGKHQVSEPKEPEAAIKLPK LRT
I (SAM binding site)
LDVFSGCGGLSEGFGHQAGISETLWAIEMWDPAQAFLNNPGTTVFTEDCNVLLKLVMAG
IV (Active site)
 EVTNSVGQRLP QKGDVEMLCGGPPCQGFSGMNRFTLPHLSPPSKNSLVVSFLSYCDYY RPR
VI FFLENVNRNFVS YRRSMVLKLT LRCLVRMGYQCTFG VII VLQAGQYGVAQTRRRRAJLAAAPGE
 KLPLFPPEPLHVFAPRACQLSVVVDKKFVSNITRLSSGPFRITITVRDTMSDLPEIQNGASNSEI
 PYNGEPLSWFQRQLRGSQYQPILQGPALQGHGPLVAARMPHIPLFPGSDWRDLPNIQVRLGD
 GVIAHKLQYTFHDVKNGYSSTGALRGVCSCAEGKACDPESRQFSTLIPWCLPHTGNRHNHW
IX
 AGFYGRLEWDGFFSTTVTNPEPMGKQGRVLHPEQ HRVVSVRECAR SQGFPSYRLFGNILD
X
RHRQVGNAVPPPLAKAIGLEIKLCLSSARESASAAVKAKEEAATKE

Landmark on the rice C-5 MTase primary structure. Several functional domains base on homology with other known sequences have been identified.

Figure 29 Alignment of the conserved motifs of known plant DNA MTase cDNA with rice DNA MTase cDNA

		I			IV
Rice		LRITLDVFSGCCGLSEGFHQAGI	Rice		QKGGIVEMLCGGPPCQGFSGMNRHT
Maize		LAITLDIFAGCGGLSEGLQQAGV	Maize		VPGIEVEFINGGPPCQGFSGMNRFN
Carrot 1		LATLDIFAGCGGLSEGLQKSGV	Carrot 1		IPGQVDFINGGPPCQGFSGMNRFN
Carrot 2		LATLDIFAGCGGLSEGLQQSGV	Carrot 2		IPGQVDFINGGPPCQGFSGMNRFN
Tomato		LSTLDIFAGCGGLSEGLQHSGV	Tomato		IPGQVDFINGGPPCQGFSGMNRFN
Pea		LATLDIFAGCGALSEGLHKSGA	Pea		IPGQVDFINGGPPCQGFSGMNRFN
Arabidopsis		LATLDIFAGCGGLSHGLKKAGV	Arabidopsis		PLPQVDFINGGPPCQGFSGMNRFN
		VI			VIII
Rice		RPRFFLLENVRNFVSYRR	Rice		VLQAGQYGVAAQTRRAIILAA
Maize		RPRFFLLENVRNFVSFNK	Maize		ILEAGAFGVAQSRKRAFTWAA
Carrot 1		RPKYFLLNVRTFVSFNK	Carrot 1		ILEAGAYGV PQSRKRAFTWAA
Carrot 2		RPKYFLLNVRFVSFNK	Carrot 2		ILEAGAFGV PQSRKRAFTWAA
Tomato		RPKFLLNVRFVSFNQ	Tomato		ILEAGAYGV PQSRKRAFTWAG
Pea		RPRYFLLNVRFVSFNK	Pea		ILEAGAFGV SQSRKRAFTWAA
Arabidopsis		RPRYFLLNVRTFVSFNK	Arabidopsis		ILEAGAYGV SQSRKRAFTWAA
		IX			X
Rice		HRVMSVRECAR SQGFPSY	Rice		DRHRQVGNVPPPLAKAIGLEIKLC
Maize		DRITTVRECAR SQGFPSY	Maize		NKHRQIGNAVPPPLAYALGRKLKEA
Carrot 1		HRITTVRECAR SQGFPSY	Carrot 1		HKHQQIGNAVPPPLAYALGMKLKEA
Carrot 2		DRITTVRECAR SQGFPSY	Carrot 2		HKHRQIGNAVPPPLAYALGRKLKEA
Tomato		DRITTVRECAR SQGFPSY	Tomato		HKHRQIGNAVPPPLAYALGRKLKEA
Pea		DRITTVRECAR SQGFPSY	Pea		HKHRQIGNAVPPPLAFALGRKLKEA
Arabidopsis		HRITTVRECAR SQGFPSY	Arabidopsis		HKHRQIGNAVPPPLAFALGRKLKEA

Alignment of the conserved motifs of plant C-5 methyltransferase

4) การศึกษาการแสดงออกของยีน DNA MTase ในข้าว

4.1) การตรวจสอบยีน DNA MTase ใน genome ของข้าว

ผลการทำ Southern blot hybridization ของ rice genomic DNA ซึ่งถูก digest ด้วย *BamHI* และ *HindIII* กับ probe 4.7 kbp fragment ของ rice DNA MTase cDNA ดังแสดงใน Figure 30 ซึ่งให้เห็นว่า ยีน DNA MTase ใน genome ของข้าว อาจมีเพียง copy เดียว ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการพบยีนนี้ในถั่ว (23)

4.2) ศึกษาการแสดงออกของยีน DNA MTase

ใน different developmental stage และ tissue specific ในข้าว

ผู้วิจัยทำการศึกษาการแสดงออกของยีน DNA MTase ในขั้นตอนต่างๆ ระหว่างการพัฒนาของต้นข้าว โดย Northern blot hybridization ดังแสดงผลใน Figure 31 พบว่า ไม่มีการแสดงออกของยีนนี้ใน dry embryo แต่เมื่อเมล็ดข้าวถูกแช่น้ำเริ่มการ germination จะมีการแสดงออกของ DNA MTase เพิ่มขึ้น จนกระทั่งสูงสุดที่ seedling อายุ 10 วัน แล้วมีการแสดงออกที่ค่อนข้างคงที่ จนถึง mature plant นอกจากนั้นผลการศึกษาการแสดงออกของยีน DNA MTase ในเนื้อเยื่อใบเปรียบเทียบกับรากที่อายุ 10 วัน ดังแสดงใน Figure 32 ก็ชี้ให้เห็นว่า ในรากมีการแสดงออกของยีน DNA MTase น้อยกว่าในใบข้าว ซึ่งเมื่อพิจารณาประกอบกับข้อมูลระดับ methylated cytosine ใน genome และ DNA MTase enzyme activity ที่ได้ศึกษาในเบื้องต้นในหัวข้อ 1.2 และ 1.3 แล้ว ผลการทดลองนับว่าสอดคล้องกัน

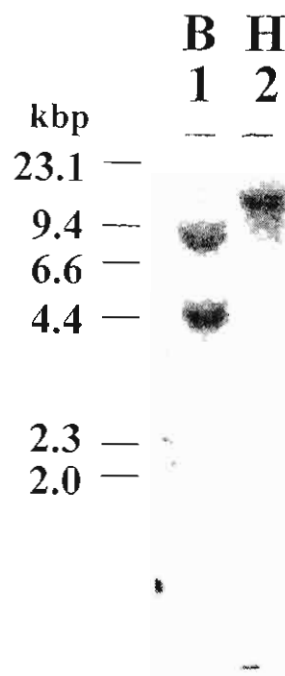


Figure 30 Southern blot hybridization of rice genomic DNA digested with *Bam*HI (lane1) and *Hind*III (lane2), and probed with 4.7 kbp *Eco*RI-*Eco*RV fragment of rice DNA MTase cDNA

Figure 31 Developmental specific DNA MTase gene expression in rice.

Aliquots of 10 μ g of total RNA isolated from different developmental stages were electrophoresed in a formaldehyde-agarose gel. The RNA was transferred and fixed to a hybond membrane and probed with 4.7 kbp *EcoRI-EcoRV* fragment of rice DNA MTase cDNA. Lane1: dry embryo (D), Lane2 and 3: 1 and 3-day-germinated embryo, Lane 4-7: 7, 10, 14 and 30-day-old-seedling, respectively.

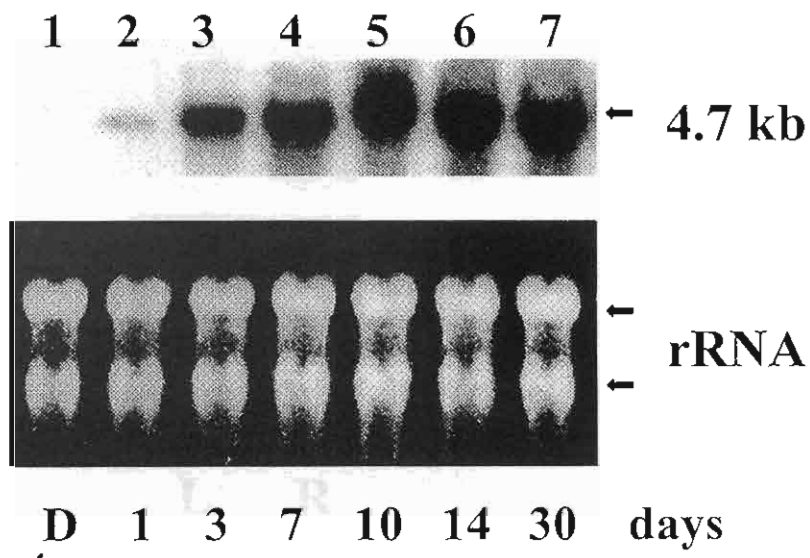
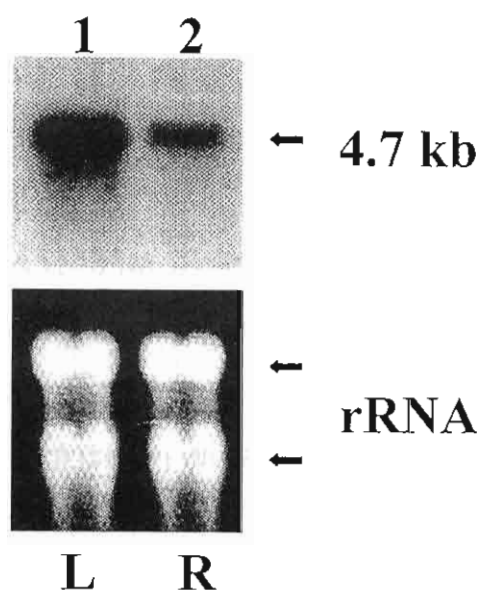


Figure 32 Tissue specific DNA MTase gene expression in rice.

Aliquots of 10 μ g of total RNA isolated from different tissues were electrophoresed in a formaldehyde-agarose gel. The RNA was transferred and fixed to a hybond membrane and probed with 4.7 kbp *EcoRI-EcoRV* fragment of rice DNA MTase cDNA. Lane1: leaf tissues (L), and Lane2: root tissues (R).



การศึกษากลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนในพืชมีความจำเป็น และเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการนำมาประยุกต์ใช้เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติต่างๆของพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นเป็นกลไกที่สามารถควบคุมการแสดงออกของยีนในขั้นตอนเริ่มต้น และมีรายงานว่า มีผล กระทบอย่างมากต่อการกีดกันการแสดงออกของยีนและความเสถียรของยีนในสิ่งมีชีวิตที่ผ่านกระบวนการถ่ายยีน แม้ดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นจะถูกพบในจีโนมของพืชทุกชนิด แต่ข้อมูลการศึกษาบทบาทของดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นในพืชยังมีอยู่น้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น จากการที่ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของดีเอ็นเอเมทิล-เลชั่นในพืชอย่างต่อเนื่องมานานกว่า 8 ปี ทำให้ผู้วิจัยเห็นความสำคัญและสนใจงานวิจัยที่จะนำไปสู่ความรู้พื้นฐานระดับเอนไซม์ในกระบวนการเกิดเมทิลเลชั่นของดีเอ็นเอในพืช

สำหรับโครงการวิจัยนี้ผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ที่จะมุ่งเน้นการศึกษาข้อมูลเกี่ยวกับกระบวนการเกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชั่นในข้าวไทย (*Oryza sativa* ssp. Indica) โดยจะทำการสกัดและแยกเอนไซม์ดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรส (DNA MTase) ให้บริสุทธิ์ เพื่อนำมาศึกษาชนิดและคุณสมบัติจำเพาะต่างๆ ของเอนไซม์ และจะทำการแยกยีน DNA MTase ดังกล่าวมาวิเคราะห์ลำดับเบส ศึกษาการแสดงออก และการควบคุมด้วย

การดำเนินงานวิจัยของโครงการนี้ในช่วง 3 ปี (1 กันยายน 2538 - 31 สิงหาคม 2541) ผู้วิจัยเริ่มต้นจากการพัฒนาวิธีเหมาะสมในการตรวจสอบ activity ของ DNA MTase จากต้นข้าว เมื่อทำการตรวจสอบ activity ของ DNA MTase ในต้นข้าวที่เจริญเติบโตในสภาวะต่างๆกันและอายุต่างๆกัน พบว่ายอดอ่อนของข้าวที่ปลูกแบบ hydroponic อายุ 10 วัน มี specific activity ของ DNA MTase สูงที่สุดจึงเลือกใช้ป็น material ในการสกัดแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ต่อไป จากการศึกษา location ของ DNA MTase ใน compartment ต่างๆ ของเซลล์ข้าวพบว่า nuclei fraction มี specific activity ของ DNA MTase สูงสุด โดยที่ plastid fraction จาก non-photosynthetic tissue มี specific activity ต่ำ ต่อ nuclear DNA ต่ำ (แต่มี specific activity ต่อ plastid DNA ก่อน

ข้างสูง) และไม่พบ DNA MTase activity ใน mitochondrial fraction ซึ่งงานวิจัยนี้จะมุ่งเน้นศึกษา nuclear DNA MTase และโดยที่ DNA MTase มีความเสถียรต่ำมาก จึงต้องศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์ในระหว่างขั้นตอนการสกัด จากการศึกษานี้ทำให้สามารถพัฒนาส่วนประกอบของ บัพเฟอร์หลักที่เหมาะสมสำหรับใช้ในขั้นตอนการสกัดเอนไซม์ได้ ในการสกัดแยกเอนไซม์นี้จากยอดอ่อนของข้าว หากเริ่มต้นที่ homogenate แล้วทำให้บริสุทธิ์โดยผ่าน chromatography ชนิดต่างๆ จะสามารถแยกเอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์ขึ้นเพียง 37 เท่า ผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธีการเตรียม nuclei extract จนได้ nuclei extract fraction เริ่มต้นที่มี specific activity ของ DNA MTase ค่อนข้างสูง ซึ่งเมื่อผ่าน chromatography ชนิดต่างๆ พบว่าสามารถแยกเอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นถึง 800 เท่า และ recovery ได้ 95% rice DNA MTase บริสุทธิ์ที่แยกได้มีขนาดประมาณ 130 kDa เมื่อตรวจสอบด้วย Gel filtration chromatography และ Native-PAGE และพบว่ามีความบริสุทธิ์ 55 kDa เมื่อตรวจสอบด้วย SDS-PAGE rice DNA MTase บริสุทธิ์ที่แยกได้นี้สามารถถูกจับด้วย antibody ของเอนไซม์นี้จากข้าวสาลี

ในการศึกษา substrate specificity ของ rice DNA MTase บริสุทธิ์ที่แยกได้ พบว่า เอนไซม์ที่แยกได้เป็น maintenance cytosine DNA MTase ซึ่งมีความจำเพาะกับ hemi-methylated DNA substrate สูง สามารถ methylate DNA substrate ใน *in vitro* ได้ดีขึ้นกว่าใน *in vivo* โดย eukaryotic DNA methylation inhibitor (S-adenosylhomocysteine และ DL-ethionine) และ de-methylating agent (5-azacytosine และ ⁶N-benzyladenine) สามารถ inhibit activity ของ rice DNA MTase ได้ จากการศึกษาผลของ salt ชนิดต่าง ๆ (NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂, Spermidine และ Spermine) ที่มีต่อ activity ของ DNA MTase พบว่า activity ของ rice DNA MTase ลดลงเมื่อเติม salt rice DNA MTase ไม่ต้องการ co-factor ใด ๆ และการใส่ dithiothreitol และ EDTA ใน assay buffer จะช่วยให้เอนไซม์ทำงานได้ปกติดีขึ้น rice DNA MTase มี optimal pH ในช่วง 7.6-8.0 และ optimal temperature ที่ 25°C ไม่ stable และ ไม่มี demethylating activity มีค่า Km ต่อ rice DNA substrate = 50

$\mu\text{g/ml}$, Km ต่อ synthetic hemi-methylated DNA substrate = $16.67 \mu\text{g/ml}$ และ Km ต่อ S-adenosylmethionine (methyl donor) = $2.63 \mu\text{M}$

ผู้วิจัยทำการ clone cDNA ของ rice DNA MTase โดยเตรียม rice cDNA library จาก poly A-mRNA ของยอดอ่อนของข้าวอายุ 10 วันซึ่งมี specific activity ของเอนไซม์ DNA MTase สูงสุด ทำการ screen หา putative cDNA clone ของ rice DNA MTase จาก cDNA library ที่เตรียมได้ โดยวิธี Plaque hybridization ด้วย 0.3 kbp fragment ของ PCR product ของ clone pPM1 ที่เตรียมได้จากการทำ PCR โดยใช้ primer ที่ design จาก specific และ conserved region ของ *Arabidopsis* DNA MTase cDNA ปรากฏว่า จากการ screen 1×10^6 pfu พบ 3 positive clones เมื่อทำการตรวจสอบขนาดของ insert ปรากฏว่าพบ insert ที่มีขนาดประมาณ 4.7 kbp อยู่เพียง 1 clone เท่านั้น จึงตั้งชื่อว่า pRM1 (rice DNA MTase clone #1) ผู้วิจัยทำการวิเคราะห์ ลำดับเบสของ putative cloned cDNA ของ rice DNA MTase ใน pRM1 โดยวิธี primer walk sequencing ทำให้ได้ข้อมูล sequence แบบ full length ครบ 4.7 kbp Total nucleotide sequence ที่ clone ได้ คือ 4,712 nucleotides โดย open reading frame (translation region) เป็น 4,506 nucleotides และ inferred amino acid sequence 1,502 amino acids ผลการวิเคราะห์ functional domains ของ rice DNA MTase inferred amino acid sequence เมื่อเปรียบเทียบกับ known sequence พบว่า rice DNA MTase amino acid sequence มี linker (GKKKGKVN) ซึ่งเป็นจุดแบ่ง N-terminal region กับ C-terminal region พบ Lys-Gly repeats (KGKGKGKGKGKGK), conserved motif I (SAM binding site), conserved motif IV (Active site), conserved motif VI, VIII, IX และ X ในบริเวณ C-terminal region เมื่อทำ alignment ส่วน conserved motifs ของ rice DNA MTase amino acid sequence เปรียบเทียบกับ known DNA MTase amino acid sequence ของพืชอื่น พบว่า DNA MTase amino acid sequence ส่วน conserved motifs ของ ข้าว ข้าวโพด แครอท มะเขือเทศ ถั่ว และ *Arabidopsis* มี identity สูง ผลการทำ Southern blot hybridization ของ rice genomic DNA ชี้ให้เห็นว่า ยีน DNA MTase ใน genome ของข้าว อาจมีเพียง copy เดียว จากการศึกษากการแสดงออกของยีน DNA MTase ในขั้นตอนต่างๆระหว่างการพัฒนาของ

ต้นข้าว โดย Northern blot hybridization พบว่าไม่มีการแสดงออกของยีนนี้ใน dry embryo แต่เมื่อเมล็ดข้าวถูกแช่น้ำเริ่มการ germination จะมีการแสดงออกของ DNA MTase เพิ่มขึ้น จนกระทั่งสูงสุดที่ seedling อายุ 10 วัน แล้วมีการแสดงออกที่ค่อนข้างคงที่ จนถึง mature plant นอกจากนั้นผลการศึกษาการแสดงออกของยีน DNA MTase ในเนื้อเยื่อใบ เปรียบเทียบกับรากที่อายุ 10 วัน ก็ชี้ให้เห็นว่า ในรากมีการแสดงออกของยีน DNA MTase น้อยกว่าในใบข้าว ซึ่งเมื่อพิจารณาประกอบกับข้อมูลระดับ methylated cytosine ใน genome และ DNA MTase enzyme activity ที่ได้ศึกษาในเบื้องต้นแล้ว ผลการทดลองนับว่าสอดคล้องกัน

คาดว่าข้อมูลพื้นฐานต่างๆเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ทำให้สามารถเข้าใจกลไกการควบคุมและการทำงานของเอนไซม์ตลอดขบวนการ development ในระยะต่างๆ ของพืชได้มากและดียิ่งขึ้น เอนไซม์และยีนที่แยกได้จะมีประโยชน์ในการศึกษาบทบาทของดีเอ็นเอเมทิลเลชันในพืชได้อย่างลึกซึ้งขึ้น และนอกจากนี้ในปัจจุบันมีรายงานว่ากลไกของดีเอ็นเอเมทิลเลชันมีผลกระทบอย่างมากต่อการควบคุมการแสดงออกของยีน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืชที่ผ่านกระบวนการถ่ายยีน ทำให้นักวิทยาศาสตร์ส่วนหนึ่งเริ่มให้ความสนใจศึกษาเรื่องนี้อย่างจริงจัง ดังนั้นการทำงานวิจัยเรื่องนี้อย่างต่อเนื่องในประเทศไทย จึงมีความสำคัญไม่เฉพาะแต่การเข้าใจถึงความรู้พื้นฐานของกลไกในระบบเมทิลเลชันของดีเอ็นเอในพืชเท่านั้น แต่ยังหมายถึงโอกาสที่จะนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้อย่างมากมายในอนาคตอันใกล้ และสามารถเข้าไปมีส่วนช่วยพัฒนาประสิทธิภาพของการถ่ายยีนที่กำลังเริ่มเป็นที่สนใจมากในวงการพันธุวิศวกรรมของพืช

1. Shen, J.C., Rideovl, W.M. and Jones P.A. (1992) Cell 71 : 1073-1080.
2. Adams, R.L.P., and Burben, R.H. (1985) Molecular biology of DNA methylation. (New York : Springer- Verlag) 247 pp.
3. Cedar, H. (1988) Cell 53 : 3-4.
4. Ngernprasirtsiri, J., Macherel, D., Kobayashi, H., and Akazawa, T. (1988) Plant Physiol. 86 : 137-142.
5. Ngernaprasirtsiri. J., Kobayashi, H., and Akazawa, T. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 :4750-4754.
6. Ngernparsirtsiri, J., Kobayashi, H., and Akazawa, T. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci.USA 86 : 7919-7923.
7. Ngernprasirtsiri, J., Kobayashi, H., and Akazawa, T (1990) Cell Structure and Function 15 : 273-283.
8. Ngernprasirtsiri, J., Kobayashi, H., and Akazawa, T. (1990) Cell Structure and Function 15 : 299-307.
9. Ngernprasirtsiri, J., Kobayashi, H., and Akazawa, T. (1988) Plant Physiol. 88 : 16-20.
10. Kobayashi, H., Ngernprasirtsiri, J., and Akazawa, T. (1990) EMBO J. 9 : 307-313.
11. Ngernprasirtsiri, J., Chollet, R., Kobayashi, H., Sugiyama, T., and Akazawa, T. (1989) J. Biol. Chem. 264 : 8241-8248.
12. Martin, C., Prescott, A., Lister, C., and Mackey, S. (1989) EMBO J. 8 :997-1004.
13. Scheid, O.M., Paszkowski, J., Potrykus, I. (1991) Mol. Gen. Genet. 228: 104-112.
14. Ngernprasirtsiri, J., and Akazawa, T, (1990) Eur. J. Biochem, 194 : 513-520.

15. Noyer-Weidner, M., and Trautner, T. (1993) DNA methylation. In :
Molecular Biology and Biological significance. J.P. Jost and H.P.
Saluz eds. (Birkhauser Verlag, Basel/Switzerland) pp. 39-108.
16. Kalousek, F., and Morri, N.R. (1969) Science 164: 721-722.
17. Sano, H., Garbowy, C. and Sager, R. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci.
USA. 78: 3118-3122.
18. Sano, H., and Sager, R. (1980) Eur. J. Biochem. 105: 471-480.
19. Theiss, G., Schleicher, R., Schimpff-Weiland, G., and Follmann, H.
(1987) Eur. J. Biochem. 167: 89-96.
20. Yesufu, H.M.L., Hanley, A., Rinaldi, A., and Adams, R.P.L. (1991)
Biochem. J. 273: 469-475.
21. Finnegan, E.J., and Dennis, E.S. (1993) Nucl. Acids. Res. 21: 2383-
2388.
22. Scheidt, G., Weber, H., Graessmann, M., and Graessmann, A. (1994)
Nucl. Acids Res. 22: 953-958.
23. Pradhan, S., Cummings, M., Roberts, R.J. and Adams, R.L.P. (1998)
Nucl. Acids Res. 26: 1214-1222.
24. Bernacchia, G., Para, A., Pedrali-Noy, G., and Cella, R. (1998) Plant
Physiol. 116: 446.
25. Bernacchia, G., Primo, A., Giorgetti, L., Pitto, L. and Cella, R. (1998)
Plant J. 13 (3): 317-330.
26. HersHKovitz, M., Gruenbaum, y., Zakai, N., and Yoyter, A. (1989)
FEBS Lett. 256 : 167-172
27. Rogers, S.W, and Rogers, J.C (1992) Plant Mol. Biol. 18 : 945-961

Output ที่ได้จากโครงการวิจัย

Output Award

ผู้วิจัยได้รับรางวัล The Ciba Foundation Symposium Bursary
for Promising Young Scientists 1997

จาก The Ciba Foundation, London, UK

ในการประชุม symposium No.214 : EPIGENETIC ที่ London, UK

ในการบรรยาย เรื่อง ‘An Investigation into Rice DNA Methylation’

Output Publications

1. *Kanjanavechakul P., and Narangajavana J. N.* Purification and properties of rice DNA methyltransferase.

Plant Mol. Biol. (1998) submitted

2. *Wiriyawutikorn N., and Narangajavana J. N.* Isolation and characterization of the putative cDNA encoding cytosine DNA methyltransferase from rice (*Oryza sativa*).

Plant Mol. Biol. (1998) in preparation to be submitted

Output Proceedings

1. **Kanjanavechakul, P., Prisananuntakul, A., and Narangajavana J.N.**

“Rice DNA methylation and DNA methyltransferase.” *In.: Proceeding of the Second Thai-French Symposium on Plant Molecular Biology. Bordeaux, France (October 6-10, 1996) pp. 26 - 35.*

2. **Kanjanavechakul, P., and Narangajavana, J.N.** “Purification and properties of rice DNA methyltransferase.” *In Proceedings of the Third Asia-Pacific Conference on Agricultural Biotechnology. Prachuab Kirikhun, Thailand (November 10-15, 1996) pp. 331 - 334 .*

รายงานการเงินตลอดโครงการ 3 ปี

ชื่อโครงการ การศึกษาเอนไซม์และยีนดีเอ็นเอเมทิลทรานสเฟอเรสในกระบวนการ
เกิดดีเอ็นเอเมทิลเลชันในข้าวไทย

ผู้วิจัย ผศ. ดร. จริญญา ณรงค์ชวณะ

หน่วยงาน ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย 3 ปี (1 กันยายน 2538 - 31 สิงหาคม 2541)

งบประมาณจาก สกว.

ปีที่ 1 (2538)	360,000	บาท
ปีที่ 2 (2539)	360,000	บาท
ปีที่ 3 (2540)	270,000	บาท (งวด 1)
	90,000	บาท (งวด 2) (ยังไม่ได้รับ)
งบประมาณรวม	1,080,000	บาท
รับแล้ว	990,000	บาท
รับดอกเบี้ยรวม	21,032.55	บาท
รวมรับ	1,011,032.55	บาท
รวมจ่าย	1,010,791.14	บาท
เหลือ	241.41	บาท

งบประมาณสมทบจาก คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ปีที่ 1 (2538)	120,000	บาท
ปีที่ 2 (2539)	120,000	บาท
ปีที่ 3 (2540)	120,000	บาท
รวมรับ	360,000	บาท
รวมจ่าย	361,424.34	บาท
เบิกเกิน	-1,424.34	บาท

รายงานการเงินแบ่งเป็น 6 งวด ดังรายละเอียดต่อไปนี้:

รายงานการเงิน

(งวดที่ 1: 1 กันยายน 2538-28 กุมภาพันธ์ 2539)

<u>รายรับ</u> เงินปีที่ 1 จาก สกว. 360,000.00 บาท ดอกเบี้ย(ก.ย.-ธ.ค.38) 4,326.16 บาท รวมรับ 364,326.16 บาท	<u>รายรับ</u> จากคณะวิทยาศาสตร์ 120,000.00 บาท มหาวิทยาลัยมหิดล รวมรับ 120,000.00 บาท
<u>รายจ่าย</u> 1. ค่าจ้าง 40,000.00 บาท (ค่าจ้างผู้ช่วยวิจัย) 2. ค่าตอบแทนเมธีวิจัย 90,000.00 บาท (15,000 บาทx6 เดือน) (ก.ย. 38- ก.พ. 39) 3. ค่าใช้สอย ค่าล้าง- 8,840.50 บาท อัดภาพ ค่าถ่าย เอกสาร ค่าไปรษณีย์, โทรสาร ค่าตรวจวัดฟิล์มรังสี) 4. ค่าวัสดุ (ค่าวัสดุอุปกรณ์ 74,089.70 บาท สำหรับปฏิบัติการ, ค่าสารเคมีต่างๆ) รวมจ่าย 176,930.20 บาท คงเหลือ 187,395.96 บาท	<u>รายจ่าย</u> 1. ค่าวัสดุ 92,703.75 บาท (ค่าสารเคมีต่างๆ) รายจ่าย 92,703.75 บาท คงเหลือ 27,296.25 บาท <u>หมายเหตุ</u> 1. เอกสารการเบิกเงินเก็บอยู่ที่หัวหน้า โครงการ 2. เอกสารการจ่ายเงิน, ใบเสร็จรับเงิน เก็บอยู่ที่ฝ่ายการเงิน คณะ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
<u>หมายเหตุ</u> 1. เอกสารการเบิก-จ่าย, ใบเสร็จรับเงิน เก็บอยู่ที่หัวหน้าโครงการ 2. เบิกจ่ายเงินจากบัญชีเมธีวิจัย สกว. จรัญญา ณรงค์ชวณะ เลขที่ 026-2-78586-0 ดังเอกสารที่แนบมา	<u>สรุปงวดที่ 1</u> รวมรับ 484,326.16 บาท รวมจ่าย 269,633.95 บาท รวมคงเหลือ 214,692.21 บาท

รายงานการเงิน

(งวดที่ 2 : 1 มีนาคม 2539- 31 สิงหาคม 2539)

<u>รายรับ</u> เหลือจาก สกว. งวด 1 187,395.96 บาท ดอกเบี้ย (ม.ค.-มิ.ย.39) 4,258.83 บาท รวมรับ <u>191,654.79 บาท</u>	<u>รายรับ</u> เหลือจากคณะวิทยาศาสตร์ 27,296.25 บาท ม. มหิดล รวมรับ <u>27,296.25 บาท</u>
<u>รายจ่าย</u> 1. ค่าจ้าง (ค่าจ้างทำบัญชี, พิมพ์งาน) 4,400.00 บาท 2. ค่าตอบแทนเมธีวิจัย 90,000.00 บาท (15,000 บาท x 6 เดือน) (มี.ค. 39- ส.ค. 39) 3. ค่าใช้สอย 12,091.50 บาท (ค่าสร้าง-อัดภาพ, ค่าถ่ายเอกสาร, ค่าไปรษณีย์-โทรสาร, ค่าวิเคราะห์ตัวอย่าง, ค่าตรวจวัดฟิล์มรังสี, ค่าลงทะเบียนประชุม) 4. ค่าวัสดุ 20,495.65 บาท (ค่าวัสดุอุปกรณ์สำหรับห้องปฏิบัติการ, ค่าสารเคมีต่างๆ) รวมจ่าย <u>126,987.15 บาท</u> คงเหลือ <u>64,667.64 บาท</u>	<u>รายจ่าย</u> 1. ค่าวัสดุ 26,322.79 บาท (ค่าสารเคมีต่างๆ) รวมจ่าย <u>26,322.79 บาท</u> คงเหลือ <u>973.46 บาท</u> <u>หมายเหตุ</u> 1. เอกสารการเบิกเงินเก็บอยู่ที่ หัวหน้าโครงการ 2. เอกสารการจ่ายเงิน, ใบเสร็จรับเงินเก็บอยู่ที่ ฝ่ายการเงินคณะวิทย์ ม. มหิดล
<u>หมายเหตุ</u> 1. เอกสารการเบิกจ่าย, ใบเสร็จรับเงินเก็บอยู่ที่ หัวหน้าโครงการ 2. เบิกจ่ายเงินจากบัญชีเมธีวิจัย สกว. จรัญญา ณรงค์ชวนะ ธนาคารไทยพาณิชย์ สาขารามาริบดี เลขที่ 026-2-78556-0 ดังสำเนาที่แนบมา	<u>สรุปงวดที่ 2</u> รวมรับ 218,951.04 บาท รวมจ่าย 153,309.94 บาท รวมคงเหลือ <u>65,641.10 บาท</u>

รายงานการเงิน

(งวดที่ 3 : 1 กันยายน 2539 - 28 กุมภาพันธ์ 2540)

รายรับ <table><tr><td>เหลือจาก สกว. งวด 2</td><td>64,667.64</td><td>บาท</td></tr><tr><td>เงินปีที่ 2 จาก สกว.</td><td>360,000.00</td><td>บาท</td></tr><tr><td>ดอกเบี้ย (ก.ค. - ธ.ค. 39)</td><td>3,480.91</td><td>บาท</td></tr><tr><td>รวมรับ</td><td>428,148.55</td><td>บาท</td></tr></table>	เหลือจาก สกว. งวด 2	64,667.64	บาท	เงินปีที่ 2 จาก สกว.	360,000.00	บาท	ดอกเบี้ย (ก.ค. - ธ.ค. 39)	3,480.91	บาท	รวมรับ	428,148.55	บาท	รายรับ <table><tr><td>เหลือจากคณะวิทยาศาสตร์</td><td>973.46</td><td>บาท</td></tr><tr><td>เงินปีที่ 2 จากคณะวิทยาศาสตร์</td><td>120,000.00</td><td>บาท</td></tr><tr><td>รวมรับ</td><td>120,973.46</td><td>บาท</td></tr></table>	เหลือจากคณะวิทยาศาสตร์	973.46	บาท	เงินปีที่ 2 จากคณะวิทยาศาสตร์	120,000.00	บาท	รวมรับ	120,973.46	บาท																											
เหลือจาก สกว. งวด 2	64,667.64	บาท																																															
เงินปีที่ 2 จาก สกว.	360,000.00	บาท																																															
ดอกเบี้ย (ก.ค. - ธ.ค. 39)	3,480.91	บาท																																															
รวมรับ	428,148.55	บาท																																															
เหลือจากคณะวิทยาศาสตร์	973.46	บาท																																															
เงินปีที่ 2 จากคณะวิทยาศาสตร์	120,000.00	บาท																																															
รวมรับ	120,973.46	บาท																																															
รายจ่าย <table><tr><td>1. ค่าจ้าง</td><td></td><td></td></tr><tr><td>(ค่าจ้างทำบัญชี, พิมพ์งาน)</td><td>400.00</td><td>บาท</td></tr><tr><td>2. ค่าตอบแทนเมธีวิจัย</td><td>90,000.00</td><td>บาท</td></tr><tr><td>(15,000 บาท x 6 เดือน) (ก.ย. 39- ก.พ. 40)</td><td></td><td></td></tr><tr><td>3. ค่าใช้สอย</td><td>839.00</td><td>บาท</td></tr><tr><td>(ค่าล้าง-อัดภาพ, ค่าถ่ายเอกสาร, ค่าไปรษณีย์-โทรสาร)</td><td></td><td></td></tr><tr><td>4. ค่าวัสดุ</td><td>40,420.46</td><td>บาท</td></tr><tr><td>(ค่าวัสดุอุปกรณ์สำหรับห้องปฏิบัติการ, ค่าสารเคมีต่างๆ)</td><td></td><td></td></tr><tr><td>รวมจ่าย</td><td>131,659.46</td><td>บาท</td></tr><tr><td>คงเหลือ</td><td>296,489.09</td><td>บาท</td></tr></table> หมายเหตุ 1. เอกสารการเบิกจ่าย, ใบเสร็จรับเงินเก็บอยู่ที่หัวหน้าโครงการ 2. เบิกจ่ายเงินจากบัญชีเมธีวิจัย สกว. จริญญา ณรงค์ชวณะ ธนาคารไทยพาณิชย์ สาขารามาริบัติ เลขที่ 026-2-78556-0 ดังสำเนาที่แนบมา	1. ค่าจ้าง			(ค่าจ้างทำบัญชี, พิมพ์งาน)	400.00	บาท	2. ค่าตอบแทนเมธีวิจัย	90,000.00	บาท	(15,000 บาท x 6 เดือน) (ก.ย. 39- ก.พ. 40)			3. ค่าใช้สอย	839.00	บาท	(ค่าล้าง-อัดภาพ, ค่าถ่ายเอกสาร, ค่าไปรษณีย์-โทรสาร)			4. ค่าวัสดุ	40,420.46	บาท	(ค่าวัสดุอุปกรณ์สำหรับห้องปฏิบัติการ, ค่าสารเคมีต่างๆ)			รวมจ่าย	131,659.46	บาท	คงเหลือ	296,489.09	บาท	รายจ่าย <table><tr><td>1. ค่าวัสดุ</td><td>123,057.80</td><td>บาท</td></tr><tr><td>(ค่าสารเคมีต่างๆ)</td><td></td><td></td></tr><tr><td>รวมจ่าย จริง</td><td>123,057.80</td><td>บาท</td></tr><tr><td>เบิกเกิน</td><td>- 2,084.34</td><td>บาท</td></tr><tr><td>รวมจ่าย</td><td>120,973.46</td><td>บาท</td></tr><tr><td>คงเหลือ</td><td>0</td><td>บาท</td></tr></table> หมายเหตุ 1. เอกสารการเบิกเงินเก็บอยู่ที่หัวหน้าโครงการ 2. เอกสารการจ่ายเงิน, ใบเสร็จรับเงินเก็บอยู่ที่ฝ่ายการเงินคณะวิทย์ ม. นิดล	1. ค่าวัสดุ	123,057.80	บาท	(ค่าสารเคมีต่างๆ)			รวมจ่าย จริง	123,057.80	บาท	เบิกเกิน	- 2,084.34	บาท	รวมจ่าย	120,973.46	บาท	คงเหลือ	0	บาท
1. ค่าจ้าง																																																	
(ค่าจ้างทำบัญชี, พิมพ์งาน)	400.00	บาท																																															
2. ค่าตอบแทนเมธีวิจัย	90,000.00	บาท																																															
(15,000 บาท x 6 เดือน) (ก.ย. 39- ก.พ. 40)																																																	
3. ค่าใช้สอย	839.00	บาท																																															
(ค่าล้าง-อัดภาพ, ค่าถ่ายเอกสาร, ค่าไปรษณีย์-โทรสาร)																																																	
4. ค่าวัสดุ	40,420.46	บาท																																															
(ค่าวัสดุอุปกรณ์สำหรับห้องปฏิบัติการ, ค่าสารเคมีต่างๆ)																																																	
รวมจ่าย	131,659.46	บาท																																															
คงเหลือ	296,489.09	บาท																																															
1. ค่าวัสดุ	123,057.80	บาท																																															
(ค่าสารเคมีต่างๆ)																																																	
รวมจ่าย จริง	123,057.80	บาท																																															
เบิกเกิน	- 2,084.34	บาท																																															
รวมจ่าย	120,973.46	บาท																																															
คงเหลือ	0	บาท																																															
	สรุปงวดที่ 3 <table><tr><td>รวมรับ</td><td>549,122.01</td><td>บาท</td></tr><tr><td>รวมจ่าย</td><td>252,632.92</td><td>บาท</td></tr><tr><td>รวมคงเหลือ</td><td>296,489.09</td><td>บาท</td></tr></table>	รวมรับ	549,122.01	บาท	รวมจ่าย	252,632.92	บาท	รวมคงเหลือ	296,489.09	บาท																																							
รวมรับ	549,122.01	บาท																																															
รวมจ่าย	252,632.92	บาท																																															
รวมคงเหลือ	296,489.09	บาท																																															

(งวดที่ 4 : 1 มีนาคม 2540- 31 สิงหาคม 2540)

89

(งวดที่ 5 : 1 กันยายน 2540- 28 กุมภาพันธ์ 2541)

90

(งวดที่ 6 : 1 มีนาคม 2541- 31 สิงหาคม 2541)

91

