บทคัดย่อ

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกวาวเครือขาวโดยการเหนี่ยวนำให้เกิดแคลลัสในอาหารเพาะ เลี้ยงสูตร Murashige และ Skoog (MS) ที่ประกอบด้วยฮอร์โมนพืชชนิดต่างๆ พบว่า ชิ้นส่วนก้านเมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ประกอบด้วย thidiazuron (TDZ) 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ผลการทดลองที่ดีที่สุด คือสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดแคลลัสได้ร้อยละ 100, เหนี่ยวนำให้เกิดยอดร้อยละ 15.63 และ สามารถผลิตสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ได้ปริมาณ 50.39±7.06 มิลลิกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง นอกจากนี้ยังได้มีการเหนี่ยวนำให้เกิดรากลอยโดยใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium rhizogenes* สายพันธุ์ ATCC15834 จากการทดลองนี้พบว่า การสร้างสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ในรากลอยมีปริมาณมากกว่าสารที่พบในธรรมชาติถึง 5.8 เท่า และพบว่า ความเข้มข้นของน้ำตาล 5% เหมาะสมที่ทำให้รากลอยเจริญเติบโตได้ดีและมีการสร้างสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ได้มากที่สุด โดยสูตรอาหารที่มีการสร้างสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ได้มากที่สุดคือ อาหารสูตร woody plant (WP) การสร้างสารไอโซฟลาโวนอยด์ในรากลอยกวาวเครือขาว จากการศึกษาผลของสารกระตุ้นต่อการผลิตสารไอโซฟลาโวนอยด์พบว่า สารกระตุ้นที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด ได้แก่ yeast extract ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ภายหลังจากเติมสารกระตุ้นลงไปเป็นเวลา 3 วัน สารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ที่ได้จากการกระตุ้นมีปริมาณสูงถึง 60 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง คิดเป็น 4.5 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จากการศึกษาการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร puerarin และ daidzin เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารกลุ่มนี้ด้วยเทคนิคอีไลซ่า โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อสาร puerarin ในการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สาร puerarin และ daidzein ซึ่งเป็นอะกลัยโคนของ puerarin โดยช่วงของการวิเคราะห์อยู่ที่ระดับ 6.10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร–1.56 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ของ puerarin และการผสมแอนติบอดีทั้งสองชนิดเพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์ปริมาณไอโซฟลาโวนอยด์รวมในขั้นตอนเดียว โดยมีช่วงการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้น 0.05–6.25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร วิธีวิเคราะห์โดย ELISA ทั้งสองวิธี ให้ผลการวิเคราะห์สอดคล้องกับค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC จากการประเมินวิธีวิเคราะห์พบว่า ทั้งสองวิธีเป็นวิธีที่มีความถูกต้อง แม่นยำ ความจำเพาะเจาะจง และความไวสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ในกวาวเครือขาว นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาผลของกวาวเครือขาวต่อสมรรถนะของเอนไซม์ไซโตโครม พี 450 ที่เกี่ยวข้อง ในหนูไมซ์ด้วยเทคนิค benzyloxyresorufin *O*-dealkylation และ real-time RT-PCR นอกจากนี้ยังทำการศึกษาผลต่อขนาด และน้ำหนักมดลูกของหนูเพศเมีย จากผลการศึกษาพบว่า เนื้อเยื่อเพาะเลี้ยงส่วนรากของกวาวเครือขาวมีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเพศหญิง โดยมีผลเพิ่มความยาวของ มดลูกหนูเพศเมีย และมีศักยภาพในการกระตุ้นการแสดงออกของ mRNA และ สมรรถนะของเอนไซม์ CYP2B9

คำหลัก: ไอโซฟลาโวนอยด์, กวาวเครือขาว, แคลลัส, รากลอย, ไซโตโครม พี 450

Abstract

Plant tissue cultures of *Pueraria candollei* was investigated for callus induction using Murashige and Skoog (MS) medium with different plant hormones. In this experiment we found that MS medium supplemented with 0.5 mg/l thidiazuron (TDZ) shows high efficiency for the callus induction (100%), shoot regeneration (15.63%) and enhances production of isoflavonoids in *P. candollei* (50.39 ± 7.06 mg/g dry wt). Transformed hairy root was established by using *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834. Hairy roots of *P. candollei* can increase the level of isoflavonoids production about 5.18-fold higher than in intact roots. The optimization of growth and isoflavonoids accumulation of *P. candollei* hairy roots was depended on sucrose concentration, 5% sucrose (w/v) was an optimum concentration for biomass and isoflavonoids accumulation, and woody plant medium is an optimal condition for isoflavonoid production. The effect of elicitors on total isoflavonoid accumulation was studied in the hairy root cultures of *Pueraria candollei*. The results showed that yeast extract (0.5 mg/ml) was the most efficient at enhancing total isoflavonoid production up to 60 mg/g dry wt, 4.5-fold higher than control hairy roots on day 3 of elicitation. To screen the level of isoflavonoids in plants, anti-puerarin and anti-daidzin polyclonal antibodies (PAbs) were produced in order to develop enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) to determine major isoflavonoids in *P. candollei.* An ELISA for determination of puerarin and its aglycone, daidzein, was established and validated in the range of 6.10 ng/ml-1.56 μg/ml of puerarin. In addition, a one-step ELISA method to determine total isoflavonoids in *P. candollei* using combination of two PAbs was also developed in the range of 0.05-6.25 μg/ml of isoflavonoids. Based on validation analysis, these analytical methods by ELISA are a precise, accurate, and sensitive method for the determination of major isoflavonoids in *P. candollei*. Furthermore, their effects on related P450 enzyme activities in mice were investigated by using benzyloxyresorufin *O*-dealkylation and real-time RT-PCR techniques. The uterus weight and length of female mice also evaluated. The results demonstrated that *P. candollei* possesses an estrogenic effect, increase uterus length and has potential to induce the expression of CYP2B9 mRNA and enzyme activity.

Key Words: isoflavonoid, *Pueraria candollei*, callus, hairy roots, CYP450