

การพัฒนาไบโอเซนเซอร์เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน:
กรณีศึกษาของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส(RhGT1)ในกุหลาบ



นางสาวอภิไลดา โอเจริญ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DEVELOPMENT OF BIOSENSOR FOR DETECTION OF GENE EXPRESSION : A CASE STUDY ON
GLUCOSYLTRANSFERASE GENE(*RhGT1*) IN ROSE



Miss Apilada Ojaroen

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Genetics

Department of Botany Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

511157

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การพัฒนาไบโอเซนเซอร์เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน:
กรณีศึกษาของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส (*RhGT1*) ในกุหลาบ

โดย

นางสาวอภิลดา โอเจริญ

สาขาวิชา

พันธุศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะศักดิ์ ชุ่มพฤษ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต

.....รองคณบดีฝ่ายบริหารคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิมลวรรณ พิมพ์พันธุ์) รักษาการแทนคณบดีคณะวิทยาศาสตร์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.พิธา บุญ-หลง)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะศักดิ์ ชุ่มพฤษ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พีระศักดิ์ ฉายประสาธ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วรุณี จุฬาลักษณ์านุกุล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กนกวรรณ เสรีภาพ)

อภิไลดา โอเจริญ : การพัฒนาไบโอเซนเซอร์เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน : กรณีศึกษาของยีน กลูโคซิลทรานสเฟอเรส (*RhGT1*) ในกุหลาบ. (DEVELOPMENT OF BIOSENSOR FOR DETECTION OF GENE EXPRESSION: A CASE STUDY ON GLUCOSYLTRANSFERASE GENE (*RhGT1*) IN ROSE) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
หลัก : ผศ.ดร.ปิยะศักดิ์ ชุ่มพฤกษ์, 53 หน้า.

พัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณแสดงออกของยีน *RhGT1* ด้วยเทคนิค electrochemical biosensor ตรวจวัดสัญญาณทางไฟฟ้าที่เกิดจากอนุภาคอิเล็กทรอนิกส์ของสารละลาย Hoechst 33258 บนอิเล็กโทรดที่ทำจากคาร์บอนพิมพ์สกรีนขนาดพื้นที่ผิว 2.63 ตารางมิลลิเมตร พบการเปลี่ยนแปลงค่ากระแสไฟฟ้าสูงสุดที่ชั่วอาโนดอยู่ในช่วงระหว่าง 0.85-2.1 ไมโครแอมแปร์ โดยค่ากระแสไฟฟ้าต่ำสุดจะบ่งบอกการแสดงออกของยีนสูงที่สุด ผลการตรวจวัดการแสดงออกของยีนในระยะการเจริญของดอกใน 5 ระยะ ที่อายุดอก 0 2 4 6 และ 8 วัน พบว่า การแสดงออกของยีน *RhGT1* ในรูปจำนวนชุดของ cDNA สูงสุดในระยะอายุดอก 4 วัน คิดเป็นร้อยละ 79.06 เมื่อเทียบกับ 18S housekeeping ยีน รองลงมาคือ ระยะอายุดอก 6 8 2 และ 0 วัน คิดเป็นร้อยละ 69.81 64.50 16.12 และ 6.66 ตามลำดับ การแสดงออกสูงสุดที่ระยะอายุดอก 4 วัน เป็นระยะก่อนการพบการเปลี่ยนสีของดอกในทางสรีรวิทยา 1 วัน แสดงให้เห็นถึงการพัฒนาของดอกที่สัมพันธ์กับการแสดงออกของยีน การทดลองนี้ชี้ให้เห็นถึงศักยภาพของเทคนิคไบโอเซนเซอร์ในการตรวจวัดการแสดงออกของยีนในเชิงปริมาณ ซึ่งสามารถนำเทคนิคนี้ไปประยุกต์กับไม้ดอกอื่นๆได้ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....พันธุศาสตร์.....ลายมือชื่อนิสิต น.ศ. อภิไลดา โอเจริญ
สาขาวิชา.....พฤกษศาสตร์.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ปีการศึกษา...2551.....

4772611023 : MAJOR GENETICS

KEY WORD: BIOSENSOR / *Rosa hybrida* / RT-PCR / GLUCOSYLTRANSFERASE / GENE EXPRESSION

APILADA OJAROEN : DEVELOPMENT OF BIOSENSOR FOR DETECTION OF GENE EXPRESSION: A CASE STUDY ON GLUCOSYLTRANSFERASE GENE(*RhGT1*) IN ROSE.

THESIS PRINCIPAL ADVISOR : ASST.PROF.PIYASAK CHAUMPLUK, Ph.D., 53 pp.

Method for glucosyl transferase gene (*RhGT1*) expression detection was developed based on signal measurement from free electron of Hoechst 33258 on carbon screen printed electrode, area 2.63 mm². Results revealed anodic current peak changes in between 0.85 – 2.1 μ A. The minimum anodic current indicated maximum *RhGT1* gene expression. When *RhGT1* gene expression was determined at all 5 flowering stages 0, 2, 4, 6 and 8 days of development, it was found that maximum *RhGT1* gene expression in term of cDNA copy numbers was detected at 4 day of development stage at 79.06% compared with that of 18S housekeeping gene. In flower stage of 6, 8, 2 and 0 day gene expression was 69.81, 64.50, 16.12 and 6.66 respectively. The finding that maximum *RhGT1* gene expression found at 4 day stage was in corresponding with stage of one day prior to the physiological color changes. This studies indicate the potential application of biosensor in semiquantitative gene expression study and constitute basis for its technical applicate to other economic flowers

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department :Botany.....Student's signature..... Miss Apilada Ojaroen

Field of study :Genetics.....Principal Advisor's signature

Academic year :2008.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์ด้วยความกรุณาช่วยเหลือเป็นอย่างดี
ยิ่งจากอาจารย์ ผศ.ดร.ปิยะศักดิ์ ชุ่มพฤกษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.ปรีดา บุญหลง
ผศ.ดร.พีระศักดิ์ ฉายประสาธ รศ.ดร.วรุฒิ จุฬาลักษณ์านุกูล และ ผศ.ดร.กนกวรรณ เสรีภาพ
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำปรึกษา แนะนำ ข้อคิดเห็นต่างๆ และตรวจแก้ไขการทำ
วิทยานิพนธ์ ครั้งนี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่ให้ทุนการศึกษาและสนับสนุนการวิจัย

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการทรานสเจนิคเทคโนโลยีและไบโอเซนเซอร์ ภาควิชา
พฤกษศาสตร์ สาขาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความ
อนุเคราะห์ทางด้านเครื่องมือ อุปกรณ์ และสถานที่ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ สวนกุหลาบรักมิตร ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างดอกกุหลาบ ในการทำ
วิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ญาติพี่น้อง ที่ให้ความช่วยเหลือสนับสนุนในด้าน
การเงินและกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดียิ่งทำให้วิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ คุณนันทวัน หัตถมาศ คุณมนตรี บุญยะผลานันท์ คุณวรุณ สุวรรณกิตติ
คุณณัฐพร อุดมพงษ์ คุณศิริพร คุ่มแว่น คุณมัลลิกา แก้วดี คุณปัทมา เสนทอง คุณนิติญา
ทองบุญรอด คุณปาลิตา แป้วไทสง คุณปรเมษฐ์ กลั่นฤทธิ์ คุณพัชนี เอื้อรักสกุล
คุณศศิษฐา ประเสริฐกุล คุณเก็จกาญจน์ สมภิตวุฒิคุณ ที่ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจโดย
ตลอดระยะเวลาที่ทำวิทยานิพนธ์

คุณความดีและประโยชน์อันพึงจะมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้กับผู้มี
พระคุณทุกท่านที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น ให้ประสบความสุข ความสำเร็จในทุกด้าน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ซ
สารบัญภาพ.....	ฅ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
2. จุดประสงค์ในการศึกษา.....	4
3. ขอบเขตของการวิจัย.....	4
4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	11
1. วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี.....	11
2. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของดอกกุหลาบ.....	12
3. การศึกษายีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส.....	12
4. การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส ด้วยเทคนิคไบโอเซนเซอร์.....	15
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	18
1. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของดอกกุหลาบ.....	18
2. การศึกษายีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส.....	20
3. การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส ด้วยเทคนิคไบโอเซนเซอร์.....	26
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	36
รายการอ้างอิง.....	40
ภาคผนวก.....	45
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	53

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
ตารางที่ 1	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสในพืชชนิดต่างๆ.....22
ตารางที่ 2	ลำดับไพรเมอร์ของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส.....23
ตารางที่ 3	การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ forward GT ในพืชชนิดต่างๆ.....23
ตารางที่ 4	การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ reverse GT ในพืชชนิดต่างๆ.....24
ตารางที่ 5	ลำดับไพรเมอร์ของยีน 18S rRNA.....24
ตารางที่ 6	ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ.....28
ตารางที่ 7	ค่าความสัมพันธ์ของ anodic current peak ของดอกกุหลาบ ในระยะต่างๆ.....31
ตารางที่ 8	จำนวนโมเลกุลดีเอ็นเอของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส.....33
ตารางที่ 9	จำนวนโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน 18S rRNA.....33
ตารางที่ 10	ร้อยละของสัดส่วนระหว่างยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส กับยีน 18S rRNA.....34
ตารางที่ 11	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของดอกกุหลาบในแต่ละวันที่ทำการศึกษา.....49
ตารางที่ 12	ค่า anodic current peak (μA) ที่ระดับจำนวนโมเลกุลต่างๆ ของ ยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส50
ตารางที่ 13	ค่า anodic current peak (μA) ที่ระดับจำนวนโมเลกุลต่างๆ ของ ยีน 18S rRNA50
ตารางที่ 14	ค่า anodic current peak (μA) ของดอกกุหลาบระยะต่างๆของ ยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส.....51
ตารางที่ 15	ค่า anodic current peak (μA) ของดอกกุหลาบระยะต่างๆ ของ ยีน 18S rRNA.....51

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1	วัฏจักรการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานิน.....7
ภาพที่ 2	กราฟแสดงการพัฒนาของดอกกุหลาบโดยวัดขนาดของ เส้นผ่านศูนย์กลางของดอก.....18
ภาพที่ 3	การเปลี่ยนแปลงสีของดอกกุหลาบโดยการตัดตามยาว ของดอกวันที่ 0 – 10.....19
ภาพที่ 4	การเปลี่ยนแปลงสีของดอกกุหลาบ 5 ระยะการศึกษา.....20
ภาพที่ 5	ข้อมูลการสืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส ที่คล้ายกันในพืชชนิดต่างๆ.....21
ภาพที่ 6	ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอเป้าหมายของ ก) ชิ้นส่วนของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส.....25 ข) ชิ้นส่วนของยีน 18S rRNA.....25
ภาพที่ 7	ผลการโคลนยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส.....26
ภาพที่ 8	ผลการสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากกลีบดอกกุหลาบ ทั้ง 5 ระยะการศึกษา.....27
ภาพที่ 9	เปรียบเทียบการสังเคราะห์ยีน 18S rRNA และ GT ในกลีบดอกกุหลาบทั้ง 5 ระยะการศึกษา.....28
ภาพที่ 10	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากโคลนของยีน 18S rRNA ที่ 10 ระดับความเข้มข้น30
ภาพที่ 11	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากโคลนของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส ที่ 10 ระดับความเข้มข้น.....30
ภาพที่ 12	กราฟมาตรฐานสำหรับการคำนวณจำนวนโมเลกุล ของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส.....32
ภาพที่ 13	กราฟมาตรฐานสำหรับการคำนวณจำนวนโมเลกุล ของยีน 18S rRNA.....32
ภาพที่ 14	กราฟแสดงความสัมพันธ์ของจำนวนโมเลกุลระหว่าง ยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสเปรียบเทียบกับยีน 18S rRNA.....34

บทที่ 1 บทนำ

1.ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ไบโอเซนเซอร์ (biosensor) เป็นเทคนิคที่นำหลักการทางฟิสิกส์มาใช้ในการตรวจวัดโมเลกุลเป้าหมายที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ (Analyze) โดยอาศัยการรวมตัวกับตัวตรวจจับหรือรีเซพเตอร์ (receptor) แล้วแปลงการจับตัวนั้นให้เป็นสัญญาณในทางกายภาพเช่น ความร้อน สี แสง หรือสัญญาณทางเคมี เช่น การปลดปล่อยไอออน หรืออิเล็กตรอน เป็นต้น (Rasooly and Herold, 2006) การแปลงการจับตัวระหว่างโมเลกุลเป้าหมายกับตัวตรวจจับ อาศัยตัวแปลงสัญญาณหรือทรานสดิวเซอร์ (transducer) ซึ่งจะแปลงสัญญาณให้อยู่ในรูปที่ตรวจวัดได้ ซึ่งจะทำได้ให้สามารถนำไปใช้วิเคราะห์สรุปข้อมูลต่างๆ ได้ในเชิงคุณภาพและปริมาณ

ไบโอเซนเซอร์ ประกอบไปด้วยส่วนสำคัญ ได้แก่

1. ตัวตรวจจับที่เชื่อมโยงกับวัสดุทางชีวภาพ เช่น เนื้อเยื่อ ออร์แกนเนล จุลินทรีย์ เอนไซม์ แอนติบอดี กรดนิวคลีอิก หรืออาจเป็นสารที่ผลิตได้จากชีวภาพ หรือสร้างสารชีวโมเลกุลขึ้นก็ได้ โดยมีความไวในการจับกับตัววิเคราะห์ที่ต้องการ

2. ตัวแปลงสัญญาณ สำหรับแปลงสัญญาณการจับตัวให้เป็นสัญญาณทางกายภาพหรือเคมีที่ตรวจวัดเป็นตัวเลข

ในปัจจุบันตัวแปลงสัญญาณในไบโอเซนเซอร์แบ่งเป็นรูปแบบหลัก ได้แก่ optical biosensor piezoelectric biosensor potentiometric biosensor และ electrochemical biosensor

1. optical biosensor เป็นเทคนิคที่ใช้หลักการทางแสง เช่น การเกิดการสะท้อนที่ผิวของวัตถุ เมื่อแสงตกกระทบบนผิวของอนุภาคทองคำที่ฉาบบางๆ (surface plasmon resonance) อยู่บนแผ่นแก้วที่มีค่าดัชนีหักเหสูง (Lin *et al.*, 2006) สามารถตรวจได้ด้วยการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสง (Jensen *et al.*, 1999) หรือการเปลี่ยนแปลงของสารจากโมเลกุลเรืองแสง (fluorescence) (Tawa *et al.*, 2008)

2. piezoelectric biosensor เป็นเทคนิคที่ใช้ผลึก (crystal) เมื่อรับศักย์ทางไฟฟ้าเข้าไป จะทำให้เกิดการสั่นสะเทือนของผลึกที่มีความถี่เฉพาะตัว ซึ่งความถี่นี้เกิดอย่างอิสระบนผิวผลึก ดังนั้นถ้าเคลือบหรือฉาบผิวของผลึกนั้นด้วยตัวตรวจจับที่เชื่อมโยงกับสิ่งที่ต้องการวิเคราะห์ จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความถี่ของการสั่นสะเทือนซึ่งเป็นสัญญาณที่ต่างไปจากเดิม สามารถตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงสัญญาณเหล่านี้ได้ (Serra *et al.*, 2008)

3. potentiometric biosensor เทคนิคนี้เกี่ยวข้องกับค่าความต่างศักย์ ซึ่งการทำงานจะตรงข้ามกับการเกิดกระแสไฟฟ้าตามที่เราทราบกันดีแล้ว ซึ่งไบโอเซนเซอร์ชนิดนี้มักใช้ screenprinted electrode ที่เคลือบโพลีเมอร์บริเวณผิวหน้าเป็นตัวนำปฏิกิริยาเชื่อมโยงลงบนพื้นผิวของเซนเซอร์ จากนั้นจึงสามารถตรวจการเปลี่ยนแปลงของศักย์ทางไฟฟ้า (Purvis *et al.*, 2003) ตัวเทคนิคมีความไว ความทนทาน และความแม่นยำสูง สามารถตรวจสอบระดับของตัววิเคราะห์ได้ในปริมาณน้อยกว่าที่ใช้ตรวจด้วยเทคนิคอื่นๆ เช่น HPLC และ LC/MS และไม่ต้องเตรียมตัวอย่างมาก สัญญาณที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงทางเคมีไฟฟ้าและการเปลี่ยนแปลงทางฟิสิกส์ ในชั้นของโพลีเมอร์ตัวนำบนผิวของเซนเซอร์นั้นอาจเป็นความแรงของไอออน pH ปฏิกิริยาไฮเดรชัน ปฏิกิริยารีดอกซ์ หรือการเปลี่ยนแปลง substrate ของปฏิกิริยา

4. electrochemical biosensor ซึ่งมีหลักการอยู่บนการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์มาติคคะตะไลซิส (enzymatic catalysis) ซึ่งผลิตประจุออกมา การวิเคราะห์ตัวอย่างทำในรูปการตรวจวัดปฏิกิริยาบนผิวของแอคทีฟอิเล็กโทรด ในขั้นตอนการให้ความต่างศักย์เข้าสู่ระบบจะทำให้มีอิเล็กตรอนซึ่งจะนำไปหักล้างกับในเรฟเฟอร์เรนซ์อิเล็กโทรด จะได้สัญญาณออกมาเป็นค่าปริมาณของตัววิเคราะห์ที่ต้องการได้

ปัจจุบันมีผู้นำไบโอเซนเซอร์ไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ได้แก่

1. ด้านการแพทย์ มีการนำเทคนิคไบโอเซนเซอร์ใช้ตรวจวินิจฉัยโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย (Serra *et al.*, 2008) ไวรัส (Moschopoulou *et al.*, 2008) การวัดปริมาณก๊าซและไอออน (Andreescu and Sadik, 2005) รวมถึงสารเมตาบอลิต์ในเลือด เช่น วัดระดับน้ำตาลในเลือดผู้ป่วยที่เป็นเบาหวาน (Kumar *et al.*, 1992)

2. ด้านอุตสาหกรรม มีการใช้ไบโอเซนเซอร์ในกระบวนการผลิต โดยเฉพาะกระบวนการหมักและการวิเคราะห์การปนเปื้อน ช่วยลดการสูญเสียผลิตภัณฑ์และใช้พลังงานอย่างมีประสิทธิภาพ (D'Souza, 2001)

3. ด้านการทหาร มีความจำเป็นอย่างยิ่งในการตรวจวิเคราะห์อย่างรวดเร็ว สำหรับตรวจอันตรายที่ไม่ทราบในสนามรบ เช่น การตรวจวิเคราะห์ก๊าซซาริน ซึ่งมีผลต่อระบบประสาท การวิเคราะห์วัตถุระเบิด โดยตรวจสอบสารที่เอ็นทีที่มีปริมาณต่ำและตรวจสอบสารพิษอื่นๆอีกมากมาย (Lin and Chung, 2008)

4. ด้านสิ่งแวดล้อม ใช้วิเคราะห์สารปนเปื้อน ยารฆ่าแมลง มลพิษในน้ำและอากาศ ของเสียจากโรงงาน เป็นต้น (Andreescu and Sadik, 2005; Percell *et al.*, 1990)

เทคนิคไบโอเซนเซอร์แม้มีความไวของปฏิกิริยาและความแม่นยำสูง อย่างไรก็ตามแต่ละเทคนิคมีความเหมาะสมและต้นทุนรวมถึงความยากง่ายที่แตกต่างกันออกไป

electrochemical biosensor เป็นเทคนิคที่มีรูปแบบที่เรียบง่าย ใช้เวลาสั้น และใช้ต้นทุนไม่สูงมาก และสามารถใช้ได้ดีในห้องปฏิบัติการ

การตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอในตัวอย่าง ด้วยหลักการบนพื้นฐานการใช้สารเคมี (DNA binder) การเข้าจับกับดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ การเข้าจับตัวกันนี้ไม่ต้องการยึดกับผิววัตถุใดๆ จึงเป็นระบบ Non-immobilization สารเคมีดังกล่าวมี 2 รูปแบบคือ intercalator คือจับตัวแทรกอยู่ระหว่างคู่เบสของดีเอ็นเอ เช่น ethidium bromine methylene blue propidium iodide ellipticine actinomycin D และ amino acridine เป็นต้น และอีกรูปแบบคือ minor groove binder จับตัวอยู่ระหว่างร่องขนาดเล็กของเกลียวดีเอ็นเอสายคู่ เช่น DAPI distamneine nuclear yellow berenil และ Hoechst 33258 (Wiederholt *et al.*, 1996) Chaumpluk *et al.* (2006a) เลือกใช้ Hoechst 33258 ในการตรวจการปนเปื้อนดีเอ็นเอจาก bovine เนื่องจาก Hoechst 33258 มีช่วงความต่างศักย์กว้างที่สุด ใช้ค่ากระแสไฟฟ้าเริ่มต้นน้อยที่สุดและมีความจำเพาะเจาะจงสูง โมเลกุลของ Hoechst 33258 เข้าจับกับดีเอ็นเอ โดยจะจับกับบริเวณ AT ของดีเอ็นเอสายคู่ ไม่จับกับอาร์เอ็นเอหรือดีเอ็นเอสายสั้นๆ ทำให้สามารถป้องกันการผิดพลาดจากการจับกับอาร์เอ็นเอที่ปนอยู่และกับไพริเมอริ์นในปฏิกิริยาที่ซีอาร์ทีไม่พึ่งประสงค์ด้วย สารเคมี Hoechst 33258 นี้เมื่อเข้าไปจับกับดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจวิเคราะห์จะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอิเล็กตรอนอิสระและเมื่อนำสารละลายผสมระหว่าง Hoechst 33258 และดีเอ็นเอ ไปหยดลงบนผิวของอิเล็กโทรดขนาดเล็กจะสามารถตรวจวัดค่าประจุอิเล็กตรอนที่ลดลงได้โดยที่ความสัมพันธ์ของค่ากระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นกับปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมายจะแปรผกผันกัน การตรวจด้วยเทคนิคนี้เหมาะในการตรวจในเชิงคุณภาพและปริมาณจึงมีผู้เลือกมาใช้วัดการแสดงออกของยีน โดยมีงานวิจัยที่เกี่ยวกับพืชบางชนิด เช่น บล็อกคอรี (Chaumpluk *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตามก็ยังมีใครทำการศึกษาการแสดงออกของยีนในกุหลาบด้วยเทคนิคนี้เลยจึงเป็นสิ่งสำคัญและน่าสนใจ เนื่องจากกุหลาบเป็นไม้ดอกที่ได้รับความนิยมสูงในเทศกาลต่างๆ ตลาดมีความต้องการมาก

กุหลาบมีชื่อสามัญว่า Rose ชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Rosa hybrida* อยู่ในสกุล Rosaceae กุหลาบได้รับความนิยมเพราะมีสีสันทที่สวยงาม สีที่นิยมกันมากคือ สีแดง ในแหล่งที่ขายกุหลาบ กุหลาบสีแดงพันธุ์ที่นิยมกันคือพันธุ์แกรนด์ กาลา (Grand Gala) เป็นกุหลาบตัดดอกที่มีก้านยาว ไร้หนาม จึงได้รับความนิยมมาก การแสดงออกของยีนในวัฏจักรการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานิน (anthocyanin pathway) ซึ่งในไม้ดอกทั่วไป การแสดงออกของยีนในวัฏจักรนี้มีผลอย่างยิ่งในการพัฒนาคุณภาพของสีดอก โดยมียีนหลักที่เกี่ยวข้องได้แก่ chalcone synthase (CHS) chalcone isomerase (CHI) flavonone 3-hydroxylase (F3H) flavonoid 3-hydroxylase (F3'H) dihydroflavonol 4-reductase (DFR) anthocyanidin synthase (ANS)

และ glucosyltransferase (GT) ซึ่งยีน GT นี้เป็นยีนที่น่าสนใจ พบว่ามีผู้ศึกษายีนนี้ในกุหลาบ (*RhGT1*) มาบ้างแล้ว (Ogata *et al.*, 2005) ยีนนี้มีความสำคัญคือจะเปลี่ยนสารไม่มีสีเป็นแอนโทไซยานินที่มีสีต่างๆกัน ภายหลังจากการเพิ่มโมเลกุลน้ำตาลกลูโคสซึ่งจะช่วยเพิ่มความสามารถในการขนย้ายรงควัตถุและช่วยรักษาเสถียรภาพในการสะสมรงควัตถุในแวคคิวโอลในดอกกุหลาบ จึงเป็นยีนที่น่าสนใจนำมาใช้เป็นตัวแบบ ในการศึกษาการแสดงออกของยีนในวัฏจักรการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานิน

ในอดีตจนถึงปัจจุบัน การตรวจวัดการแสดงออกของยีนนั้นมักใช้เทคนิค RT-PCR และ Southern blotting hybridization (Tzeri *et al.*, 1991; Watson *et al.*, 1987; Zuker *et al.*, 2002) เพื่อตรวจสอบการมีดีเอ็นเอเป้าหมาย ส่วนเทคนิค northern blotting hybridization (Vishnevsky *et al.*, 1996; Zuker *et al.*, 2002) นั้นใช้ในการตรวจสอบการมีอาร์เอ็นเอเป้าหมายและเทคนิค western blotting hybridization (Caiqing and Kapulnik, 2000) ใช้ในการตรวจสอบการมีโปรตีนเป้าหมาย ซึ่งเทคนิคเหล่านี้ ต้องการดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอเป้าหมายในรูปของโพรบ และการตรวจวัดต้องใช้สารกัมมันตรังสี เช่น ^{32}P เป็นต้นหรือต้องใช้แอนติบอดี ซึ่งต้องใช้ค่าใช้จ่ายสูง เป็นอันตรายต่อร่างกายและมีความยุ่งยากในการเตรียมสาร ต่อมาได้มีการพัฒนาเทคนิค RT-PCR ในการตรวจสอบระดับการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอทำให้ทราบระดับการแสดงออกของยีน แม้เทคนิคเหล่านี้จะได้รับความนิยมมาก แต่เทคนิคมักให้ผลการทดลองที่เป็นข้อมูลในเชิงคุณภาพเท่านั้น ถ้าต้องการข้อมูลเชิงปริมาณจะต้องใช้เทคนิค Realtime-PCR เข้าช่วย ซึ่งก็มีความยุ่งยากและใช้ระยะเวลาในการตรวจสอบเช่นกัน ดังนั้นหากสามารถประยุกต์เทคนิคที่ใช้ตรวจสอบได้ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณอย่างเทคนิคไบโอเซนเซอร์จะเหมาะสมอย่างยิ่งในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในกุหลาบและคาดหวังว่าผลที่ได้จะช่วยพัฒนาการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในไม้ดอกชนิดอื่นๆ อีกต่อไปในอนาคต เพื่อที่จะนำมาพัฒนาวงการวิทยาศาสตร์ในประเทศไทยให้ก้าวหน้าต่อไป

2. จุดประสงค์ในการศึกษา

เพื่อพัฒนาเทคนิคไบโอเซนเซอร์ที่เหมาะสมในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในไม้ดอกโดยใช้กรณีศึกษาของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส (*RhGT1*) ในกุหลาบ

3. ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของดอกกุหลาบและตรวจสอบการแสดงออกของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสและยีน 18S rRNA ในฐานข้อมูล Gen Bank เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐาน ในการสังเคราะห์ไพรเมอร์ เพื่อการโคลนชิ้นส่วนของยีนทั้งสองในกุหลาบตัดดอกสายพันธุ์ แกรงค์

กาลา และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนที่โคลนได้ทั้งสอง จากนั้นเปรียบเทียบ การแสดงออกของยีนแต่ละระยะกับสรีรวิทยาของดอกกุหลาบโดยเทียบปริมาณยีน กลูโคซิลทรานสเฟอเรสกับยีนที่ทำงานตลอดเวลาอย่างยีน 18S rRNA ในกุหลาบสายพันธุ์ เดียวกันด้วยเทคนิคไบโอเซนเซอร์ ปริมาณดังกล่าวจะแสดงถึงค่าการแสดงออกของยีนที่ต้องการ ได้

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้วิธีวิเคราะห์การแสดงออกของยีนโดยใช้ยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสเป็นโมเดลเพื่อ พัฒนาระบบการตรวจสอบการแสดงออกด้วยเทคนิคไบโอเซนเซอร์ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการ ประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนอื่นต่อไป



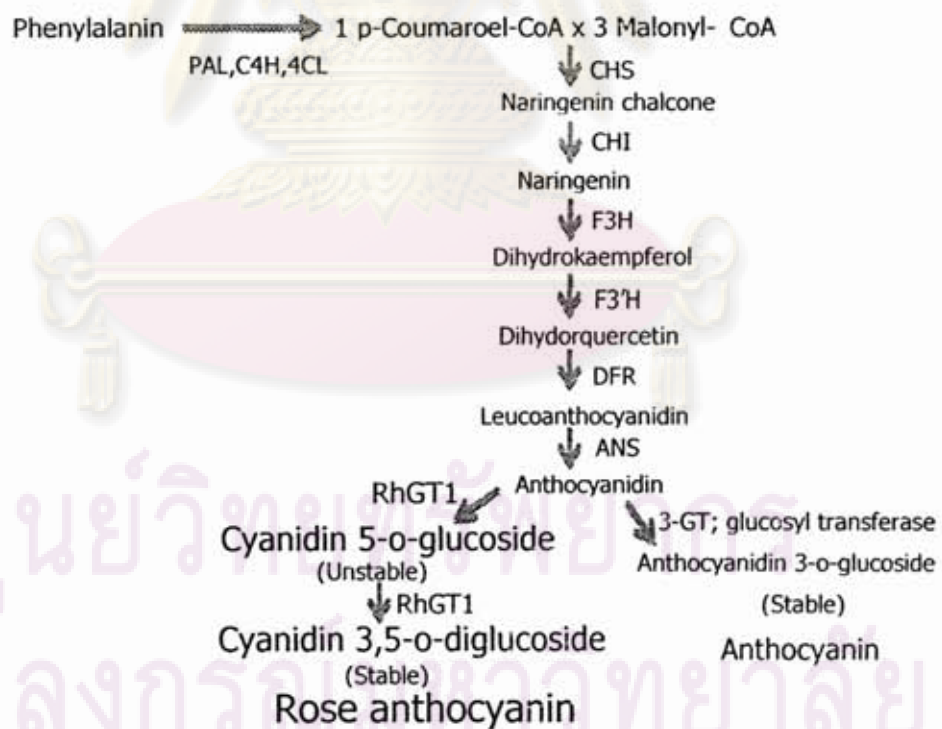
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กุหลาบพันธุ์แกรนด์ กาลา (*Rosa hybrida* cv. Grand Gala) เป็นไม้ดอกขนาดใหญ่ อยู่ในวงศ์ Rosaceae ให้ออกที่มีก้านยาว สีแดงเข้ม กุหลาบพันธุ์นี้ เป็นพืชเศรษฐกิจที่ได้รับความนิยมทั่วโลก มียอดขายสูงสุดในประเทศต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบกับไม้ดอกชนิดอื่นๆ โดยประเทศที่ผลิตกุหลาบรายใหญ่ของโลกได้แก่ อิตาลี เนเธอร์แลนด์ สเปน สหรัฐอเมริกา โคลัมเบีย เอกวาดอร์ อิสราเอล เยอรมันนี เกาหลี ชิมบับเว เบลเยียม ฝรั่งเศส เม็กซิโก แทนซาเนีย และมาลาวี เป็นต้น (http://www.panmai.com/GardenSong/flower_04.htm) ส่วนในประเทศไทย แหล่งปลูกที่สำคัญได้แก่ อ.พท.พระ จ.ตาก (http://www.panmai.com/GardenSong/flower_04.htm) ผลผลิตส่วนใหญ่ ส่งจำหน่ายในตลาดที่มีขนาดใหญ่ เช่น ปากคลองตลาด เนื่องจากดอกกุหลาบพันธุ์นี้มีสีแดงเข้มสวยงาม และไม่มีหนาม จึงทำให้ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก สีของดอกมีสีเข้มซึ่งเป็นสารเคมีที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ ซึ่งรู้จักในชื่อรงควัตถุ (pigment) รงควัตถุประกอบด้วยส่วนสำคัญ คือ แอนโทไซยานิน (anthocyanin) เป็นสารทุติยภูมิ ละสมอยู่ภายในแวคิวโอล (vacuole) ภายในเซลล์ที่สามารถละลายน้ำได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเซลล์ epidermis ของกลีบดอก สำหรับการศึกษายืนและสีดอกเริ่มต้นจากเมนเดลที่ทำการศึกษาดอกของถั่ว ซึ่งเป็นพื้นฐานในการศึกษาบทบาทของสีดอกในเวลาต่อมา สารแอนโทไซยานินให้สีในช่วงตั้งแต่แดง น้ำเงิน และม่วง สีดังกล่าวช่วยเพิ่มสีสันของดอกในการดึงดูดแมลงมาช่วยในการผสมเกสรและกระจายพันธุ์ (Ogata *et al.*, 2005) หรือที่พบในผลและเมล็ด จะช่วยในการแพร่กระจายเมล็ด ช่วยป้องกันการทำลายด้วยรังสี UV (Springob *et al.*, 2003) แอนโทไซยานินยังเป็นสารประกอบด้านการเกิด oxidation และช่วยเป็น anti cancer และ anti arteriosclerosis ในมนุษย์ด้วย วัฏจักรในการสังเคราะห์สารแอนโทไซยานิน มีเอนไซม์หลายตัวเข้ามาเกี่ยวข้อง (ปิยะศักดิ์, 2542) โดยเริ่มต้นจากเอนไซม์ phenylalanine ammonia lyase (PAL) จะเคลื่อนย้ายกลุ่มแอมโมเนียออกจากโมเลกุลของกรดอะมิโน ซึ่ง phenylalanine ทำให้ได้ trans-cinnamate ซึ่งจะเปลี่ยนต่อไปเป็น trans 4-coumarate เชื่อมต่อกับ Coenzyme A (CoA) โดยเอนไซม์ 4-coumarate CoA ligase (4CL) ได้เป็น 4-coumaroyl CoA ซึ่งจะเข้าจับกับ malonyl-CoA 3 โมเลกุล เปลี่ยนไปเป็น naringenin chalcone ด้วยเอนไซม์

chalcone synthase (CHS) จากนั้นเอนไซม์ chalcone isomerase จะเปลี่ยน chalcone ไปเป็น flavanone ในรูป naringenin และจะเปลี่ยนเป็น dihydrokaempferol ด้วยเอนไซม์ flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H) เปลี่ยนให้เป็น dihydroquercetin แล้วเปลี่ยนต่อไปเป็น leucoanthocyanidin ด้วยเอนไซม์ dihydroflavonol 4-reductase (DFR) จากนั้นเปลี่ยนไปเป็น anthocyanidin ด้วยเอนไซม์ anthocyanidin synthase เป็นลำดับขั้น ซึ่ง anthocyanidin เป็นสารที่ไม่เสถียร (Teusch, Forkmann and Seyffert, 1986) จนกระทั่งมีการเติมโมเลกุลน้ำตาลกลูโคสเข้าไปโดย UDP-glucose flavonoid 3-O-glucosyl transferase (UGFT) หรือ flavonoid 3-glucosyl transferase (3GT) จะเปลี่ยนสารไม่มีสีให้มีสี ซึ่งจะช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำ และช่วยรักษาเสถียรภาพในการสะสมของสารในแวคิวโอล ทำให้ได้สาร anthocyanin ที่เสถียรและให้สีอยู่ช่วงสีแดง นอกจากนี้ leucoanthocyanidin อาจเปลี่ยนไปเป็นสาร delphinidin หรือ pelagonidin ซึ่งให้สีเป็นม่วงน้ำเงิน และส้ม ตามลำดับ ดังภาพ (Ogata *et al.*, 2005; Holton and Cornish, 1995; Winkel, 2001; Springob *et al.*, 2003)



ภาพที่ 1 Pathway anthocyanin

โดยธรรมชาติ กุหลาบสามารถสร้างสาร anthocyanin ได้ตามขั้นตอนที่กล่าวมาข้างต้น แต่ไม่มีเอนไซม์ F3'5'H ที่จะเปลี่ยนไปเป็นสารกลุ่ม pelargonidin ได้ ทำให้ดอกกุหลาบไม่มีสีน้ำเงินหรือฟ้า ทำให้มีผู้สนใจศึกษาการแสดงออกของยีนในการสร้างสารในกลุ่มแอนโทไซยานินหลายกรณี เริ่มจาก Katsumoto *et al.* (2007) ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน flavonoid 3',5'-hydroxylase (F3',5'H) ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักในการสังเคราะห์สาร delphinidin เป็นส่วนประกอบสำคัญในดอกไม้ที่มีช่วงสีม่วงถึงน้ำเงิน แต่เนื่องจากกุหลาบไม่สามารถสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้ จึงพยายามถ่ายยีนนี้เข้าสู่กุหลาบ เพื่อให้ได้สิ่งที่ต้องการ ซึ่งการสร้างสีดอกนั้นนอกจากจะมีปัจจัยภายใน คือยีนแล้ว ยังมีปัจจัยภายนอกที่มีผลต่อการสร้างสีของดอก คือ co-pigment และ pH ในแวคิวโอล

ในการศึกษาทดลองของ Ogata *et al.* (2005) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีนในกลุ่มแอนโทไซยานิน ในดอกกุหลาบ *Rosa hybrida* cv. Crimson Glory พบว่าบนโมเลกุลของแอนโทไซยานินมีการเติมน้ำตาลกลูโคส 2 ตำแหน่ง โดยเกิดการเติมที่ตำแหน่ง 5-OH ก่อนจากนั้นจึงเติมที่ตำแหน่ง 3-OH ตามลำดับ ซึ่งขัดแย้งกับข้อสมมุติฐานที่ว่าความเสถียรของแอนโทไซยานินเกิดขึ้นเมื่อเติมน้ำตาลกลูโคสที่ตำแหน่ง 3-OH เพียงอย่างเดียว การเปรียบเทียบระหว่างเอนไซม์ที่สกัดได้และเอนไซม์ที่ได้จากการโคลน ของ cDNA (*RhGT1:AB201048*) และตรวจสอบด้วยวิธี northern blot analysis (^{32}P labelled probe) ก็ให้ผลเป็นเช่นเดียวกัน รูปแบบการสังเคราะห์จะต่างกับที่พบในดอกคาร์เนชัน (*Dianthus caryophyllus*) ที่จะเติมน้ำตาลกลูโคสที่ตำแหน่ง 3-OH ส่วนตำแหน่ง 5-OH ไม่รับกลูโคส เอนไซม์กลูโคซิลทรานสเฟอเรสในกุหลาบนี้เป็น UDP-glucose:anthocyanidin 3,5-O glucosyltransferase โดยที่ uridine diphosphate เป็นตัวนำกลูโคสเข้าสู่แอนโทไซยานิน สำหรับสร้างสีของดอกกุหลาบ

Springob *et al.* (2003) รายงานถึงการศึกษารูปแบบของรงควัตถุแอนโทไซยานิน อยู่ในรูป glycosylated ซึ่งมีกลุ่ม phenolic hydroxyl จำนวน 1 กลุ่มหรือมากกว่านั้น ถูกเติม glucose ใน flavonoid c-15 skeleton ส่วนมากจะถูกเติมที่ตำแหน่ง 3 และบางครั้งอาจเติมที่ตำแหน่ง 5 ของวงแหวน ภายหลังจากที่ H หลุดออกจากอะตอม และอาจมีปฏิกิริยาต่อไปนี้ เช่น เกิด glycosylation acylation methylation และ phenylation ในโมเลกุลแอนโทไซยานินด้วย ซึ่งจะทำให้เพิ่มความเสถียรของแอนโทไซยานิน และอาจมีผลต่อความหลากหลายของสีของแอนโทไซยานิน

Muller *et al.*(2002) วางรูปแบบในการศึกษาการแสดงออกของยีน CTR ที่สังเคราะห์โปรตีน kinase ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อ ethylene ทั้งสองไฮโมโลกัส คือ *RhCRT1* และ *RhCRT2* ในดอกกุหลาบ (*Rosa hybrida*) 2 สายพันธุ์ ได้แก่ Vanilla และ Bronze โดยอ้างอิงข้อมูลชิ้นส่วนของยีน *RhCRT1* จากข้อมูล Gen Bank Acc.No.AF271206 นำไปสังเคราะห์ cDNA ที่ได้จากกลีบกุหลาบ ส่วน *RhCRT2* นั้นได้จาก Acc.No.AY029067 ซึ่งเหมือนกับ *RhCRT1* 69% การศึกษานี้แยกอาร์เอ็นเอจากกลีบดอกกุหลาบที่มีการเจริญ 3 ระยะ ได้แก่ ระยะตูมดอก ระยะดอกแย้ม และระยะดอกบานเต็มที่ โดยตรวจสอบด้วยวิธี RT-PCR (AMV) และเปรียบเทียบกับ 18S ribosomal RNA ของตัวอย่างเดียวกัน พบว่าในระยะดอกบานเต็มที่ มีการแสดงออกของยีนทั้งสองเพิ่มขึ้นมากกว่าในชุดควบคุมหลังจากที่ได้รับเอทิลีน 0.25 ไมโครลิตรต่อลิตร เป็นเวลา 3 วัน

Boss, Davies and Robinson (1996) ศึกษาการแสดงออกของยีนเกี่ยวข้องในการสังเคราะห์แอนโทไซยานินในองุ่น (*Vitis vinifera* L.cv Shiraz) ทั้งหมด 7 ยีน ได้แก่ *PAL* *CHS* *CHI* *F3H* *DFR* *LDOX* และ *UFGT* โดยตรวจสอบตั้งแต่เริ่มเกิดตูมดอกจนกระทั่งผลองุ่นสุก ยีน *CHS* *CHI* *F3H* *DFR* และ *LDOX* ในดอกและผิวของผลองุ่นมีการแสดงออกของยีนใน 4 สัปดาห์ หลังเกิดดอก และลดลงในสัปดาห์ที่ 6-8 และ พบการแสดงออกของยีน *CHS* *CHI* *F3H* *DFR* *LDOX* และ *UFGT* หลังเกิดดอก 10 สัปดาห์ ซึ่งใกล้เคียงกับการเริ่มสังเคราะห์สารแอนโทไซยานิน

จากการศึกษาการแสดงออกของยีนในกุหลาบรวมถึงสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น มักใช้วิธีการ hybridization ด้วยเทคนิค northern blotting หรือ Southern blotting จาก RT-PCR (Zuker *et al.*,2002) ซึ่งมีข้อจำกัดในเรื่องใช้ระยะเวลานาน มีหลายขั้นตอนทำให้สูญเสียผลิตภัณฑ์ (Kai *et al.*,1999) ในการตรวจวัดการแสดงออก รวมทั้งยุ่งยากในการเตรียมสารต่างๆ ที่สำคัญสามารถตรวจวัดในเชิงคุณภาพเท่านั้น แต่ถ้าต้องการตรวจวัดในเชิงปริมาณ จะต้องใช้เทคนิค Real-Time PCR ซึ่งมีความยุ่งยากในการจัดอุปกรณ์และราคาแพง จึงมีความพยายามในการค้นหาวีธีการใหม่ๆ ในการตรวจวัดเพื่อให้มีความรวดเร็วมากขึ้น สะดวก มีความจำเพาะเจาะจง มีความไว สามารถตรวจสอบซ้ำได้ ราคาไม่แพง และตรวจวัดได้ทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณได้ (ปิยะศักดิ์, 2549, 2550)

ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เทคนิคไบโอเซนเซอร์ในการตรวจวัดการแสดงออกของยีนในรูปแบบตรวจวัดสัญญาณหลากหลายรูปแบบ ซึ่งขึ้นอยู่กับ ตัวจับสัญญาณ และตัวแปลงสัญญาณ

Wang *et al.* (1997) ใช้เทคนิคไบโอเซนเซอร์ ในการตรวจวัดลำดับดีเอ็นเอจากโปรโตซัวก่อโรค *Cryptosporidium parvum* สามารถวัดการปนเปื้อนได้ถึงระดับ 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรโดยใช้เวลาเพียง 3-15 นาที

Okahata *et al.* (1998) ใช้เทคนิค quartz-crystal microbalance กับ โมเลกุล probe ขนาด 10 - 30 นิวคลีโอไทด์ สำหรับจับดีเอ็นเอที่มีความเฉพาะเจาะจงซึ่งละลายอยู่ในน้ำ สามารถตรวจถึงระดับนาโนกรัม

Chaumpluk *et al.* (2007) ศึกษาการแสดงออกของยีนคลอโรฟิลเลสในเนื้อเยื่อของบลิอคคอลลี โดยใช้เทคนิค electrochemical biosensor ในการตรวจวัดการแสดงออกของยีน เริ่มจาก cDNA ที่ได้จาก RT-PCR และเปรียบเทียบกับการแสดงออกของยีน 18S rRNA ที่เป็น house keeping gene หรือยีนที่มีการแสดงออกตลอดเวลา นำ cDNA ที่แยกออกมาได้ จับกับโมเลกุล Hoechst 33258 วัดค่าการเปลี่ยนแปลงกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นด้วย carbon screen printed electrode ด้วยหลักการ Linear Sweep Voltametry การแสดงออกของยีนในบลิอคคอลลี ที่เก็บรักษา วัดในการเปลี่ยนแปลงทางกระแสไฟฟ้า อยู่ระหว่าง 1.12 - 2.13 ไมโครแอมแปร์ ซึ่งสามารถนำมาคำนวณเชิงปริมาณ สำหรับการแสดงออกของยีนคลอโรฟิลเลส และยีน 18S rRNA และเมื่อเทียบอัตราส่วนของยีนคลอโรฟิลเลสกับยีน 18S rRNA พบการแสดงออกสูงถึง 81% ของยีนที่มีการแสดงออกตลอดเวลา การแสดงออกของยีนคลอโรฟิลเลสพบสูงสุด หลังจากเก็บไว้ 3 วัน ที่ 27°C เทคนิคนี้ ง่ายและรวดเร็วในการตรวจสอบเชิงปริมาณ และมีค่าใช้จ่ายน้อย

จะเห็นได้ว่าการพัฒนาเทคนิคไบโอเซนเซอร์สามารถใช้ตรวจสอบการแสดงออกของยีนได้ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณโดยมีประสิทธิภาพและรวดเร็วมากกว่าเดิม การขยายผลการศึกษาการแสดงออกของยีนคลอโรฟิลเลสจากในพืชบลิอคคอลลี ไปเป็นยีนอื่นในพืชจะทำให้สามารถเข้าใจกลไกการแสดงออกของยีนต่างๆ ได้ดีขึ้นในเวลาอันสั้น ในการทดลองนี้จึงนำเทคนิคไบโอเซนเซอร์มาพัฒนาการตรวจสอบการแสดงออกของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส ในกุหลาบ เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานสำหรับการพัฒนาการตรวจวัดในเชิงคุณภาพและในเชิงปริมาณในไม้ดอกต่อไป

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

1. พืชทดลอง วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1.1 พืชทดลองที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย

ดอกกุหลาบ(*Rosa hybrida*) สายพันธุ์แกรนด์ กาลา (Grand Gala) ซึ่งมีสีแดงจากสวนกุหลาบรักมิตร อำเภอพนัสนิคม จังหวัดชลบุรี

1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย

- เครื่องชั่งไฟฟ้า (Libror EL-120HA(SHIMADZU), Japan)
- แถบสีมาตรฐาน RGB color charts, Swatches and Color Table for Photoshop และ The Royal Horticultural Society colour chart (London, 1966,1986,1995)
- ตู้เขี่ยเชื้อ (Augusta safety cabinet (Lio Lab Co., Ltd.,Thailand)
- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR) (BIO RAD Gene Cyclor™, USA.)
- เครื่องปั่นตกตะกอน (MIKRO 12-24 Hettich Zentrifugen, Germany)
- เครื่องอิเล็กทรอนิกส์ (Mupid Advance Co., Ltd., Japan)
- เครื่องทำดีเอ็นเอแห้ง (lyophilizer, EYELA, Japan)
- เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์
- เครื่องฉายรังสีอุลตราไวโอเล็ต (UV Electronic Dual Light™ Transillumination, Ultralum, USA.)
- เครื่องตรวจวัดไบโอเซนเซอร์ (Brodenk, Japan)

1.3 สารเคมีที่ใช้ในการดำเนินการ

- | | |
|------------------------------|----------------------------|
| - DEPC | - 0.5 M EDTA |
| - Phenol: Chloroform | - CTAB extraction buffer |
| - Chloroform: Isoamylalcohol | - 10x TE |
| - 50x TAE | - 1% TAE Agarose gel (w/v) |
| - 50x TBE | - Lysozyme buffer |
| - Ethidium bromide | - 3 M LiCl |

- | | |
|----------------------|--------------------------|
| - Potassium acetate | - 70% Ethanol |
| - 10% SDS | - SOB medium |
| - SOC medium | - 1 M Glucose |
| - Sodium acetate | - 50mM CaCl ₂ |
| - 50mM Glycerol | - 1.0 M Tris |
| - 5 M NaCl | - 5 M Potassium acetate |
| - 10x Loading buffer | - LB broth |

2. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของดอกกุหลาบ

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของดอกกุหลาบ เพื่อจัดแบ่งระยะการพัฒนาดอกและการเปลี่ยนแปลงของสีกลีบดอกกุหลาบออกเป็น 5 ระยะ โดยใช้เกณฑ์ดังนี้

2.1. การพัฒนาขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของดอก

การกำหนดตำแหน่งของการวัด โดยเลือกบริเวณที่มีขนาดกว้างที่สุดตามแนวขวางของดอก เพื่อใช้ค่าดังกล่าวเป็นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของดอก ระยะเริ่มต้นของการศึกษาเริ่มตั้งแต่ดอกกุหลาบอยู่ในขั้นเป็นตุ่มดอก จนกระทั่งดอกเจริญเข้าสู่ระยะดอกตูม เป็นเวลา 10 วัน วันละ 5 ชั่วโมง พร้อมบันทึกขนาดที่ได้ และหาค่าเฉลี่ย

2.2. การพัฒนาการเปลี่ยนแปลงสีของกลีบดอก

ตัดดอกกุหลาบแบ่งครึ่งดอกตามแนวยาว เพื่อศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงสีของดอกภายในกลีบเลี้ยง เปรียบเทียบสีของกลีบดอกกับแถบสีมาตรฐาน RGB color charts, Swatches and Color Table for Photoshop และ The Royal Horticultural Society colour chart (R.H.S., 1966) บันทึกรหัสสีที่ได้ ตลอดระยะเวลาการศึกษาเป็นเวลา 10 วัน ทำการศึกษาวันละ 5 ชั่วโมง

3. การศึกษายีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส

3.1 การรวบรวมข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์

ยีนที่ใช้ดำเนินการวิจัยแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ ยีนเป้าหมายคือยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส (glucosyltransferase; *GT*) ของกุหลาบ เป็นยีนเป้าหมายที่ต้องการศึกษาการแสดงออกของยีนในครั้งนี้ และยีนเจ้าบ้านที่มีการแสดงออกตลอดเวลา (housekeeping gene) คือ ยีน *18S rRNA* เพื่อใช้เป็นยีนอ้างอิงการศึกษาการแสดงออกทำได้โดยการเปรียบเทียบจำนวนโมเลกุล (copy number) ของยีนเป้าหมายต่อยีนเจ้าบ้าน

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส (glucosyltransferase: GT) ของพืชชนิดต่างๆ จากฐานข้อมูล Gen Bank (www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank) และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสจากพืชต่างชนิดที่ได้ มาจัดให้อยู่ในรูปแบบ Fasta format จากนั้นนำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์และเปรียบเทียบในรูป sequence alignment ด้วยโปรแกรม Clustal W2 (Larkin *et al.*, 2007) คัดเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุดในรูปแบบ consensus 2 บริเวณ มาใช้อ้างอิงในการออกแบบไพรเมอร์ forward และ reverse เน้นให้มีความเฉพาะเจาะจงกับยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสกับพืชชนิดต่างๆ มากที่สุด ตรวจสอบความเหมาะสมและความคล้ายคลึงของบริเวณที่ออกแบบไพรเมอร์ไว้กับพืชชนิดอื่นๆ โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Blastn (Altschul *et al.*, 1997)

สำหรับการศึกษายีนเจ้าบ้านที่มีการแสดงออกตลอดเวลา (housekeeping gene) ใช้ยีน 18S rRNA ออกแบบโดยใช้วิธีการเช่นเดียวกันกับยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสสังเคราะห์ไพรเมอร์ที่ได้

ตรวจสอบศักยภาพและความเหมาะสมของคู่ไพรเมอร์ที่ได้ด้วยการนำไพรเมอร์มาใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) (Sambrook, 1989) เพื่อสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณยีนที่ต้องการ หลังจากนั้นนำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอมาแยกด้วยสนามไฟฟ้าด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) โดยใช้เจลอะกาโรส 2% ในสารละลาย 1xTAE และย้อมเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 15 ไมโครลิตร นาน 10 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอบนเจลภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง UV transilluminator และวิเคราะห์เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับขนาดของยีนเป้าหมาย โดยขนาดดีเอ็นเอของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสจากการคำนวณมีขนาด 187 คู่เบส และยีน 18S rRNA มีขนาด 100 คู่เบส

3.2. การสร้างยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส และยีน 18S rRNA เพื่ออ้างอิงเชิงปริมาณการสกัดอาร์เอ็นเอ

สกัดอาร์เอ็นเอจากดอกกุหลาบ ปริมาณ 300 มิลลิกรัม 5 ตัวอย่าง โดยวิธี CTAB ดัดแปลงจาก Chang *et al.* (2002)

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส และยีน 18S rRNA

นำสารละลาย cDNA ที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส โดยใช้คู่ไพรเมอร์

forward GT (5' TTGTGGGTGGTACGTAATCCACC 3')

reverse GT (5' TTCCACCCACAGTGAGT 3')

และเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน 18S rRNA โดยใช้คู่ไพรเมอร์

forward 18S (5'AAGGGCACCCAGGAGTGGAGCC3')

reverse 18S (5'AAGAA AGAGCTCTCAGTCTCAATC3')

โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนที่ 93 °C 40 วินาที, 50°C 2 นาที, 73 °C 1 นาที 40 รอบ ตามด้วยการบ่ม 73 °C 10 นาที โดยการใช้สารเคมี Taq DNA Polymerase (Promega, USA) จากนั้นนำดีเอ็นเอเป้าหมายทั้ง 2 ยีนดังกล่าวในแต่ละระยะการศึกษามาทำการตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส ซึ่งขนาดยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสที่ควรได้ 187 คู่เบส และยีน 18S rRNA 100 คู่เบส

3.3 การโคลนยีนเป้าหมาย

นำ PCR products ของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM ด้วยเอนไซม์ไลแกลส(T₄ DNA lygase)(Promega,USA) บ่มปฏิกิริยาที่ 18 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเข้าสู่ แบคทีเรีย *E coli* สายพันธุ์ TOP10 ด้วยวิธี heat shock (Sambrook *et al.*,1989)

คัดเลือกโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็งแต่ละโคโลนีเลี้ยงในอาหารแข็ง LA และอาหารเหลว LB ตามลำดับ สกัดพลาสมิด โดยใช้ Small scale preparation (Sambrook *et al.*, 1989) และตรวจสอบพลาสมิดที่สกัดได้ ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส ในเจลอะกาโรส 1% ที่มีสารละลาย 1xTAE นำแผ่นเจลไปย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เช่นเดิม เปรียบเทียบระดับของพลาสมิดที่ได้กับพลาสมิด pGEM มาตรฐาน ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ต จากนั้นตรวจสอบด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนแต่ละยีน จากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ เปรียบเทียบกับขนาดของชิ้นดีเอ็นเอของยีนทั้งสอง

หลังจากตรวจสอบโคลนที่ได้ด้วยวิธี PCR เรียบร้อยแล้ว เพื่อให้แน่ชัดมากขึ้น จึงต้องทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่โคลนได้ โดยนำพลาสมิดไปวิเคราะห์ด้วยวิธี sequencing นำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ได้มาตรวจสอบความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเป้าหมายของไพรเมอร์จำเพาะ ด้วยโปรแกรม Clustal W2 เพื่อหาบริเวณที่เป็นยีน จากนั้นเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนนั้นมาตรวจสอบความจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Blastn อีกครั้ง

4. การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสด้วยเทคนิคไบโอเซนเซอร์

4.1 การสกัดอาร์เอ็นเอจากกลีบกุหลาบทั้ง 5 ระยะ

นำกลีบดอกกุหลาบทั้ง 5 ระยะมาสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธี CTAB (Chang *et al.*, 2002) โดยสุ่มตัวอย่างกลีบดอกแต่ละระยะอย่างน้อย 5 ช้ำ ให้ได้น้ำหนักรวมประมาณ 300 มิลลิกรัม บดในสารละลาย CTAB ซึ่ง จากนั้นใส่สารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์ม ปริมาตรเท่ากัน บดให้ละเอียดจนเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นดูดสารละลายใส่ในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบ เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติมสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์ม (1:1) ปริมาตรเท่ากับสารละลายส่วนใสที่ได้ จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบ เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำจนส่วนใสไม่มีตะกอนขุ่น นำส่วนใสที่ได้ใส่หลอดใหม่ เติมสารละลายกลีเซอรีน 1 ใน 10 ของปริมาตรส่วนใส และใส่ 95 %เอธานอล 2.5 เท่าของปริมาตร วางตั้งไว้ที่อุณหภูมิ -80°C เป็นเวลา 60 นาที เพื่อตกตะกอนอาร์เอ็นเอออกจากสารละลาย ปั่นแยกตะกอนอาร์เอ็นเอออกจากสารละลาย ล้างด้วย 70% เอธานอล 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง lyophilizer แล้วละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย น้ำ DW RNase free ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เก็บอาร์เอ็นเอ ไว้ในตู้เย็น -80°C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

ตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอ โดยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส ใช้สารละลายอาร์เอ็นเอ 3 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นเจลอะกาโรส 1% ในสารละลาย 1xTBE แยกขนาดอาร์เอ็นเอด้วยสนามไฟฟ้าเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 15 ไมโครลิตร นาน 15 นาที ตรวจสอบแถบอาร์เอ็นเอภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ต จากนั้นทำให้อาร์เอ็นเอบริสุทธิ์มากขึ้นโดยตกตะกอนอีกครั้งด้วย สารละลายลิเทียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 3 โมลต่อลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ใส่ในสารละลายอาร์เอ็นเอ 5 ไมโครลิตร เติมน้ำที่ทำปฏิกิริยากับ DEPC (diethyl pyrocarbonate) แล้ว (Sambrook *et al.*, 1989) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และ 95% เอธานอล 2.5 เท่าของปริมาตร วางตั้งไว้ที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อให้อาร์เอ็นเอตกตะกอน เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำอาร์เอ็นเอที่ได้มาแยกตะกอนออกจากสารละลาย โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบ เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนไปทำให้แห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำ DW RNase free 30 ไมโครลิตร(Gibco BRL, USA) จากนั้นนำไปตรวจสอบคุณภาพซ้ำด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส

ตรวจสอบปริมาณอาร์เอ็นเอที่แยกได้โดยนำสารละลายอาร์เอ็นเอปริมาตร 1 ไมโครลิตร ละลายในน้ำ DEPC ให้ความเข้มข้นลดลง 500 เท่า จากนั้นนำไปตรวจสอบการดูดกลืนแสง ด้วย

4.2 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากอาร์เอ็นเอด้วยวิธี RT-PCR

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.4.1 สังเคราะห์ cDNA สายแรกด้วยปฏิกิริยาที่ประกอบไปด้วย Nuclease-Free Water (Gibco BRL, USA) 5x Reaction buffer 10mM dNTP Ribonuclease inhibitor 0.1M DTT Reverse primer และเอนไซม์ AMV reverse transcriptase (Toyobo, Japan) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 60 นาทีและหยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 10 นาที และนำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้ นำไปเก็บปริมาณ ยีนเป้าหมายด้วยไพรเมอร์ forward GT / reverse GT สำหรับ ยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส และคู่ไพรเมอร์ forward 18S / reverse 18S สำหรับยีน 18S rRNA โดยใช้เทคนิค PCR ด้วยสภาวะในการทำปฏิกิริยา 40 วินาที 93 °C 2 นาที 50 °C 1 นาที 73 °C 40 รอบ 10 นาที 73 °C

นำ RT-PCR ที่ได้ ตรวจสอบขนาดโดยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยอะกาโรส 2 % ในสารละลาย 1x TAE จากนั้นย้อมดีเอ็นเอบนแผ่นเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 15 ไมโครลิตร เป็นเวลา 15 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ต เปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอเป้าหมายกับดีเอ็นเออ้างอิงมาตรฐาน (100 bp)

4.3 การวัดระดับการแสดงออกของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสด้วยเทคนิคไบโอเซนเซอร์ แบ่งการตรวจวัดออกเป็น 2 ระบบ

ระบบแรกคือยีนเป้าหมาย เตรียมความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเอที่ผ่านการโคลนและยืนยันการเข้าของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสเรียบร้อยแล้วให้ได้จำนวนโมเลกุล 10 ระดับดังนี้ 500,000 50,000 5,000 500 50 5 0.5 0.05 0.005 และ 0.0005 ตามลำดับ นำดีเอ็นเอแต่ละระดับความเข้มข้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR (Gardner *et al.*, 1991) และตรวจสอบลักษณะการปรากฏของดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสเจล 2% นำดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณเหล่านี้ตรวจวัดด้วยไบโอเซนเซอร์ เพื่อตรวจหาความสัมพันธ์ระหว่างค่า anodic current peak (μA) กับความเข้มข้นในรูปกราฟมาตรฐานเพื่อใช้สำหรับการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนจากดอกกุหลาบระยะต่างๆ อีกครั้งในภายหลัง

ระบบที่สอง คือยีนเป้าหมายที่มีการแสดงออกตลอดเวลา โดยเลือกใช้ยีนที่ผ่านการโคลนและยืนยันลำดับนิวคลีโอไทด์เรียบร้อยแล้ว จึงเตรียมสารละลายดีเอ็นเอพลาสมิดที่ระดับจำนวนโมเลกุลที่แตกต่างกันทั้ง 10 ระดับดังนี้ 500,000 50,000 5,000 500 50 5 0.5 0.05 0.005 และ 0.0005 ตามลำดับ ด้วยวิธีเดียวกันกับการศึกษาโดยยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส และตรวจสอบลักษณะการปรากฏของดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรสเจล 2% พร้อมนำไปตรวจวัดด้วยไบโอเซนเซอร์เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างค่า anodic current peak (μA) กับความเข้มข้น เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการสร้างกราฟมาตรฐานต่อไป

เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส และยีน 18S rRNA ของกลีบกุหลาบทั้ง 5 ระยะเวลา ด้วยวิธี RT-PCR เพื่อนำสารละลายดีเอ็นเอมาทำการตรวจวัดปริมาณด้วยเทคนิค ไบโอเซนเซอร์ โดยใช้ดีเอ็นเอปริมาตร 15 ไมโครลิตรผสมกับโมเลกุล Hoechst 33258 เข้มข้น 50 ไมโครโมลต่อลิตร ซึ่งเป็นโมเลกุลที่จับตัวกับดีเอ็นเอ ปริมาตร 15 ไมโครลิตร เมื่อผสมสารละลาย ทั้งสองเข้าด้วยกันแล้ว นำสารละลายผสม หยดลงบนพื้นผิวของอิเล็กโทรดขนาดเล็กทำด้วยแผ่น พิรม์คาร์บอนพื้นที่ 2.64 mm.² ด้วยเทคนิค Linear Sweep Voltammetry โดยใช้ตัวตรวจวัด BDT chip tester (Biodevice Technology, Japan) ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ บันทึกข้อมูลที่ได้ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาจำนวนโมเลกุลของยีนแต่ละยีนต่อไป หากความสัมพันธ์ระหว่างยีนเป้าหมายกับยีนเจ้าบ้าน โดยการเทียบจำนวนโมเลกุลของยีนที่ แสดงออกโดยตรงในแต่ละระยะ



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

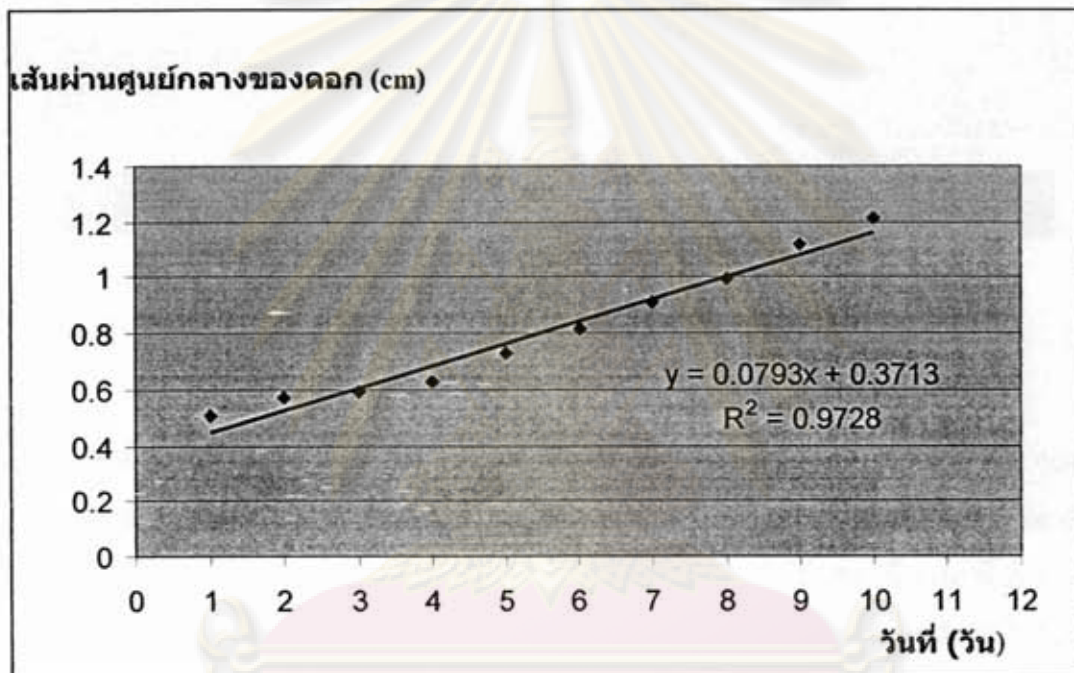
บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของดอกกุหลาบ

1.1 การพัฒนาขนาดของดอก

ผลการศึกษาการพัฒนาของดอกกุหลาบสายพันธุ์แกรนด์ กาลา โดยวัดขนาดของดอก จากระยะเริ่มเห็นตุ่มดอกจนถึงระยะดอกตูม สังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงทั้งขนาดและสีของกลีบดอก

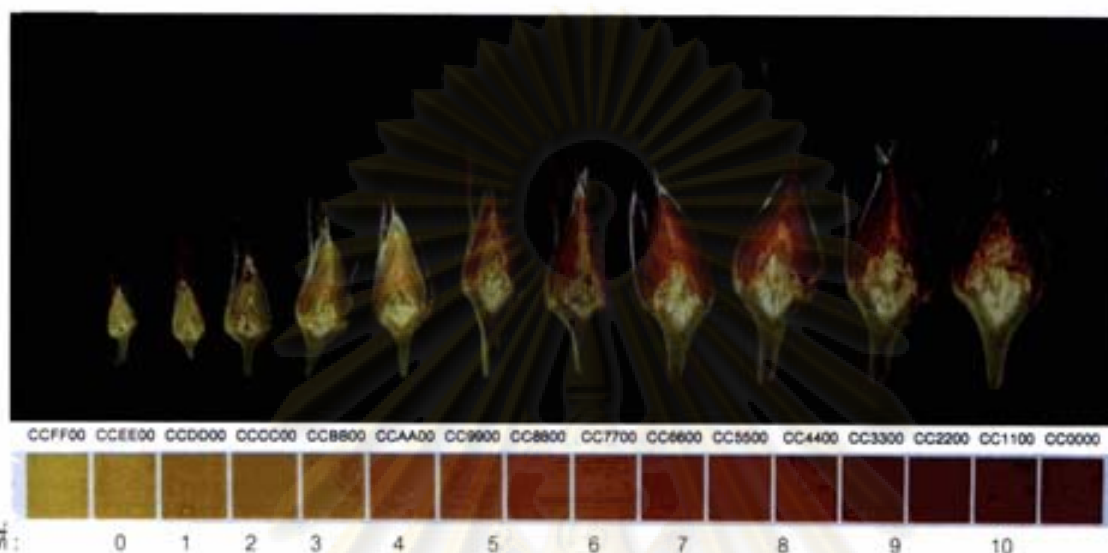


ภาพที่ 2 การพัฒนาของดอกกุหลาบโดยการวัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของดอก

โดยการพัฒนาทางขนาดของดอกกุหลาบตลอดระยะเวลา 10 วัน เมื่อใช้เส้นผ่านศูนย์กลางดอกเป็นเกณฑ์ในการวัด (ภาพที่ 2) พบว่าดอกกุหลาบในระยะวันที่ 0 ซึ่งยังคงเป็นดอกตูมมีขนาดเริ่มต้นเพียง 0.48 เซนติเมตร (ภาคผนวก) และมีการพัฒนาขนาดอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันที่ 4 - 10 โดยมีอัตราการเพิ่มขนาดถึงร้อยละ 10 โดยทุกระยะของการพัฒนาที่กล่าวถึงดอกจะยังคงอยู่ในภาวะตูมจึงถูกปกคลุมด้วยกลีบเลี้ยงอยู่

1.2 การพัฒนาการเปลี่ยนแปลงสีของกลีบดอก

และเมื่อนำดอกกุหลาบที่ได้ในแต่ละระยะมาตัดตามแนวยาวของดอก ตลอดระยะเวลา 10 วัน เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงสีของกลีบดอกที่อยู่ภายในกลีบเลี้ยง ได้ผลดังภาพที่ 3



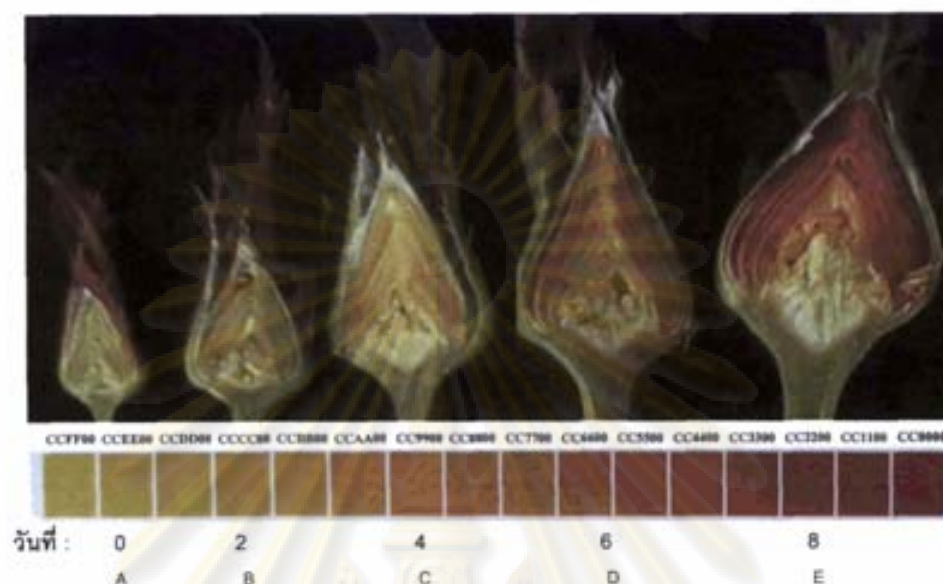
วันที่:

ภาพที่ 3 การเปลี่ยนแปลงสีของดอกกุหลาบโดยการตัดตามยาวของดอก ตั้งแต่วันที่ 0 – 10

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงสีของกลีบดอกเปรียบเทียบกับแถบสีมาตรฐาน RGB color charts, Swatches and Color Table for Photoshop และ The Royal Horticultural Society colour chart ตามลำดับ ในระยะ 10 วันแรก พบว่าในระยะ 2 วันแรก กลีบดอกมีการเปลี่ยนแปลงจากสีเหลืองสด กลายเป็นสีเหลืองอ่อน และเริ่มพัฒนาเข้าสู่ระยะที่กลีบดอกจะเปลี่ยนเป็นสีแดง ตั้งแต่วันที่ 3 - 4 โดยระยะนี้จะเริ่มจากการที่กลีบดอกเปลี่ยนเป็นสีเหลืองส้ม หลังจากวันที่ 5 กลีบดอกจะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีแดงในที่สุด โดยจะเหลือส่วนที่ยังคงเป็นสีเหลืองอยู่เพียงเล็กน้อย และในระยะสุดท้ายที่จะปรากฏสีแดงอย่างชัดเจน ตามลำดับ

จากการเปลี่ยนแปลงของกลีบดอก โดยเปรียบเทียบกับแถบสีมาตรฐาน สามารถคัดเลือกระยะการเปลี่ยนแปลงสีของดอกได้ 5 ระยะ คือ ระยะที่ 1 วันเริ่มต้น ซึ่งเป็นระยะที่กลีบดอกยังมีสีเหลืองสด (RGB:CCFF00,RHS:149A) อยู่ ต่อมาระยะที่ 2 (วันที่ 2 ของการศึกษา)(อายุดอก 2 วัน) กลีบดอกจะเริ่มเปลี่ยนแปลงจากสีเหลืองสด เป็นสีเหลืองอ่อน (RGB:CCCC00, RHS:150A) ระยะที่ 3 (วันที่ 4 ของการศึกษา)(อายุดอก 4 วัน) พบสีเหลืองส้ม (RGB:CCAA00, RHS:151A) กระจายอยู่ทั่วไปประมาณร้อยละ 30 บนกลีบดอก และระยะที่ 4 (วันที่ 6 ของการศึกษา) (อายุดอก 6 วัน) เป็นระยะที่เริ่มปรากฏสีแดงส้ม (RGB:CC8800, RHS:167A) อย่างชัดเจนประมาณร้อยละ 50 ของกลีบดอก แต่ยังคงพบสีเหลืองอ่อนอยู่ที่บริเวณตรงกลางดอกอยู่ ระยะสุดท้าย (วันที่ 8 ของ

การศึกษา) (อายุดอก 8 วัน) กลีบดอกจะเปลี่ยนแปลงเป็นสีแดงเข้ม (RGB:CC4400, RHS:45A) อย่างชัดเจน (ภาพที่ 4)



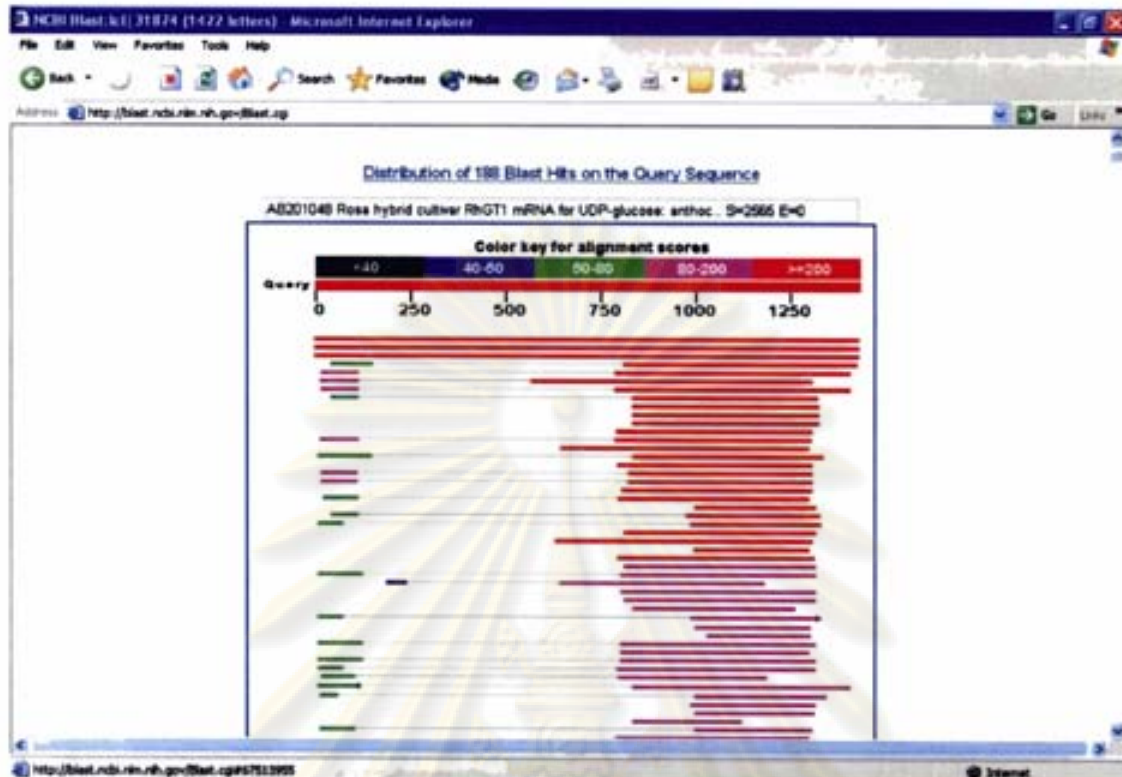
ภาพที่ 4 การเปลี่ยนแปลงสีของดอกกุหลาบ 5 ระยะ

- A คือ ระยะที่ 1 (วันที่เริ่มต้นศึกษา) (อายุดอก 0 วัน)
- B คือ ระยะที่ 2 (วันที่ 2 ของการศึกษา)(อายุดอก 2 วัน)
- C คือ ระยะที่ 3 (วันที่ 4 ของการศึกษา)(อายุดอก 4 วัน)
- D คือ ระยะที่ 4 (วันที่ 6 ของการศึกษา)(อายุดอก 6 วัน)
- E คือ ระยะที่ 5 (วันที่ 8 ของการศึกษา)(อายุดอก 8 วัน)

2. การศึกษายีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส

2.1 การรวบรวมข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์

จากการศึกษา และรวบรวมข้อมูลจากฐานข้อมูล Gen Bank เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสในพืชแต่ละชนิด พบรายงานของยีนดังกล่าว 100 ข้อมูล (ตารางที่ 1) จากนั้นทำการ alignment ของยีนที่เกี่ยวข้องในพืชแต่ละชนิดด้วยโปรแกรม Clustal W2 (Larkin *et al.*, 2007) เพื่อคัดเลือกบริเวณที่มีความเหมือนกันของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสมากที่สุด 2 บริเวณ เพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ได้ผลดัง ตารางที่ 2



ภาพที่ 5 ข้อมูลการสืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสที่เหมือนกันในพืชชนิดต่างๆ

จากภาพที่ 5 แสดงให้เห็นว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส จาก *RhGT1* คล้ายกับพืชชนิดต่างๆ โดยพิจารณาแถบสีแดงซึ่งแสดงถึงค่าความเหมือนสูงที่สุด คือมากกว่า 200 คะแนน มีทั้งหมด 27 ข้อมูล แถบสีชมพูแสดงถึงค่าความเหมือนอยู่ในช่วง 80-200 คะแนน มี 35 ข้อมูล แถบสีเขียวแสดงถึงค่าความเหมือนอยู่ในช่วง 50-80 คะแนน มี 15 ข้อมูล แถบสีน้ำเงิน แสดงถึงค่าความเหมือนอยู่ในช่วง 40-50 คะแนน มี 1 ข้อมูล ส่วนแถบสีดำแสดงถึงค่าความเหมือนน้อยกว่า 40 คะแนน ไม่มีข้อมูล จากนั้นเลือกบริเวณที่พบความเหมือนสูงสุดคือบริเวณแถบสีแดง และรองลงมาคือแถบสีชมพู เพื่อนำไปออกแบบไพรเมอร์ของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสในพืชชนิดต่างๆ

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [G](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AB021058.1	Rosa hybrid cultivar RHGT3 mRNA for UDP-glucose: anthocyanid	2545	2545	100%	0.0	100%	
AB021059.1	Rosa hybrid cultivar RHGT1 mRNA for UDP-glucose: anthocyanid	2545	2545	100%	0.0	100%	
AB021059.1	Rosa hybrid cultivar RHGT2 mRNA for UDP-glucose: anthocyanid	2531	2457	100%	0.0	98%	
AB292194.1	Glycine max Gm1F707 mRNA for UDP-glucose:soflavone 7-O-gl	336	411	50%	1e-08	76%	UG
AF059075.2	Vitis vinifera contig VV78X228784.5, whole genome shotgun seq	232	303	50%	5e-78	77%	
AF042927.1	Vitis vinifera, whole genome shotgun sequence, contig VV78X211	227	306	50%	1e-76	75%	
AF041422.2	Vitis vinifera contig VV78X086521.4, whole genome shotgun seq	225	379	50%	5e-76	78%	
AF072748.1	Vitis vinifera A8G1-5 mRNA for glucosyltransferase-5, complet	225	372	39%	5e-76	82%	
AF072747.1	Vitis vinifera A8G1-1 mRNA for glucosyltransferase-1, partial c	224	291	34%	6e-75	73%	
AF072745.1	Vitis vinifera LFG1V7 mRNA for UDP-glucose:flavanoid glucosyl	224	282	34%	3e-72	73%	
AF072746.1	Vitis vinifera A8G1-3 mRNA for glucosyltransferase-3, complet	220	280	34%	1e-71	73%	
AF042991.1	Perilla frutescens PFUGT56 mRNA for UGT5607, complete cds	222	277	36%	1e-70	72%	
AF041304.2	Vitis vinifera contig VV78X232533.7, whole genome shotgun seq	222	309	43%	1e-70	77%	
DQ986178.1	Madura pennifera glucosyltransferase UGT8844 mRNA, complete	215	295	45%	4e-64	69%	
DQ975481.1	Medicago truncatula isolate GT24C (neo)flavanoid glucosyltransf	248	298	45%	2e-61	71%	U
AB262995.1	Secamum indicum SAUGT21 mRNA for UGT8806, complete cds	228	228	36%	2e-55	69%	
AF042942.2	Vitis vinifera contig VV78X063777.14, whole genome shotgun seq	222	305	40%	2e-54	78%	
AF042955.2	Vitis vinifera contig VV78X161435.9, whole genome shotgun seq	222	305	40%	2e-54	78%	
AF042952.2	Vitis vinifera contig VV78X202698.5, whole genome shotgun seq	215	215	35%	4e-52	69%	
AF042961.1	Stevia rebaudiana UDP-glucosyltransferase 88B1 mRNA, complet	216	292	41%	1e-51	78%	
AF042959.1	Scutellaria laete-olacea var. rakusimansa SUGT mRNA for UGT	208	208	22%	5e-50	74%	
DQ975480.1	Medicago truncatula isolate GT22509 (neo)flavanoid glucosyltrans	208	289	30%	2e-49	81%	U
AF042972.2	Vitis vinifera contig VV78X269767.3, whole genome shotgun seq	201	256	29%	2e-48	76%	
AF042970.2	Vitis vinifera contig VV78X097672.40, whole genome shotgun seq	203	392	35%	2e-48	73%	
AF042974.1	Vitis vinifera contig VV78X024267.14, whole genome shotgun seq	203	203	47%	2e-48	64%	

ข้อมูลจากตารางที่ 1 แสดงชนิดและรหัสหมายเลขของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ศึกษาได้จากพืชชนิดต่างๆ และมีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสที่ได้จากกุหลาบ (*RhGT1*) โดยเรียงลำดับตั้งแต่มีความเหมือนสูง และลดลงตามลำดับ การที่ยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสมีบริเวณนิวคลีโอไทด์ที่มีความเหมือนกับพืชจำนวนมากเพื่อยืนยันว่ายีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสในกุหลาบพันธุ์แกรนด์ กาลา มีส่วนที่เป็น conserve elements ซึ่งบริเวณดังกล่าวจะมีแนวโน้มที่ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงในพืชหลายชนิด จึงทำให้มีโอกาสที่จะพบบริเวณอนุรักษ์เดียวกันนี้ในกุหลาบสายพันธุ์แกรนด์กาลาที่ยังไม่เคยมีผู้ใดโคลนยีนได้มาก่อนอีกด้วย และหากใช้บริเวณดังกล่าวอ้างอิงเพื่อออกแบบไพรเมอร์จะทำให้ได้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 แสดงลำดับไพรเมอร์ของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส

primer	Nucleotide sequence	TM	%GC content
forward GT	5' TTGTGGGTGGTACGTAATCCACC 3'	70.75	52.17
reverse GT	5' TTCCACCCACAGTGAGTCAC 3'	66.47	50.00

จากผลที่ได้ทำให้สามารถออกแบบไพรเมอร์ที่ได้ทั้ง 2 สายดังแสดงในตารางที่ 2 และเมื่อนำมาศึกษาความจำเพาะของยีนดังกล่าวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของพืชชนิดอื่นๆ โดยการ Blastn (Altschul *et al.*, 1997) อีกครั้งเพื่อศึกษาและยืนยันโอกาสความเป็นไปได้ที่ยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส จะสามารถเกิดการแสดงออกได้ โดยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในไพรเมอร์ดังกล่าวเป็นต้นแบบ ได้ผลดังตารางที่ 3 และ 4 ตามลำดับ

ตารางที่ 3 การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ forward GT ในพืชชนิดต่างๆ

ชนิดของพืช	Accession number	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (23 bp.)	%ความเหมือน	ค่า E value
1. <i>Rosa hybrida</i>	AB201048	TTGTGGGTGGTACGTAATCCACC	100%	0.001
	AB201049	TTGTGGGTGGTACGTAATCCACC	100%	0.32
	AB201050	TTGTGGGTGGTACGTAATCCACC	100%	0.32
2. <i>Arabidopsis thaliana</i>	AY088211	TTGTGGGTGGTCCGTAATCCACC	95%	0.32
	AY143902	TTGTGGGTGGTCCGTAATCCACC	95%	0.32
	BX822788/CNSOA4US	TTGTGGGTGGTCCGTAATCCACC	95%	0.32
	BX822861/CNSOA71Q	TTGTGGGTGGTCCGTAATCCACC	95%	0.32
	BX823361/CNSOA6ND	TTGTGGGTGGTCCGTAATCCACC	95%	0.32
	BX823408/CNSOA6LZ	TTGTGGGTGGTCCGTAATCCACC	95%	0.32
	NM112523	TTGTGGGTGGTCCGTAATCCACC	95%	0.32
	NM112524	TTGTGGGTGGTCCGTAATCCACC	95%	0.32
3. <i>Vitis vinifera</i>	NM180266	TTGTGGGTGGTCCGTAATCCACC	95%	0.32
	AM441422	TTGTGGGTGGTGCGCAATCCACC	91%	79
	AM443575	TTGTGGGTGGTGCGCAATCCACC	91%	79

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ reverse GT ในพืชชนิดต่างๆ

ชนิดของพืช	Accession No.	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (20 bp.)	% ความเหมือน	ค่า E value
1. <i>Rosa hybrida</i>	AB201048	GTGACTCACTGTGGGTGGAA	100%	0.041
2. <i>Rosa hybrida</i>	AB201049	GTGACTCACTGTGGGTGGAA	100%	0.041
3. <i>Rosa hybrida</i>	AB201050	GTGACTCACTGTGGGTGGAA	100%	0.041
4. <i>Vitis vinifera</i>	AM468150	GTGACTCACTGTGGGTGGAA	100%	0.041
5. <i>Vitis vinifera</i>	AM429626	GTGACTCACTGTGGGTGGAA	100%	0.041
6. <i>Vitis vinifera</i>	AM453555	GTGACTCACTGTGGGTGGAA	100%	0.041
7. <i>Vitis vinifera</i>	AM439877	GTGACTCACTGTGGGTGGAA	100%	0.041
8. <i>Fragaria x anassa</i>	DQ289588	GTGACTCACTGTGGGTGGAA	100%	0.041
9. <i>Dorotheanthus bellidifomia</i>	Y18871	TGACTCACTGTGGGTGGAA	100%	0.16

จากตารางที่ 3 และ 4 แสดงให้เห็น เปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดอกกุหลาบกับพืชชนิดอื่นๆ

2.2 การสร้างยีน 18S rRNA เพื่อใช้เป็นโมเลกุลอ้างอิง

จากการสืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล Gen Bank เพื่อนำมาออกแบบไพรเมอร์อ้างอิง โดยใช้ยีน 18S ribosomal RNA ของ *Rosa hybrida* เป็นชิ้นยีนมาตรฐานในการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส ซึ่งสามารถออกแบบไพรเมอร์ได้ดังตารางที่ 5

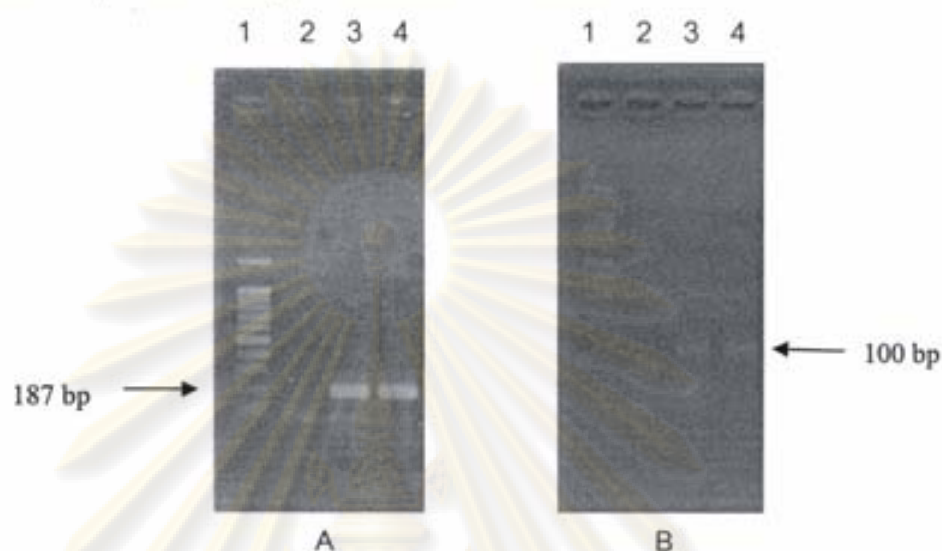
ตารางที่ 5 แสดงลำดับไพรเมอร์ของยีน 18S rRNA

primer	nucleotide sequence	TM	%GC content
forward 18S	5'AAGGGCACCACCAGGAGTGGAGC3'	80.70	66.67
reverse 18S	5'AAG A A AGAGCTCTCAGTCTCAATC3'	70.46	41.67

2.3 การสร้างชิ้นส่วนยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสและยีน 18S rRNA เพื่อใช้อ้างอิง

จากการออกแบบไพรเมอร์ยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส และยีน 18S rRNA โดยใช้ดอกกุหลาบที่สกัดด้วยวิธี CTAB (Chang et al.,1993) เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ จากนั้นทำการเพิ่ม

ปริมาณชิ้นส่วนของยีนจำเพาะดังกล่าวทั้ง 2 ชิ้น ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) พบว่ายีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสและยีน *18S rRNA* มีขนาดสอดคล้องกับขนาดคาดหวัง ตามทฤษฎี คือ 187 คู่เบส และ 100 คู่เบส ตามลำดับได้ผลดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 ผลิตรหัสดีเอ็นเอเป้าหมายของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส และยีน *18S rRNA*

A ชิ้นส่วนของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส (1 =100 bp 2 = negative control

3 และ 4 = ยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส)

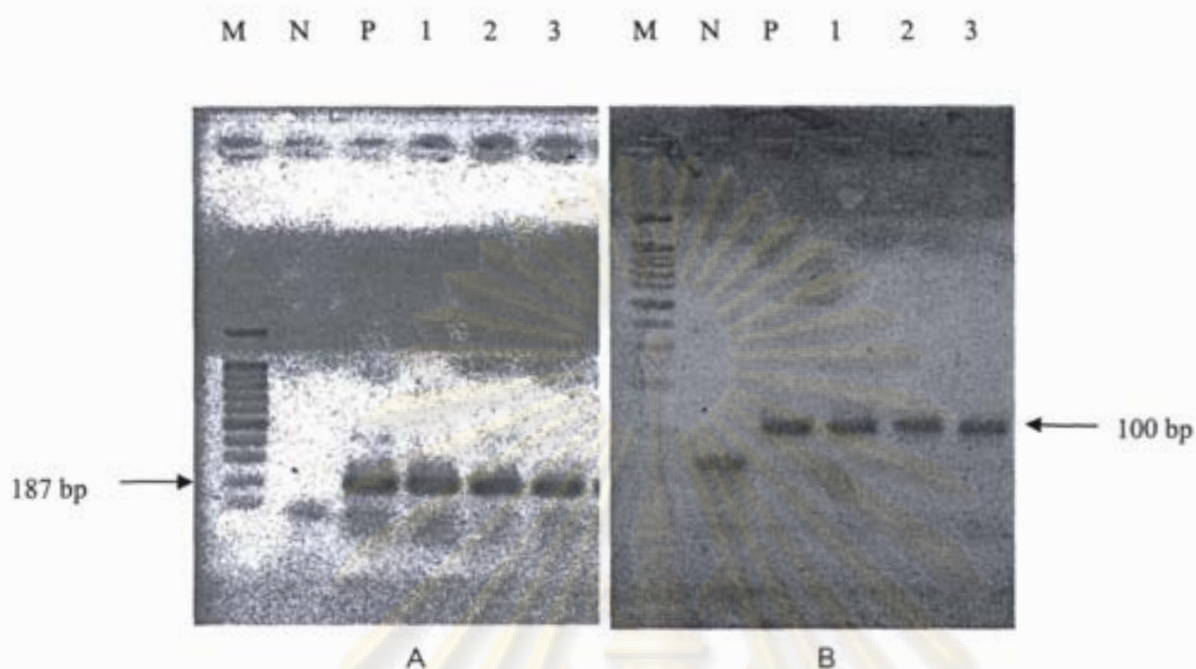
B ชิ้นส่วนของยีน *18S rRNA*(1=100 bp 2 = negative control

3 และ 4 =*18S rRNA*)

2.4 การโคลนยีน *GT* และ *18S rRNA*

จากผลการโคลนยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสโดยถ่ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ TOP10 สามารถคัดเลือกเซลล์ของแบคทีเรียที่ได้รับการถ่ายยีนได้เป็นผลสำเร็จอย่างละจำนวน 3 โคลน โดยเมื่อใช้เทคนิค PCR ในการยืนยันผลสามารถตรวจพบชิ้นส่วนของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสที่เป็นยีนเป้าหมาย และมีขนาด 187 และ 100 คู่เบสตามที่ได้ออกแบบไว้เบื้องต้น ดังแสดงในภาพที่ 7

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 7 ผลการโคลนยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส(A) และ *18S rRNA*(B)

ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานเทียบขนาด 100 นิวคลีโอไทด์

N คือ negative control

P คือ positive control

1-3 คือ ตัวอย่างจากโคลนที่ 1 - 3 ของแต่ละยีน ตามลำดับ

3 การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส ด้วยเทคนิค ไบโอเซนเซอร์

3.1 การสกัดอาร์เอ็นเอจากกลีบกุหลาบทั้ง 5 ระยะ

จากการนำกลีบดอกกุหลาบในระยะ 0 2 4 6 และ 8 วัน ไปสกัดอาร์เอ็นเอ จากปริมาณตัวอย่างเริ่มต้นตัวอย่างละ 300 มิลลิกรัม เมื่อนำมาแยกขนาดด้วยเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ปริมาตร 3 ไมโครลิตร แสดงดังภาพที่ 8

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1 2 3 4 5



ภาพที่ 8 ผลการสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากกลีบดอกกุหลาบทั้ง 5 ระยะ

- ช่องที่ 1 คือ อาร์เอ็นเอดอกกุหลาบระยะที่ 1 (อายุดอก 0 วัน)
 ช่องที่ 2 คือ อาร์เอ็นเอดอกกุหลาบระยะที่ 2 (อายุดอก 2 วัน)
 ช่องที่ 3 คือ อาร์เอ็นเอดอกกุหลาบระยะที่ 3 (อายุดอก 4 วัน)
 ช่องที่ 4 คือ อาร์เอ็นเอดอกกุหลาบระยะที่ 4 (อายุดอก 6 วัน)
 ช่องที่ 5 คือ อาร์เอ็นเอดอกกุหลาบระยะที่ 5 (อายุดอก 8 วัน)

จากลักษณะอาร์เอ็นเอที่สกัดจากดอกกุหลาบทั้ง 5 ระยะมีลักษณะแบบเดียวกัน คือ มีลักษณะปรากฏของแถบอาร์เอ็นเอของ tRNA และ rRNA และมีแถบเป็นแนวยาวที่บ่งชี้ถึง mRNA และคุณภาพของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ โดยเฉพาะในระยะที่ 2 - 4 จะพบว่าอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ยังไม่สะอาดนัก จึงนำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ทั้ง 5 ระยะไปทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งด้วยการตกตะกอนในลิเทียมคลอไรด์ (LiCl) จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อหาความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอได้ผลดังตารางที่ 6

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

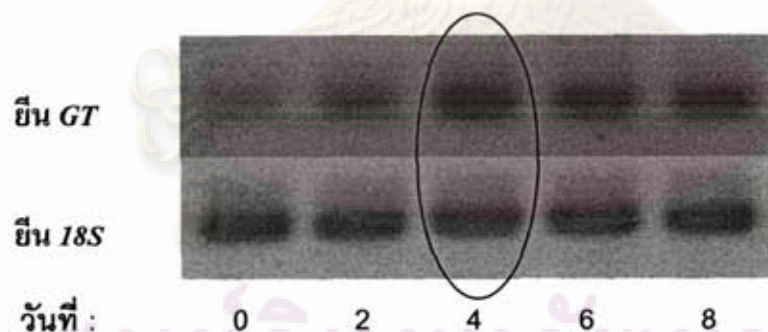
ตารางที่ 6 ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่ได้จากกลีบดอกระยะต่างๆ

ลำดับที่	ระยะของกลีบดอก	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร	ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ (ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)
1	ระยะที่ 1 (วันที่ 0)	0.051	0.816
2	ระยะที่ 2 (วันที่ 2)	0.042	0.672
3	ระยะที่ 3 (วันที่ 4)	0.029	0.464
4	ระยะที่ 4 (วันที่ 6)	0.028	0.448
5	ระยะที่ 5 (วันที่ 8)	0.033	0.528

จากค่าความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่ได้ ทำให้ทราบคุณภาพและปริมาณของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้โดยประมาณ จากนั้นนำไปใช้ในการตรวจสอบรูปแบบการแสดงออกของยีนโดยเทคนิค RT-PCR ในขั้นตอนต่อไป

3.2 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากอาร์เอ็นเอด้วยวิธี RT-PCR

เมื่อนำอาร์เอ็นเอของตัวอย่างที่สกัดได้จากกลีบดอกกุหลาบทั้ง 5 ระยะการศึกษา มาใช้เป็นแม่แบบเริ่มต้นในปฏิกิริยา RT-PCR พบว่าการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนจำเพาะของ ยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส และยีน 18S rRNA เป็นดังภาพที่ 9



ภาพที่ 9 เปรียบเทียบการสังเคราะห์ยีน 18S rRNA และ GT ในกลีบดอกกุหลาบทั้ง 5 ระยะการศึกษา

- 0 คือ ยีน 18S rRNA และ GT ในกลีบดอกกุหลาบระยะที่ 1 (อายุดอก 0 วัน)
- 2 คือ ยีน 18S rRNA และ GT ในกลีบดอกกุหลาบระยะที่ 2 (อายุดอก 2 วัน)
- 4 คือ ยีน 18S rRNA และ GT ในกลีบดอกกุหลาบระยะที่ 3 (อายุดอก 4 วัน)
- 6 คือ ยีน 18S rRNA และ GT ในกลีบดอกกุหลาบระยะที่ 4 (อายุดอก 6 วัน)
- 8 คือ ยีน 18S rRNA และ GT ในกลีบดอกกุหลาบระยะที่ 5 (อายุดอก 8 วัน)

ระบบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำเพาะเป็นไปอย่างสมบูรณ์ พิจารณาจาก negative control และ positive control พบว่าระบบไม่มีการปนเปื้อนของแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างไปจากค่าคาดหวัง (ไม่แสดงผล) และการทำปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ (ไม่แสดงผล)

จากภาพที่ 9 เมื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีน 18S rRNA ในกลีบดอกกุหลาบทั้ง 5 ระยะโดยการเปรียบเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอในกลีบดอกกุหลาบแต่ละระยะพบว่า ความเข้มชั้นของแถบดีเอ็นเอในแต่ละระยะไม่มีความแตกต่างกัน โดยขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวมีขนาดเท่ากันคือ 100 คู่เบส จึงเป็นเครื่องบ่งชี้ให้เห็นว่ากลีบดอกกุหลาบมีระดับการแสดงออกของยีน 18S rRNA สม่ำเสมอเท่ากันทุกระยะการศึกษา

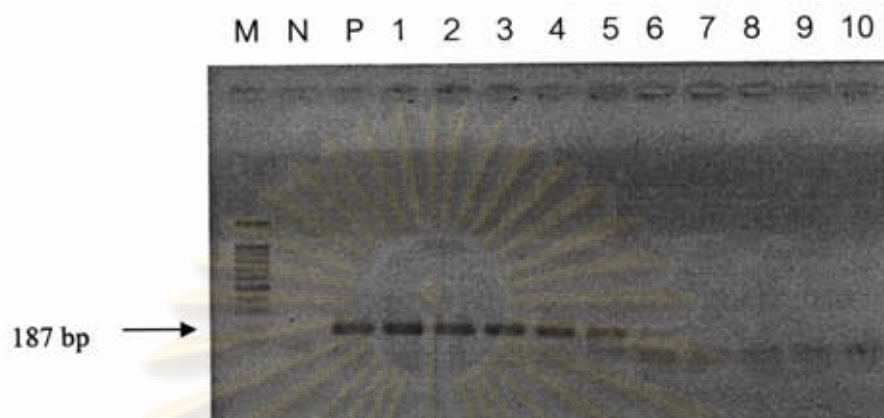
เมื่อศึกษาระดับการแสดงออกของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส โดยพิจารณาจากความเข้มของแถบดีเอ็นเอเป้าหมายซึ่งมีขนาด 187 คู่เบสนั้น พบว่าระยะเวลาการศึกษามีผลต่อระดับการแสดงออกของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส เนื่องจากพบความแตกต่างของความเข้มของแถบดีเอ็นเอในแต่ละระยะ โดยในช่วงระยะที่ 1 (อายุดอก 0 วัน) พบว่ามีระดับการแสดงออกของยีนต่ำที่สุด เนื่องจากความเข้มของแถบดีเอ็นเอน้อยที่สุด ต่อมาในระยะที่ 2 (อายุดอก 2 วัน) จึงมีการเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน โดยสังเกตจากความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในระยะที่ 3 (อายุดอก 4 วัน) ที่ตรวจพบว่ากุหลาบมีอัตราการแสดงออกของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสสูงสุด เนื่องจากมีแถบดีเอ็นเอเข้มมากที่สุด หลังจากนั้นระดับการแสดงออกของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสเริ่มค่อยๆ ลดลงโดยพิจารณาจากแถบดีเอ็นเอที่เริ่มมีความเข้มลดลงในระยะที่ 4 (อายุดอก 6 วัน) และ 5 (อายุดอก 8 วัน) ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม یریก็ตีถึงแม้ว่าความเข้มของแถบดีเอ็นเอจะเริ่มลดลงก็ตาม แต่ก็ยังคงมีความเข้มมากกว่าที่ตรวจพบได้ในระยะที่ 1 และ 2

3.3 การวัดระดับการแสดงออกของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสด้วยเทคนิคไบโอเซนเซอร์

ด้วยหลักการของไบโอเซนเซอร์ทางเคมีไฟฟ้าที่ประยุกต์ใช้โดย Chaumpluk *et al.* (2006) ซึ่งเป็นเทคนิคที่อาศัยการตรวจวัดค่าการเปลี่ยนแปลงของอิเล็กตรอนอิสระที่ได้จากการทำปฏิกิริยาระหว่างผลิตภัณฑ์ cDNA ที่ได้จากยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส กับ minor groove binder Hoechst 33258 โดยระดับปริมาณ cDNA จะแปรผกผันกับการเปลี่ยนแปลงทางกระแสไฟฟ้ารูปค่า anodic current peak (μA) สามารถวัดผลการเปลี่ยนแปลงของค่า anodic current peak กับความเข้มข้นของดีเอ็นเอเริ่มต้นเพื่อใช้เป็นค่าอ้างอิงได้

ผลการสร้างกราฟมาตรฐานของดีเอ็นเออ้างอิงยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส และ 18S rRNA โดยใช้ พลาสมิดดีเอ็นเอต้นแบบที่โคลนได้เตรียมเป็นสารละลายดีเอ็นเอต้นแบบที่มี

จำนวนโมเลกุล 10 ระดับ ตั้งแต่ 500,000 50,000 5,000 500 50 5 0.5 0.05 0.005 และ 0.0005
ได้ผลดังภาพที่ 10 และ 11 ตามลำดับ



ภาพที่ 10 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากโคลนของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส ที่ 10 ระดับความเข้มข้น

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp) N คือ negative control

P คือ positive control

1-10 คือ ยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส ที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณจากดีเอ็นเอเริ่มต้นที่มีจำนวน

โมเลกุลตั้งแต่ 500,000 50,000 5,000 500 50 5 0.5 0.05 0.005 และ 0.0005

ตามลำดับ



ภาพที่ 11 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากโคลนของยีน 18S rRNA ที่ 10 ระดับความเข้มข้น

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp) N คือ negative control

P คือ positive control

1-10 คือ ยีน 18S rRNA ที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณจากดีเอ็นเอเริ่มต้นที่มีจำนวนโมเลกุล

ตั้งแต่ 500,000 50,000 5,000 500 50 5 0.5 0.05 0.005 และ 0.0005 ตามลำดับ

นำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสและยีน 18S rRNA ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค RT-PCR จากหัวข้อ 3.2 ตรวจวัดด้วยเทคนิคโวลแทมเมตรี ได้ผลดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ค่าความสัมพันธ์ของ anodic current peak (μA)

ตำแหน่ง กุหลาบ	ชนิดยีนที่เปรียบเทียบ	ค่า anodic current peak ที่ระยะต่างๆ (μA)					
		500,000	50,000	5,000	500	50	5
กลีบดอก	ยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส	0.851	0.962	1.151	1.272	1.451	1.682
	18S rRNA	0.802	0.951	1.112	1.173	1.441	1.661

* ดูภาคผนวก(ตารางที่12,13)

จากตารางที่ 7 ค่า anodic current peak ของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสที่ระดับปริมาณต่างๆ ตั้งแต่ 0.85-1.68 μA ในขณะที่เมื่อวัดค่า anodic current peak ของยีน 18S rRNA มีค่าตั้งแต่ 0.80 – 1.66 μA .จากนั้นเมื่อนำค่า anodic current peak ที่ได้ของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส และยีน 18S rRNA มาสร้างเป็นกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอในรูปของจำนวน copy กับค่าของ anodic current peak (μA) ที่ได้จากการวัดค่า Linear Sweep Voltammetry มาสร้างแสดงความสัมพันธ์ของยีนทั้งสอง ในรูปของค่า log ซึ่งค่า anodic current peak มีความสัมพันธ์ผกผันกับ log ของความเข้มข้น โดยเมื่อความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาก จะมีค่า anodic current peak น้อย ความสัมพันธ์ระหว่างค่า anodic current peak และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ แสดงในภาพที่ 12 และ 13 ตามลำดับ

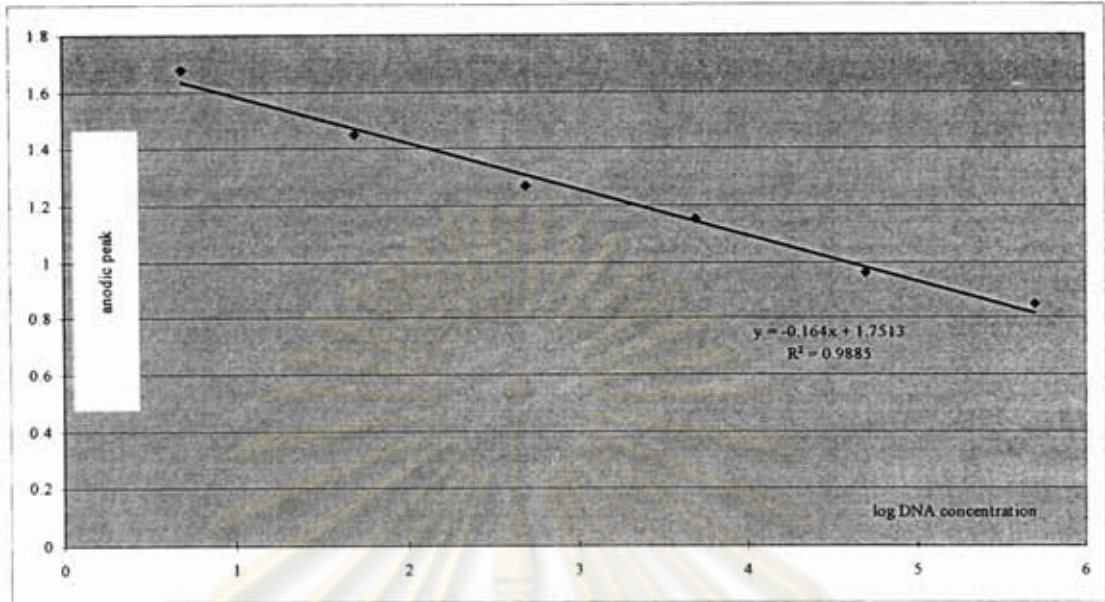
สมการเส้นตรงของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส คือ

$$y = -0.164X + 1.751 \quad R^2 = 0.9885$$

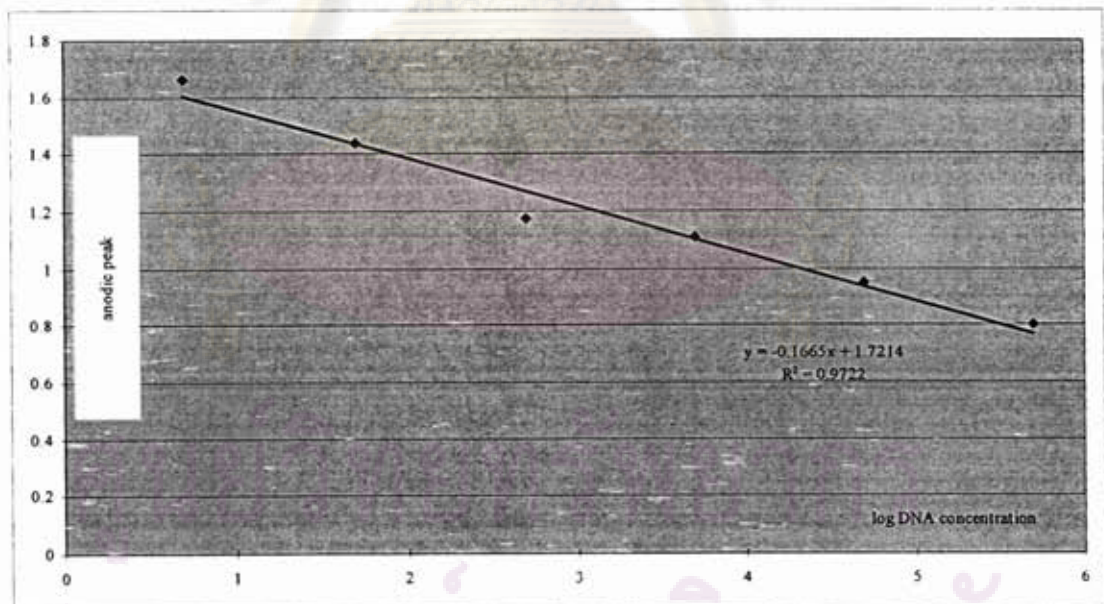
สมการเส้นตรงของยีน 18S rRNA คือ

$$y = -0.1665X + 1.7214 \quad R^2 = 0.9722$$

ศูนย์วิจัยที่รักษากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 12 กราฟมาตรฐานสำหรับการคำนวณโมเลกุลของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส
เมื่อ แกน X คือ log ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (จำนวนโมเลกุล)
แกน Y คือ anodic current peak ที่วัดได้ (μA)



ภาพที่ 13 กราฟมาตรฐานสำหรับการคำนวณโมเลกุลของยีน 18S rRNA
เมื่อ แกน X คือ log ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (จำนวนโมเลกุล)
แกน Y คือ anodic current peak ที่วัดได้ (μA)

การคำนวณปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากการแสดงออกของยีนเป้าหมาย สามารถคำนวณได้จากความสัมพันธ์ข้างต้นทั้งสิ้น anodic current peak ที่ได้จากการสร้างกราฟมาคำนวณหาจำนวนโมเลกุลดีเอ็นเอของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส และยีน 18S rRNA และสัดส่วนระหว่างยีนทั้งสองได้ผลดังตารางที่ 8 และ 9 ตามลำดับ

ตารางที่ 8 ค่าเฉลี่ยของ anodic current peak (μA) และ copy number ยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส ทั้ง 5 ระยะเวลาทำการทดลอง

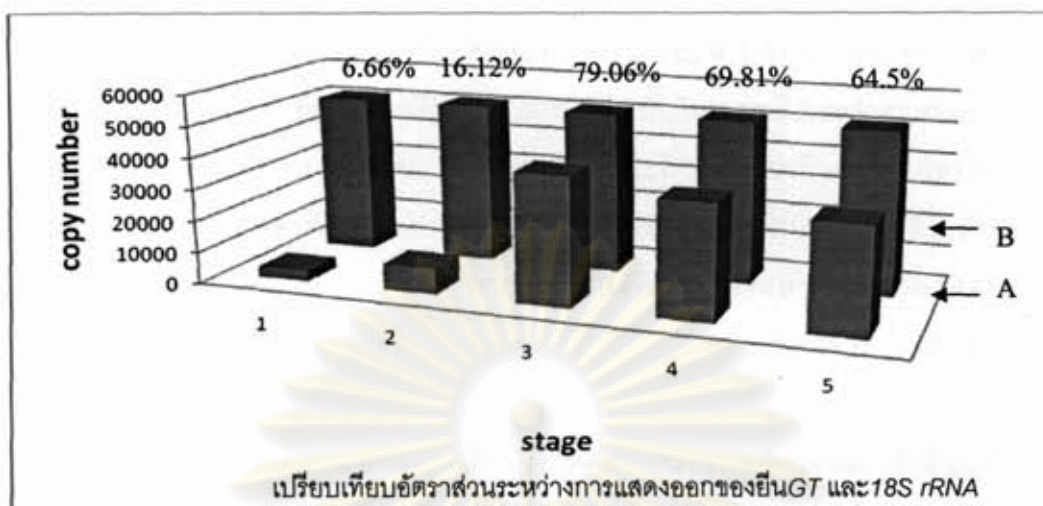
ค่าที่วัดได้	ระยะเวลาทำการศึกษา				
	ระยะที่	ระยะที่	ระยะที่	ระยะที่	ระยะที่
	1	2	3	4	5
Anodic current peak (μA)	1.201	1.156	0.990	1.000	1.010
Concentrate of DNA (copy number)	3413	8280	40520	35954	33324

* ดูภาคผนวก(ตารางที่14)

ตารางที่ 9 ค่าเฉลี่ยของ anodic current peak (μA) และ copy number ยีน 18S rRNA ทั้ง 5 ระยะเวลาทำการทดลอง

ค่าที่วัดได้	ระยะเวลาทำการศึกษา				
	ระยะที่	ระยะที่	ระยะที่	ระยะที่	ระยะที่
	1	2	3	4	5
Anodic current peak (μA)	0.941	0.937	0.940	0.936	0.939
Concentrate of DNA (copy number)	51210	51354	51250	51430	51340

* ดูภาคผนวก(ตารางที่15)



ภาพที่ 14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของ copy number ระหว่างยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส เปรียบเทียบกับยีน 18S rRNA เมื่อ A คือ ยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส และ B คือ ยีน 18S rRNA

ตารางที่ 10 ร้อยละของสัดส่วนระหว่างยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส (GT) กับยีน 18S rRNA

ชนิดของยีน	จำนวนโมเลกุลของยีนที่ตรวจวัดด้วยไบโอเซนเซอร์				
	ระยะที่ 1	ระยะที่ 2	ระยะที่ 3	ระยะที่ 4	ระยะที่ 5
GT	3413	8280	40520	35954	33324
18S rRNA	51210	51354	51250	51430	51340
GT / 18S rRNA	0.0066	0.1612	0.7906	0.6981	0.6450
GT / 18S rRNA (%)	6.66	16.12	79.06	69.81	64.50

จากภาพที่ 14 แสดงความสัมพันธ์ของจำนวนโมเลกุลระหว่างยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส เปรียบเทียบกับยีน 18S rRNA พบว่ายีน 18S rRNA มีปริมาณคงที่ตลอดทั้ง 5 ระยะ แต่ยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา โดยระยะแรกปริมาณยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสจะมีความเข้มข้นต่ำที่สุด จึงเริ่มเพิ่มปริมาณขึ้นเล็กน้อย และเพิ่มปริมาณความเข้มข้นสูงสุดในระยะที่ 3 หลังจากนั้นยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสจึงเริ่มลดลงตามลำดับ

เมื่อพิจารณาจำนวนโมเลกุลของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสเปรียบเทียบกับยีน 18S rRNA เกิดเป็นสัดส่วนระหว่างยีนทั้ง 2 ทำให้ทราบระดับการแสดงออกของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสได้

อย่างชัดเจน ดังแสดงในตารางที่ 10 โดยจะพบว่าในระยะที่ 1 ยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสจะมีระดับการแสดงออกที่ต่ำที่สุด(ดอกเริ่มต้น 6.66%) จากนั้นในระยะที่ 2 ระดับการแสดงออกของยีนจะเพิ่มขึ้น (ดอกอายุ 2 วัน 16.12%) โดยเฉพาะในระยะที่ 3 ที่พบว่ายีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสจะมีระดับการแสดงออกสูงที่สุด(ดอกอายุ 4 วัน 79.06%) หลังจากนั้นจะเริ่มมีระดับการแสดงที่ลดลง(ดอกอายุ 6 วัน 69.81% ดอกอายุ 8 วัน 64.5 %) ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับภาพที่ 10 และ 11 ของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสและยีน 18S rRNA ตามลำดับ ที่พบว่าแถบดีเอ็นเอของยีนทั้งสองที่ตรวจพบได้ในแต่ละระยะการศึกษามีความเข้มที่แตกต่างกัน โดยความเข้มของแถบดีเอ็นเอในระยะเวลาเริ่มต้นมีเพียงเล็กน้อย ต่อจากนั้นความเข้มของแถบดีเอ็นเอจึงเริ่มเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะที่ 3 จะพบว่าแถบดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นประมาณ 3 เท่าของการศึกษาในระยะ 2 หลังจากนั้นความเข้มของแถบดีเอ็นเอจะเริ่มลดความเข้มลง ตั้งแต่ในระยะที่ 4 ถึงระยะที่ 5



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของดอกกุหลาบ

จากการศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของดอกกุหลาบพันธุ์แกรนด์ กาลา โดยการวัดการพัฒนาของดอกกุหลาบด้วยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางดอกตามแนวขวาง และการวัดค่าการเปลี่ยนแปลงสีของกลีบดอกโดยใช้วิธีเปรียบเทียบสีของกลีบดอกที่ถูกตัดแบ่งครึ่งตามแนวยาว เพื่อเปรียบเทียบกับค่าของแถบสีมาตรฐาน RGB color charts Swatches and Color Table for Photoshop และ The Royal Horticultural Society color chart สามารถกำหนดระยะของการพัฒนาดอกกุหลาบออกเป็น 5 ระยะ ที่มีลักษณะการเปลี่ยนแปลงสีชัดเจนที่สุด คือ ช่วงระยะเวลาศึกษาทุกๆ 2 วัน ตั้งแต่วันเริ่มต้น จนถึงวันที่ 10 ของการศึกษา พบว่าดอกกุหลาบมีลักษณะการเปลี่ยนแปลงขนาดดอกและการเปลี่ยนแปลงสีของกลีบดอกในรูปแบบเดียวกัน คือ ในช่วงระยะที่ 1 และ 2 จะมีการเปลี่ยนแปลงขนาดและสีเพียงเล็กน้อย คือ ดอกยังคงเป็นดอกตูมอยู่ และกลีบดอกยังคงเป็นสีเขียว แต่การเปลี่ยนแปลงขนาดของดอกในระยะที่ 3 มีอัตราการเพิ่มขนาดดอกอย่างรวดเร็ว และกลีบดอกจะเริ่มเปลี่ยนแปลงจากสีเขียวกลายเป็นสีเหลืองส้ม ซึ่งลักษณะปรากฏของสีเหลืองส้มนั้นเกิดขึ้นจากการสะสมรงควัตถุแอนโทไซยานินภายในแวคิวโอลของเซลล์ ที่พบมากในเซลล์ epidermis ของกลีบดอก (Holton and Cornish, 1995) แต่หลังจากนั้น อัตราการเปลี่ยนแปลงขนาดดอกและสีของกลีบดอกจะแตกต่างกัน คือ ในระยะที่ 4 และ 5 จะมีอัตราการเพิ่มขนาดของดอกใกล้เคียงกับระยะที่ 3 ในทางกลับกันเมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงสีของกลีบดอก จะมีการเปลี่ยนแปลงจากสีเหลืองส้มกลายเป็นสีแดงอย่างรวดเร็วจากระยะที่ 3 เข้าสู่ระยะที่ 4 และหลังจากนั้นกลีบดอกจะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีแดงเข้ม จนเต็มกลีบดอก ยกเว้นบริเวณที่เป็นใจกลางของดอกเท่านั้น

2. การศึกษาอินทรีโคซิลทรานสเฟอเรส

การเปลี่ยนแปลงสีของดอกกุหลาบทั้ง 5 ระยะพบว่า แม้กุหลาบจะยังคงเป็นดอกตูม แต่กลีบดอกภายในกลีบเลี้ยงมีการเปลี่ยนแปลงทุกระยะ โดยเปลี่ยนแปลงจากสีเขียวกลายเป็นสีเหลืองส้ม และเป็นสีแดงในที่สุด เนื่องจากมีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินซึ่งเป็นรงควัตถุที่ให้สารสีแดง จากการศึกษาพบว่าในระยะแรกจะมีการสังเคราะห์แอนโทไซยานินน้อยมาก แต่จะมีการสังเคราะห์เพิ่มมากขึ้นเมื่อดอกเริ่มมีการเปลี่ยนสี จากการศึกษาของปิยะศักดิ์ (2542) กล่าวว่าการทำงานของยีนจะสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของสีในพืชดอกที่ระยะต่างๆ

จากกลไกการเปลี่ยนแปลงทางเคมี พบว่ายีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส ที่มีผลต่อการสังเคราะห์แอนโทไซยานิน และมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสีของกลีบดอก สอดคล้องกับการศึกษากลไกการทำงานของยีน *Rosa hybrida* glucosyltransferase (*RhGT1*) ซึ่งเป็นยีนที่มีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยน anthocyanidin ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีสี ให้เปลี่ยนเป็น Cyanidin 3,5-O-diglucoside ที่เป็นสารเริ่มต้นที่จะแสดงลักษณะปรากฏของโทนสีแดงของแอนโทไซยานิน

ดังนั้นจึงทำจากการศึกษาการแสดงออกของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสในดอกกุหลาบทั้ง 5 ระยะ เริ่มจากการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส โดยใช้การสืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์จากสิ่งมีชีวิตจำนวน 100 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ดังกล่าวสามารถนำมาใช้เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสที่มีขนาด 187 คู่เบสในดอกกุหลาบได้ ต่อมาจึงทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสทั้ง 5 ระยะ วัดค่าได้จากการสังเคราะห์ปริมาณ cDNA สายแรกจาก mRNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างของดอกกุหลาบในระยะต่างๆ พบว่าปริมาณ cDNA ที่สังเคราะห์ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับโมเลกุล 18S rRNA ที่มีขนาด 100 คู่เบส ซึ่งเป็น ยีนเจ้าบ้าน ที่มีคุณสมบัติเหมาะสำหรับการนำมาใช้ในการเป็นโมเลกุลอ้างอิงมาตรฐาน พบว่ายีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสจะมีปริมาณเริ่มต้นน้อยที่สุดในระยะที่ 1 ต่อมาในระยะที่ 2 ความเข้มข้นของ cDNA จะค่อยๆ เพิ่มสูงขึ้น สังเกตจากความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอที่สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงสีของกลีบดอก โดยเฉพาะในระยะที่ 3 ความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอจะมีความเข้มข้นมากที่สุด ซึ่งแสดงว่าการสร้างยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสของดอกกุหลาบในระยะที่ 3 มีปริมาณมากที่สุด จึงสามารถเปลี่ยนกลีบดอกสีเขียวให้เข้าสู่ระยะสีของแอนโทไซยานินได้ จะเห็นได้ว่าเวลาที่แตกต่างกัน ย่อมมีผลต่อการสังเคราะห์และการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันด้วย อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของแถบดีเอ็นเอยังสามารถใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ระดับการแสดงออกของยีนได้ส่วนหนึ่งในเชิงปริมาณ ถึงแม้จะไม่สามารถให้ค่าในเชิงตัวเลขได้ชัดเจนก็ตาม

จากการศึกษาวิจัยสรุปได้ว่า ระดับของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส ย่อมมีผลต่อระดับการแสดงออกของยีน และอัตราการเปลี่ยนแปลงสีของกลีบดอก โดยจะพบว่าเป็นช่วงที่มีการแสดงออกของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสสูง ย่อมเกิดกลไกการสังเคราะห์รงควัตถุเพิ่มสูงขึ้นด้วย และจะมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของกลีบดอกในเวลาต่อมา และการแสดงออกของยีนก็จะค่อยลดลง ย่อมทำให้ระดับการตรวจสอบ cDNA ลดลงด้วย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Muller *et al.* (2002) ที่ศึกษาเกี่ยวกับเอทิลีนมีผลต่อระดับการแสดงออกของยีน *RhCTR1* และ *RhCTR2* ในดอกกุหลาบ 3 ระยะโดยเปรียบเทียบค่าการแสดงออกของยีนทั้ง 2 กับยีนอ้างอิงมาตรฐาน (18S rRNA) ซึ่งวิธีการเทียบกับยีนที่มีการแสดงออกตลอดเวลา ทำให้ทราบว่าการแสดงออกของยีนในแต่ละระยะมีความแตกต่างกันและแสดงออกสูงสุดในระยะใด แต่เนื่องจากเป็นการ

ตรวจสอบในเชิงคุณภาพยังไม่สามารถระบุการแสดงออกเป็นค่าปริมาณได้จึงเป็นแนวทางในการพัฒนาเทคนิคใหม่ที่สามารถตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนในเชิงปริมาณได้ด้วย

3. การตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยไบโอเซนเซอร์

การตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนในระบบไบโอเซนเซอร์ เป็นระบบทางเคมีไฟฟ้าที่ใช้หลักการตรวจจับสัญญาณดีเอ็นเอ เริ่มจากการสกัดอาร์เอ็นเอของกลีบดอกกุหลาบในระยะเวลาที่แตกต่างกัน เพื่อให้ได้ mRNA สำหรับเป็นต้นแบบการสังเคราะห์ cDNA เพื่อนำ cDNA มาผสมรวมกับสารโมเลกุลสี Hoechst 33258 ซึ่งเป็นโมเลกุลกระตุ้นให้ดีเอ็นเอเกิดการรวมตัว และแปลงสัญญาณดีเอ็นเอเป็นสัญญาณทางไฟฟ้า ที่ตรวจวัดค่าในรูปของ anodic current peak โดยค่าดังกล่าวจะแปรผกผันกับค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ถูกวัดให้อยู่ในรูปของ copy number (Chaumpluk *et al.*, 2006a,b)

การตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสด้วยเทคนิคไบโอเซนเซอร์ในกุหลาบพันธุ์แกรนด์ กาลา จึงเป็นการศึกษาในเชิงปริมาณ เนื่องจากยังไม่มีผู้ศึกษาความสัมพันธ์เบื้องต้นของการพัฒนาสีดอกกับระดับการแสดงออกของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส ก่อนที่กลีบดอกจะพัฒนาเป็นสีแดงอย่างเต็มที่ ด้วยเทคนิคนี้ จากที่ผ่านมา มีรายงานการตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนในเชิงคุณภาพด้วยวิธี RT-PCR Southern blot (Zuker *et al.*, 2002) northern blot (Fukuchi-Mizutani *et al.*, 2003; Ogata *et al.*, 2005; Zuker *et al.*, 2002) และ western blot (Caiqing and Kapulnik, 2000) เป็นส่วนใหญ่เท่านั้น เช่น การตรวจสอบการแสดงออกของแอนโทไซยานินในเชิงคุณภาพเท่านั้น Werner *et al.*, (1998) กระตุ้นด้วยแสง UV และ elicitor ให้กับแครอท การตรวจระดับการแสดงออกด้วย RNA gel blot ภายหลังการถ่ายยีน Transposable element Activator (Ac) เข้าสู่ดอกพิกุล (Chuck *et al.*, 1993) Shalit *et al.* (2003) ได้ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารหอมระเหยในกุหลาบโดยแบ่งดอกออกเป็นระยะต่างๆ 6 ระยะตั้งแต่ดอกตูมจนกระทั่งบานเต็มที่ ศึกษาการแสดงออกโดย RNA gel blot เปรียบเทียบกับโปรตีนของยีนนั้นๆ ที่แยกด้วยวิธี HPLC ต่อมาได้มีการพัฒนาการศึกษาการแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิคไบโอเซนเซอร์ เริ่มจากการตรวจในลักษณะงานตรวจเชื้อโรค การปนเปื้อนต่างๆ เช่น การปนเปื้อนของเชื้อ *E. coli* ในน้ำดื่ม (Baumner *et al.*, 2003) จากนั้น Chaumpluk *et al.* (2007) ศึกษาการแสดงออกของยีนคลอโรฟิลเลสในปลีคอกอสีด้วยเทคนิคไบโอเซนเซอร์ได้ จึงนับว่าเป็นเทคนิคใหม่ที่ถูกนำมาใช้เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนในกุหลาบแกรนด์ กาลาเป็นครั้งแรก โดยเทคนิคนี้จะใช้วัดการสังเคราะห์ cDNA ที่ได้โดยเทียบกับโมเลกุล 18S rRNA พบว่ามีสัดส่วนการแสดงออกระหว่างยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสกับยีน 18S rRNA ระหว่าง 6.66 -79.06 เปอร์เซ็นต์ เทคนิคนี้สามารถวิเคราะห์ได้ง่าย รวดเร็ว ไม่

จำเป็นต้องใช้ประสบการณ์ในการวิเคราะห์มากนัก ซึ่งแตกต่างกับการวิเคราะห์ด้วยวิธีอื่น ๆ ข้างต้นที่กล่าวมาแล้ว นอกจากนี้แล้ววิธีดังกล่าวยังเป็นเทคนิคที่สามารถบอกความเข้มข้นหรือระดับการแสดงออกในเชิงปริมาณได้ด้วยต้นทุนที่ต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์เชิง competitive - quantitative RT - PCR (Marone *et al.*, 2001) หรือ real time - PCR (Rajagopal *et al.*, 2005) ที่มีต้นทุนสูง และใช้วิธีการวิเคราะห์ที่ยุ่งยาก ซับซ้อน ทำให้ต้องใช้เวลาในการวิเคราะห์ รวมทั้งต้องมีความพร้อมในด้านบุคลากรด้วย ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์ cDNA ด้วยเทคนิคไบโอเซนเซอร์พร้อมทั้งการเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ของ cDNA ด้วยโมเลกุลอ้างอิง 18S rRNA (Chaumpluk *et al.*, 2007; Muller *et al.*, 2002) จึงเหมาะสมในการวิเคราะห์เชิงปริมาณในปัจจุบัน จากข้อมูลในการทำวิจัยครั้งนี้ สามารถนำข้อมูลการเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีรวิทยาและระดับการแสดงออกของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสของดอกกุหลาบในช่วงเวลาต่างๆ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการหาระยะ ที่เหมาะสมในการพัฒนา และปรับปรุงด้านคุณภาพและการสร้างสายพันธุ์ใหม่ ให้แก่ดอกกุหลาบในอนาคตต่อไป การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของดอกกุหลาบพบว่า ดอกกุหลาบจะมีการพัฒนาสีของดอกจากสีเขียวกลายเป็นสีแดง ซึ่งเป็นรงควัตถุของแอนโทไซยานิน แม้ดอกจะยังคงอยู่ในระยะดอกตูม ภายใต้กลีบเลี้ยงอยู่ก็ตาม ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลน ทำให้เข้าใจโครงสร้าง และการทำงานของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสในดอกกุหลาบแกรนด์ กาลา ปรากฏโคลนที่ได้มีขนาด 187 คู่เบส รูปแบบการแสดงออกของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสตลอด 5 ระยะเวลาที่ศึกษา พบว่าการแสดงออกของยีนจะค่อยๆ เพิ่มขึ้น และจะมีการแสดงออกของยีนสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว จากนั้นการแสดงออกของยีนจึงเริ่มลดลงตามลำดับ ได้ข้อมูลพื้นฐานการแสดงออกของดอกกุหลาบในระหว่างการพัฒนาของดอกในระยะดอกตูม ซึ่งเป็นประโยชน์ในการนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงคุณภาพของดอกกุหลาบในอนาคตต่อไป ดังนั้น จากการศึกษาโดยใช้กุหลาบเป็นต้นแบบในการศึกษาการแสดงออกของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรสนั้น ทำให้ได้พัฒนาระบบการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเชิงปริมาณด้วยเทคนิคไบโอเซนเซอร์ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นวิธีพื้นฐานกับงานอื่นๆ เพื่อเป็นการลดระยะเวลาและต้นทุน ในการวิจัยในไม้ดอกอื่นๆ ต่อไป

ศูนย์วิจัยการขยายพันธุ์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- ปิยะศักดิ์ ชุ่มพฤกษ์. ไบโอดีเซนเซอร์กับการตรวจวิเคราะห์อาหารด้วยโมเลกุลดีเอ็นเอในสัมมนาเชิงปฏิบัติการการวิเคราะห์ดีเอ็นเอกับการเสริมศักยภาพในอุตสาหกรรมอาหาร. หน่วยปฏิบัติการชีววิทยาโมเลกุล ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (2549): 1-7.
- ปิยะศักดิ์ ชุ่มพฤกษ์. DNA Sensor: Biosensor สำหรับอุตสาหกรรมอาหาร. Food Focus Thailand (กุมภาพันธ์ 2550): 40-43.
- ปิยะศักดิ์ ชุ่มพฤกษ์. เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมในการควบคุมสีและลักษณะของดอก. วารสารข่าวศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและปลูกพืชทดลอง 13, 1 (2542): 9-13.

ภาษาอังกฤษ

- Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schaffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W. and Lipman, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. Nucleic Acids and Research 25 (1997): 3389-3402.
- Andreescu, S.; and Sadik, O. A. Advanced electrochemical sensors for cell cancer monitoring. Methods 37 (2005): 84-93.
- Baeumner, A. J.; Cohen, R. N.; Miksic, V. and Min, J. RNA biosensor for the rapid detection of viable *Escherichia coli* in drinking water. Biosensors and Bioelectronics 18 (2003): 405-413.
- Boss, P. K.; Davies, C.; and Robinson, S. P. Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. Plant Physiology 111 (1996): 1059-1066.
- Caiqing, M. and Kapulnik, Y. In Situ Western Blot : A novel Strategy to study gene expression in transgenic plant roots. Plant Molecular Biology Reporter 18 (2000): 289a – 289e.
- Chang, S.; Pryear, J. and Cairney, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. Plant Molecular Biology Report 11 (1993): 113 -117.

- Chuck, G.; Robbins, T.; Nijjar, C.; Ralston, E.; Courtney - Gutterson, N. and Dooner, H. K. Tagging and cloning of a petunia flower color gene with the maize transposable element activator. The Plant Cell 5 (1993); 371-378.
- Chaumpluk, P.; Chikae, M.; Takamura, Y.; and Tamiya, E. Novel electrochemical identification and semi quantification of bovine constituents in feedstuffs. Science and Technology of Advanced Materials 7 (2006a): 263-269.
- Chaumpluk, P.; Kerman, K.; Takamura, Y.; and Tamiya, E. Accumulation of amplified target DNAs using thio/biotin labeling, S₁ nuclease and ferrocen estreptavidin magnetic system and direction of specific DNA signals with screen printed gold electrode. Science and Technology of Advanced Materials (2006b): 1-7.
- Chaumpluk, P.; Hadthamard, N.; Kosakul, T.; Kanlayanarat, S.; and Tamiya, E. An electrochemical DNA sensor for the detection of chlorophyllase gene expression in fresh cut broccoli. Acta Horticulturae 746 (2007): 195-202.
- D'Souza, S. F. Review Microbial biosensors. Biosensors & Bioelectronics 16 (2001): 337-353.
- Fukuchi-Mizutani, M.; Okuhara, H.; Fukui, Y.; Nakao, M.; Katsumoto, Y.; Yonekura-Sakakibara, K.; et al. Biochemical and molecular characterization of a novel UDP-glucose: anthocyanin 3'-o-glucosyltransferase, a key enzyme for blue anthocyanin biosynthesis, from gentian. Plant Journal 132(2003); 1652-1663.
- Gardner, E. J.; Simmous, M. J. and Snustad, D. P. Principles of genetics, 8th ed. (New York: John and Son, 1991).
- Holton, T. A.; and Cornish, E. C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. The Plant Cell 7 (1995): 1071-1083.
- Jensen, T. R.; Schatz, G. C.; Duyne R. P. V. Nanosphere lithography: Surface plasmon resonance spectrum of a periodic array of silver nanoparticles by ultraviolet-visible extinction spectroscopy and electrodynamic modeling. Journal Physiology and Chemistry 103 (1999): 2394-2401.
- Kai, E.; Sawata, S.; Ikebukuro, K.; Lida, T.; Honda, T. and Karube, I. Detection of PCR products in solution using surface plasmon resonance, Analytical Chemistry 71 (1999); 796-800.

- Katsumoto, Y.; Fukuchi-Mizutani, M.; Fukui, Y.; Brugliera, F.; Holton, T. A.; Karan, M.; et al. Engineering of the rose flavonoid biosynthetic pathway successfully generated blue-hued flowers accumulating delphinidin. Plant Cell Physiology 48 (2007): 1589-1600.
- Kumar, S. D.; Kulkarni, A. V.; and Dhaneshwar, R. G. Cyclic voltammetric studies at the glucose oxidase enzyme electrode. Bioelectrochemistry and Bioenergetics 27 (1992): 153-160.
- Larkin, M. A.; Blackshields, G.; Brown, N. P.; Chenna, R.; McGettigan, P. A.; McWilliam, H.; et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 23,21 (2007); 2947-2948.
- Lin, T.; Huang, K.; and Liu, C. Determination of organophosphorous pesticides by a novel biosensor base on localized surface plasmon resonanced. Biosensors and Bioelectronics 22 (2006): 513-518.
- Lin, T.; and Chung, M. Detection of cadmium by a fiber-optic biosensor base on localized surface Plasmon resonance. Biosensors and Bioelectronics (2008).
- Marone, M.; Mozzetti, S.; Ritis, D. D.; Pierelli, L.; and Scambia, G. Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. Biological Procedures Online 3 (2001): 19-25.
- Moschopaulau, G.; Vitsa, K.; Ben F.; Vassilakos, N.; Perollikaris, A.; Blouhos, P.; et al. Engineering of the membrane of fibrablast cells with virus-specific antibodies: A novel biosensor tool for virus detection. Biosensor and Bioelectron 4 (July 2008).
- Muller, R.; Owen, C. A.; Xue, Z.; Welander, M.; and Stummann, B. M. Characterization of two CTR-like protein kinases in *Rosa hybrida* and their expression during flower senescence and in response to ethylene. Journal of Experimental Botany 53 (May 2002): 1223-1225.
- Ogata, J.; Kanno, Y.; Itoh, Y.; Tsugawa, H.; and Suzuki, M. Plant biochemistry :Anthocyanin biosynthesis in roses. Nature 435 (2005): 757-758.
- Percell, M.; Carpentier, R.; Belanger D.; and Fortier, G. Immobilized plant thylakoid membranes as a biosensor for herbicides. Biotechnology Techniques 4,5 (1990): 363-368.

- Purvis, D.; Leonardova, O.; Farmakovskiy, D.; and Cherkasov, V. An ultrasensitive and stable potentiometric immunosensor. Biosensors and Bioelectronics **18** (2003): 1385-1390.
- Rajagopal, R.; Thamilarasi, K.; Venkatesh, R. G.; Srinivas, P.; and Bhatnagar K. R. Immune cascade of *Spodoptera litura*: Cloning, expression and characterization of inducible prophenol oxidase. Biochemical and Biophysical Research Communications **339** (2005): 394-400.
- Rasooly, A.; and Herold, K. E. Biosensors for the analysis of food and waterborne pathogens their toxins. Journal of AOAC International **89,3** (2006): 873-883.
- R.H.S.,R.H.S. Colour Charts, The Royal Horticultural Society,London(1966,1986,1995).
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; and Maniatis, T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York: Cold Spring Harbor, 1989 .
- Serra, B.; Gamella, M.; Reviejo, A. J.; and Pingarron, J. M. Lectin-modified piezoelectric biosensors for bacteria recognition and quantification. Analytical and Bioanalytical Chemistry **391** (2008): 1853-1860.
- Shalit, M.; Guterman, I.; Volpin, H.; Bar, E.; Tamari, T.; Menda, N.; et al. Volatile ester formation in roses. Identification of and Acetyl-Coenzyme A. Geraniol/Citronellol Acetyltransferase in developing rose petals. Plant Physiology **131** (2003): 1868-1876.
- Springob, K.; Nakajima, J.; Yamazaki, M. and Saito, K. Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins. Nature Product Report **20** (2003): 288-303.
- Tawa, K.; Hori, H.; Kintaka, K.; Kiyosue, K.; Tatsu, y.; Nishii, J. Optical microscopic observation of fluorescence enhanced by grating-coupled surface plasmon resonance. Optics Express **16,13** (June 2008): 9781-9790.
- Teusch, M., Forkmann, G. and Seyffert, W. Genetics control of UDP-glucose: Anthocyanin 5-O-glucosyltransferase from flowers of *Matthiola incana* R.Br. Planta **168** (1986): 586-559.
- Tzuri, G.; Hillel, J.; Lavi, U.; Haberfeld, A.; and Vainstein, A. DNA fingerprints of ornamental plants. Plant Science **76** (1991): 91-97.

- Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; and Gibson, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22 (1994): 4573-4680
- Vishnevsky, M.; Ovadis, M.; Itzhaki, H.; Levy, M.; Libal-Weksler, Y.; Zach, A.; et al. Molecular cloning of a carotenoid-associated protein from *Cucumis sativus* corollas: homologous genes involved in carotenoid sequestration in chromoplasts. Plant Journal 10 (1996): 1111-1118.
- Wang, J.; Rivas, G.; Parrado, C.; Cai, X.; and Flair, M. N. Electrochemical biosensor for detecting DNA sequences from the pathogenic protozoan *Cryptosporidium parvum*. Talanta 44 (1997): 2003-2010.
- Watson, J. D. ; Hopkins, N. H. ; Robert, J. W.; Steitz, J.A.; and Weiner, A.M. Molecular biology of the gene. 4th ed. California: The Benjamin/Cummings, 1987 .
- Wiederholt, K.; Rajur, S. B.; Jr. J. G.; O'Donnell, M. J.; and Mclaughlin, L. W. DNA-tethered Hoechst groove-binding agents: Duplex stabization and fluorescence characteristics. Journal American Chemical Society 118 (1996): 7055-7062.
- Winkel-Shirley, B. Flavonoid biosynthesis: A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. Plant Physiology 126 (June 2001): 485-493.
- Zuker, A.; Tzfira, T.; Ben-Meir, H.; Ovadis, M.; Shklarman, E.; Itzhaki, H.; et al. Modification of flower color and fragrance by antisense suppression of the flavanone 3-hydroxylase gene. Molecular Breeding 9 (2002): 33-41.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมี

CTAB extraction buffer

CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide)	4	g
1 M Tris-HCl, PH 8.0	20	ml
0.5 M EDTA	8	ml
5 M NaCl	56	ml
Adjust water up to	200	ml

Phenol: Chloroform (Phenochor)

Phenol	1000	ml
Chloroform	960	ml
Isomyl alcohol	40	ml
8-Hydroxyquinoline	2	g
β -(or 2) Mercaptoethanal	4	ml
1 M Tris.HCl non adj pH	600	ml

Chloroform:Isoamylalcohol (24:1,v/v)

Chloroform	24	ml
Isoamylalcohol	1	ml

3 M LiCl (500 ml)

LiCl	118.36	g
Add H ₂ O to	500	ml

0.5 M EDTA Stock

EDTA	186.1	g
DW up to	800	ml
Adj pH to 8.0 (by NaOH~ 20 g)		
Autoclave		

SOC medium (100 ml)

SOB medium	100	ml
1 M glucose	20	ml

Lysozyme buffer

50 mM Tris. HCl pH 8.0		
50 mM Sucrose (342.342. MW)		
10 mM EDTA		
1 M Tris.HCl pH 8.0	50	ml
Sucrose	17.1	g
0.5 M EDTA Stock	20	ml

50x TAE

Tris	121	g
Acetic acid	28.5	ml
EDTA	9.3	g

5x TBE

Tris	54	g
Borate	27.5	g
EDTA	7.44	g
DW up to 1 lite		

SOB medium

Bacto trypton	2.0	g
Bacto yeast extract	0.5	g
5 M NaCl Solution	200	μ l
2 M KCl	125	μ l
add DW	99	ml
autoclave		
add 2M MgCl ₂ solution	0.5	ml

LB broth (1000 ml)

Bacto-tryptone	10	g
Bacto-yeast extract	5	g
NaCl	10	g
Add H ₂ O to	1000	ml
Adjust pH 7.5		

5 M NaCl (500 ml)

NaCl	146.1	g
H ₂ O to	500	ml
Autoclave		

1 % TAE Agarose gel (w/v)

Agarose	1	g
1X TAE	99	ml

Tris-buffer (1.0 M Tris. HCl, pH 7.5)

Tris	60.7	g
H ₂ O to	500	ml
Adjust pH 7.5		

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 11 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของดอกกุหลาบในแต่ละวันที่ทำการศึกษา (5 ซ้ำ)

ตัวอย่างที่	เส้นผ่านศูนย์กลางของดอกกุหลาบในแต่ละวัน (cm)										
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7	วันที่ 8	วันที่ 9	วันที่ 10
1	0.4820	0.5090	0.5700	0.5900	0.6300	0.7290	0.8140	0.8830	0.9550	1.1026	1.2149
2	0.4740	0.5100	0.5720	0.5870	0.6290	0.7326	0.8200	0.8867	0.9670	1.1200	1.2100
3	0.4790	0.5010	0.5670	0.5910	0.6370	0.7350	0.8100	0.9300	1.0500	1.1310	1.2030
4	0.4766	0.4990	0.5735	0.5880	0.6250	0.7324	0.8250	0.9475	1.0350	1.1100	1.2113
5	0.4834	0.5160	0.5710	0.5690	0.6305	0.7320	0.8160	0.8836	0.9590	1.1145	1.2144
ค่าเฉลี่ย	0.4790	0.5070	0.5710	0.5890	0.6303	0.7322	0.8170	0.9062	0.9932	1.1156	1.2107
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.0038	0.0062	0.0023	0.0014	0.0039	0.0019	0.0051	0.0272	0.0407	0.0096	0.0043

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 ค่า anodic current peak (μA) ที่ระดับจำนวนโมเลกุลต่างๆ ของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส (3 ซ้ำ)

ชนิดยีน	ตัวอย่างที่	ค่า anodic current peak(μA) ที่จำนวนโมเลกุลระดับต่างๆ					
		500,000 โมเลกุล	50,000 โมเลกุล	5,000 โมเลกุล	500 โมเลกุล	50 โมเลกุล	5 โมเลกุล
GT	1	0.8550	0.9650	1.1530	1.2730	1.4470	1.6840
	2	0.8520	0.9610	1.1460	1.2680	1.4550	1.6750
	3	0.8460	0.9600	1.1540	1.2750	1.4510	1.6870
	ค่าเฉลี่ย	0.8510	0.9620	1.1510	1.2720	1.4510	1.6820
	ส่วน เบี่ยงเบน มาตรฐาน	0.0037	0.0022	0.0036	0.0029	0.0033	0.0051

ตารางที่ 13 ค่า anodic current peak (μA) ที่ระดับจำนวนโมเลกุลต่างๆ ของยีน 18S rRNA (3 ซ้ำ)

ชนิดยีน	ตัวอย่างที่	ค่า anodic current peak(μA) ที่จำนวนโมเลกุลระดับต่างๆ					
		500,000 โมเลกุล	50,000 โมเลกุล	5,000 โมเลกุล	500 โมเลกุล	50 โมเลกุล	5 โมเลกุล
18S rRNA	1	0.8060	0.9500	1.1190	1.1750	1.4430	1.6640
	2	0.8100	0.9460	1.1170	1.1760	1.4520	1.6620
	3	0.7900	0.9570	1.1000	1.1680	1.4280	1.6570
	ค่าเฉลี่ย	0.8020	0.9510	1.1120	1.1730	1.4410	1.6610
	ส่วน เบี่ยงเบน มาตรฐาน	0.0086	0.0045	0.0085	0.0036	0.0099	0.0029

ตารางที่ 14 ค่า anodic current peak (μA) ของดอกกุหลาบระยะต่างๆของยีนกลูโคซิลทรานสเฟอเรส (3 ซ้ำ)

ชนิดยีน	ตัวอย่างที่	ค่า anodic current peak(μA) ของดอกทั้ง 5 ระยะ				
		ระยะที่ 1	ระยะที่ 2	ระยะที่ 3	ระยะที่ 4	ระยะที่ 5
GT	1	1.2060	1.1570	0.9850	0.9960	1.0200
	2	1.2000	1.1560	0.9890	0.9930	1.0130
	3	1.1970	1.1550	0.9960	1.0110	0.9970
	ค่าเฉลี่ย	1.2010	1.1560	0.9900	1.0000	1.0100
	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.0037	0.0008	0.0045	0.0079	0.0096

ตารางที่ 15 ค่า anodic current peak (μA) ของดอกกุหลาบระยะต่างๆ ของยีน18S rRNA (3 ซ้ำ)

ชนิดยีน	ตัวอย่างที่	ค่า anodic current peak(μA) ของดอกทั้ง 5 ระยะ				
		ระยะที่ 1	ระยะที่ 2	ระยะที่ 3	ระยะที่ 4	ระยะที่ 5
18S rRNA	1	0.9360	0.9370	0.9430	0.9350	0.9370
	2	0.9380	0.9340	0.9400	0.9400	0.9450
	3	0.9490	0.9400	0.9370	0.9330	0.9350
	ค่าเฉลี่ย	0.9410	0.9370	0.9400	0.9360	0.9390
	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	0.0057	0.0024	0.0024	0.0029	0.0043

แถบสีมาตรฐาน RGB color charts, Swatches and Color Table for Photoshop



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวกิลดา ไอเจริญ เกิดวันที่ 23 กันยายน พ.ศ.2521 ที่โรงพยาบาลอภัยภูเบศร อำเภอเมือง จังหวัดปราจีนบุรี สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์ สาขาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปีพ.ศ.2542 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีพ.ศ.2547 ได้รับทุนอุดหนุนวิจัย จากบัณฑิตวิทยาลัย พ.ศ. 2550



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย