การโคลนและถ่ายยีนแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสชนิดสายสั้น (*Le-scADHs*) ในมะเขือเทศ

นางสาวจุฑามาศ ตรงชื่น

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2553

CLONING AND TRANSFORMATION OF TOMATO SHORT-CHAIN ALCOHOL DEHYDROGENASES (*Le-scADHs*)

Juthamas Trongchuen

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Crop Production Technology

Suranaree University of Technology

Academic Year 2010

การโคลนและถ่ายยีนแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสชนิดสายสั้น (*Le-scADHs*) ในมะเขือเทศ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

____

(ผศ. ดร.หัสไชย บุญจูง)
ประธานกรรมการ

____

(รศ. ดร.ปิยะดา ตันตสวัสดิ์)
กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

____

(รศ. ดร.หนึ่ง เตียอำรุง)
กรรมการ

____

(ผศ. ดร.หนูเดือน เมืองแสน)
กรรมการ

____

(ศ. ดร.ชูกิจ ลิมปิจำนงค์)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

____

(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)
คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

จุฑามาศ ตรงชื่น : การโคลนและถ่ายยีนแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสชนิดสายสั้น (*Le-scADHs*) ในมะเขือเทศ (CLONING AND TRANSFORMATION OF TOMATO SHORT-CHAIN ALCOHOL DEHYDROGENASES (*Le-scADHs*)) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา ตันตสวัสดิ์, 129 หน้า.

แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase; ADH) เป็นเอนไซม์ที่มีส่วนร่วมในกระบวนการสังเคราะห์กลิ่นในผลไม้ โดยเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนกลับระหว่างสารอัลดีไฮด์ และแอลกอฮอล์ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) โคลนยีนแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสชนิดสายสั้นในมะเขือเทศ จำนวน 2 ยีน คือ ยีน *Le-scADH1* และยีน *Le-scADH2* เพื่อนำมาศึกษาการแสดงออกของยีนทั้งสองในเซลล์ยีสต์ และเซลล์แบคทีเรีย 2) โคลน และถ่ายยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* เข้าสู่มะเขือเทศ เพื่อสร้างมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ยับยั้งการแสดงออกของยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* ในการทดลองที่ 1 ทำการเพิ่มปริมาณยีนทั้งสองด้วยวิธีพีซีอาร์ แล้วนำยีนมาเชื่อมต่อกับเวคเตอร์จำเพาะ (pYES และ pET) ถ่ายเข้าสู่เซลล์ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) และแบคทีเรีย (*Escherichia coli*) ทดสอบการผลิตโปรตีนผสมในยีสต์ที่ระยะเวลา 0, 12, 24 และ 48 ชั่วโมงโดยวิธี Western analysis พบว่าระยะเวลาที่ชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* สูงสุดในเซลล์ยีสต์คือ 24 ชั่วโมง แต่ในแบคทีเรียไม่พบโปรตีนจากทั้งสองยีน และจากค่า Michaelis constant (K_m) และ maximum velocity (V_{max}) พบว่าเอนไซม์ทั้งสองสามารถเร่งปฏิกิริยาในเซลล์ยีสต์ได้ดี โดยเอนไซม์ Le-scADH1 มีประสิทธิภาพสูงในปฏิกิริยา dehydrogenation เปลี่ยนสารอัลดีไฮด์เป็นสารแอลกอฮอล์ แต่ไม่พบปฏิกิริยา reduction เกิดขึ้น ส่วนเอนไซม์ Le-scADH2 มีประสิทธิภาพในปฏิกิริยา reduction เปลี่ยนสารแอลกอฮอล์เป็นสารอัลดีไฮด์สูงกว่าปฏิกิริยา dehydrogenation โดยมีค่า K_m ต่ำกว่า 60 เท่า สำหรับการทดลองที่ 2 ทำการเพิ่มปริมาณยีนทั้งสองด้วยวิธีพีซีอาร์ แล้วนำยีนมาเชื่อมต่อกับเวคเตอร์จำเพาะ (pSRO2) ในรูปแบบวิธี RNA interference (RNAi) และถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศโดยวิธี *Agrobacterium*-mediated transformation พบว่า สามารถชักนำชิ้นส่วนมะเขือเทศให้เกิดยอดได้ดี แต่ความสามารถในการเกิดรากต่ำ อย่างไรก็ตาม มีชิ้นส่วนมะเขือเทศที่สามารถพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ และเมื่อสังเกตลักษณะทางฟีโนไทป์ของรุ่นลูกต่อมา พบว่า ต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมส่วนใหญ่มีการเจริญเติบโตปกติเหมือนกับต้นมะเขือเทศที่ไม่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรม มีเพียงส่วนน้อย (25%) ที่มีการเจริญเติบโตผิดปกติ คือ มีลักษณะต้นแคระแกร็น ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการลดระดับการแสดงออกของยีน *scADH* ในช่วงการพัฒนาของมะเขือเทศ ในอนาคตจะมีการประเมินลักษณะต่างๆ ของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมเหล่านี้ในรุ่นลูก T2 ด้วยวิธีวิเคราะห์ฟีโนไทป์ RT-PCR และวิธีการทางชีวเคมี

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช ลายมือชื่อนักศึกษา____________________

ปีการศึกษา 2553 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา________________

JUTHAMAS TRONGCHUEN : CLONING AND TRANSFORMATION OF TOMATO SHORT-CHAIN ALCOHOL DEHYDROGENASES (*Le-scADHs*). THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PIYADA TANTASAWAT, Ph.D., 129 PP.

ALCOHOL DEHYDROGENASES/TOMATO/*Solanum lycopersicum* Mill./AROMA FORMATION/YEAST EXPRESSION

Alcohol dehydrogenase (ADH) is an enzyme that participates in the biosynthetic pathway of aroma volatiles in fruits by reversible conversion of aldehydes into their corresponding alcohols. The objectives of this study were 1) to clone and evaluate expression of tomato short-chain alcohol dehydrogenase genes (*Le-scADH1*, *Le-scADH2*) in yeast and bacteria, 2) to clone and transform tomato short-chain alcohol dehydrogenase genes in tomatoes in order to down-regulate *Le-scADH1* and *Le-scADH2* in tomato plants. In the first experiment, both *Le-scADH1* and *Le-scADH2* coding sequences were amplified by PCR and cloned into the specific vectors (pYES and pET), using the yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and bacteria (*Escherichia coli*) expression systems. Recombinant protein production in yeast was evaluated at different induction times (0, 12, 24 and 48 hours) by Western analysis. The highest expression levels of both genes were achieved at 24 hours. But no protein encoded by these two genes was observed in bacteria. Values obtained for Michaelis constant (K_m) and maximum velocity (V_{max}) indicated that the two encoded proteins were enzymatically active upon expression in yeast. Le-scADH1 was highly efficient in the dehydrogenation reaction (conversion of aldehydes to alcohols) but had no reduction activities.

In contrast, Le-scADH2 was much more active as reductases with K_m 60 times lower for the conversion of alcohols to aldehydes than for the dehydrogenation of aldehydes to alcohols. In the second experiment, both *Le-scADH1* and *Le-scADH2* were amplified by PCR and cloned into the specific vector (pSRO2), using RNA interference (RNAi) technology. Tomato transformation was performed using the *Agrobacterium*-mediated method. The results showed that most explants were able to form many shoots but could not develop roots. However, some explants could develop into whole plants with intact shoots and roots. When observing phenotypes of the T1 progenies, it was found that most plants displayed similar growth as nontransformed plants while twenty five percents had their growth rates severely affected, suggesting a possible impact of *scADHs* down-regulation in plant development. The T2 progenies of these transgenic plants will be further characterized by phenotypic analysis, RT-PCR, and biochemical method.

School of Crop Production Technology Student's Signature__________________

Academic Year 2010 Advisor's Signature__________________

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณ บุคคล และกลุ่มบุคคลต่าง ๆ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา ช่วยเหลือ อย่างดียิ่ง ทั้งในด้านวิชาการ และด้านการดำเนินงานวิจัย ได้แก่

รองศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา ตันตสวัสดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสทางการศึกษา ให้คำแนะนำปรึกษา ช่วยเหลือ เอาใจใส่อย่างดียิ่ง และเป็นแบบอย่างนักวิจัยที่ดีแก่ข้าพเจ้า รวมทั้งช่วยตรวจทาน และแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์

Assoc. Prof. Dr. Benoit Van Der Rest อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ให้คำปรึกษาและช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับภาษาอังกฤษจนเสร็จสมบูรณ์

รัฐบาลไทย และรัฐบาลฝรั่งเศสที่ให้การสนับสนุนทุนการวิจัย ภายใต้โครงการ SUT-ENSAT (INP-Toulouse) Joint M.Sc and Ph.D Programs in Agricultural Sciences และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้การสนับสนุนทุนการศึกษาสำหรับการศึกษา

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุนทร กาญจนทวี, Prof. Dr. Jean Claude Pech และ Prof. Dr. Mondher Bouzayen ที่ได้ให้โอกาส คำปรึกษา ช่วยเหลือ และเอาใจใส่ในการไปทำวิจัยที่เมืองตูลูส ประเทศฝรั่งเศส

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หัสไชย บุญจูง รองศาสตราจารย์ ดร.หนึ่ง เตียอำรุง และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หนูเดือน เมืองแสน ที่กรุณาให้คำปรึกษา และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสิ้น

เพื่อน พี่น้อง ทุกคนทั้งที่อยู่ที่ประเทศไทย และประเทศฝรั่งเศสที่ให้กำลังใจ คำปรึกษา และความช่วยเหลือมาโดยตลอด

ขอกราบขอบพระคุณ บิดามารดา ที่อบรมเลี้ยงดู เอาใจใส่ ให้กำลังใจ คำปรึกษา ส่งเสริมและสนับสนุนด้านการศึกษาเป็นอย่างดีตลอดมา จนทำให้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการศึกษา

จุฑามาศ ตรงชื่น

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย) ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) ข
กิตติกรรมประกาศ ง
สารบัญ จ
สารบัญตาราง ช
สารบัญภาพ ซ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ ฎ

บทที่

1 บทนำ 1
1.1 ความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ 3
1.3 สมมุติฐานการวิจัย 4
1.4 ขอบเขตการวิจัย 4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 5

2 ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 6
2.1 ความสำคัญของมะเขือเทศ 6
2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมะเขือเทศ 8
2.3 สภาพแวดล้อม การปลูก และการดูแลรักษามะเขือเทศ 9
2.4 พันธุ์มะเขือเทศ 11
2.5 วิธีการเก็บเกี่ยวมะเขือเทศ 11
2.6 โรคของมะเขือเทศ 12
2.7 แมลงศัตรูมะเขือเทศ 12
2.8 การปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศ 13
2.9 การสังเคราะห์กลิ่นในพืช 14
2.10 การสังเคราะห์กลิ่นในผลไม้ 16

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.11 การสังเคราะห์กลิ่นในมะเขือเทศ 17
2.12 แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส 21
2.13 ยีนและการแสดงออกของยีน 25
2.14 การถ่ายยีนเข้าสู่พืชและประเมินพืชดัดแปลงพันธุกรรม 37
3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย 45
3.1 วัสดุ อุปกรณ์ 45
3.2 สถานที่ทำการทดลอง 46
3.3 ระยะเวลาการทดลอง 46
3.4 วิธีการทดลอง 46
3.4.1 การโคลนยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* จากผลสุกของมะเขือเทศ 47
3.4.2 การถ่ายยีนและศึกษากรแสดงออกของยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* ในเซลล์สิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก 53
3.4.3 การโคลนยีนและสร้าง construct เพื่อถ่ายยีนเข้ามะเขือเทศ 63
3.4.4 การถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศ 69
4 ผลการทดลองและวิจารณ์ 72
4.1 การโคลนยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* จากผลสุกของมะเขือเทศ 72
4.2 ถ่ายยีนและศึกษาการแสดงออกของยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* ในเซลล์สิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก 77
4.3 การโคลนยีนและสร้าง construct เพื่อถ่ายยีนเข้ามะเขือเทศ 84
4.4 การถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศ 93
5 สรุปผลการทดลอง 105
รายการอ้างอิง 107
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก แสดงข้อมูลจากการทดลอง ผลการทดสอบ ตารางแสดงผล 115
ภาคผนวก ข แสดงแผนที่พลาสมิด 121
ประวัติผู้เขียน 129

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1 คุณค่าทางโภชนาการใน 100 กรัม ของมะเขือเทศรับประทานผลสดและมะเขือเทศแปรรูป 7

2 ประเภทของกลุ่มยีน alcohol dehydrogenase 23

3 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* *เพื่อ*การทดสอบการแสดงออกในเซลล์ยีสต์และแบคทีเรีย 53

4 องค์ประกอบในการทดสอบ ADH activity 60

5 ไพรเมอร์ตำแหน่ง antisense และ sense ของ Le-scADH1 และ Le-scADH2 63

6 Specific activities ของเอนไซม์ *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* 81

7 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของชิ้นส่วนมะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* ที่ระยะการเจริญเติบโตต่าง ๆ กัน 95

8 ประชากรรุ่นลูกของ pB3 และ pB4 100

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1 แหล่งคาร์บอนธรรมชาติสำหรับการสร้างสารระเหยที่เป็นองค์ประกอบของรสชาติ 16
2 สารระเหยที่พบมากและมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดกลิ่นในผลของมะเขือเทศ 19
3 กระบวนการหลักของการสังเคราะห์กลิ่นในมะเขือเทศ 20
4 กระบวนการสังเคราะห์กลิ่นจากกรดไขมัน 20
5 ปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส 21
6 โครงสร้างของยีน 25
7 โครงสร้างที่เป็นองค์ประกอบอื่นของยีน 26
8 กระบวนการแสดงออกของยีนเริ่มต้นจนได้โปรตีน 29
9 miRNA pathway 30
10 siRNA pathway 31
11 ตัวอย่างเซลล์เจ้าบ้านที่นิยมใช้ในการโคลนยีน 33
12 สีโคโลนีของแบคทีเรีย E. coli ที่ได้รับและไม่ได้รับ recombinant DNA เมื่อใช้พลาสมิดที่มี lac Z ในการโคลนยีนโครงสร้างของยีน 35
13 โครงสร้างของ Ti plasmid 40
14 แผนภูมิแสดงการตรวจสอบยีนเป้าหมายในพืชดัดแปลงพันธุกรรม 44
15 แผนที่ของเวคเตอร์ pYES2.1/V5-His-TOPO 54
16 รูปแบบของ RNAi construct 64
17 การจัดวางตำแหน่งของยีนในเวคเตอร์ pSRO2 vector 65
18 แผนผัง Tree phylogenetic family ของ scADH ในมะเขือเทศ 73
19 ขนาดท่อนดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ของยีน Le-scADH1 และยีน Le-scADH2 ที่จะนำไปทดสอบการแสดงออกของยีนในยีสต์ 74
20 ขนาดท่อนดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ของยีน Le-scADH1 และยีน Le-scADH2 ที่จะนำไปทดสอบการแสดงออกของยีนในแบคทีเรีย 74
21 การคัดเลือกพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอ Le-scADH1 ในเวคเตอร์ pGEM-T โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI 76

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

22 การคัดเลือกพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอ Le-scADH2 ในเวคเตอร์ pGEM-T โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI 76
23 การคัดเลือกพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอ Le-scADH2 ในเวคเตอร์ pYES 2.1/V5-His-TOPO โดยการตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ HindIII และ XbaI 78
24 การคัดเลือกโคโลนีของยีสต์ที่มีพลาสมิดของเวคเตอร์ pYES 2.1/V5-His-TOPO และ Le-scADH2 โดยการเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ GAL I และ Le-ADH2 low 79
25 การทดสอบช่วงเวลาที่ใช้ในการชักนำการแสดงออกของยีน Le-scADH1 และ Le-scADH2 ในเซลล์ยีสต์บน Western blot ที่ระยะเวลา 0, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง 80
26 ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดเวคเตอร์ pET 15b และดีเอ็นเอ Le-scADH1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NdeI และ XhoI 82
27 ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดเวคเตอร์ pET 15b และดีเอ็นเอ Le-scADH2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NdeI และ XhoI 83
28 ขนาดของท่อนดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่มียีน Le-scADH1 และ Le-scADH2 สำหรับสร้าง construct ตามวิธี RNAi 85
29 การคัดเลือกพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอ Le-scADH1 (antisense) และ Le-scADH1 (sense) ในเวคเตอร์ pGEM-T โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NcoI, XbaI และ PstI, EcoRI 86
30 การคัดเลือกพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอ Le-scADH2 (antisense) และ Le-scADH2 (sense) ในเวคเตอร์ pGEM-T โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NcoI, XbaI และ PstI, EcoRI 86
31 การตัดพลาสมิด pSRO2 และดีเอ็นเอ Le-scADH1 (antisense) และ Le-scADH2 (antisense) ในเวคเตอร์ pGEM-T ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ NcoI และ XbaI 87
32 การตัดพลาสมิด pB1, pB2 และดีเอ็นเอ Le-scADH1 (sense) และ Le-scADH2 (sense) ในเวคเตอร์ pGEM-T ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ PstI และ EcoRI 88
33 ลำดับเบสของยีน Le-scADH1 (pB3) ในรูปแบบ RNAi construct 90

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

34 ลำดับเบสของยีน Le-scADH2 (pB4) ในรูปแบบ RNAi construct 91
35 การตรวจสอบโคโลนีของแบคทีเรีย A. tumefaciens ที่มี construct pB3 โดยการเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ 92
36 การตรวจสอบโคโลนีของแบคทีเรีย A. tumefaciens ที่มี construct pB4 โดยการเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ 93
37 พัฒนาการของลำต้นอ่อนและใบเลี้ยงของมะเขือเทศที่เจริญเติบโตบนอาหาร MS ชนิดต่าง ๆ 96
38 การตรวจสอบต้นกล้ามะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม 97
39 การคัดเลือกมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ 98
40 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศปกติ และต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม pB3 และ pB4 (T0-generation) 99
41 ต้นมะเขือเทศปกติและมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม pB3 (T1-generation) 101
42 ต้นมะเขือเทศปกติและมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม pB4 (T2-generation) 102

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

A	=	Absorbance
Amp	=	Ampicillin
ATP	=	Adenosine triphosphate
bp	=	Base pairs
BSA	=	Bovine Serum Albumin
CaMV 35S	=	35S gene of cauliflower mosaic virus
cDNA	=	Complementary deoxynucleic acid
Carb	=	Carbenicillin
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
EST	=	Expressed Sequence Taq
(m, n) g	=	(milli, nano) Gram
IAA	=	Indole-3-acetic acid
IPTG	=	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
kDa	=	Kilo Dalton
LB	=	Luria-Bertani medium
(m, μ) M	=	(milli, micro) Molar
(μ, m) L=	=	(micro, milli) Liter
mRNA	=	Messenger ribonucleic acid
MS	=	Murashige and Skoog medium
NCBI	=	National Center for Biotechnology Information
OD	=	Optical density
ORF	=	open reading frame
PBS	=	phosphate-buffered saline
PCR	=	Polymerase chain reaction
RNA	=	Ribonucleic acid
RNase	=	Ribonuclease
RT	=	Reverse transcriptase

อธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

RT-PCR	=	Reverse transcriptase PCR
SDS-PAGE	=	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
TEMED	=	Tetramethylenediamine
Tris	=	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethane
UV	=	Ultraviolet ray
U	=	Unit, µmol/min
V	=	Voltage
v/v	=	Volume/volume
w/v	=	Weight/volume
X-gal	=	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
YPD	=	Yeast Extract Peptone Dextrose medium

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญของปัญหา

มะเขือเทศ (tomato; *Solanum lycopersicum*) เป็นพืชผักผลไม้เศรษฐกิจสำคัญที่นิยมปลูกและบริโภคกันอย่างแพร่หลายทั่วโลก ทั้งในด้านการบริโภคผลสด และการแปรรูป ซึ่งลักษณะการบริโภคจะแตกต่างกันไปตามสภาพภูมิอากาศ เช่น ประเทศในเขตร้อนจัดให้มะเขือเทศเป็นพืชผัก แต่ประเทศในแถบทวีปยุโรป อเมริกาเหนือ และประเทศอื่น ๆ ในเขตหนาวจัดให้มะเขือเทศเป็นผลไม้ อย่างไรก็ตาม มะเขือเทศจัดเป็นผักผลไม้ที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยเป็นแหล่งของโปรตีน ไวตามิน และแร่ธาตุ โดยเฉพาะส่วนของผลอุดมไปด้วยไวตามินเอ ไวตามินซี และไลโคพีน ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการเกิดเซลล์มะเร็ง (Jones, 1999) นอกจากนี้ มะเขือเทศยังสามารถให้ผลผลิตได้ตลอดทั้งปี และใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมได้มากมาย เช่น น้ำมะเขือเทศเข้มข้น ซอสมะเขือเทศ มะเขือเทศอบแห้ง เป็นต้น ประเทศไทยได้รับอิทธิพลการบริโภคมาจากประเทศตะวันตก ทำให้มีการบริโภคมะเขือเทศหลากหลายมากขึ้น ทั้งในด้านบริโภคผลสด เช่น สลัด และมะเขือเทศแปรรูป เช่น ซอสมะเขือเทศ ส่งผลให้มีการผลิตเพิ่มมากขึ้น เพื่อตอบสนองต่อปริมาณความต้องการที่เพิ่มสูงขึ้น จึงกล่าวได้ว่ามะเขือเทศเป็นพืชที่มีศักยภาพที่จะพัฒนาเป็นธุรกิจเกษตรครบวงจร และสามารถขยายการผลิตทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพได้ แต่ก็ประสบปัญหาหลายประการที่ทำให้การผลิตไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร คือ ความสามารถในการติดผลยังไม่มากพอ ความอ่อนแอต่อโรค และแมลงต่าง ๆ และคุณภาพของผลผลิตต่ำ เหตุผลเหล่านี้ทำให้มีการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศทั้งด้านการเพิ่มปริมาณผลผลิต การต้านทานต่อโรคและแมลง และการปรับปรุงคุณภาพของผลมะเขือเทศ โดยเฉพาะการปรับปรุงลักษณะคุณภาพนั้นเป็นสิ่งที่สำคัญมาก เนื่องจากเป็นปัจจัยหลักที่กำหนดความน่าซื้อ ซึ่งลักษณะคุณภาพนั้นมีหลายองค์ ประกอบ ได้แก่ รสชาติ เนื้อสัมผัส สี และกลิ่น การปรับปรุงลักษณะคุณภาพนี้ ผู้ปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศจะต้องทราบว่าจะส่งผลผลิตไปจำหน่ายยังแหล่งใด และต้องคำนึงถึงความต้องการของผู้บริโภคในประเทศต่าง ๆ เช่น ในแถบทวีปยุโรปนิยมผลมะเขือเทศสีแดง ในสหรัฐอเมริกา รัฐไอโอว่านิยมผลมะเขือเทศสีชมพู แต่ทางตอนใต้ชอบผลมะเขือเทศสีแดง ในญี่ปุ่น และเกาหลีชอบผลมะเขือเทศสีชมพูมากกว่าสีแดง เป็นต้น โดยมะเขือเทศแต่ละประเภทก็จะเน้นคุณสมบัติแตกต่างกันไป เช่น มะเขือเทศที่ใช้เป็นวัตถุดิบในโรงงานอุตสาหกรรมต้องมีเนื้อมากความหวานไม่ต่ำกว่า 4.5บริกซ์ ค่าความเป็นกรดสูงประมาณ 4.4 ผลเล็ก สีผลแดงจัด

เนื้อแน่นแข็ง ผิวเหนียว ส่วนมะเขือเทศที่ใช้ในการบริโภคผลสดนั้นต้องมีผลกลมขนาดใหญ่และสม่ำเสมอ ผิวเรียบ มีช่องว่างภายในผลมาก (multicular tomato) ผนังผลหนา (thick wall) เนื้อมาก สีแดงสดใสและมีกลิ่นหอม ซึ่งเห็นได้ว่าคุณภาพของผลมะเขือเทศนั้นเป็นสิ่งที่สำคัญมาก เนื่องจากไม่สามารถปรุงแต่งรสชาติจากภายนอกได้ ซึ่งกลิ่นถือว่าเป็นปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่งที่ส่งเสริมให้มีการบริโภคมากขึ้นนอกเหนือจากการมีรสชาติที่ดี ในการบริโภคผลมะเขือเทศนั้นมักประสบปัญหาด้านกลิ่น เช่น ผู้บริโภคบางรายไม่ชอบกลิ่นเหม็นเขียวในผลมะเขือเทศ จึงหลีกเลี่ยงการรับประทานมะเขือเทศแบบผลสด ซึ่งอุดมไปด้วยเกลือแร่ และไวตามินที่สำคัญ อีกทั้งราคาไม่แพงและสามารถหาบริโภคได้ทั้งปี ทำให้สูญเสียผักผลไม้ที่มีประโยชน์ไป ในผลมะเขือเทศแต่ละพันธุ์จะมีกลิ่นแตกต่างกัน โดยเฉพาะพันธุ์ที่เป็นมะเขือเทศรับประทานผลสด ผลจะมีกลิ่นหอม ชวนรับประทาน แต่การปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศด้านคุณภาพโดยเฉพาะรสชาติและกลิ่นนี้ยังมีการศึกษาน้อย เนื่องจากมีกระบวนการที่ซับซ้อน อย่างไรก็ตาม ได้มีการนำเทคโนโลยีชีวภาพมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาบทบาทของยีนที่มีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์รสชาติ และกลิ่น ซึ่งจะนำไปสู่ความเข้าใจในด้านการควบคุม และดัดแปลงการสังเคราะห์รสชาติและกลิ่นในอนาคต

การสังเคราะห์กลิ่นในมะเขือเทศเกิดจาก 3 กระบวนการหลัก ได้แก่ กระบวนการ catabolism ของกรดอะมิโน (amino acids), คาโรทีนอยด์ (carotenoids) และ กรดไขมัน (fatty acids) ในการศึกษาครั้งนี้ได้มุ่งเน้นกระบวนการ catabolism ของกรดไขมัน โดยเฉพาะการสลายตัวของ lipid short chain alcohol และ aldehyde เช่น hexanol และ hexenol ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญที่พบในผลไม้ในช่วงระหว่างการสุก อนุพันธ์กรดไขมันที่ระเหยได้ ได้แก่ สารพวก saturated และสาร unsaturated short-chain alcohols, aldehydes และ esters ซึ่งในกระบวนการสังเคราะห์สารระเหยจากกรดไขมันมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง 4 ชนิด คือ lipoxygenase (LOX), hydroperoxide lyase (HPL), alcohol dehydrogenase (ADH) และ alcohol acyltransferase (AAT)

Lipoxygenases (LOX) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา hydroperoxidation ของ polyunsaturated fatty acids สร้างสาร 2 ชนิด คือ สาร 9-hydroxyperoxides และ 13-hydroxyperoxides จากนั้นเอนไซม์ hydroperoxide lyase (HPL) จะเปลี่ยนสาร 9-hydroxyperoxides และ 13-hydroxyperoxides ให้เป็นสาร ประกอบพวกอัลดีไฮด์ ซึ่งจะถูกนำไปใช้สังเคราะห์กลิ่นในผลไม้จากการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ alcohol dehydrogenases (ADH) ได้สารประกอบพวกแอลกอฮอล์ และเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ alcohol acyl transferase (AAT) ได้สารประกอบพวก ester ซึ่งเป็นสารระเหยส่วนใหญ่ที่สามารถพบได้ในผลไม้สุก

Alcohol dehydrogenases (ADHs; alcohol : NAD oxidoreductase; EC 1.1.1.1) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนอัลดีไฮด์ให้เป็นแอลกอฮอล์ ในขณะเดียวกันก็สามารถเปลี่ยนแอลกอฮอล์กลับเป็นอัลดีไฮด์ได้เช่นเดียวกัน โดยมากจะพบเอนไซม์นี้ในพืชที่อยู่ในสภาวะเครียด เช่น การขาด

ออกซิเจน การถูกกระตุ้นโดย elicitors หรือ abscisic acid (Chase, 1999) อย่างไรก็ตาม พบว่า ยีน *ADH* นี้มีส่วนร่วมในการสังเคราะห์กลิ่นโดยเฉพาะในระยะการสุกแก่ของผล (Van der Straeten et al., 1991; Speirs et al., 1998; Manriquez et al., 2006) ในองุ่นพบยีน *ADH* จำนวน 3 ยีนที่แสดงออกในระหว่างการพัฒนาของผล โดยพบว่ายีน *Vv-ADH1* และยีน *Vv-ADH3* จะมีการแสดงออกมากที่ระยะผลอ่อน ขณะที่ยีน *Vv-ADH2* มีการแสดงออกมากที่ระยะเริ่มต้นการสุกของผล (Tesnière and Verriès, 2000) นอกจากนี้ยังพบว่ามียีน *Cm-ADH* ที่มีการแสดงออกเฉพาะในผลแคนตาลูป จำนวน 2 ยีน ซึ่งควบคุมการสร้าง ADH ชนิด medium-chain และ short-chain ซึ่งเมื่อทำการทดสอบในแคนตาลูป พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณของสารระเหยที่เป็นองค์ประกอบของกลิ่นได้ (Manriquez et al., 2006) สำหรับการศึกษาในมะเขือเทศ Longhurst et al. (1994) ทำการโคลน (clone) cDNA ที่ควบคุมการสร้าง medium chain ADHs จากผล ซึ่งต่อมา Speirs et al. (1998) ได้นำมาถ่ายเข้าสู่ต้นมะเขือเทศ โดยเมื่อเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน พบว่าสามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มกลิ่นในผลได้ ส่วน short chain ADHs นั้น Picton et al. (1993) ได้โคลน cDNAs ที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในระยะผลสุก พบว่า มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกับ short chain ADHs แต่การศึกษาบทบาทของยีนนี้ยังมีน้อย ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการโคลน cDNA ที่ควบคุมการสร้าง short chain ADHs ในมะเขือเทศเพื่อศึกษาถึงหน้าที่ และความสำคัญของยีนนี้โดยการเปลี่ยนแปลงระดับเอนไซม์ ADH ในมะเขือเทศโดยตรง อย่างไรก็ตาม การถ่ายยีนเข้าสู่พืชนั้นมีขั้นตอน และวิธีการที่ยุ่งยาก และใช้เวลานาน ดังนั้นควรมีการทดสอบและประเมินระดับการเปลี่ยนแปลงเบื้องต้นของยีนในเซลล์สิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก เช่น ยีสต์ และแบคทีเรียก่อน เนื่องจากมีขั้นตอนวิธีการทดสอบที่ง่าย และใช้เวลาน้อยกว่าการทดสอบในพืชโดยตรง จากนั้นจึงค่อยทำการถ่ายเข้าสู่ต้นมะเขือเทศ เพื่อนำไปทดสอบถึงหน้าที่ที่แท้จริงของยีนต่อไป งานวิจัยนี้นอกจากจะนำไปสู่ความเข้าใจถึงหน้าที่ที่แท้จริงของยีน *Le-scADHs* ในการสังเคราะห์สารระเหยในมะเขือเทศมากขึ้นแล้ว ยังสามารถนำไปใช้ปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศบริโภคผลสด และพืชอื่น ๆ ให้มีคุณภาพตรงตามความต้องการของผู้บริโภค ในด้านการเพิ่มให้มีกลิ่นมากขึ้นหรือน้อยลง หรือไม่มีเลย เพื่อเป็นแนวทางที่สำคัญในการเพิ่มมูลค่าแก่ผลผลิต และเป็นทางเลือกแก่ผู้บริโภคอีกทางหนึ่งด้วย

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อโคลนยีน *Le-scADH1* และยีน *Le-scADH2* จากอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากผลสุกของมะเขือเทศ ทำให้ได้ยีนที่มีการแสดงออกเฉพาะในช่วงการสุกของผลมะเขือเทศ

1.2.2 เพื่อศึกษาบทบาทการแสดงออกเบื้องต้นของยีน *Le-scADH1* และยีน *Le-scADH2* ในเซลล์สิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก ได้แก่ ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) และแบคทีเรีย (*Escherichia coli*) เพื่อคัดเลือกยีน *Le-scADH1* และยีน *Le-scADH2* ที่มีระดับการแสดงออกที่เหมาะสมต่อการ

ทดสอบในต้นมะเขือเทศ

1.2.3 เพื่อโคลน และถ่ายยีน *Le-scADH1* และยีน *Le-scADH2* ที่คัดเลือกแล้วจากข้อ 1.2.2 เข้าสู่ต้นมะเขือเทศ และศึกษาการแสดงออกของยีนทั้งสองนี้ในมะเขือเทศ

1.2.4 เพื่อนำต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมไปใช้เป็นพืชต้นแบบในการศึกษาหน้าที่ของยีนทั้งสองในอนาคต

1.2.5 เพื่อนำความรู้ที่ได้ไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศ และหรือพืชชนิดอื่น ๆ ให้มีลักษณะคุณภาพตรงตามความต้องการของผู้บริโภคในอนาคต

1.3 สมมุติฐานการวิจัย

Alcohol dehydrogenases (ADH) เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในการเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนสารระหว่างสารอัลดีไฮด์และแอลกอฮอล์ ซึ่งสารอัลดีไฮด์ และแอลกอฮอล์เป็นสารตั้งต้นสำคัญในการนำไปสู่การสังเคราะห์กลิ่น เนื่องจากอัลดีไฮด์ และแอลกอฮอล์เป็นสารระเหยหลักที่สามารถพบได้ในผลไม้ทั่วไป การโคลนยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์นี้ และถ่ายเข้าสู่พืชจึงเป็นสิ่งที่จำเป็น ในการศึกษาบทบาทที่แท้จริงของเอนไซม์ ADH ต่อการเกิดกลิ่น หากเอนไซม์นี้มีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์กลิ่นจริง เมื่อลดระดับเอนไซม์ลงอาจทำให้มีกลิ่นลดลง แต่ถ้าเพิ่มระดับเอนไซม์ขึ้นอาจทำให้มีกลิ่นมากขึ้น ในทางตรงกันข้ามหากเอนไซม์นี้ไม่มีบทบาทในการสังเคราะห์กลิ่น การเพิ่มหรือลดระดับเอนไซม์ก็จะไม่มีผลต่อการเกิดกลิ่น อย่างไรก็ตามวิธีการนี้มีขั้นตอนและวิธีการทดสอบที่ยุ่งยาก และใช้เวลานาน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทดสอบระดับการแสดงออกของยีน *ADH* ในเซลล์สิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก ได้แก่ ยีสต์ และแบคทีเรียก่อน เพื่อประเมินประสิทธิภาพของยีนก่อนถ่ายเข้าสู่พืช การสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ยับยั้งการแสดงออกของยีนเป็นขั้นตอนแรกที่สำคัญในการศึกษาหน้าที่ของยีนในพืช โดยเฉพาะในมะเขือเทศที่มีการสังเคราะห์กลิ่นอยู่แล้ว หากลด หรือยับยั้งการแสดงออกของยีนนี้อาจทำให้ไม่มีการสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ หรือมีการสร้างแต่เกิดน้อยมากซึ่งอาจนำไปสู่การยับยั้งการสังเคราะห์กลิ่นในผลได้ เนื่องจากขาดเอนไซม์ ADH ที่จะไปสร้างสารตั้งต้น (alcohol) ให้กระบวนการต่อไป (ester formation) และเกิดการสะสมของสารอัลดีไฮด์ และแอลกอฮอล์ ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อคุณภาพของผลผลิตในด้านอื่น ๆ ด้วย เช่น เนื้อสัมผัส รสชาติและสีผล เป็นต้น

1.4 ขอบเขตการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นศึกษาการประเมิน และทดสอบการชักนำการแสดงออกเบื้องต้นของยีน *Le-scADH1* และยีน *Le-scADH2* ซึ่งโคลนมาจากผลสุกของมะเขือเทศในเซลล์สิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก ได้แก่ ยีสต์ และแบคทีเรีย และนำยีนที่เหมาะสมมาสร้างมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่มีระดับ

ADH activity ต่ำลง เพื่อนำมาใช้ศึกษาถึงบทบาท และหน้าที่ของยีนทั้งสองนี้ในการสังเคราะห์กลิ่นในผลต่อไปในอนาคต

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ได้ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับการแสดงออกของยีน *Le-scADHs* ของมะเขือเทศในเซลล์สิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก ได้แก่ ยีสต์ และแบคทีเรีย เพื่อนำไปใช้เลือกยีนสำหรับถ่ายเข้าสู่มะเขือเทศ

1.5.2 ได้เทคนิควิธีการในการสร้างมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม และเทคนิคเบื้องต้นในการตรวจสอบพืชดัดแปลงพันธุกรรม ซึ่งเป็นความรู้ที่นักปรับปรุงพันธุ์พืช นักพันธุวิศวกรรม และนักชีวเคมี สามารถนำไปใช้ได้

1.5.3 ได้มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ยับยั้งการแสดงออกของยีน *Le-scADHs* เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาหน้าที่ของยีน *ADH* นี้ในการสังเคราะห์กลิ่นของมะเขือเทศในอนาคต

1.5.4 สามารถนำความรู้ที่ได้มาใช้ปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศหรือพืชอื่น ๆ ให้มีกลิ่นเพิ่มขึ้นหรือไม่มีกลิ่นตามความต้องการของผู้บริโภค เพื่อเพิ่มมูลค่าแก่ผลผลิตและเป็นทางเลือกแก่ผู้บริโภคในอนาคต

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความสำคัญของมะเขือเทศ

มะเขือเทศ (tomato) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Solanum lycopersicum* อยู่ในวงศ์ Solanaceae เป็นพืชผักผลไม้เศรษฐกิจที่มีคุณค่าทางอาหารสูง โดยเป็นแหล่งของโปรตีน ไวตามิน และแร่ธาตุ โดยเฉพาะไวตามินเอ และไวตามินซี เมื่อเปรียบเทียบมะเขือเทศกับผลไม้ชนิดอื่น ๆ ประเภทเดียวกันพบว่า มะเขือเทศผลขนาดปานกลางจะมีปริมาณไวตามินซีครึ่งหนึ่งของส้มโอทั้งผล และมะเขือเทศหนึ่งผลจะมีไวตามินเอประมาณ 1 ใน 3 ของไวตามินที่ร่างกายต้องการในหนึ่งวัน ดังนั้นมะเขือเทศจึงเป็นผักผลไม้สุขภาพที่ได้รับการยอมรับกันอย่างกว้างขวาง นอกจากนี้มะเขือเทศยังเป็นพืชที่มีบทบาทสำคัญในด้านการปรับปรุงพันธุ์ โดยถูกนำมาใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ โดยเฉพาะการศึกษาการแสดงออกของยีนในผลไม้ เนื่องจากเป็นพืชที่มีผลและมีวงจรชีวิตสั้น ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญที่สามารถนำไปใช้ปรับปรุง และนำมาดัดแปลงใช้ในพืชกลุ่มอื่น ๆ ที่มีลักษณะทางฟีโนไทป์ และสรีรวิทยาคล้ายคลึงกัน แต่มีวงจรชีวิตยาวนาน

มะเขือเทศเป็นพืชผักผลไม้เศรษฐกิจสำคัญที่มีผู้นิยมปลูก และบริโภคกันอย่างแพร่หลายทั่วโลก ทั้งด้านการบริโภคผลสด การนำมาประกอบอาหาร และส่งเข้าโรงงานอุตสาหกรรมเพื่อแปรรูปได้หลากหลาย เช่น น้ำมะเขือเทศเข้มข้น ซอสมะเขือเทศ และมะเขือเทศอบแห้ง เป็นต้น ดังนั้นความต้องการของตลาดมะเขือเทศจึงมีอยู่ตลอดทั้งปี นอกจากนี้มะเขือเทศยังเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งที่ทำรายได้ให้กับประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2551 มีมูลค่าการส่งออกถึง 88.6 ล้านบาท แบ่งเป็นมะเขือเทศสด หรือแช่เย็น 8.1 ล้านบาท และมะเขือเทศปรุงแต่ง 80.5 ล้านบาท ตามลำดับ (ศูนย์สารสนเทศการเกษตร, 2552) และจากสถิติการเพาะปลูกปี 2551 มีพื้นที่การเพาะปลูกมะเขือเทศทั้งสิ้น 50,751 ไร่ ผลผลิตทั้งหมด 192,805 ตัน (ศูนย์สารสนเทศการเกษตร, 2552) พื้นที่เพาะปลูกส่วนใหญ่อยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ โดยแบ่งแหล่งการผลิตหลัก ๆ เป็น 2 แหล่ง คือแหล่งปลูกมะเขือเทศรับประทานผลสด ได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย ลำปาง นครราชสีมา นครปฐม ราชบุรี ลพบุรี และกาญจนบุรี และแหล่งปลูกมะเขือเทศอุตสาหกรรม ได้แก่ หนองคาย นครพนม สกลนคร อุดรธานี สุรินทร์กาฬสินธุ์ เชียงใหม่ เชียงราย และตาก ในด้านโภชนาการนั้นมะเขือเทศจัดเป็นพืชผักผลไม้ที่มีคุณค่าทางอาหารสูง (ตารางที่ 1) โดยในผลมะเขือเทศมีสารพวกแคโรทีนอยด์ เช่น ไลโคพีน เป็นสารสีแดง ซึ่งเป็นสารยับยั้งการเกิดมะเร็ง และมีไวตามินหลายชนิด เช่น ไวตามินเอ ไวตามินซี ไวตามินบี 1 และบี 2 โดยเฉพาะไวตามินเอ และไวตามินซีมีอยู่ในผลเป็นปริมาณสูง

นอกจากนี้ยังมีกรดมาลิค และกรดซิตริก ซึ่งให้รสชาติเปรี้ยว และกรดกลูตามิค ซึ่งเป็นกรดอะมิโน ช่วยเพิ่มรสชาติให้อาหาร และมีสารเบต้าแคโรทีน และแร่ธาตุหลายชนิด เช่น แคลเซียม ฟอสฟอรัส และ หล็ก เป็นต้น (สถิต วิมล, 2542)

ตารางที่ 1 คุณค่าทางโภชนาการใน 100 กรัม ของมะเขือเทศรับประทานผลสดและมะเขือเทศแปรรูป (Anon, 1971)

ธาตุอาหาร	ผลสด	บรรจุกระป๋อง	ซอส	น้ำมะเขือเทศ
น้ำ (%)	94.00	94.00	69.00	94.00
พลังงาน (แคลลอรี่)	19.00	21.00	106.00	19.00
โปรตีน (กรัม)	0.70	0.80	1.8.0	0.80
ไขมัน (กรัม)	น้อยมาก	น้อยมาก	0.40	น้อยมาก
คาร์โบไฮเดรต (กรัม)	4.00	4.00	25.00	4.00
แคลเซียม (มิลลิกรัม)	12.00	6.00	22.00	7.00
ฟอสฟอรัส (มิลลิกรัม)	24.00	19.00	50.00	18.00
เหล็ก (มิลลิกรัม)	0.40	0.50	0.80	0.90
โปแตสเซียม (มิลลิกรัม)	222.00	217.00	363.00	227.00
ไวตามินเอ (ไอ.ยู.)	822.00	900.00	1,399.00	798.00
ไทอามีน (มิลลิกรัม)	0.05	0.05	0.00	0.05
ไรโบฟลาวิน (มิลลิกรัม)	0.04	0.03	0.00	0.03
ไนอาซีน (มิลลิกรัม)	0.70	0.70	1.60	0.80
กรดแอสคอบิค (มิลลิกรัม)	21.00	17.00	15.00	16.00

นอกจากผลของมะเขือเทศที่มีประโยชน์แล้ว ส่วนอื่น ๆ ของมะเขือเทศก็ยังมีประโยชน์มากด้วยเช่นกัน ตัวอย่างเช่น กลิ่นในมะเขือเทศใช้เป็นยาไล่แมลง ซึ่งกลิ่นนี้เป็นสารประเภทโทมาทีนที่มีผลต่อแมลง และมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคพืชได้ ด้านสรรพคุณทางยา เช่น ใบใช้เป็นยาทา หรือพอกแก้ผิวหนังถูกแดดเผา ผลที่มีรสเปรี้ยวช่วยดับกระหาย ทำให้เจริญอาหาร บำรุงกระเพาะอาหาร ลำไส้ และไตให้ทำงานได้ดี และยังเป็นยาระบายอ่อน ๆ น้ำมะเขือเทศสดมีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดมะเร็งที่กระเพาะปัสสาวะ และช่วยลดมะเร็งในระบบทางเดินอาหารได้ นอกจากนี้ รากของมะเขือเทศยังใช้ต้มเป็นยาล้างแผลและแก้ปวดฟันได้อีกด้วย (กระทรวงการคลัง, 2543)

2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

มะเขือเทศมีจำนวนโครโมโซม 2n = 24 เป็นพืชผสมตัวเองตามธรรมชาติ และมีการผสมข้าม 2-5 เปอร์เซ็นต์ มีลักษณะทางพฤษศาสตร์ ดังนี้

ลำต้น ตั้งตรง มีลักษณะเป็นไม้พุ่มเตี้ยกึ่งเลื้อย ความสูง 50-150 เซนติเมตร แตกกิ่งก้านมาก ลำต้นสีเขียว มีขนนุ่มปกคลุม และมีเมือกเหนียวมือ

ใบ เป็นใบประกอบ ออกสลับกัน ใบย่อยมีขนาดไม่เท่ากัน บางใบเล็กรียาว บางใบกลมใหญ่ ปลายใบแหลม ขอบใบเป็นหยักลึกคล้ายฟันเลื่อย มีขนอ่อน ๆ บริเวณซอกใบ ก้านใบยาว 3-5 เซนติเมตร มีใบย่อย 5-9 เซนติเมตร ใบย่อยรูปสามเหลี่ยม ขอบใบจัก แผ่นใบขรุขระเล็กน้อย มีขนนุ่มปกคลุม สีเขียวเข้ม ขนาดใบย่อยกว้าง 2-4 เซนติเมตร และยาว 3-6 เซนติเมตร

ดอก มะเขือเทศออกดอกเป็นช่อแบบ raceme ดอกเกิดเป็นช่อเจริญจากบริเวณข้อ หรือระหว่างข้อ กลีบดอกและกลีบเลี้ยงมี 5-7 กลีบ และมีสีเหลืองล้อมรอบส่วนของเกสรตัวผู้ และเกสรตัวเมีย ช่อดอกมีดอกย่อย 4-50 ดอก มีเกสรตัวผู้ 5 อัน ประกอบด้วยอับเรณูใหญ่และก้านอับเรณูสั้นอยู่รอบเกสรตัวเมีย ดอกเป็นดอกสมบูรณ์เพศ ประกอบด้วยส่วนของเกสรตัวเมีย คือ รังไข่ และก้านชูเกสรตัวเมีย ส่วนของเกสรตัวผู้ประกอบด้วยอับละอองเกสรตัวผู้ 5-10 อัน ซึ่งมีลักษณะเป็นแท่งเชื่อมติดกันเป็นรูปกรวย เรียกว่า anther cap หรือ anther cone ซึ่งอยู่ล้อมรอบส่วนของเกสรตัวเมีย โดยปกติก้านชูเกสรตัวเมียจะสั้นกว่าอับละอองเกสรตัวผู้ ดังนั้นเมื่อละอองเกสรตัวผู้พร้อมที่จะผสมเกสร ส่วนของละอองเกสรตัวผู้จะฟุ้งกระจายอยู่ภายใน anther cap และตกลงบนเกสรตัวเมีย ทำให้มีการผสมตัวเองสูง แต่ในสภาพอุณหภูมิ และความชื้นสัมพัทธ์สูง อาจพบส่วนของก้านชูเกสรตัวเมียยาวโผล่พ้นอับละอองเกสรตัวผู้ออกมา ทำให้มีอัตราการผสมข้ามสูงขึ้นในพันธุ์ทนร้อน และชื้น มักพบลักษณะนี้และมีการผสมข้ามสูง (จานุลักษณ์ ขนบดี, 2541)

ผล เป็นผลเดี่ยว รูปทรงของผลมีทั้งแบบกลมจนถึงรี มีขนาดรูปร่าง และสีต่างกัน ซึ่งมีทั้งขนาดเล็กประมาณ 3 เซนติเมตร จนถึงใหญ่ประมาณ 10 เซนติเมตร รูปร่างมีทั้งกลม กลมแบน หรือกลมรี ผิวนอกเรียบเป็นมัน สีของผลจะขึ้นอยู่กับเม็ดสี 2 ชนิด คือ ไลโคปีน (lycopene) ซึ่งทำให้เกิดสีแดง และแคโรทีน (carotene) ทำให้เกิดสีเหลืองแดง ส้ม และสีน้ำตาลอ่อน เนื้อภายในฉ่ำด้วยน้ำมีรสเปรี้ยว ภายในมีเมล็ดเรียงตัวเป็นช่อง ๆ และมีเมือกวุ้นห่อหุ้มเมล็ด ผลเป็นแบบเบอร์รี่ ประกอบด้วยช่องว่างภายในผล 2-25 ช่อง ปกติมักมี 2-9 ช่อง

เมล็ด มีลักษณะค่อนข้างกลมแบน มีสีน้ำตาลอ่อน ขนาด 0.2-0.5 เซนติเมตร มีขนสั้น ๆ โดยรอบ และมีปริมาณมาก

ราก มะเขือเทศมีระบบรากเป็นแบบรากแก้ว มีรากแขนงเจริญไปตามแนวนอนไปได้ไกลถึง 60 เซนติเมตร และสามารถเจริญในแนวดิ่งได้ลึกประมาณ 100-120 เซนติเมตร อีกทั้งยังสามารถเกิด

รากได้ทั่ว ๆ ไปตามลำต้นที่สัมผัสกับพื้นผิวดิน ซึ่งเป็นลักษณะพิเศษของมะเขือเทศ (เกียรติเกษตร กาญจนพิสุทธิ์, 2538; อร่าม คุ้มทรัพย์, 2543; เมฆ จันทน์ประยูร, 2548)

2.3 สภาพแวดล้อม การปลูกและการดูแลรักษามะเขือเทศ

2.3.1 สภาพอากาศที่เหมาะสม

มะเขือเทศเจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 18-28 องศาเซลเซียส ดังนั้นฤดูหนาวจึงเป็นฤดูที่เหมาะสมในการปลูกมะเขือเทศ เพราะมะเขือเทศจะแข็งแรง และให้ผลผลิตสูง ถ้าความชื้นของอากาศ และอุณหภูมิสูงจะทำให้ผลผลิต และคุณภาพลดลง และทำให้เกิดโรคต่าง ๆ ง่าย ปัญหาการปลูกมะเขือเทศในฤดูฝน คือ ในฤดูฝนมีความชื้น และอุณหภูมิเหมาะแก่การเจริญเติบโตของโรคหลายชนิด และมะเขือเทศบางพันธุ์ ผลจะแตกง่ายเมื่อถูกฝน แต่ถ้าต้องการจะปลูกมะเขือเทศในฤดูฝน สิ่งที่ควรคำนึงถึง คือ การเลือกพื้นที่ปลูกซึ่งควรเป็นที่สูงมีการระบายน้ำดีเป็นพิเศษ ดินมีสภาพเป็นกลาง คือ มีค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ประมาณ 6.5-6.8 ใช้พันธุ์ที่เหมาะสม คือ ให้ผลดกในฤดูฝน และฤดูร้อน มีการปฏิบัติรักษาอย่างถูกต้อง คือ เตรียมดินใส่ปุ๋ยถูกต้อง ฉีดพ่นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชอย่างถูกต้อง และบ่อยครั้งเป็นพิเศษ (เกียรติเกษตร กาญจนพิสุทธิ์, 2538; อร่าม คุ้มทรัพย์, 2543; เมฆ จันทน์ประยูร, 2548)

2.3.2 การเตรียมดิน

ดินที่เหมาะสมในการปลูกมะเขือเทศควรเป็นดินร่วนมีอินทรียวัตถุสูง และมีการระบายน้ำดี ความเป็นกรดเป็นด่างของดิน ประมาณ 6.5-6.8 ถ้าดินเป็นกรด หรือด่างมากเกินไป จะทำให้ดินขาดธาตุอาหารบางอย่างได้ หรือธาตุอาหารบางชนิดสามารถละลายออกมาได้มากเกินไปจนเป็นเหตุให้เป็นพิษต่อต้นพืช การปลูกมะเขือเทศโดยทั่วไปไม่ควรปลูกซ้ำที่เดิม หรือในพื้นที่ปลูกพืชในตระกูลเดียวกันกับมะเขือเทศมาก่อน เช่น พริก มะเขือ และยาสูบ เป็นต้น เพราะอาจมีเชื้อโรคต่าง ๆ สะสมอยู่ในดิน ซึ่งเป็นโอกาสให้มะเขือเทศเป็นโรคได้ง่าย ควรเตรียมดินให้ลึก 30-40 เซนติเมตร ถ้าใช้เครื่องทุ่นแรง หรือรถไถควรไถ 2-3 ครั้ง โดยไถกลบดินไปมา และตากดินให้แห้ง 3-4 สัปดาห์ แล้วย่อยดินให้ละเอียดพอควร อย่าให้ละเอียดมากเกินไป เพราะมะเขือเทศต้องการสภาพดินที่มีการระบายน้ำ และถ่ายเทอากาศได้ดี ถ้าหากดินเป็นกรดให้ใช้ปูนขาวหว่านในอัตราประมาณ 100-300 กิโลกรัมต่อไร่ โดยใช้ปูนขาวหว่าน และคลุกเคล้ากับดิน หรืออาจจะหว่านก่อนการเตรียมดินครั้งสุดท้าย แต่อย่างไรก็ตามควรใส่ปูนขาวก่อนปลูก 2-3 สัปดาห์ (เกียรติเกษตร กาญจนพิสุทธิ์, 2538; อร่าม คุ้มทรัพย์, 2543; เมฆ จันทน์ประยูร, 2548)

2.3.3 วิธีการปลูก

แปลงปลูกควรไถพรวน และปรับระดับดินให้เรียบสม่ำเสมอกัน แล้วยกระดับแปลงให้สูงประมาณ 30 เซนติเมตร กว้าง 100 เซนติเมตร ปลูกเป็นแถวคู่ ระยะระหว่างแถว 70 เซนติเมตร

ระหว่างต้น 50 เซนติเมตร วิธีการปลูกมะเขือเทศสามารถทำได้ 2 วิธี คือ การเพาะกล้าแล้วย้ายปลูก และการหยอดเมล็ดลงแปลงโดยตรงโดยตรง

การเพาะกล้าแล้วย้ายปลูก อาจเพาะในกะบะเพาะในกรณีที่ต้องการต้นกล้าจำนวนไม่มากนัก หรือในกรณีที่ต้องการต้นกล้าเป็นจำนวนมากควรทำแปลงเพาะกล้าแล้วหยอดเมล็ดในแปลงห่างกัน 10 เซนติเมตรใช้ฟางคลุมแปลง รดน้ำสม่ำเสมอในช่วง 3 วันแรก เมื่อกล้าอายุ 22-25 วัน (มีใบจริง 3-4 ใบ จึงย้ายปลูก ก่อนย้าย 1 สัปดาห์ ควรให้น้ำน้อยลง แต่ก่อนย้ายจะต้องรดน้ำในแปลงชำให้ชุ่มเสียก่อน เพื่อความสะดวกในการถอนต้นกล้า และรากต้นกล้าจะไม่ขาดและไม่ถูกกระทบกระ เทือน ก่อนปลูกควรรองก้นหลุมปลูกด้วยปุ๋ยคอก และปุ๋ยสูตร 15-15-15 อัตรา 1 กรัมต่อต้น คลุก เคล้าให้เข้ากันแล้วจึงย้ายกล้าลงหลุมปลูกหลุมละ 1-2 ต้น กลบดินให้เสมอระดับผิวดินอย่าให้เป็นแอ่ง หรือเป็นหลุม เพราะจะทำให้น้ำขัง และต้นกล้าเน่าตายได้ ถ้าปลูกขณะที่ฤดูฝนยังไม่สิ้นสุด แต่ถ้าปลูกในฤดูหนาว หรือฤดูแล้งควรจะกลบดินให้ต่ำกว่าระดับหลุมเล็กน้อย ควรย้ายปลูกในเวลาที่อากาศไม่ร้อน คือ ในตอนบ่าย หรือตอนเย็น เมื่อย้ายเสร็จให้รีบรดน้ำตามทันที

หยอดเมล็ดลงแปลงโดยตรง โดยทำแปลงเป็นร่อง แล้วนำเมล็ด 3-5 เมล็ด หยอดในหลุมปลูกแล้วคลุมด้วยฟาง เมื่อเป็นต้นกล้าก็ทำการถอนให้เหลือหลุมละ 1-2 ต้น (เกียรติเกษตร กาญจนพิสุทธิ์, 2538; อร่าม คุ้มทรัพย์, 2543; เมฆ จันทน์ประยูร, 2548)

2.3.4 การดูแลรักษา

มะเขือเทศเป็นพืชที่ต้องการน้ำสม่ำเสมอ ตั้งแต่เริ่มปลูกไปจนถึงผลเริ่มแก่ หลังจากนั้นควรลดการให้น้ำลง เพราะอาจทำให้ผลแตกได้ การรดน้ำมากเกินไปจะทำให้ดินชื้น ซึ่งทำให้เชื้อราที่ทำให้เกิดโรคเน่าเจริญได้ดี แต่หากมะเขือเทศขาดน้ำ และให้น้ำอย่างกะทันหันก็จะทำให้ผลแตกได้เช่นกัน สำหรับการใส่ปุ๋ยนั้นขึ้นอยู่กับสภาพของดินแต่ละแห่ง เช่น ถ้าดินเป็นดินเหนียว ปุ๋ยเคมีที่ใช้ควรมีปริมาณไนโตรเจน และโปแตสเซียมเท่ากัน ส่วนฟอสฟอรัสให้มีอัตราสูง เช่น สูตร 12-24-12 หรือ 15-30-15 ถ้าเป็นดินร่วนควรให้ปุ๋ยที่มีปริมาณโปแตสเซียมสูงขึ้น แต่ไม่สูงกว่าฟอสฟอรัส เช่น สูตร 10-20-15 ส่วนดินทรายเป็นดินที่มีโปแตสเซียมต่ำ จึงควรให้ปุ๋ยที่มีธาตุโปแตสเซียมสูงกว่าตัวอื่น เช่น สูตร 15-20-20, 13-13-21 และ 12-12-17 เป็นต้น สำหรับการปลูกมะเขือเทศนอกฤดูจะต้องให้ปุ๋ยที่มีธาตุไนโตรเจนสูง เนื่องจากมะเขือเทศจะใช้ปุ๋ยไนโตรเจนมากถ้าหากอุณหภูมิของอากาศสูง อย่างไรก็ตาม ถ้าไม่สามารถหาปุ๋ยสูตรดังกล่าวข้างต้นได้ก็สามารถใช้ปุ๋ยสูตร 15-15-15 ในอัตรา 100 กิโลกรัมต่อไร่ โดยการแบ่งใส่ 3 ครั้ง ครั้งที่ 1 หลังจากย้ายปลูก 7 วัน ครั้งที่ 2 หลังจากครั้งที่หนึ่ง 15 วัน และครั้งที่ 3 หลังจากครั้งที่สอง 20 วัน (เกียรติเกษตร กาญจนพิสุทธิ์, 2538; อร่าม คุ้มทรัพย์, 2543; เมฆ จันทน์ประยูร, 2548)

2.4 พันธุ์ของมะเขือเทศ

พันธุ์มะเขือเทศสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ แบ่งตามลักษณะการเจริญเติบโตของลำต้น และการเกิดช่อดอก และอีกประเภทหนึ่ง คือ แบ่งการตามใช้ประโยชน์ ซึ่งการแบ่งแต่ละประเภทมีหลักเกณฑ์ ดังต่อไปนี้ คือ

2.4.1 การแบ่งพันธุ์มะเขือเทศตามลักษณะการเจริญเติบโตของลำต้น และการเกิดช่อดอก

แบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ

1. พันธุ์พุ่มหรือพันธุ์ไม่ทอดยอด เป็นพันธุ์ที่มีลำต้นลักษณะเป็นพุ่ม ช่อดอกเกิดได้ทุก 2 ข้อของลำต้น และส่วนปลายจะกลายเป็นช่อดอกแทน มะเขือเทศพันธุ์นี้มักจะออกดอกในเวลาใกล้เคียงกัน ดังนั้นการเก็บเกี่ยวจึงทำได้สะดวก คือ สามารถเก็บได้พร้อมกัน

2. พันธุ์เลื้อยหรือพันธุ์ทอดยอด เป็นพันธุ์ที่มีลำต้นเลื้อย ไม่มีดอกที่ปลายยอด ตามปกติต้นจะทอดยอดออกไปเรื่อย ๆ นอกจากในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมเท่านั้นยอดจะชะงักการเจริญเติบโต ช่อดอกเกิดทุก ๆ 3 ข้อ การปลูกมะเขือเทศพันธุ์นี้ต้องทำค้าง โดยใช้ไม้ปัก หรือเชือกพลาสติกขึง เพื่อช่วยให้ผลมีคุณภาพดีขึ้น ไม่เปื้อนดิน และไม่ถูกทำลายจากโรคและแมลงในดิน แต่ในบางแห่งที่มีค่าจ้างแรงงานสูง และต้องลงทุนสูงในการทำค้าง ก็จะปล่อยให้เลื้อยไปตามดิน โดยไม่ทำค้างแต่ใช้วัสดุคลุมดินแทน เช่น ฟางข้าว เพื่อป้องกันความเสียหายที่จะเกิดขึ้นกับผลของมะเขือเทศ ซึ่งใช้ได้ผลดีกับมะเขือเทศพันธุ์สีดา และฟลอราเดล เป็นต้น (เกียรติเกษตร กาญจน พิสุทธิ์, 2538; อร่าม คุ้มทรัพย์, 2543; เมฆ จันทน์ประยูร, 2548)

2.4.2 การแบ่งพันธุ์มะเขือเทศตามประเภทการใช้ประโยชน์

แบ่งออกได้ 2 ประเภทใหญ่ ๆ ได้แก่

1. พันธุ์บริโภคสด มะเขือเทศชนิดนี้มีทั้งแบบผลขนาดเล็ก นิยมสีชมพูมากกว่าสีแดง สำหรับผลขนาดใหญ่ลักษณะผลกลมคล้ายแอปเปิ้ลผลสีเขียวเมื่อสุกจะมีสีแดงจัดเนื้อหนาแข็ง เปลือกไม่เหนียวและผลไม่กลวง พันธุ์ที่ใช้ปลูกเพื่อบริโภคสดมีหลายพันธุ์ด้วยกัน เช่น พันธุ์สีดา และพันธุ์ฟลอราเดล เป็นต้น

2. พันธุ์อุตสาหกรรม ลักษณะของมะเขือเทศพันธุ์อุตสาหกรรม ได้แก่ มะเขือเทศพันธุ์เนื้อมีรสเปรี้ยวจัด มีเปอร์เซ็นกรดสูง มีผลสุกพร้อม ๆ กันเกือบทั้งต้น ทำการเก็บเกี่ยวเพียง 2-3 ครั้ง พันธุ์พุ่ม เปลือกเหนียว ไม่แตกช้ำง่ายในขณะขนส่ง ผลสุกมีสีแดงจัดทั้งผล ขนาดและรูปร่างของผลสม่ำเสมอ กลีบรองดอกที่ติดผล แยกหลุดจากผลได้ง่ายขณะเก็บเกี่ยว ทนทานต่อโรค และแมลงได้ดี ผลผลิตต่อไร่สูง (จานุลักษณ์ ขนบดี, 2541)

2.5 วิธีการเก็บเกี่ยวมะเขือเทศ

การเก็บเกี่ยวขึ้นอยู่กับพันธุ์ โดยเฉลี่ยแล้วเมื่อปลูกได้ประมาณ 30-45 วัน มะเขือเทศจะเริ่ม

ออกดอก และจะเริ่มเก็บเกี่ยวได้เมื่ออายุประมาณ 70-90 วัน และระยะเวลาจากเริ่มปลูกถึงเก็บเกี่ยวหมดประมาณ 4-5 เดือน

อายุของผลที่เก็บเกี่ยวขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการปลูกเป็นสำคัญ หากเป็นการปลูกเพื่อส่งตลาดสดจะต้องเก็บในระยะที่ไม่แก่จัด คือ ในระยะที่ผลเป็นสีเขียว และเริ่มการเปลี่ยนแปลงสีเป็นสีชมพูเรื่อ ๆ เพียงเท่านั้น และการเก็บจะต้องให้ขั้วผลติดมาด้วย เหตุที่ต้องเก็บผลในระยะที่ไม่แก่จัดเนื่องจากทำให้ทนทานต่อการขนส่ง และเมื่อมะเขือเทศถึงมือผู้บริโภค หรือวางขายในตลาดก็จะเริ่มสุก (แก่จัดผลมีสีส้มหรือสีแดง) พอดี ส่วนการเก็บเกี่ยวผลมะเขือเทศเพื่อส่งโรงงานอุตสาหกรรมนั้นต้องเก็บในระยะผลสุกเป็นสีแดง หรือสีส้มทั้งผล (แล้วแต่พันธุ์) และเก็บไม่ให้มีขั้วผลติดมากับผล หากผลไม่สุกแดง และมีขั้วผลติดมาด้วยโรงงานอุตสาหกรรมจะคัดทิ้ง เนื่องจากหากเอาไปทำผลิตภัณฑ์แล้ว จะทำให้คุณภาพ และสีของผลิตภัณฑ์เสียไม่เป็นไปตามมาตรฐานที่ต้องการ (กรมวิชาการเกษตร, 2542)

2.6 โรคของมะเขือเทศ

โรคที่ทำความเสียหายให้กับมะเขือเทศมีทั้งโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และการขาดธาตุอาหาร ซึ่งโรคที่มีสาเหตุเกิดจากเชื้อรา คือ โรคใบไหม้ (late blight) สาเหตุเกิดจากเชื้อ *Phytophthora infestans* โรคใบจุดวง (early blight) สาเหตุเกิดจาก *Alternaria solani* โรคเหี่ยวเหลือง (wilt) สาเหตุเกิดจากเชื้อ *Fusarium oxysporum* และ *Sclerotium rolfsii* โรคราเขม่า (grey leaf mold) สาเหตุเกิดจากเชื้อ *Cercospora fuligena* โรคราก้ามะหยี่ (leaf mold) สาเหตุเกิดจากเชื้อ *Cla dosporium fulvum* โรคราแป้ง (powdery mildew) สาเหตุเกิดจากเชื้อ *Oidiopsis* sp. โรคกล้าเน่าตายหรือโรคเน่าคอดิน (damping off) สาเหตุเกิดจากเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Rhizoc tonia solani, Pythium* sp. และ *Pseudomonas solanacearum* โรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส ได้แก่ โรคใบหงิกเหลือง (tomato yellow leaf curl) และโรคใบด่างเรียวเล็ก (cucumber mosaic virus) ส่วนโรคที่มีสาเหตุมาจากการขาดธาตุอาหาร คือ โรคผลเน่าสีดำ หรือโรคปลายผลเน่าดำ (blossom end rot) ซึ่งเกิดจากการขาดธาตุแคลเซียม (กรมวิชาการเกษตร, 2542)

2.7 แมลงศัตรูมะเขือเทศ

มะเขือเทศมีแมลงศัตรูเข้าทำลายได้ทุกส่วน คือ

ใบและยอดอ่อน แมลงที่เข้าทำลาย คือ หนอนเจาะสมอฝ้าย (cotton bollworm; *Heliothis armigera* (Hübner)) หนอนกระทู้หอม (beet armyworm; *Spodoptera exigua* (Hübner) หนอนกระทู้ผัก (commom cutworm; *Spodoptera litura* (F.)) หนอนแมลงวันชอนใบ (leaf miner; *Liriomyza* sp.) ซึ่งจะกัดกินใบและยอดอ่อน แมลงหวี่ขาว (tobacco whitefly*; Bemisia tabaci* (Gennadius)) ตัวอ่อน

และตัวเต็มวัยดูดกินน้ำเลี้ยงบริเวณใบ และเป็นพาหนะนำโรคที่เกิดจาก tomato yellow leaf curl virus เพลี้ยอ่อน (aphid; *Myzus persicae* (Sulzer)) เพลี้ยจักจั่น (leafhopper; *Empoasca* sp.) มวนมะเขือเทศ (lygeid bug; *Ligaeus pandurus* Scopoli) และมวนเขียวข้าว (Green stink bug; *Nezara viridura* (Linnaeus)) ซึ่งดูดกินน้ำเลี้ยงบริเวณใบ และยอด

ลำต้น แมลงที่เข้าทำลาย คือมวนเขียวข้าว ดูดกินน้ำเลี้ยงบริเวณลำต้น หนอนเจาะลำต้น (corn stem borer; *Ostrinia furnacalis* (Guenee)) ทำความเสียหายโดยเจาะลำต้นมะเขือเทศ และหนอนกระทู้ดำ (black cutworm; *Agrotis ipsilon* (Hufnagel)) จะกัดกินลำต้นอ่อน

ดอก แมลงที่เข้าทำลาย คือมวนเขียวข้าว ดูดกินน้ำเลี้ยงจากดอก หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนกระทู้หอม ซึ่งจะกัดกินดอกของมะเขือเทศ

ผล แมลงที่เข้าทำลาย คือ หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนกระทู้หอม ซึ่งจะกัดกินที่ผิวของผล และเจาะเข้าไปกัดกินในผล ส่วนมวนมะเขือเทศดูดกินน้ำเลี้ยงจากผล (กองกีฏและสัตววิทยา, 2542)

2.8 การปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศ

การปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศ เริ่มศึกษากันอย่างจริงจังเมื่อประมาณ ค.ศ.1850 ที่ Columbus, Ohio สหรัฐอเมริกา โดยนักผลิตเมล็ดพันธุ์ชื่อ Alexander Livington ซึ่งพบมะเขือเทศที่แปลกจากที่เคยปลูก จึงคัดเลือกพันธุ์เก็บไว้ และนำไปปลูก ปรากฏว่าไม่กลายพันธุ์ จากนั้นจึงเริ่มคัดเลือกพันธุ์ สามารถปรับปรุงพันธุ์ให้ดีขึ้นได้ในระยะเวลา 10 ปี หลังจากนั้นจึงทำการคัดเลือก และผลิตเมล็ดออกจำหน่าย โดยใช้ชื่อพันธุ์ว่า พันธุ์พารากอน (paragon) ในขณะเดียวกันก็มีการคัดเลือกพันธุ์มะเขือเทศ โดยนักปรับปรุงพันธุ์คนอื่น ๆ และผลิตเมล็ดพันธุ์ขายในชื่อต่าง ๆ กัน คือ Fejee และ Conqueror จากนั้นมีการปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศอย่างต่อเนื่อง ลักษณะของพันธุ์มะเขือเทศถูกปรับปรุงคัดเลือกให้มีลักษณะตามความต้องการของตลาด ซึ่งเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา (สถิต วิมล, 2542)

การปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศในปัจจุบัน นักวิชาการได้เน้นการปรับปรุงพันธุ์เพื่อต้านทานโรค และแมลงที่เป็นปัญหาสำคัญในการผลิตมะเขือเทศ การปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศที่สามารถติดผลได้ดีภายใต้อุณหภูมิสูง และความชื้นเกินความต้องการ เป็นสิ่งที่จำเป็นสำหรับการปลูกมะเขือเทศในประเทศไทย การปรับปรุงทางด้านคุณภาพของผลมะเขือเทศ สามารถแบ่งได้หลายองค์ประกอบได้แก่ สีผล ความแน่นเนื้อ รสชาติ และกลิ่น ซึ่งการคัดเลือกมะเขือเทศเพื่อส่งเข้าโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูป และรับประทานผลสดจะมีการกำหนดคุณภาพที่ไม่เหมือนกัน ในมะเขือเทศที่ส่งเข้าโรงงานอุตสาหกรรมนั้นต้องการผลมะเขือเทศที่มีขนาดสม่ำเสมอ เนื้อมาก ความหวานไม่ต่ำกว่า 4.5 บริกซ์ และความเป็นกรดสูง ไส้กลวง ผลเล็ก สีผลแดงจัด เนื้อแน่นแข็ง ผิวเหนียว แต่ในมะเขือเทศรับประทานผลสด ต้องการผลกลมโต ขนาดสม่ำเสมอ ผิวเรียบ มีช่องว่างภายในผลมาก

ผนังผลหนา เนื้อมาก สีของผลเมื่อสุกเต็มที่แดงจัดสม่ำเสมอ รสชาติและกลิ่นดี แต่ลักษณะการเก็บเกี่ยวผลมะเขือเทศโดยมากจะเก็บเกี่ยวในระยะผลเริ่มแก่ และปล่อยให้สุกในโรงเก็บ หรือระหว่างการขนส่ง ซึ่งทำให้ไวตามินซี และปริมาณน้ำตาลในผลลดลง ส่งผลให้รสชาติ และกลิ่นไม่ดีไปด้วย ในทางตรงกันข้าม ถ้าปล่อยให้มะเขือเทศสุกคาต้นจะทำให้ได้มะเขือเทศที่มีปริมาณน้ำตาล และกรดในระดับที่พอเหมาะ ทำให้ได้กลิ่นและรสชาติดีที่สุด แต่จะประสบปัญหาเรื่องการสุกงอม และการบอบช้ำในระหว่างที่มีการขนส่งหรือระหว่างการจำหน่าย ปัจจุบันนักปรับปรุงพันธุ์ได้ปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศที่ยืดอายุการเก็บรักษาของผลให้นานขึ้น ได้แก่ พันธุ์ที่มียีน rin (ripening inhibitor) และพันธุ์ที่มียีน nor (non ripening) ซึ่งเมื่อผลแก่จะยังมีเนื้อแข็ง สภาพผลดีเป็นเวลาหลายเดือนหลังจากเก็บเกี่ยว เพื่อนำมาผสมกับมะเขือเทศพันธุ์การค้า ทำให้มีการเพิ่มมูลค่าแก่ผลผลิตและสามารถเก็บรักษาได้นานขึ้นด้วย (สถิต วิมล, 2542)

2.9 การสังเคราะห์กลิ่นในพืช

สารระเหยที่เป็นองค์ประกอบของกลิ่น และรสชาติ มีส่วนประกอบสำคัญมาจากสารที่มีน้ำหนักมวลโมเลกุลต่ำ ได้แก่ สารจากกลุ่มกรดไขมัน กรดอะมิโน และคาร์โบไฮเดรต ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีความแตกต่างกันทั้งทางด้านโมเลกุลที่มีทั้งอิ่มตัว และไม่อิ่มตัว และด้านโครงสร้างที่มีทั้งแบบสายตรง (straight-chain) แบบกิ่งแขนง (branched-chain) และแบบวงกลม (cyclic) ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้ทำให้ได้สารเคมีกลุ่มต่าง ๆ กัน ได้แก่ แอลกอฮอล์ อัลดีไฮด์ คีโตน เอสเทอร์ และอีเทอร์ (Schwab et al., 2008)

สารระเหยเป็นสิ่งที่จำเป็นมากทางการค้าทั้งในด้านการผลิตอาหาร การผลิตยา การทำเกษตรกรรม และอุตสาหกรรมด้านการเพิ่มรสชาติอาหาร การผลิตสารกำจัดแมลง และการผลิตอาหารเลี้ยงสัตว์ ซึ่งปัจจุบันสารระเหยที่ใช้ในทางการค้าส่วนมากเป็นสารระเหยที่ได้จากธรรมชาติ ส่วนสารระเหยที่สังเคราะห์ขึ้น ส่วนใหญ่สกัดมาจากสารพวกปิโตรเลียม (petroleum-derived precursors) ซึ่งยังไม่เป็นที่ยอมรับของสังคม เนื่องจากสารเคมีที่สังเคราะห์ขึ้นยังมีอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม แสดงให้เห็นถึงข้อจำกัดของวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการผลิต ดังนั้นจึงได้นำวิธีการผลิตแบบชีวภาพ (bioproduction) ซึ่งประกอบด้วย การสกัดสารระเหยจากวัตถุดิบธรรมชาติ การใช้จุลินทรีย์ในการหมัก และการเปลี่ยนกลับของวัตถุดิบธรรมชาติโดยใช้จุลินทรีย์ หรือการแยกด้วยเอนไซม์ (bioconversion of natural precursors) มาใช้ ซึ่งให้ผลต่อสิ่งแวดล้อมดีกว่า (Guentert, 2007)

ในชิ้นส่วนต่าง ๆ ของพืช ได้แก่ ใบ ดอก ผล ลำต้น และราก จะมีการปล่อยสารระเหยหลายชนิดที่สามารถทำปฏิกิริยาร่วมกันได้ดี (Pichersky and Gershenzon, 2002) เนื่องจากสารระเหยในพืชเป็นสารที่ประกอบกันแบบที่มีปฏิริยาจำเพาะระหว่างสิ่งมีชีวิตกับสิ่งแวดล้อม (species-specific ecological interactions) และส่วนใหญ่มักเป็นการจำกัดเฉพาะชนิด ซึ่งเชื่อว่าสารระเหยเหล่านี้เกี่ยว

ข้องกับการป้องกันตัว และการดึงดูดของพืช (defensive and attractive roles) และสารระเหยเหล่านี้ยังมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของพืชโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อพืชตกอยู่ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่กดดัน พืชจะมีการปรับตัวโดยการสร้างสารระเหยชนิดพิเศษออกมาเพื่อใช้ในการเอาชีวิตรอด (Picher sky et al., 2006)

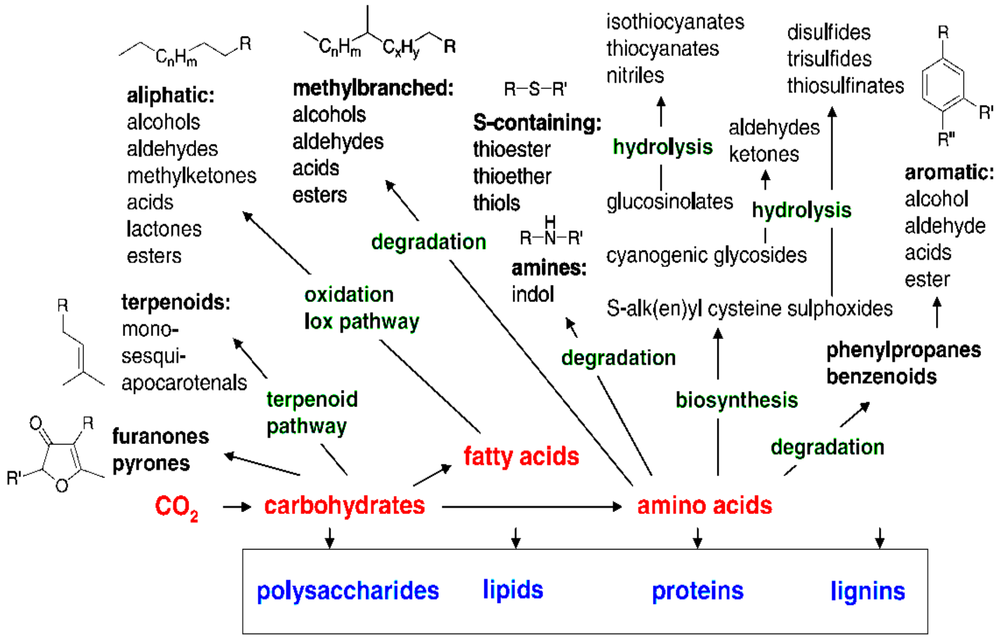
ในส่วนของดอกไม้ ดอกไม้ส่วนมากจะมีการปล่อยสารระเหยออกมาเพื่อดึงดูดแมลงให้มาผสมเกสร และการดึงดูดแมลงให้มาผสมเกสรนั้น กลิ่นจัดว่าเป็นสื่อที่ดีกว่าสีหรือรูปร่างของดอก และยังสามารถต่อต้านกิจกรรมของจุลินทรีย์และสัตว์กินพืชได้อีกด้วย ตัวอย่างเช่น สารระเหยที่สามารถปกป้องพืชจากแมลงศัตรูพืช ได้แก่ สาร S-linalool ซึ่งเป็นสารขับไล่เพลี้ย (aphid; *Myzus persicae*) (Aharoni et al., 2003)

คุณสมบัติโดยทั่วไปของชิ้นส่วนพืชที่เป็นส่วนเนื้อเยื่อเจริญ (vegetative plant tissue) จะมีการปล่อยสารระเหยเมื่อถูกสัตว์กัดกิน (De Bruxelles and Roberts, 2001; Pichersky and Gershen zon, 2002) ซึ่งในสารระเหยบางชนิดจะแสดงการปกป้องพืชโดยตรง โดยสารระเหยเหล่านี้จะดึงดูดแมลงจำพวกที่มีขาเป็นปล้อง ๆ เช่น แมงมุม หรือปรสิตของสัตว์ที่กินพืชเป็นอาหาร ให้มากำจัดหรือรบกวนแมลง หรือสัตว์ชนิดนั้น ดังนั้นพืชจึงถูกทำลายน้อยลง นอกจากนี้กลิ่นยังสามารถขับไล่หรือแสดงความเป็นพิษต่อสัตว์กินพืช และพืชสาเหตุโรคพืช และยังมีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลออกซิเจนที่ไม่ดีได้อีกด้วย สารระเหยจากส่วนเนื้อเยื่อเจริญส่วนมากถูกปล่อยจากส่วนราก ซึ่งมีส่วนในกิจกรรมการต่อต้านจุลินทรีย์ หรือสัตว์กินพืช หรือส่งเสริมการเพิ่มขึ้นของ allelopathic activities ในระบบการแข่งขันของพืชในระบบนิเวศวิทยานั้น (Steeghs et al., 2004) การปล่อยสารระเหยของพืชบางชนิดในระดับต่ำสามารถช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย epiphytic โดย phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* (Abanda-Nkp-watt et al., 2006a) ในขณะเดียวกัน กลับพบว่าสารระเหยบางชนิดจะดึงดูดแมลงตัวเมียให้มาวางไข่บนตาดอก และผลอ่อนด้วย (Tasin et al., 2007)

ในส่วนของผลไม้ มีการสะสมสารระเหยในระยะผลเริ่มสุก และเมื่อสารระเหยถูกปล่อยออกมาจะมีผลทำให้เกิดการกระจายของเมล็ดพันธุ์พืชโดยสัตว์ และแมลง และสารระเหยในผลไม้ยังมีความสำคัญต่อการค้ามาก คือ เป็นมาตรฐานอีกอย่างหนึ่งที่กำหนดความมีคุณภาพของผลไม้ และความพึงพอใจของผู้บริโภค สารระเหยที่เกิดขึ้นในผลไม้นี้เป็นสัญญาณแสดงถึงการสุกในผล ซึ่งสารระเหยกลุ่มนี้จะพบเฉพาะในผลไม้ที่มีการสุกเท่านั้น ไม่พบในดอกไม้ ชิ้นส่วนพืชที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญ และผลไม้ที่ไม่มีการสุก ซึ่งสารระเหยที่พบในผลไม้ที่มีการสุก ดอกไม้ และชิ้นส่วนพืชที่เป็นส่วนเนื้อเยื่อเจริญนี้ ส่วนมากมักผลิตและปลดปล่อยเป็นปริมาณมากเมื่อพืชเกิดบาดแผล นอกจากนี้สารระเหยที่เป็นองค์ประกอบของรสชาติยังส่งเสริมการต่อต้านกิจกรรมของจุลินทรีย์ และต่อต้านการเกิดเซลล์มะเร็งได้ด้วย แต่ถ้ามีสารระเหยในปริมาณที่สูงเกินไปก็อาจเป็นพิษได้ (Goff and Klee, 2006)

จากที่ได้กล่าวถึงสารระเหยที่มาจากส่วนต่างๆ ของพืชข้างต้น แสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบของรสชาติ และกลิ่นประกอบด้วยสารเคมีกลุ่มต่าง ๆ หลายกลุ่มรวมอยู่ด้วยกัน ทั้งกลุ่มที่มีโครงสร้างแบบเส้นตรง แบบกิ่งก้าน และแบบ aromatic ซึ่งประกอบเป็นสารหลายกลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม hydroxyl, carbonyl, carboxyl, ester, lactone, amine และ thiol จากการนำไปทดสอบและจัดลำดับพบว่า มีสารที่เป็นองค์ประกอบของรสชาติมากกว่า 700 ชนิด (Surburg and Panten, 2005)

เส้นทางการสังเคราะห์สารระเหยในพืชมีการบันทึกรายงานจากอดีตถึงปัจจุบัน (Croteau and Karp, 1991) แสดงให้เห็นว่าคาร์โบไฮเดรต กรดไขมัน และกรดอะมิโน เป็นแหล่งคาร์บอนธรรมชาติที่สำคัญสำหรับกระบวนการสร้างสารระเหยที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของรสชาติ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แหล่งคาร์บอนธรรมชาติสำหรับการสร้างสารระเหยที่เป็นองค์ประกอบของรสชาติ (Schwab et al., 2008)

2.10 การสังเคราะห์กลิ่นในผลไม้

คุณภาพของผักและผลไม้ เกิดจากองค์ประกอบหลายชนิดมารวมกัน ได้แก่ สี เนื้อสัมผัส รสชาติ และกลิ่น เป็นต้น กลิ่นประกอบด้วยสารระเหยหลายชนิดมารวมตัวกัน จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการหาองค์ประกอบของสารระเหย และอธิบายถึงเส้นทางการสังเคราะห์กลิ่นตามธรรมชาติโดยวิธี bioconversion (El-Sharkawy et al., 2004) และมีนักวิจัยหลายท่านที่พยายามจะแยกยีนที่ทำให้เกิดกลิ่นในผักและผลไม้ (Aharoni et al., 2000; Yahyaoui et al., 2002; Beekwilder et

al., 2004) หรือในพวกดอกไม้ (Dudareva and Pichersky, 2000) ซึ่งพบยีนที่เกี่ยวข้องเป็นจำนวนมาก แต่ยังไม่ทราบการแสดงออกของยีนกลุ่มนี้มากนัก

กลิ่นเกิดจากการรวมตัวกันอย่างซับซ้อนขององค์ประกอบหลาย ๆ อย่าง ซึ่งกลิ่นแต่ละชนิดก็จะมีลักษณะเฉพาะ ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบ และการแสดงออกของลักษณะพิเศษของสารระเหยชนิดนั้น ๆ ส่วนองค์ประกอบที่สำคัญและพบมากในกลิ่นของผัก และผลไม้ ได้แก่ กลุ่ม mono terpenes, sesquiterpenes, lipid derived compounds, sugar derived compounds และ amino acid derived ซึ่งองค์ประกอบที่หลากหลายและเส้นทางของกระบวนการเมตาบอลิซึมที่แตกต่างกันนี้จะถูกควบคุมด้วยฮอร์โมนและ transcription factor ซึ่งกลไกสุดท้ายประกอบด้วยการเก็บและแยกสารระเหยจากส่วนอื่น ได้แก่ กระบวนการ glycosylation และการเก็บสารระเหยไว้ในแวคคิวโอล นอกจากนี้การผลิตสารระเหยที่เป็นส่วนประกอบของรสชาติ สามารถทำได้โดยการใช้พันธุวิศวกรรม ตัวอย่างเช่น การยับยั้งการแสดงออก ของ polygalacturonase (PG), pectin methyl esterase (PME) และ PG+PME ในผลไม้ดัดแปลงพันธุกรรม ช่วยให้การสลายตัวของ pectin ต่ำลง สามารถช่วยลด flavor volatile ได้ (Baldwin et al., 2000)

2.11 การสังเคราะห์กลิ่นในมะเขือเทศ

การปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศมีทั้งในด้านการเพิ่มผลผลิต และด้านคุณภาพ ได้แก่ สี กลิ่นเนื้อสัมผัส และรสชาติ ในระหว่างการสุกของผลไม้ จะเกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงในด้านต่าง ๆ ได้แก่ การเปลี่ยนสีของผลจากเขียวเป็นแดง ซึ่งเกิดจากคลอโรพลาสต์เปลี่ยนเป็นคลอโมพลาสต์ และเมื่อคลอโรฟิลล์เริ่มสลายตัว จะมีการสะสมของคาโรทีนอยด์มากขึ้น ความนุ่ม และเนื้อสัมผัสของผลที่เปลี่ยนไปเกิดจากผนังเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลง และการเปลี่ยนแปลงรสชาติและกลิ่น ซึ่งในระยะการสุกของผลจะมีการผลิตสารระเหยจำเพาะเพิ่มขึ้น และมีปริมาณน้ำตาลและกรดสมดุลกันมากขึ้น (Grierson and Alexander, 2002) ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์และน้ำตาลมีส่วนสำคัญต่อรสชาติมาก ทำให้มีรสหวาน รสเปรี้ยว รสฝาด รสขม

รสชาติและกลิ่นในผลเกิดจากการผลิตสารระเหยที่ทำให้เกิดกลิ่นในช่วงระยะการสุกและการเน่าเปื่อยของผล โดยสามารถตรวจสอบโครงสร้างของสารระเหยในผลไม้ด้วยวิธี gas chromatography และวิธี mass spectroscopy ซึ่งสารระเหยส่วนใหญ่ที่ตรวจพบเป็นสารระเหยประเภทแอลกอฮอลล์ อัลดีไฮด์ และเอสเทอร์ จากการศึกษาที่ผ่านมาชี้ให้เห็นถึงความแตกต่างของรสชาติ และกลิ่นระหว่างมะเขือเทศแต่ละพันธุ์ ซึ่งมาจากการผลิตสารระเหยที่ทำให้เกิดกลิ่นแตกต่างกัน (Brauss et al., 1998) โดยพบสารระเหยจำนวนมากกว่า 400 ชนิดในผลมะเขือเทศที่กำลังสุก แต่มีเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่เกี่ยวข้องกับการเกิดกลิ่นในมะเขือเทศ โดยสารระเหยที่พบมากและมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดกลิ่นในผลของมะเขือเทศมีอยู่ด้วยกัน 7 ชนิด ได้แก่ hexanal,

hexenal, hexenol, 3-methylbutanal, 3-methylbutanol, methylnitrobutane และ isobutylthiazole (Buttery et al., 1993) (ภาพที่ 2) ซึ่งแต่ละชนิดมีกระบวนการหลักในการสังเคราะห์แตกต่างกัน สามารถสรุปได้ ดังนี้ (ภาพที่ 3)

1) กระบวนการของกรดอะมิโน ให้สาร 3-methylbutanal และ 3-methylbutanol
2) กระบวนการของคาโรทีนอยด์ ให้สาร methylnitrobutane และ isobytylthiazole
3) กระบวนการของกรดไขมัน ให้สาร hexanal, hexenal และ hexenol

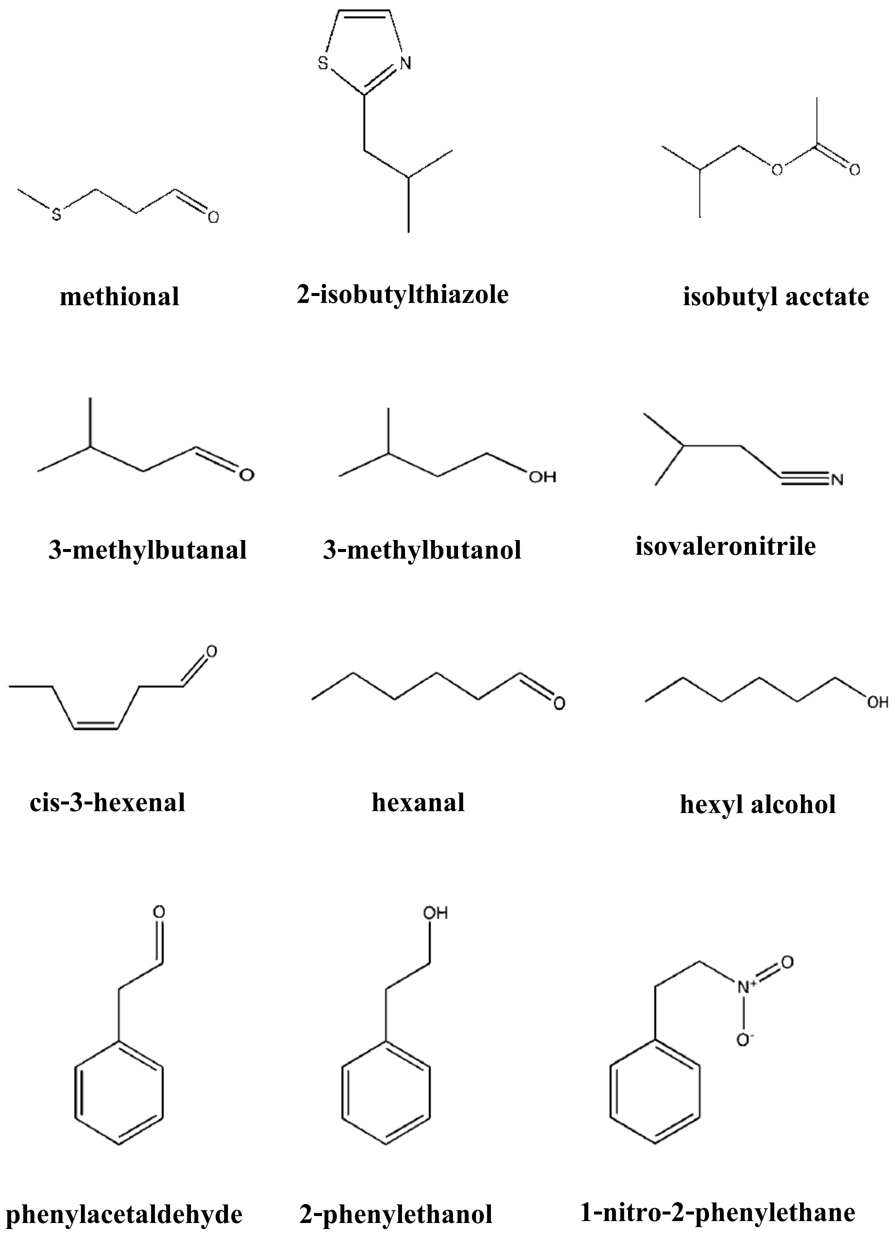
กระบวนการทั้งสามนี้ให้สารผลิตภัณฑ์ประเภทเดียวกัน คือ สารระเหยประเภทอัลดีไฮด์และคีโตน ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำคัญในการสังเคราะห์กลิ่น หลังจากนั้นเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (ADH) จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนสารระเหยประเภทอัลดีไฮด์ให้เป็นสารระเหยประเภทแอลกอฮอล์ ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำคัญของเอนไซม์ alcohol acyl transferase (AAT) ซึ่งจะเปลี่ยนสารระเหยประเภทแอลกอฮอล์ให้เป็นสารระเหยประเภทเอสเทอร์ จัดเป็นผลผลิตสุดท้ายในกระบวนการสังเคราะห์กลิ่น ภาพที่ 3 แสดงผลผลิตหลักที่ได้จากเส้นทางการสังเคราะห์สารระเหยของมะเขือเทศ ได้แก่ สารระเหยประเภทอัลดีไฮด์ แอลกอฮอล์ และเอสเทอร์ นอกจากเอนไซม์ที่ระบุในภาพที่ 3 ยังมีเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์กลิ่นอยู่อีก แต่จะพบในเส้นทางการสังเคราะห์กลิ่นเส้นทางอื่น ๆ (Buttery et al., 1993)

การศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นที่กระบวนการ catabolism ของกรดไขมัน โดยเฉพาะกรดไขมันจากเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งเป็นสารตั้งต้นหลักของสารระเหยที่ให้กลิ่นในผักและผลไม้ อนุพันธ์กรดไขมันที่ระเหยได้จากกระบวนการนี้ ได้แก่ saturated และ unsaturated short-chain แอลกอฮอล์ อัลดีไฮด์ และเอสเทอร์ (ภาพที่ 4)

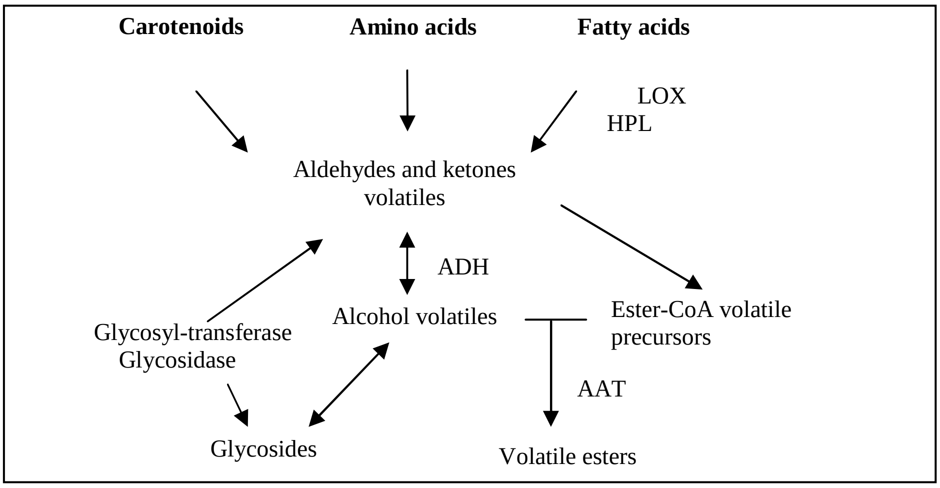
กระบวนการสังเคราะห์สารระเหยจากกรดไขมันมีเอนไซม์สำคัญ 4 ชนิด คือ lipoxygenase (LOX), hydroperoxide lyase (HPL), alcohol dehydrogenase (ADH) และ alcohol acyltransferase (AAT)

Lipoxygenase (LOX) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา hydroperoxidation ของสาร polyunsaturated fatty acids ซึ่งเป็นสารตั้งต้นพื้นฐานของ LOX ในพืช คือ linoleic และ linolenic acid โดย LOX มี 2 ชนิด ได้แก่ ชนิดที่หนึ่ง 9-LOX ซึ่งผลิตสารเฉพาะคือ 9-hydroxyperoxides และชนิดที่สอง 13-LOX ที่ผลิตสารเฉพาะคือ 13-hydroxyperoxides นอกจากนี้ LOX ยังเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสภาวะเครียด การเกิดบาดแผล และการเข้าทำลายของเชื้อโรคในพืช (Feussner and Wasternack, 2002) แต่โดยส่วนใหญ่ LOX จะมีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์องค์ประกอบของสารระเหย เช่น hexanal, hexenal และ hexenol ที่ทำให้เกิดกลิ่นในผักและผลไม้ สำหรับเอนไซม์ HPL จะทำหน้าที่เปลี่ยนสารผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา LOX คือ 9-hydroxyperoxides และ 13-hydroxyperoxides ให้เป็นสารประกอบประเภทอัลดีไฮด์ (Yilmaz, 2001) เพื่อนำอัลดีไฮด์ไปใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการ

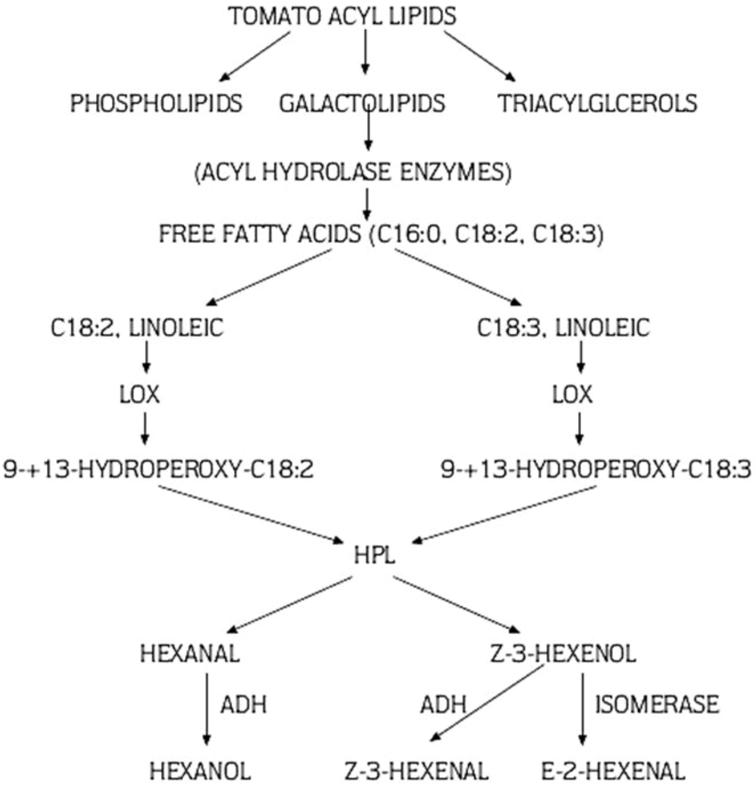
เปลี่ยนอัลดีไฮด์เป็นแอลกอฮอล์โดยเอนไซม์ ADH ซึ่งแอลกอฮอล์บางชนิด เช่น hexenol และ hexanol เป็นองค์ประกอบสำคัญของกลิ่น ในขั้นตอนสุดท้ายเอนไซม์ AAT จะทำหน้าที่เปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นสารระเหยเอสเทอร์ต่อไป ซึ่งถือเป็นการสิ้นสุดกระบวนการสังเคราะห์สารระเหยจากกรดไขมัน (Yilmaz, 2001)



ภาพที่ 2 สารระเหยที่พบมากและมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดกลิ่นในผลของมะเขือเทศ (Mathieu et al., 2009)



ภาพที่ 3 กระบวนการหลักของการสังเคราะห์กลิ่นในมะเขือเทศ, Lox : Lipoxygenase, HPL : Hydroperoxide lyase, ADH : Alcohol dehydrogense, AAT : Alcohol acyltransferase (GBF, Toulouse, 2007)

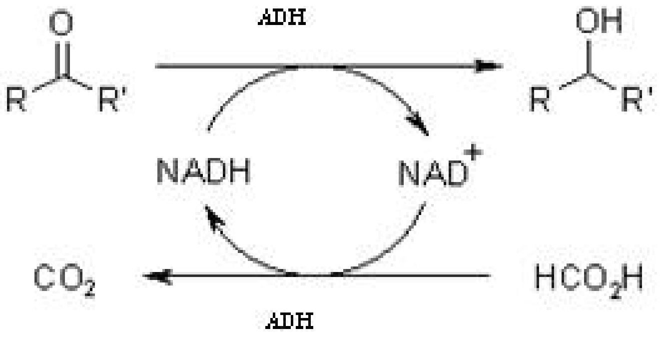


ภาพที่ 4 กระบวนการสังเคราะห์กลิ่นจากกรดไขมัน (Yilmaz, 2001)

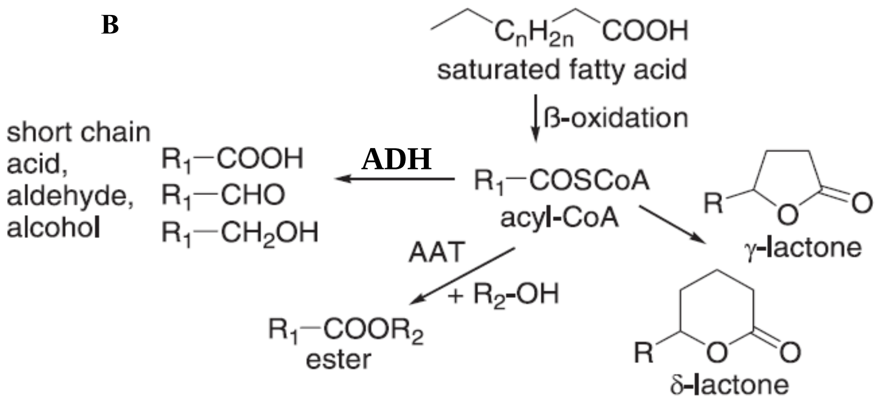
2.12 แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส

แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenases ; alcohol : NAD^+ oxidoreductase; EC 1.1.1.1 ; ADH) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนสารอัลดีไฮด์ให้เป็นแอลกอฮอล์ ในขณะเดียวกันก็สามารถเปลี่ยนสารแอลกอฮอล์กลับเป็นอัลดีไฮด์ได้เช่นเดียวกัน โดยใช้ NADH และ NAD^+ เป็นโคแฟกเตอร์ (ภาพที่ 5A) และเปลี่ยนอนุพันธ์กรดไขมันเป็น short-chain อัลดีไฮด์และแอลกอฮอล์ (ภาพที่ 5B) แอลกอฮอล์เป็นกลุ่มยีนที่มีจำนวนมาก และซับซ้อน สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ (1) medium-chain dehydrogenases/reductases (MDRs) ประกอบด้วย 350 residues/ subunit (2) short-chain dehydrogenases/reductases (SDR) ประกอบด้วย 250 residues/ subunit และ (3) iron-activated ADHs (Theodore-Chase, 1999) ซึ่งแต่ละยีนจะมีองค์ประกอบแตกต่างกัน (ตารางที่ 2)

A



B



ภาพที่ 5 ปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (Schwab et al., 2008)

A : ปฏิกิริยาการเปลี่ยนกลับระหว่างสารอัลดีไฮด์และแอลกอฮอล์โดยเอนไซม์ ADH โดยใช้ NADH และ NAD^+ เป็นโคแฟกเตอร์

B : ปฏิกิริยาการเปลี่ยนอนุพันธ์กรดไขมันเป็นสารอัลดีไฮด์และแอลกอฮอล์

ยีน *ADH* มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการพัฒนาของพืชและการตอบสนองของพืชในสภาวะเครียด (Matton et al., 1990; Christie et al., 1991; Ingersoll et al., 1994; Bucher et al., 1995) มีการศึกษาบทบาทของยีนนี้ในพืชหลายชนิด ตัวอย่างเช่น การศึกษา A*rabidopsis thaliana* ที่มีความบกพร่องของยีน *ADH* พบว่า มีผลทำให้เกิดการยับยั้งการงอกของเมล็ดในสภาวะที่มีการกระตุ้นเพิ่มระดับเอนไซม์ ADH เช่น anoxia หรือ hypoxia (Conley et al., 1999) และในกรณีที่มีการเพิ่มระดับการแสดงออก (overexpression) ของยีน *ADH* ในรากของ *Arabidopsis* ช่วยเพิ่มความต้านทานของขนรากในสภาวะที่มีออกซิเจนน้อย และเพิ่มประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตของรากด้วย (Shiao et al., 2002) แต่ไม่มีผลต่อการอยู่รอดในสภาวะน้ำขัง (Ismond et al., 2003) ใน sugarbeet พบเอนไซม์ ADH มากในเมล็ด ต้นกล้า ละอองเกสร และระบบลำเลียงของรากและใบ (Geyt and Jacobs, 2003) นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ ADH activity มีความสัมพันธ์กับระดับ ADH mRNA เช่น Tihanyi et al. (1989) พบว่าในสภาวะ anaerobiosis สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ ADH activity จากการเพิ่มระดับของ ADH mRNA ทำให้รากของ *Arabidopsis* สามารถเจริญได้ ในรากของต้นกล้าข้าวโพดเช่นเดียวกันพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ ADH1 activity 50 เท่า ในการตอบสนองต่อสภาวะ anaerobiosis (Gerlach et al., 1982) นอกจากนี้เอนไซม์ ADH ยังเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนกลับของสารที่เป็นองค์ประกอบสำคัญที่ทำให้เกิดกลิ่น ได้แก่ อัลดีไฮด์ และแอลกอฮอล์ (Bicsak et al., 1982; Molina et al., 1986; Longhurst et al., 1990) และพบว่าการแสดงออกของยีน *ADH* ในปริมาณสูงในมะเขือเทศทำให้เกิดการเปลี่ยนสมดุลระหว่าง C_6 อัลดีไฮด์ และแอลกอฮอล์ในผลสุก (Speirs et al., 1998)

ยีน *ADH* ที่พบในมะเขือเทศมีอยู่ 2 ยีน คือ ยีน *ADH1* และ *ADH2* ซึ่งยีน *ADH1* อยู่บนโครโมโซมที่ 4 และพบว่ามีการแสดงออกในละอองเกสร เมล็ดแห้ง และต้นกล้าที่เจริญสมบูรณ์ แต่จะไม่ถูกชักนำเมื่อเกิดสภาวะ anaerobiosis (Tanksley, 1979) ส่วนยีน *ADH2* อยู่บนโครโมโซมที่ 6 มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการสุกในผล และถูกชักนำในต้นกล้า ราก และลำต้นเมื่อเกิดสภาวะ anaerobic (Tansksley and Jones, 1981) นอกจากนี้ยังพบว่าในผลมะเขือเทศ ยีน *ADH2* มีหน้าที่สำคัญในการสังเคราะห์สารระเหยในระหว่างการสุกของผล เมื่อเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน *ADH2* พบว่า สามารถปรับปรุงกลิ่นในผลได้ จากการเพิ่มระดับของแอลกอฮอล์ โดยเฉพาะ Z-3-hexenol (Speirs et al., 1998) ซึ่งเป็นสารระเหยหลักที่สามารถพบได้ในผลไม้ทั่วไป

ADH เป็นเอนไซม์สำคัญที่มีบทบาทต่อการสะสม hexanol และ hexenol ในระหว่างการสุกของผล (Speirs et al., 1998) และพบว่ามีการสะสมในช่วงระยะสุดท้ายในการสุก โดยมีการสะสมของสารระเหยที่เป็นองค์ประกอบของกลิ่นและรสชาติ (Chen and Chase, 1993; Longhurst et al., 1994) ในผลมะเขือเทศขณะสุกแก่ เอนไซม์ ADH มีผลกระทบต่อการปรับสมดุลของสารอัลดีไฮด์และแอลกอฮอล์ และเมื่อเพิ่มระดับกิจกรรมของเอนไซม์ ADH2 ให้สูงขึ้น พบว่ามีผลกระทบอย่างมากต่อกลิ่นและรสชาติในผล (Speirs et al., 1998) อย่างไรก็ตามสามารถเพิ่มระดับกิจกรรมของ

เอนไซม์ ADH2ได้ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ ทำให้พืชสามารถอยู่รอดได้ดีขึ้น และเมื่อมีการเพิ่มระดับกิจกรรมของเอนไซม์ ADH2 ในระหว่างการสุกของผลยังเป็นการลดความเข้มข้นของออกซิเจนภายในผลสุก (Speirs et al., 2002) ทำให้เกิดสารพวกแอลกอฮอล์เป็นปริมาณมาก ซึ่งเมื่อมีการนำแอลกอฮอล์ไปใช้ในการสังเคราะห์น้ำตาล ก็จะทำให้ผลไม้มีรสชาติที่ดีขึ้นด้วย อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีหลักฐานทางการวิจัยที่ยืนยันว่าการเพิ่มระดับของ ADH ในปริมาณสูง จะมีผลกระทบต่อลักษณะคุณภาพด้านอื่น ๆ ด้วยหรือไม่

อย่างไรก็ตาม พบว่า ยีน *ADH* มีส่วนร่วมในการสังเคราะห์กลิ่นและการแสดงออกในระหว่างการพัฒนาของพืช โดยเฉพาะช่วงระหว่างการสุกของผล (Van der Straeten et al., 1991; Speirs et al., 1998; Manriquez et al., 2006) ในองุ่นพบยีน *ADH* จำนวน 3 ยีนที่แสดงออกในระหว่างการพัฒนาของผล โดยพบว่ายีน *Vv-ADH1* และยีน *Vv-ADH3* จะมีการแสดงออกมากที่ระยะผลอ่อน ในขณะที่ยีน *Vv-ADH2* จะมีการแสดงออกมากที่ระยะเริ่มต้นการสุกของผล (Tesnière and Verriès, 2000) ในมะเขือเทศ (Picton et al., 1993) และ สาลี่ (Fonseca et al., 2004) พบว่ามี cDNAs บางส่วนที่ควบคุมการสร้าง short-chain ADHs ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสุกในผล นอกจากนี้ยังพบยีน *Cm-ADH* ที่แสดงออกเฉพาะในผลของแคนตาลูปจำนวน 2 ยีน ซึ่งควบคุมการสร้าง *ADH* ชนิด medium-chain และ short-chain (Manriquez et al., 2006) อีกด้วย

ตารางที่ 2 ประเภทของกลุ่มยีน alcohol dehydrogenase (Theodore-Chase, 1999)

Class	Characteristics, EC numbers			References
Short chain			≈ 250 residues: Frosophila ADH (EC 1.1.1.1), steroid	Jornvall et al., 1995
Medium chain	Zn-containing	Dimeric forms	≈ 375 residues: contain a second, structural (non-catalytic) Zn: house-liver alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.1), cinnamyl alcohol dehydrogenase (EC 1.1.1.195)	Jornvall et al., 1995 Persson et al., 1994
		tetrameric forms	ADH of S. cercvisiae (EC 1.1.1.1), sorbitol dehydrogenases (EC 1.1.1.14)	
	Non-Zn-containing		≈ 375 residuces: quinine reductases/β-crystallins (EC 1.6.5.5), enoyl reductases (EC	Borras et al., 1989

ตารางที่ 2 ประเภทของกลุ่มยีน alcohol dehydrogenase (Theodore-Chase, 1999) (ต่อ)

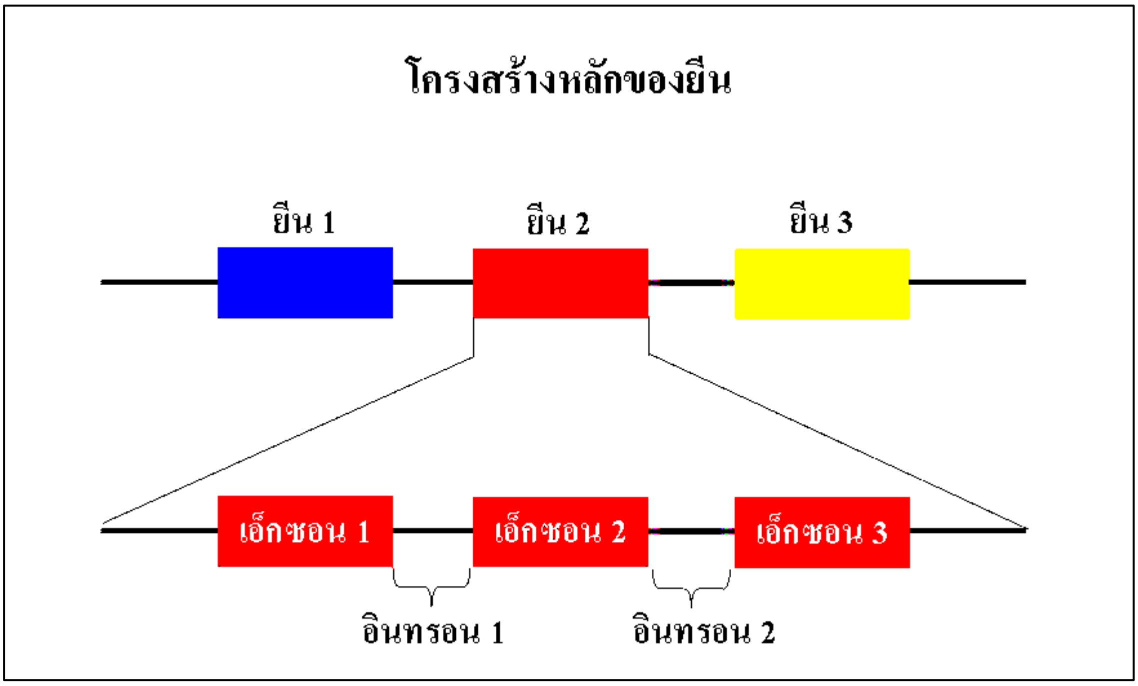
Class	Characteristics, EC numbers	References
Long chain	600-700 residues, bacterial ethanol dehydrogenases, e.g. of Acetobacter aceti; pyrroloquinoline quinine as cofactor (EC	Inoue et al., 1989
Fe-activated	1,2-propanediol dehydrogenase of E. coli (EC 1.1.1.77) ADH2 of Zymomnas mobilis (EC 1.1.1.1); ADH IV of S. cerevisiae	Sridhara et al., 1996; Scopes, 1983; Conway et al., 1987; Wiliamson and Paquin, 1987

จากงานวิจัยของห้องปฏิบัติการ Genomic and Biotechnology of Fruits (GBF) ในด้านเทคโนโลยีชีวภาพและคุณภาพของผลไม้ ภายใต้การดูแลของ Prof. Jean-Claude Pech ได้ศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของยีนชนิดใหม่ ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กลิ่นในระหว่างการสุกของพืช โดยมีจุดประสงค์หลัก คือ การศึกษา acylation ของแอลกอฮอล์โดยการเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ alcohol acyltransferase (AAT) และการศึกษาปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ alcohol dehydrogenase (ADH) ซึ่งเอนไซม์ AAT และ ADH เป็นเอนไซม์ที่สำคัญมากในการสังเคราะห์กลิ่น เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในขั้นตอนสุดท้ายและเกือบสุดท้ายในการผลิตสารระเหยซึ่งเป็นส่วนประกอบในการเกิดกลิ่นออกมา ในงานวิจัยที่ผ่านมา (Flores et al., 2002; El-Sharkawy et al., 2005; Lucchetta et al., 2007) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทและหน้าที่ของยีน *AAT* ในแคนตาลูป พบว่า เมื่อลดระดับการแสดงออกของยีน *AAT* ในแคนตาลูป ทำให้มีการสร้างสารระเหยน้อยลง ต่อมาได้เริ่มศึกษายีน *ADH* พบว่า ยีน *ADH* เป็นยีนที่มีลักษณะเป็นกลุ่มใหญ่และซับซ้อน ถึงแม้มีผู้ศึกษามากแต่ก็กระจายกันตามความสนใจของแต่ละกลุ่ม ในส่วนงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษายีน *ADH* นี้ ได้เริ่มศึกษากระบวนการสุกในแคนตาลูป โดย Manriquez et al. (2006) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของยีน *ADH* ในระหว่างการสุก และการควบคุมการแสดงออกโดยเอทธิลีนโดยพบยีน *ADH* จำนวน 2 ยีน คือ *CmADH1* และ *CmADH2* โดยที่ยีน *CmADH1* เป็นยีนที่ควบคุมการสร้าง medium chain *ADH* ที่มีลำดับเบสบางส่วนคล้ายคลึงกับ *LeADH2* ในมะเขือเทศ ในขณะที่ *CmADH2* เป็นสมาชิกของกลุ่มยีน *ADH* ที่ควบคุมการสร้าง short chain *ADH* และเร่งปฏิกิริยาแบบ oxidation-reduction โดยมีแอลกอฮอล์และอัลดีไฮด์เป็นซับสเตรท จึงนำมาเป็นต้นแบบในการศึกษา scADH ในครั้งนี้

2.13 ยีนและการแสดงออกของยีน

ยีน คือ ส่วนของโมเลกุลดีเอ็นเอบริเวณที่ทำหน้าที่เป็นรหัสสำหรับการสังเคราะห์โปรตีนเพื่อทำหน้าที่ต่าง ๆ ภายในเซลล์ ขนาดของยีนอาจเป็นไปได้ตั้งแต่เล็กมากไม่ถึง 100 คู่เบส ไปจนถึงหลาย ๆ ล้านคู่เบส สิ่งมีชีวิตไม่ว่าจะเป็นพืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์มียีนจำนวนมากมายเรียงต่อกัน เพื่อทำหน้าที่เป็นข้อมูลรหัสพันธุกรรมทั้งหมดของสิ่งมีชีวิตซึ่งเรียกว่าจีโนม

2.13.1 โครงสร้างหลักของยีน (ภาพที่ 6) เมื่อพิจารณาถึงที่ระดับดีเอ็นเอของยีนหนึ่ง ๆ จะมีลำดับเบสบางส่วนเท่านั้นที่ถูกถอดรหัสออกมาเป็นโปรตีน โดยสามารถแบ่งลำดับเบสในยีนได้เป็น 2 ส่วนหลัก ๆ คือ เอ็กซอน หมายถึง ลำดับเบสบนโมเลกุลดีเอ็นเอที่สามารถถอดรหัสเป็น mRNA ได้ และ อินทรอน หมายถึง ลำดับเบสที่ไม่สามารถถอดรหัสเป็นโปรตีนได้ (noncoding sequence) ซึ่งแทรกอยู่ระหว่างเอ็กซอน (สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย, 2548)



ภาพที่ 6 โครงสร้างหลักของยีน (สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย, 2548)

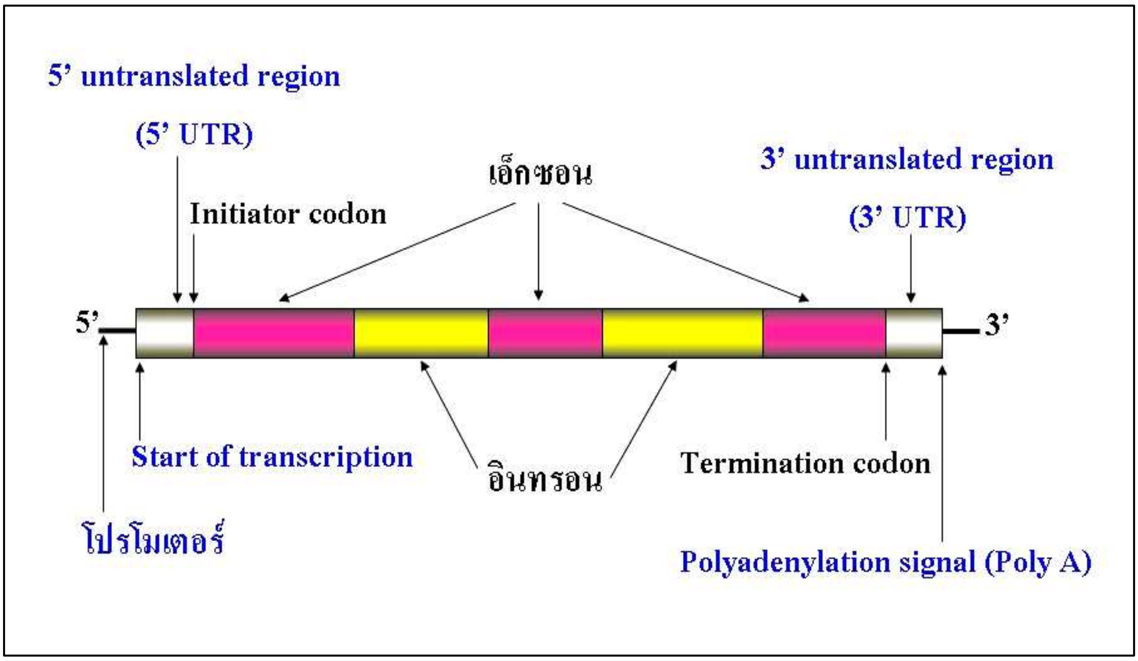
2.13.2 โครงสร้างที่เป็นองค์ประกอบอื่นของยีน (ภาพที่ 7) นอกจากเอ็กซอนและอินทรอนแล้ว ยีนยังมีโครงสร้างอื่นที่ร่วมกันทำหน้าที่ต่าง ๆ ที่ระดับโมเลกุล โดยที่โครงสร้างเหล่านี้อาจไม่ได้อยู่ในลำดับเบสของตัวยีนนั้น ๆ แต่อาจจะเป็นลำดับเบสที่อยู่ไกลออกไปมาก ๆ ก็ได้ ได้แก่

โปรโมเตอร์ อยู่ที่ด้าน 5’ ของยีน จะเป็นบริเวณที่มีเอนไซม์อาร์เอ็นเอโพลีเมอเรส (RNA polymerase) เข้ามาจับเพื่อเริ่มต้นการสร้าง mRNA

Upstream element เป็นส่วนของดีเอ็นเอที่ด้าน 5’ ของโปรโมเตอร์ มีส่วนสำคัญสำหรับการจับตัวของโปรตีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของยีนหรือควบคุมการกระตุ้นและยับยั้งการสร้าง mRNA จากยีนนั้น

Enhancer และ silencer ทำหน้าที่คล้าย upstream element โดย enhancer จะกระตุ้นการทำงานของยีน ในขณะที่ silencer จะยับยั้งการทำงาน ทั้งสองส่วนนี้จะควบคุมการทำงานของยีนได้โดยไม่ขึ้นกับทิศทางและตำแหน่ง

เทอร์มิเนเตอร์ ทำหน้าที่กำหนดบริเวณสิ้นสุดการถอดรหัส (สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย, 2548)



ภาพที่ 7 โครงสร้างที่เป็นองค์ประกอบอื่นของยีน (สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย, 2548)

2.13.3 องค์ประกอบของยีน แม้ว่าสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันจะมีจำนวนโครโมโซม และลักษณะประจำตัวแตกต่างกัน แต่เมื่อพิจารณาถึงองค์ประกอบที่เล็กที่สุดที่รวมตัวกันเป็นยีนแล้ว จะพบว่ายีนทุกยีนมีองค์ประกอบเป็นโมเลกุลขนาดเล็กที่เรียกว่า นิวคลีโอไทด์หลาย ๆ โมเลกุลมาเรียงต่อกันได้เป็นสารประกอบที่เรียกว่า กรดนิวคลีอิค ยีนแต่ละยีนประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวนแตกต่างกัน นิวคลีโอไทด์ที่เรียงตัวต่อกันเป็นยีน ทำหน้าที่เป็นรหัสในการสังเคราะห์โปรตีนขึ้นภายในเซลล์ โปรตีนที่เซลล์สร้างขึ้นจะเป็นสารประกอบ หรือสารเคมีที่สำคัญต่อการดำเนินกิจกรรมต่าง ๆ ภาย ในเซลล์ เพื่อการเจริญเติบโต และการดำรงอยู่ของสิ่งมีชีวิต มนุษย์ พืช และสัตว์ เนื่องจากองค์ ประกอบทางเคมีของยีน คือ นิวคลีโอไทด์ที่มาเรียงต่อกัน ถ้าสกัดยีนของสิ่งมีชีวิตทุก

ชนิดออกมาจากเซลล์ แล้วนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบก็จะพบว่าเป็นสารเคมีประเภทเดียวกันที่มาเกาะกันเป็นโมเลกุลของนิวคลีโอไทด์ ความแตกต่างของยีนแต่ละยีนจึงอยู่ที่ชนิดของไนโตรเจนเบสบนนิวคลี-โอไทด์ และการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเมื่อเซลล์มีการถอดรหัส และแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนเรียงต่อกัน จะเกิดการสังเคราะห์โปรตีนที่มีรูปร่าง ขนาด และหน้าที่ต่างกันมากมายเกิดขึ้นอยู่ในเซลล์ และเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเกิดกิจกรรมต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต (สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย, 2548)

2.13.4 การแสดงออกของยีน รหัสข้อมูลของยีนที่กำหนดการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 3 โมเลกุลที่เรียงต่อกัน เซลล์จะถอดรหัส และแปลรหัสนิวคลีโอไทด์ 3 โมเลกุลนี้เป็นกรดอะมิโน กรดอะมิโนหลาย ๆ โมเลกุลเรียงตัวต่อกันเป็นโปรตีน ดังนั้นจำนวนกรดอะมิโนที่เกาะต่อกันเป็นโปรตีนจึงมีสัดส่วนเป็น 1 ใน 3 ของจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่เป็นองค์ประกอบของยีน เซลล์จะสังเคราะห์โปรตีนแต่ละชนิดในช่วงเวลา และปริมาณที่แตกต่างกันไป โดยมีชุดของดีเอ็นเอควบคุมการสังเคราะห์ได้อย่างมีระบบ ชุดดีเอ็นเอควบคุมจะประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์หลายโมเลกุลเรียงตัวอยู่ในบริเวณที่ขนาบ 2 ข้างของยีน ซึ่งได้แก่ โปร โมเตอร์ทำหน้าที่กำหนดบริเวณที่จะเริ่มถอดรหัส และแปลรหัส ส่วนเทอร์มิเนเตอร์ทำหน้าที่กำ หนดบริเวณสิ้นสุดการถอดรหัส ยีนที่มีองค์ประกอบครบสมบูรณ์สำหรับการสังเคราะห์โปรตีนจึงต้องประกอบด้วย โปรโมเตอร์-รหัสโปรตีน-เทอร์มิเนเตอร์ เรียงตามลำดับ การถอดรหัสและแปลรหัสของยีน เรียกว่า การแสดงออกของยีน ซึ่งทำให้เซลล์มีการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอส่งข่าว และโปรตีนขึ้น (สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย, 2548)

2.13.5 การควบคุมการแสดงออกของยีน

การควบคุมการแสดงออกของยีน เป็นการถ่ายทอดข้อความทางชีวภาพหรือข้อความทางพันธุกรรมที่บรรจุอยู่ในดีเอ็นเอไปยัง mRNA แล้วจึงแปลรหัสไปเป็นโปรตีน ในเซลล์ร่างกายของสิ่งมีชีวิตทุกเซลล์มีข้อมูลทางพันธุกรรมหรือยีนเหมือนกัน แต่ในระหว่างการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนสภาพ แต่ละเซลล์มีกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนเหล่านี้ต่างเวลาหรือต่างวาระกัน การควบคุมการแสดงออกของยีนอาจแบ่งเป็น 2 ช่วงคือ ช่วงระหว่างกระบวนการถอดรหัสพันธุกรรม โดยเป็นการควบคุมการสังเคราะห์ mRNA ซึ่งลำดับเบสที่อยู่บนสาย mRNA ถูกกำหนดโดยลำดับของเบสในสายแม่พิมพ์ ดีเอ็นเอ และช่วงระหว่างกระบวนการแปลรหัสพันธุกรรมมาเป็นโพลีเปปไทด์ หรือโปรตีนโดยเป็นการสังเคราะห์ โพลีเปปไทด์ หรือการสร้างโปรตีน (Nelson and Cox, 2000)

การแสดงออกของยีนตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งได้ผลผลิตของยีนที่ทำหน้าที่ได้ ได้แก่ โปรตีน tRNA หรือ rRNA ควบคุมและสั่งการโดยข่าวสารพันธุกรรมที่เก็บอยู่ในสารพันธุกรรม ซึ่งมักจะเป็น DNA ยกเว้นไวรัสบางตัวที่สารพันธุกรรมเป็น RNA การส่งผ่านข่าวสารพันธุกรรมจะเรียกว่า เป็น

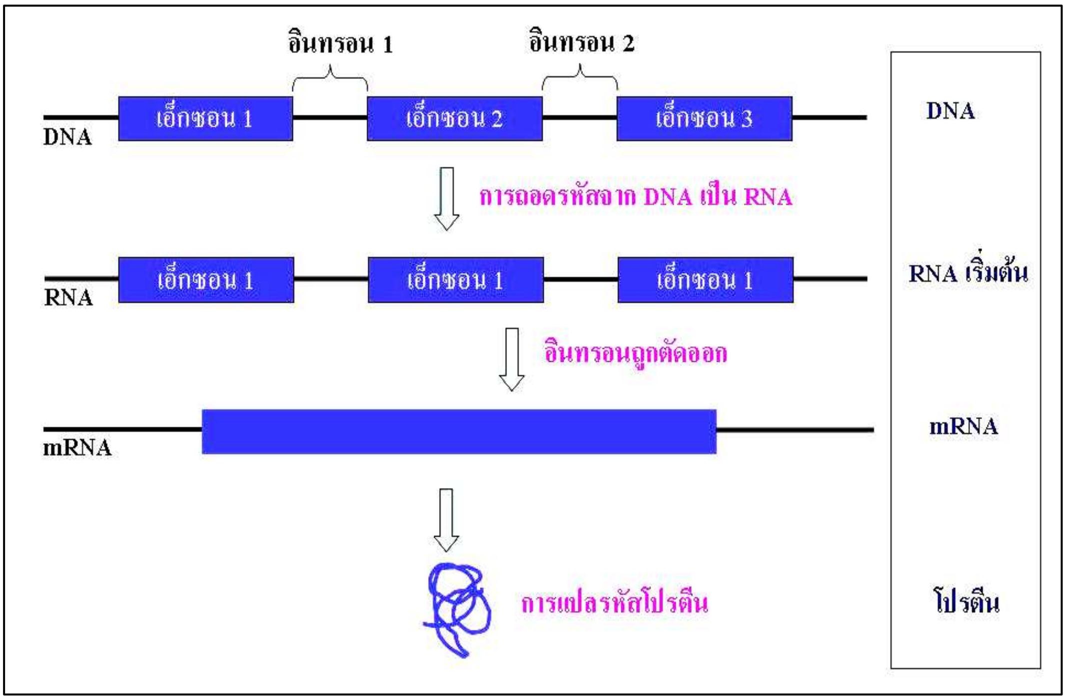
central dogma ซึ่งกำหนดว่าการส่งผ่านข่าวสารพันธุกรรมจะส่งผ่าน DNA ไปสู่ RNA และสร้างโปรตีน (สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย, 2548)

สิ่งมีชีวิตแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ขึ้นกับว่าเซลล์มีนิวเคลียสหรือไม่ กลุ่มที่ไม่มีนิวเคลียสเรียกว่า โปรคาริโอต ได้แก่ แบคทีเรีย และ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (blue green algae) อีกกลุ่มหนึ่งเป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียส เรียกว่า ยูคาริโอต ได้แก่ เซลล์ของสัตว์ พืช ยีสต์ และรา เป็นต้น ในเซลล์โปรคาริโอต โปรตีนที่เกี่ยวข้องในขบวนการ metabolism จะอยู่เป็น operon และถูกจำลองแบบสร้างเป็น mRNA ที่มียีนหลายยีน (polycistronic mRNA) อยู่ด้วยกัน และเมื่อมีการแปลรหัสที่อยู่บน mRNA ทำให้ได้โปรตีนหรือเอนไซม์หลายชนิด ความแตกต่างในการเรียงลำดับเบสในสาย DNA ทำให้สิ่งมีชีวิตต่างกัน และทำให้สิ่งมีชีวิตตอบสนอง และมีชีวิตในสิ่งแวดล้อมที่ต่างกันได้ กระบวนการควบคุมการแสดงออกของยีนในยูคาริโอต จะซับซ้อนกว่าที่พบในโปรคาริโอต ในเซลล์โปรคาริโอตการเปิดปิดกระบวนการถอดรหัสพันธุกรรมจะเป็นกลไกสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีน แม้ว่ากลไกอื่น ๆ เช่น การหยุดถอดรหัสพันธุกรรม การควบคุมการแปลรหัสพันธุกรรม และการสลาย mRNA และโปรตีน จะมีส่วนสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีน ในยูคาริโอตจะมีการควบคุมการแสดงออกของยีนคล้ายคลึงกับที่กล่าวมาแล้ว และในปัจจุบันยังพบว่ายีนหลายชนิดของยูคาริโอตมีการควบคุมในระดับของการดัดแปลง RNA ด้วย (สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย, 2548)

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการทำงานหรือการแสดงออกของยีน ได้แก่

โปรโมเตอร์ โปรโมเตอร์ทำหน้าที่ควบคุมการถอดรหัส และแปลรหัสของยีน และค่อนข้างมีความจำเพาะเจาะจงกับเซลล์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด การใช้โปรโมเตอร์ที่ไม่เหมาะสมกับชนิดของเซลล์ จะยับยั้งการแสดงออกของยีน และเซลล์ไม่สามารถผลิตสารหรือโปรตีนได้ตามต้องการ

ตำแหน่งของการสอดแทรกยีน ในการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ของสิ่งมีชีวิตเพื่อดัดแปลงพันธุกรรม หากเกิดการสอดแทรกยีนจากภายนอกเข้าเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอบนโครโมโซมตรงบริเวณที่ไม่เหมาะสม อาจทำให้ยีนนั้น ๆ ไม่มีการแสดงออก หรืออาจมีผลเสียต่อการแสดงออกของยีนเดิมบนโครโมโซมด้วย (สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย, 2548)



ภาพที่ 8 กระบวนการแสดงออกของยีนเริ่มต้นจนได้โปรตีน (สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย, 2548)

2.13.6 การควบคุมการแสดงออกของยีนโดย RNA interference (RNAi)

กระบวนการ RNA interference (RNAi) เป็นกระบวนการในการควบคุมการแสดงออกของยีนและใช้ในการศึกษาหน้าที่ต่าง ๆ ของยีนได้ โดยในกลไก RNAi นี้ จะใช้โมเลกุลของ small noncoding double-stranded RNA ในการยับยั้งการแสดงออกของยีนผ่านกลไกการทำงาน 2 รูปแบบ คือ การทำลาย mRNA หรืออาจเป็นการยับยั้งการแปลรหัสของ mRNA นั้น ๆ ซึ่งทั้ง 2 รูปแบบจะทำให้ mRNA ไม่สามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนต่อไปได้

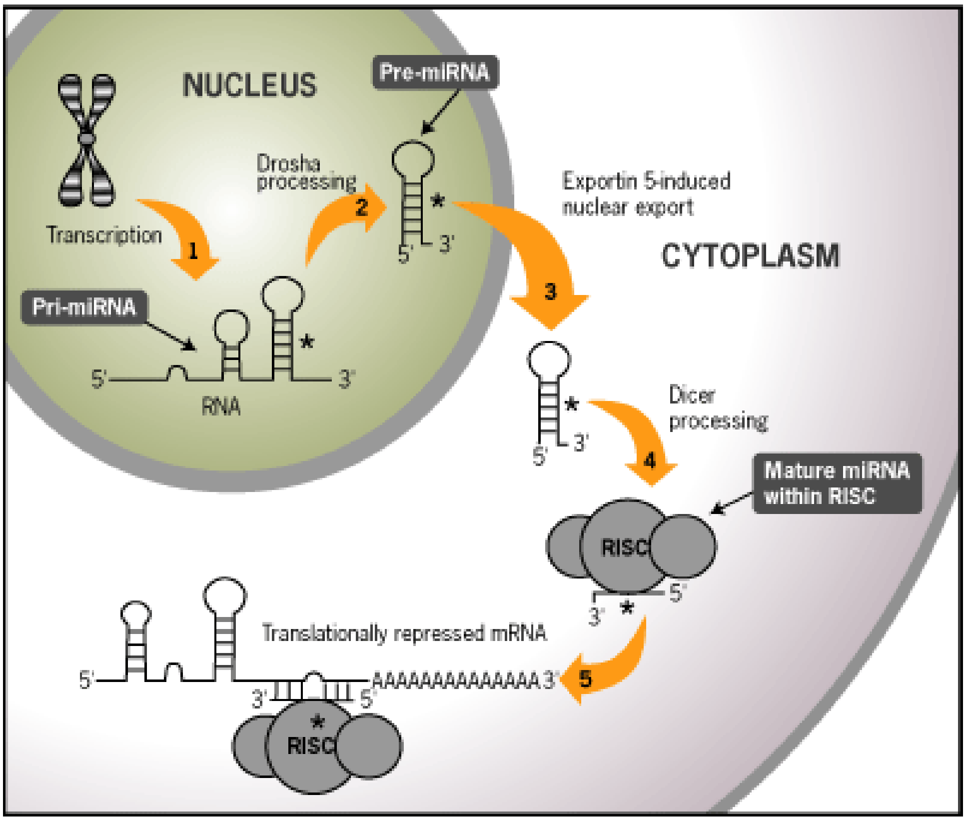
2.13.6.1 กลไกการทำงานของ RNA interference

กลไกการทำงานของ RNA interference ที่สำคัญที่ใช้ในการควบคุมการแสดงออกของยีนในยูคาริโอตมี 2 รูปแบบ คือ microRNAs (miRNAs) และ small interfering RNAs (siRNAs) ซึ่งทั้ง 2 กลไกนั้น มีรูปแบบการทำงานดังนี้

1. miRNA pathway (ภาพที่ 9)

miRNA มีกลไกการทำงานเริ่มต้นที่นิวเคลียสของเซลล์ โดยจะอยู่ในรูปของ primary miRNA (pri-miRNA) ในลักษณะโครงสร้างแบบ hairpin โดย pri-miRNA นั้นสร้างมาจาก genome จากการเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ RNA Polymerase II ต่อมา dsRNA-specific ribonuclease

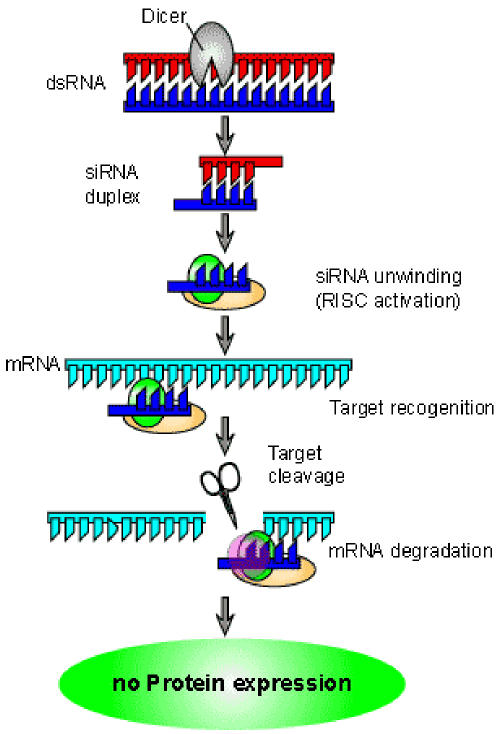
ที่ชื่อว่า Drosha จะทำหน้าที่ตัด primiRNA ให้เป็น precursor miRNA (pre-miRNA) โดย pre-miRNA นั้นจะมีความยาวประมาณ 70 เบส และจะมี 1-4 เบส อยู่ตรงด้านปลาย 3’ ที่ยื่นออกมา และประมาณ 25-30 เบส เป็นส่วนของก้าน hairpin ส่วนเบสที่เหลือนั้นเป็นส่วนของ loop เล็กๆ หลังจากนั้น pre-miRNA จะถูกปล่อยจากนิวเคลียสเข้าสู่ไซโทพลาสซึมโดยการทำงานของ exportin-5 ต่อมาเอนไซม์ Dicer ซึ่งเป็นเอนไซม์ใน RNase III superfamily ที่อยู่ในไซโทพลาสซึมของเซลล์จะทำหน้าที่ตัด pre-miRNA ทำให้ได้ double-stranded RNA ขนาดสั้น ๆ ประมาณ 19 คู่เบส โดยยังมีเบสประมาณ 1-4 เบส อยู่ตรงด้านปลาย 3’ ที่ยื่นออกมาติดอยู่ด้วย ต่อมา double-stranded RNA ขนาดสั้น ๆ นี้จะแยกสาย sense และantisense ออกจากกัน และส่วนของ antisense strand ของ miRNA ก็จะเข้าจับกับ RNA-inducing silencing complex (RISC) ซึ่งเป็น multi-protein complex ได้เป็น RISC-associated miRNA complex ซึ่ง RISC จะพา miRNA ไปจับกับ mRNA เป้าหมาย แล้วทำการยับยั้งการแปลรหัสของ mRNA ทำให้เกิดกระบวนการยับยั้งการแสดงออกของยีนต่อไป (ศูนย์ข้อมูลโรคติดเชื้ออุบัติใหม่, 2549)



ภาพที่ 9 miRNA pathway (ศูนย์ข้อมูลโรคติดเชื้ออุบัติใหม่, 2549)

2. siRNA pathway (ภาพที่ 10)

siRNA มีกลไกการทำงาน โดยเริ่มจากการที่นำ double-stranded RNA (dsRNA) เข้าสู่เซลล์ต่อจากนั้น เอนไซม์ Dicer จะมาตัด dsRNA ทำให้ได้ dsRNA สายสั้น ๆ ประมาณ 21-23 คู่เบสโดยมีเบสประมาณ 2 เบสอยู่ตรงส่วนปลาย 3’ ที่ยื่นออกมา เรียกส่วนนี้ว่า siRNA ต่อมา siRNA จะแยกสาย sense และ antisense ออกจากกัน ต่อจากนั้น antisense strand ของ siRNA ก็จะเข้าจับกับ RISC ได้เป็น RISC-associated siRNA complex ซึ่ง RISC จะพา siRNA ไปจับกับ mRNA เป้าหมาย แล้วจะทำลาย mRNA เป้าหมายนั้น ทำให้ไม่เกิดการแปลรหัสเป็นโปรตีนได้ เกิดการแสดงออกของยีนนั้น ๆ ขึ้น (ศูนย์ข้อมูลโรคติดเชื้ออุบัติใหม่, 2549)



ภาพที่ 10 siRNA pathway (ศูนย์ข้อมูลโรคติดเชื้ออุบัติใหม่, 2549)

2.13.6.2 การสร้างโมเลกุล RNA interference

โมเลกุล RNAi สามารถสร้างได้ใน 2 รูปแบบ คือ แบบสังเคราะห์ทางเคมีโดยตรง (direct chemical synthesis) และแบบการใช้ RNA polymerase promoter เป็นตัวทำให้เกิดการลอกรหัสพันธุกรรม และเกิดเป็นโมเลกุล RNAi ขึ้น (vector-based expression) โดยวิธีที่นิยมใช้กัน คือ แบบ vector-based ซึ่งเป็นวิธีที่ทำได้รวดเร็ว มีค่าใช้จ่ายน้อยกว่า และยังสามารถสร้างขึ้นใหม่ได้ตลอดเวลา การใช้โมเลกุล RNAi แบบสังเคราะห์ทางเคมีโดยตรงนั้นจะทำให้โมเลกุล RNAi

สามารถอยู่ภายในเซลล์ได้เพียงช่วงเวลาหนึ่งเท่านั้น แต่ถ้าสร้างโมเลกุล RNAi แบบ vector-based จะทำให้สามารถสร้างโมเลกุล RNAi ในเซลล์ได้ในระยะเวลาที่ยาวนานกว่า นอกจากนี้วิธีการสร้างแบบ vector-based นั้น จะทำให้เราสามารถแยกเซลล์ที่ได้รับโมเลกุล RNAi กับเซลล์ที่ไม่ได้รับโมเลกุล RNAi ออกจากกันได้ โดยใช้คุณสมบัติของ vector ในการต้านทานสารปฏิชีวนะมาช่วยในการคัดแยกเซลล์ได้ ซึ่งทำให้การทดลองเกี่ยวกับกลไก RNAi มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้นและน่าเชื่อถือมากขึ้น (ศูนย์ข้อมูลโรคติดเชื้ออุบัติใหม่, 2549)

2.13.6.3 การนำเทคโนโลยี RNAi ไปใช้ในพืช

การนำเทคโนโลยี RNAi ไปใช้ในพืช ส่วนใหญ่แล้วจะมุ่งเน้นการนำ RNAi ไปเป็นเครื่องมือในการยับยั้งการแสดงออกของยีนเป้าหมายที่จำเพาะ หรือตำแหน่ง promoters ของยีนนั้นเพื่อปรับปรุงพันธุ์พืชให้ได้ลักษณะใหม่ ๆ ที่ต้องการซึ่งสามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกได้ การสร้าง dsRNA ในพืชมีหลายวิธี เช่น การสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ผลิต sense RNA และพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ผลิต antisense RNA แยกต้นกัน แล้วนำทั้ง 2 ต้นมาผสมข้ามกัน ทำให้เกิดต้นพืชที่ผลิต dsRNA พบว่า ต้นพืชที่ผลิต dsRNA มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีนได้ดีกว่าต้นที่ผลิตเพียง sense หรือ anti-sense RNA เพียงอย่างเดียว (Wang et al., 2001) นอกจากนี้อาจทำได้ด้วยวิธี hpRNA โดยการสร้างลำดับทั้ง sense และ antisense RNA ให้อยู่ใน promoter เดียวกัน โดยมี intron คั่นกลางระหว่างลำดับ sense และ antisense หลังผ่านกระบวนการถอดรหัส ลำดับเบสเหล่านี้จะสร้างเป็น hpRNA หลังจากผ่านกระบวนการถอดรหัส ซึ่งวิธีการใหม่นี้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีนในพืชได้ดีกว่า dsRNA โดยจะให้ผล 80-100% (Mallory et al., 2001) ดังนั้นจึงมีการนำวิธี hpRNA มาใช้กันอย่างแพร่หลาย (ศูนย์ข้อมูลโรคติดเชื้ออุบัติใหม่, 2549)

2.13.7 การโคลนยีน (gene cloning) คือ การเคลื่อนย้ายชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งเข้าไปยังสารพันธุกรรมที่สามารถจำลองตัวเองได้ (self-replicating genetic element) เช่น พลาสมิดของแบคทีเรีย แล้วชิ้นส่วนดีเอ็นเอนั้นก็จะสามารถเพิ่มปริมาณไปกับเซลล์เจ้าบ้านได้ การสร้างดีเอ็นเอสายผสมทำได้โดยการตัดหรือแยกยีนที่ต้องการศึกษา นำมาเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะหรือเวคเตอร์ของดีเอ็นเอจนมีปริมาณมากพอตามความต้องการในการนำไปใช้ในงานอื่น ๆ ต่อไป เช่น การหาลำดับเบส การศึกษาการควบคุมการแสดงออก และหน้าที่ของยีน และของโปรตีนในเซลล์ การฝากยีนลงในสิ่งมีชีวิตอื่นเพื่อให้มีการผลิตสารหรือแสดงลักษณะบางประการ (สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย, 2548)

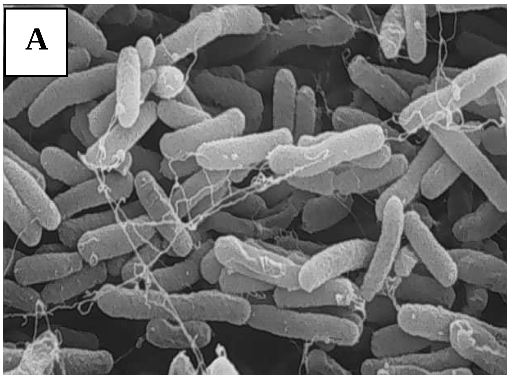
2.13.7.1 องค์ประกอบของการโคลนยีน ได้แก่

1. เอนไซม์ที่ใช้ในการโคลนยีน มี 2 ประเภท คือ เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) เป็นเอนไซม์ที่แบคทีเรียมีไว้สำหรับทำลายดีเอ็นเอแปลกปลอมจากไวรัสของแบคทีเรียไม่ให้เข้าสู่เซลล์ และเอนไซม์ดีเอ็นเอไลเกส (DNA ligase) เป็นเอนไซม์ที่ใช้เชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

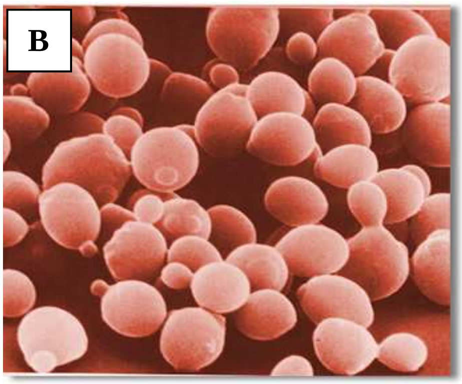
2. เวคเตอร์ เป็นดีเอ็นเอที่ใช้ในการสอดใส่ยีนหรือดีเอ็นเอที่สนใจก่อนที่จะนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านเพื่อให้ดีเอ็นเอที่แทรกในเวคเตอร์สามารถเพิ่มจำนวนไปพร้อม ๆ กัน ดีเอ็นเอเวคเตอร์มีด้วยกันหลายชนิด มีคุณสมบัติและการใช้งานที่แตกต่างกันออกไป ตัวอย่างเช่น พลาสมิด ฝาจชนิดแลมป์ดา (λ phage) และคอสมิด

3. ดีเอ็นเอที่ต้องการโคลน ดีเอ็นเอที่นำมาใช้ในการโคลนยีนมีที่มาจาก 3 แหล่ง ได้แก่ แหล่งที่หนึ่งดีเอ็นเอที่แยกมาจากเซลล์สัตว์หรือพืช ซึ่งเป็นดีเอ็นเอทั้งหมดในจีโนมของสิ่งมีชีวิตนั้น (genomic DNA) แหล่งที่สองดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นมาจาก mRNA ที่เรียกว่า comple menttary DNA ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่ได้จากยีนที่แสดงออกในเนื้อเยื่อหนึ่งในช่วงเวลาหนึ่งของชีวิต และแหล่งที่สามดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี หรือ ดีเอ็นเอจากผลผลิตพีซีอาร์ (สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย, 2548)

4. เซลล์เจ้าบ้าน หมายถึง เซลล์ที่ทำหน้าที่เป็นผู้รับดีเอ็นเอสายผสมที่เกิดจากการเชื่อมต่อกันของเวคเตอร์ กับดีเอ็นเอที่สนใจ เซลล์เจ้าบ้านมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอสายผสมที่ใส่อยู่ภายในเซลล์แบคทีเรีย เพราะเมื่อเซลล์เจ้าบ้านเกิดการแบ่งตัว ดีเอ็นเอก็จะมีการสังเคราะห์ และเพิ่มปริมาณตามการแบ่งตัวของเซลล์เจ้าบ้านด้วย เซลล์เจ้าบ้านที่มีดีเอ็นเอสายผสมเหมือน ๆ กัน เรียกว่า โคลน ซึ่งสามารถนำมาเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังกล่าวได้อย่างไม่มีขีดจำกัด เซลล์เจ้าบ้านมีด้วยกันหลายชนิด ได้แก่ เซลล์แบคทีเรีย เซลล์ยีสต์ (ภาพที่ 11) ชนิดของเซลล์เจ้าบ้านที่นำมาใช้ในการโคลนยีนขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอที่ต้องการโคลน และชนิดของเซลล์ที่ยีนนั้น ๆ จะสามารถแสดงออกได้ (สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย, 2548)



เซลล์แบคทีเรีย



เซลล์ยีสต์

ภาพที่ 11 เซลล์เจ้าบ้านที่นิยมใช้ในการโคลนยีน (สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย, 2548)
A = เซลล์แบคทีเรีย, B =เซลล์ยีสต์

2.13.7.2 วิธีการนำเวคเตอร์ลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

หลังจากที่ได้ทำการเชื่อมดีเอ็นเอที่สนใจเข้ากับเวคเตอร์จนได้เป็นพลาสมิดลูกผสม ขั้นตอนต่อไป คือ การนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของเวคเตอร์ที่ใช้ การนำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านมีวิธีการ และประสิทธิภาพที่แตกต่างกัน การเลือกใช้วิธีใดจะต้องคำนึงถึงข้อดีและข้อเสียของแต่ละวิธี ชนิดของเวคเตอร์ และเซลล์เจ้าบ้านที่เลือกใช้เพื่อทำให้การถ่ายโอนดีเอ็นเอมีประสิทธิภาพ และทำได้ง่าย ได้แก่

1. ทรานส์ฟอร์มเมชั่น (transformation) เป็นวิธีที่ทำให้เกิดรูขึ้นชั่วคราวบนเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) และนำดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ด้วยการเปลี่ยนอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว

2. ทรานส์ดักชั่น (transduction) ใช้กับ λ phage และคอสมิด โดยจะมีขบวนการบรรจุดีเอ็นเอเข้าโปรตีนห่อหุ้มของ phage ก่อน เรียกว่า invitro packaging เพื่อสร้างอนุภาค phage ที่สมบูรณ์แล้วจึงนำเข้าสู่เซลล์โดยวิธีการบุกรุกเหมือน phage ทั่วไป

3. อิเล็คโตรพอเรชั่น (electroporation) วิธีนี้จะทำโดยการใช้กระแสไฟฟ้าทำให้เกิดรูขึ้นชั่วคราวที่ผนังเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อให้ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ได้ ขนาดของกระแสไฟฟ้า และระยะเวลาที่ใช้มีผลต่อประสิทธิภาพในการทำ กระแสไฟฟ้าที่ใช้มี 2 ระบบ คือ ระบบที่ใช้ความแรงของกระแสไฟฟ้าต่ำ ระยะเวลานาน และระบบที่ใช้ความแรงของกระแสไฟฟ้าสูง ระยะเวลาสั้น (สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย, 2548)

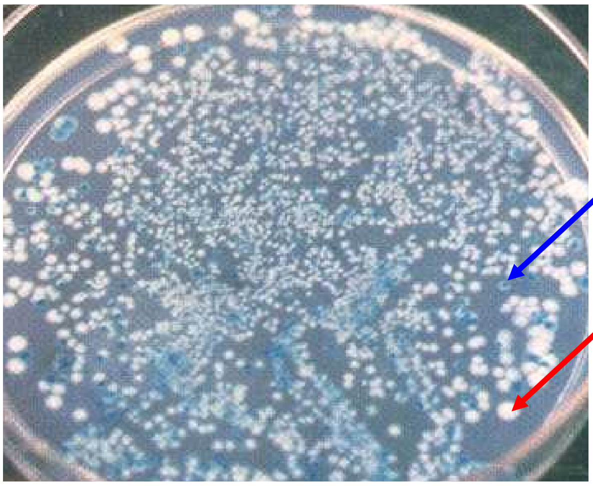
2.13.7.3 การตรวจโคลนที่ต้องการ

การตรวจสอบหาโคลนที่ได้รับดีเอ็นเอลูกผสม และมีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน สามารถทำได้หลายวิธีขึ้นกับเวคเตอร์ที่ใช้และที่มาของโคลน ได้แก่

1. คัดเลือกจากฟีโนไทป์ (phenotypic selection)

วิธีนี้จะใช้ในกรณีที่เซลล์เจ้าบ้านได้รับพลาสมิดลูกผสมเข้าไป แล้วมีการเปลี่ยนแปลงทางฟีโนไทป์ และปรากฏลักษณะที่ต่างไปจากเดิม เช่น กรณีของพลาสมิด pGEM-T จะมีส่วนของยีนแลคซี (*lacZ*) ซึ่งกำหนดการสังเคราะห์เอนไซม์เบต้ากาแล็คโตไซเดส (β-galactosidase) ตำแหน่งที่ใช้ในการสอดใส่ดีเอ็นเอที่สนใจอยู่ภายในยีนนี้ ดังนั้นเมื่อมีการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเข้าไปภายในยีนจะทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์เบต้ากาแล็คโตไซเดสได้ เมื่อนำพลาสมิดลูกผสมมาถ่ายโอนเข้าเซลล์เจ้าบ้าน แล้วเลี้ยงในอาหารที่ใส่ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินและสารเหนี่ยวนำให้มีการสร้างเอนไซม์เบต้ากาแล็คโตไซเดสพร้อมกับสาร X-gal ซึ่งเป็นซับสเตรตของเอนไซม์นี้ลงไปด้วย เซลล์ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมเท่านั้นที่จะสามารถเจริญเติบโตได้ สีของโคโลนีที่เปลี่ยนเป็นตัวบ่งชี้ว่ามีการสร้างเอนไซม์เบต้ากาแล็คโตไซเดส และพลาสมิดมีดีเอ็นเอที่สนใจสอดแทรกอยู่หรือไม่ กล่าวคือ แบคทีเรีย *E. coli* ที่ได้รับพลาสมิดลูกผสมจะไม่สามารถผลิตเอนไซม์เบต้ากาแล็คโตไซเดส ทำให้สาร X-gal ไม่ถูกย่อย โคโลนีจึงมีสีขาว แต่แบคทีเรีย *E. coli* ที่ได้รับเฉพาะพลาสมิด

เปล่า ๆ จะยังคงสามารถผลิตเอนไซม์เบต้ากาแล็คโตไซเดส จึงสามารถย่อย X-gal ได้ โคโลนีจึงเปลี่ยนเป็นสีฟ้า (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 สีโคโลนีของแบคทีเรีย *E. coli* ที่ได้รับและไม่ได้รับ recombinant DNA เมื่อใช้พลาสมิดที่มี *lacZ* ในการโคลนยีน (สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย, 2548)

2. การตรวจโดยวิธีทางอิมมูโนเคมี (immunochemical screening)

การคัดเลือกโคโลนีโดยวิธีนี้ทำได้เมื่อโคลนที่ต้องการมีการแสดงออกของฟีโนไทป์ไม่เด่นชัด จึงต้องอาศัยแอนติบอดีต่อโปรตีนที่ต้องการเป็นตัวตรวจสอบ โดยดูผลบวกจากการจับกันของแอนติบอดีกับโปรตีน

3. การตรวจโดยวิธีนิวคลีอิคแอซิดไฮบริไดเซชั่น (nucleic acid hybridization)

วิธีนี้เป็นการตรวจที่ใช้กับโคลนที่ไม่แสดงลักษณะใด ๆ โดยใช้ DNA probe หรือ RNA probe ซึ่งมีเบสคู่สมกับส่วนใดส่วนหนึ่งของสายดีเอ็นเอที่เราสนใจไปจับกับดีเอ็นเอภายในโคลน (hybridization) และตรวจสอบผลบวกจากการจับกันของดีเอ็นเอทั้งสองสาย (สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย, 2548)

2.13.7.4 การวิเคราะห์และตรวจสอบดีเอ็นเอที่โคลนได้

เป็นการตรวจสอบว่าดีเอ็นเอที่โคลนได้นั้นมีความถูกต้องตามที่ต้องการหรือไม่เป็นชิ้นส่วนที่สมบูรณ์และทำงานได้หรือไม่ โดยในขั้นตอนนี้จะมีการสกัดแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการวิเคราะห์ให้บริสุทธิ์ก่อน แล้วจึงดำเนินการตรวจสอบภายในขั้นตอนและวิธีการต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

1. การตรวจสอบลักษณะทั่วไปของชิ้นดีเอ็นเอ

เป็นการเปรียบเทียบหาขนาดของดีเอ็นเอที่สอดแทรกอยู่ในเวคเตอร์ โดยทำให้โมเลกุลของ recombinant DNA เป็นเส้นตรงก่อนโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แล้วจึงอิเล็คโตรโฟรีซีส เปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอที่ทราบขนาดแล้ว เพื่อใช้ในการหาขนาดของดีเอ็นเอที่สอดแทรกในเวคเตอร์ ซึ่งจะหาได้จากขนาดที่หาได้ครั้งใหม่ลบด้วยขนาดของเวคเตอร์ที่ใช้

2. การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing)

การหาลำดับเบสเพื่อตรวจวิเคราะห์ผลจากการโคลน เป็นวิธีที่อาศัยการตรวจสอบลำดับเบสโดยตรงว่ามีการเรียงต่อกันระหว่างลำดับเบสของเวคเตอร์กับลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการโคลนหรือไม่ ซึ่งถ้ามีการเชื่อมต่อกันของลำดับเบสทั้งสองจะแสดงว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการโคลนมีการเชื่อมต่อกับเวคเตอร์จริง และนอกจากนี้การหาลำดับเบสยังสามารถบอกได้ด้วยว่าทิศทางของดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกันนั้นถูกต้องหรือไม่ มีการขาดหาย หรือมีส่วนที่ผิดพลาดของลำดับเบสบนชิ้นดีเอ็นเอที่ใส่ไปหรือไม่ สำหรับการหาลำดับเบสในปัจจุบันสามารถทำได้ง่าย โดยอาศัยเครื่องมือซึ่งสามารถหาลำดับเบสได้อัตโนมัติที่เรียกว่า automated sequencer ผลที่ได้จากการตรวจสอบโดยวิธีนี้ เป็นวิธีที่ให้ความแม่นยำสูง แต่มีข้อจำกัดที่ต้องมีค่าใช้จ่ายสูง และเครื่องมือมีราคาแพง (สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย, 2548)

2.13.8 การถ่ายยีนเข้าสู่พืชเป้าหมาย

การถ่ายยีนเข้าพืชเป็นการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) เพื่อนำยีนของพืช หรือสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น เช่น เชื้อรา หรือแบคทีเรีย เข้าไปยังพืชที่ตั้งใจปรับปรุงพันธุ์ เมื่อเพาะเลี้ยงจนได้ต้นแล้ว เรียกพืชนี้ว่า พืชดัดแปลงพันธุ์ หรือพืชดัดแปลงพันธุกรรม (transgenic plant) ที่เรียกกันสั้น ๆ ว่า พืชจีเอ็ม (genetically modified plant [GM plant]) พืชชนิดนี้มียีนแปลกปลอมอยู่ในตัว การปรับปรุงพันธุ์พืชวิธีนี้ เรียกว่า transgenic breeding ซึ่งไม่ได้ผ่านกระบวนการผสม และคัดเลือกพันธุ์ ตัวอย่างเช่น ทำให้ดอกคาร์เนชั่น หรือดอกกุหลาบมีสีน้ำเงิน หรือทำให้พืชมีลักษณะดีกว่าเดิม เช่น มีความต้านทานต่อโรคที่เกิดจากไวรัสบางชนิด (สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย, 2548)

กระบวนการสร้างพืชดัดแปลงพันธุกรรมประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก ได้แก่

1. การสร้างชุดยีน สำหรับถ่ายเข้าสู่พืช ซึ่งอย่างน้อยต้องประกอบด้วยชุดยีนเป้าหมาย (target gene cassette) และชุดยีนคัดเลือก (selectable marker cassestte) แต่ละชุดยีนจะต้องมีโปรโมเตอร์ ซึ่งเป็นส่วนที่ควบคุมการแสดงออกของยีน ส่วนที่อยู่ถัดมาคือ ยีนเป้าหมายที่สร้างลักษณะใหม่ให้กับพืช โดยมีเทอร์มิเนเตอร์อยู่ตอนท้ายของชุดยีน เพื่อหยุดการแสดงออกของยีน (การแสดงออกของยีนในที่นี้ได้แก่การสังเคราะห์อาร์เอ็นเอส่งข่าว)

2. พัฒนาระบบเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป้าหมายให้เป็นต้นที่สมบูรณ์รวมทั้งพัฒนาระบบที่ใช้ในการคัดเลือกต้นพืชที่ได้รับการถ่ายยีน

3. การตรวจสอบยีน และการแสดงออกของยีน ในต้นพืชที่เพาะเลี้ยงได้ รวมทั้งการทดสอบ

คุณสมบัติของพืชดัดแปลงพันธุกรรม เช่นการทดสอบความต้านทานต่อไวรัส (สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย, 2548)

2.14 การถ่ายยีนเข้าสู่พืชและประเมินพืชดัดแปลงพันธุกรรม

2.14.1 การถ่ายยีนเข้าสู่พืช

ในช่วงปี ค.ศ. 1980 เป็นต้นมามีรายงานเกี่ยวกับการถ่ายยีนเข้าสู่พืช ได้เป็นผลสำเร็จในหลายประเทศ เริ่มจากมีผู้นำยีนจากสิ่งมีชีวิตหลายชนิดมาสอดแทรกในโครโมโซมของพืช และพบว่า ยีนเหล่านั้นทำงานได้ในพืช ปัจจัยที่สำคัญของความสำเร็จเหล่านี้ได้แก่ คุณสมบัติของเซลล์พืชเองที่สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นต้นพืชได้ เมื่อมีการนำเซลล์เดี่ยว ๆ มาเพาะเลี้ยงในอาหาร และต้นพืชนั้นสามารถผลิตดอก และผลิตเมล็ดเพื่อถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมไปสู่รุ่นลูกหลานได้ (พิส-สวรรณ เจียมสมบัติ, 2545)

2.14.1.1 วัตถุประสงค์ของการถ่ายยีนเข้าสู่พืช มี 2 ประการได้แก่

1. ความต้องการนำยีนที่ควบคุมลักษณะบางอย่างที่เป็นประโยชน์ เข้าสู่โครโม-โซมพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เพื่อปรับปรุงพันธุ์ให้เป็นพืชที่มีลักษณะดีตามความต้องการของเกษตรกรและผู้บริโภค ทั้งพืชไร่ และพืชสวน

2. เพื่อการศึกษาให้เกิดความเข้าใจในกลไก หรือการทำงานของยีน หรือกระบวนต่าง ๆ ในทางชีววิทยา โดยเมื่อถ่ายยีนเข้าสู่พืชแล้ว และยีนดังกล่าวมีการแสดงออกในต้นพืช ก็จะสามารถอธิบายหรือแสดงให้เห็นถึงบทบาทของยีนและกระบวนการที่เกิดขึ้นในพืชได้ ทั้งนี้รวมถึงการศึกษาในด้านปฏิสัมพันธ์ระหว่างพืชกับเชื้อโรค หรือจุลินทรีย์ด้วยยีนเดี่ยว หรือยีนกลุ่มเล็ก ๆ ที่นำมาใช้ถ่ายเข้าสู่พืช เพื่อปรับปรุงพันธุ์พืช ได้แก่ ยีนควบคุมแมลงศัตรูพืช ยีนต้านทานไวรัสพืช ยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืช ยีนควบคุมการสุกของผลไม้ ยีนเปลี่ยนสีกลีบดอกไม้ ยีนควบคุมคุณค่าทางโภชนาการของเมล็ดพืช และยีนควบคุมการผสมตัวเอง ส่วนพืชเศรษฐกิจหลายชนิดที่มีรายงานการถ่ายยีนได้แล้ว และยีนดังกล่าวทำงานได้เมื่อเข้าไปสอดแทรกในโครโมโซมพืช ได้แก่ มะเขือเทศ มันฝรั่ง ผักกาดหอม คาโนลา ฝ้าย ถั่วเหลือง ข้าวโพด และข้าว เป็นต้น (พิสสวรรณ เจียมสมบัติ, 2545)

การถ่ายยีนเข้าสู่พืชจึงเป็นการปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะดีตรงตามความต้องการได้อีกวิธีหนึ่ง นอกเหนือไปจากการผสมพันธุ์พืชที่ปฏิบัติกันมานานโดยทั่วไป ทั้งนี้คาดหวังว่าการถ่ายยีนให้กับพืช จะมีข้อได้เปรียบบางประการ คือ สามารถผลิตพืชที่มีลักษณะทางพันธุกรรม (genotype) ที่ดี ซึ่งการใช้วิธีผสมพันธุ์พืชแบบทั่วไปทำไม่ได้ สามารถเปลี่ยนแปลงข้อด้อยบางอย่างของพันธุ์พืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถเพิ่มคุณค่าหรือคุณสมบัติในด้านที่เป็นประโยชน์ทางการค้าให้แก่พืชโดยใช้วิธีการที่ชัดเจน ทำให้มีการขอสิทธิประโยชน์จากการดำเนินงานดังกล่าวได้อย่างเป็นรูปธรรม (ในทางกฎหมาย)

2.14.1.2 ปัจจัยสำคัญต่อความสำเร็จในการถ่ายยีนเข้าสู่พืช ได้แก่ มีระบบการเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืชจนสามารถพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ และพืชนั้นถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมไปสู่รุ่นลูกได้ และมีวิธีการที่เหมาะสมสำหรับนำยีนจากภายนอกต้นพืชเข้าสอดแทรกในโครโมโซมของเซลล์พืช

2.14.1.3 การโคลนยีนสำหรับถ่ายเข้าสู่พืช ประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

1. การสร้างส่วนประกอบของชุดยีนที่ถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์พืช ได้แก่

1.1 ยีนควบคุมการทำงานของยีนอื่น (regulatory gene) มีหน้าที่เสมือนเป็นสวิตซ์เปิด-ปิดการทำงานของยีนเพื่อควบคุมการสร้างโปรตีน โปรโมเตอร์เป็นส่วนที่ควบคุมให้มีการเริ่มต้นการทำงานของยีน เปรียบเหมือนสวิตซ์เปิด โปรโมเตอร์ที่นิยมใช้ในการสร้างพืชจีเอ็มโอ คือ โปรโมเตอร์จากไวรัสดอกกะหล่ำที่ชื่อว่า <u>C</u>auliflower <u>m</u>osaic <u>v</u>irus ดังนั้นจึงเรียกว่า CaMV 35S promoter หรือเรียกย่อ ๆ ว่า 35S promoter ซึ่งมีความสามารถในการควบคุมยีนให้ผลิตโปรตีนหรือเอนไซม์ได้ในปริมาณมาก เทอร์มิเนเตอร์เป็นส่วนของดีเอ็นเอที่ทำหน้าที่หยุดการทำงานของยีน เปรียบเป็นสวิตซ์ปิด โดยเทอร์มิเนเตอร์ที่นิยมใช้ คือ <u>no</u>paline <u>s</u>ynthase terminator หรือ *nos* terminator

1.2 ยีนบ่งชี้หรือยีนที่ใช้สำหรับคัดเลือก (selectable marker gene) พืชดัดแปลงพันธุกรรมและพืชปกติไม่สามารถแยกความแตกต่างออกจากกันโดยใช้ลักษณะภายนอก ดังนั้นในการคัดเลือกเซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายโอนชุดยีนจำเป็นที่จะต้องมียีนบ่งชี้ ส่วนใหญ่ที่นำมาใช้ คือ ยีนต้านทานยาปฏิชีวนะ เช่น ยีนต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซิน

1.3 ยีนที่ต้องการถ่ายโอนเข้าสู่สิ่งมีชีวิตที่ต้องการ (target gene) ที่มาของยีนเหล่านี้มาจากพืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์

2. วิธีการถ่ายโอนชุดยีนเข้าสู่เซลล์พืช มีหลายวิธี ซึ่งแสดงรายละเอียดบางวิธีพอสังเขป ดังนี้

2.1 การใช้ไวรัส ไวรัสที่นิยมใช้คือ Caulimovirus และ Germinivirus ตัดต่อยีนเป้าหมายเข้าสู่จีโนมของไวรัส จากนั้นปล่อยไวรัสเข้าสู่พืช ไวรัสจะถ่ายยีนเป้าหมายเข้าไปแทรกตัวในจีโนมพืช

2.2 การใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย (*Agrobacterium*-mediated gene transfer) วิธีนี้เป็นการถ่ายยีนเข้าสู่โครโมโซมในเซลล์พืช จากนั้นจึงจะเพาะเลี้ยง ชักนำและพัฒนาเซลล์พืชที่มียีนเพิ่มเข้ามาในโครโมโซมเดิมให้เจริญเป็นต้นพืชต้นใหม่ ซึ่งจะทำให้พืชที่เพาะเลี้ยงได้มีลักษณะทางพันธุกรรมเปลี่ยนไป ประกอบด้วยองค์ประกอบดังต่อไปนี้

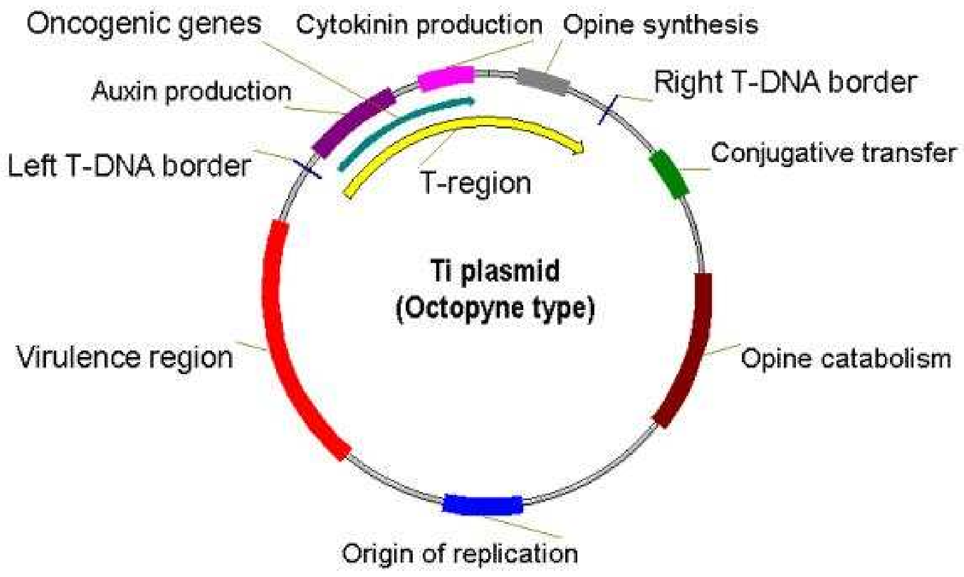
3. พลาสมิดพาหะที่ใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดยใช้เชื้อแบคทีเรียอะโกรแบคทีเรียประกอบด้วย ชุดโครงสร้างของยีนควบคุมการทำงานของยีนอื่น (regulatory gene) ยีนที่ต้องการ

และยีนบ่งชี้หรือยีนที่ใช้สำหรับคัดเลือก และชุดโครงสร้างของ T-DNA ชุดโครงสร้างยีนบน plant vector ที่เกี่ยวข้องกับการส่งถ่ายยีนให้กับโครโมโซมพืชด้วยเชื้ออะโกรแบคทีเรีย เรียกว่า Transfer DNA หรือ T-DNA เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากพลาสมิดของเชื้อแบคทีเรีย *A. tumefacien*s ที่เรียกย่อ ๆ ว่า Ti plasmid (Tumor-inducing plasmid) เชื้ออะโกรแบคทีเรียเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชที่มี Ti plasmid อยู่ภายในเซลล์จึงสามารถส่งถ่ายดีเอ็นเอจากพลาสมิดเข้าไปสอดแทรกในดีเอ็นเอของโครโมโซมพืชด้วยกระบวนการเฉพาะตัวที่เกิดจากการทำงานของยีนใน Ti plasmid ดังกล่าว แล้วทำให้พืชมีลักษณะเปลี่ยนไปจากเดิม โดยเกิดการสังเคราะห์สารที่ทำให้เซลล์พืชเจริญผิดปกติและเกิดเป็นปุ่มปม (gall) ขึ้นตามส่วนต่าง ๆ ของพืช ยีน และดีเอ็นเอที่ทำงานร่วมกันในการถ่ายยีนเข้าสู่พืชของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย (ภาพที่ 13) ได้แก่

3.1 ดีเอ็นเอบน Ti plasmid ที่ทำหน้าที่ถ่ายยีน เรียกว่า Transfer DNA หรือ T-DNA

3.2 ยีนบน Ti plasmid ที่ทำให้พืชสังเคราะห์สารพิษที่ก่อให้เกิดเซลล์ปุ่มปมคือ Oncogenes (ONC) ซึ่งได้แก่ ยีนควบคุมการสังเคราะห์ออกซินและไซโตไคนิน

3.3 ยีนที่จำเป็นสำหรับเชื้ออะโกรแบคทีเรียในการผ่านเข้าสู่เซลล์พืช เรียกว่า vir genes ประกอบด้วยยีนชุดย่อย ๆ จำนวนมาก vir genes ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการนำเชื้อเข้าสู่เซลล์ และปลดปล่อย T-DNA ออกจากพลาสมิดไปสู่โครโมโซมพืช การนำ T-DNA มาใช้ถ่ายยีนเข้าสู่พืชจะต้องตัดเอา ONC gene ออกจาก T-DNA (Disarmed Ti plasmid) ส่วนที่นำมาใช้ ได้แก่ ดีเอ็นเอสายสั้น ๆ สองส่วนที่อยู่ขนาบข้าง ONC genes ซึ่งเรียกว่า right border (RB) และ left border (LB) มีขนาดความยาวข้างละ 25 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเมื่อตัดต่อเอาชิ้นส่วนดีเอ็นเอใด ๆ (studied gene/target gene) เข้าไปไว้ภายในบริเวณระหว่าง RB และ LB ดีเอ็นเอนั้นก็จะถูกถ่ายเข้าไปสอดแทรกในโครโมโซมพืชได้ แบบสุ่ม ด้วยเหตุนี้โครงสร้างพลาสมิดชนิด plant vector จึงไม่ทำให้เซลล์พืชผิดปกติ เนื่องจากปราศจาก ONC gene แต่ดีเอ็นเอหรือยีนที่เข้ามาแทนที่ ONC gene จะถูกตัดต่อไว้ในพลาสมิดพาหะ เรียกว่า plant vector โดยอาจเพิ่มยีนที่ควบคุมลักษณะอื่น ๆ นอกเหนือจากยีนที่ควบคุมพันธุกรรมใหม่ของพืช เช่น เพิ่ม selectable marker หรือ screenable marker เข้าไปใน plant vector ด้วย (Potrykus and Spangeniserg, 1995)



ภาพที่ 13 โครงสร้างของ Ti plasmid (T-DNA) ประกอบด้วย (1) left repeat (2) ยีนควบคุมการสร้างออกซินและไซโตไคนิน (*onc* genes) (3) ยีนควบคุมการสังเคราะห์โอพีน (opine) (4) right repeat (สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย, 2548)

4. ชิ้นส่วนพืชหรือเนื้อเยื่อพืชที่นำมาถ่ายยีน (explant) ในการคัดเลือกชิ้นพืชและเนื้อเยื่อพืชสำหรับถ่ายยีน จำเป็นต้องมีการทดสอบทดลอง เพาะเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของพืชที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นต้นพืชที่ติดดอกออกผลได้ดี ข้อควรคำนึงในการคัดเลือก explant ได้แก่ สามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้อย่างต่อเนื่อง มีอัตราการเจริญ และพัฒนาเป็นต้นพืชได้ในเวลาไม่นานนัก explant ที่นำมาใช้ในการถ่ายยีนได้ ได้แก่ ใบเลี้ยงคู่แรกของต้นกล้าพืช ต้นอ่อนของพืช รากพืช คัพภะ ใบจริงของพืช ละอองเกสร โปรโตพลาสต์ แคลลัสและเซลล์แขวนลอย สำหรับพืชใบเลี้ยงคู่ใช้ explant ได้หลายชนิด แต่พืชใบเลี้ยงเดี่ยว นิยมใช้ คัพภะ โปรโตพลาสต์ แคลลัส และเซลล์แขวนลอย

5. วิธีการถ่ายยีนเข้าสู่พืชโดยใช้เชื้ออะโกรแบคทีเรีย

explant ที่ใช้อาจเป็นใบเลี้ยง หรือต้นอ่อน หรือใบจริงของพืช ซึ่งเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ที่เติมฮอร์โมนต่าง ๆ ให้เหมาะสมแล้วสามารถพัฒนาเป็นยอด หรือคัพภะของพืช และเจริญเติบโตเป็นต้นพืชได้ มีขั้นตอนสรุปได้ดังนี้

5.1 เพาะเลี้ยงต้นกล้าพืชหรือต้นพืชที่มีใบจริงในอาหารสังเคราะห์

5.2 ตัดชิ้นส่วนใบเลี้ยงหรือต้นอ่อนให้มีขนาดพอเหมาะ เพื่อให้เกิดบริเวณที่เป็นรอยตัดของเซลล์

5.3 เตรียมเชื้ออะโกรแบคทีเรียซึ่งภายในเซลล์บรรจุพลาสมิด 2 ชนิด ได้แก่ ชนิดที่หนึ่ง helper plasmid หรือ disarmed plasmid เป็นพลาสมิดที่ประกอบด้วย tran acting element ได้แก่ ยีน *vir* ซึ่งจำเป็นต่อการเข้าสู่เซลล์พืชของเชื้ออะโกรแบคทีเรีย ส่วนมากนิยมเตรียมเชื้ออะโกรแบคทีเรียมให้มีพลาสมิดชนิดนี้ไว้เป็นสายพันธุ์พิเศษสำหรับถ่ายยีน ตัวอย่างพลาสมิดเหล่านี้ได้แก่ pAL 4404, pGV 3850, pEHA 101, pMOG 301 เป็นต้น และชนิดที่สอง autonomous vector หรือ bacterial plasmid เป็นพลาสมิดที่ประกอบด้วย *cis*-acting element คือ ยีนเป้าหมายที่ต้องการถ่ายเข้าสู่พืช พร้อมด้วยโปรโมเตอร์ และเทอร์มิเนเตอร์ โดยมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอ right border (RB) และ left border (LB) ขนาบข้างไว้ นอกจากนี้อาจสอดแทรกชุดของยีนที่ใช้เป็น selectable marker เพิ่มเติมไว้ด้วย ชื่อเรียกของพลาสมิดแบบนี้เปลี่ยนแปลงไปได้ตามแต่ผู้จัดทำจะกำหนดขึ้น มีทั้งที่เป็นการค้าและที่ทำขึ้นใช้เอง เมื่อต้องการถ่ายยีนที่อยู่ใน autonomous vector เข้าสู่พืชก็จะโยก ย้าย พลาสมิดนี้เข้าสู่เซลล์อะโกรแบคทีเรียที่มี helper plasmid อยู่แล้วในกรณีที่ plant vector มีชุดโครงสร้างยีนที่เป็น selectable marker จะเติมสารที่จำเป็นสำหรับการคัดเลือกเฉพาะเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนลงในอาหารเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนพืชด้วย ถ้ามี screenable marker จะสามารถตรวจสอบการเกาะยึดของเซลล์แบคทีเรียกับชิ้นพืช และการแสดงออกของ marker แบบ transient expression ได้ภายใน 24-48 ชั่วโมง (พิสสวรรณ เจียมสมบัติ, 2545)

5.4 ในการถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์พืช กระทำโดยนำแบคทีเรียที่มีพลาสมิดนี้ไปเพาะเลี้ยงร่วมกับเนื้อเยื่อพืช เช่น ส่วนของใบ หรือแคลลัส หลังจากเพาะเลี้ยง 2-3 วัน ในช่วงเวลานี้แบคทีเรียจะจับตัวกับเซลล์พืช แล้วมีการส่งยีนเข้าไปในเซลล์ และไปยังโครโมโซม หลังจากนั้นก็ย้ายเนื้อเยื่อต่อไปยังอาหารเพาะเลี้ยงใหม่ที่มีสารคาร์เบนนิซิลินเพื่อฆ่าแบคทีเรีย และสารปฏิชีวนะหรือสารกำจัดวัชพืช เพื่อทำลายเซลล์ที่ไม่มีการดัดแปลงพันธุกรรม ย้ายลงอาหารที่มีสารปฏิชีวนะหรือสารกำจัดวัชพืชอีกหลายครั้ง เพื่อคัดเลือกเฉพาะเซลล์ที่มีการดัดแปลงพันธุกรรม ต่อจากนั้นในเวลา 4-8 สัปดาห์ ก็จะได้ต้นพืชเล็ก ๆ ที่มีทั้งใบ และรากเพื่อย้ายลงดินต่อไป วิธีการนี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในขณะนี้ ใช้ถ่ายยีนได้ทั้งในพืชใบเลี้ยงคู่ และใบเลี้ยงเดี่ยวหลายชนิด เช่น มะละกอ ทานตะวัน ถั่วเหลือง มะเขือเทศ ข้าว ข้าวสาลี ข้าวโพด ฯลฯ

6. การใช้เครื่องยิงอนุภาค

เครื่องยิงอนุภาค เป็นอุปกรณ์ยิงที่มีความเร็วสูง ใช้ยิงอนุภาคทังสเตนหรือทองคำที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-3 ไมครอน ก่อนยิงนำอนุภาคนี้มาฉาบหุ้มผิวด้วยดีเอ็นเอ แล้วนำไปเข้าเครื่องยิง กระบวนการดังกล่าวเรียกว่า particle bombardment หรือ biolistic system จากการยิงนี้ ทำให้สามารถส่งยีนเข้าไปในเนื้อเยื่อ หรือเซลล์พืช ในปัจจุบันใช้ก๊าซฮีเลียม กลไกของเครื่องยิงจะอัดก๊าซให้มีแรงดันสูง ซึ่งสามารถขับดันให้อนุภาคเคลื่อนที่ด้วยความเร็ว 430 เมตรต่อวินาที อนุภาคที่เคลื่อนที่ด้วยความเร็วภายในห้องเครื่องที่มีสภาวะเกือบเป็นสุญญากาศ จะเข้าไปทะลุ

ทะลวงเนื้อเยื่อ แล้วนำดีเอ็นเอที่เคลือบอยู่นอกผิวอนุภาคเข้าไปภายในเซลล์ และเข้าไปรวมกับโครโมโซมแบบไม่จำเพาะเจาะจง ชิ้นส่วนของพืชที่นำมารับการถ่ายยีนอาจเป็นส่วนของใบอ่อน แคลลัส ยอดอ่อน ฯลฯ ในการยิงครั้งเดียวอาจถ่ายยีนเข้าไปได้หลายเซลล์ ในปัจจุบันนี้ได้มีการใช้วิธีการถ่ายยีนด้วยวิธีนี้กันอย่างกว้างขวาง มากเป็นอันดับสองรองจากวิธีใช้ *A. tumefaciens* มีพืชมากมายหลายชนิดที่พัฒนาโดยวิธีนี้ เช่น มะละกอ ข้าว ข้าวโอ๊ต ข้าวสาลี มันสำปะหลัง ฯลฯ

7. การกระตุ้นด้วยไฟฟ้า

การกระตุ้นด้วยไฟฟ้า เป็นการกระตุ้นให้เยื่อหุ้มเซลล์เปิดรูชั่วคราว เพื่อให้ยีนเข้าไปในโปรโตพลาสต์อาจกระตุ้นด้วยไฟฟ้าแรงสูงในเวลาอันสั้นหรือไฟฟ้าแรงต่ำแต่ใช้ระยะเวลานาน และปรับความเข้มข้นของสารละลายให้เหมาะสมกับชนิดของพืชและเนื้อเยื่อ ในการถ่ายยีนวิธีนี้ควรใช้โปรโตพลาสต์ โดยนำโปรโตพลาสต์ใส่ในสารละลายที่มีดีเอ็นเอหรือโครโมโซม แล้วทำการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า หลังจากนั้นก็นำเนื้อเยื่อไปเพาะเลี้ย มีการใช้การถ่ายยีนวิธีนี้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชหลายชนิด เช่น ยาสูบ ข้าว และข้าวโพด ฯลฯ

8. การถ่ายยีนโดยใช้สารเคมี

นำดีเอ็นเอและโปรโตพลาสต์มาผสมรวมกันในสารละลายที่มีส่วนผสมของ PEG, polyvinyl alcohol และ calcium phosphate ซึ่งช่วยกระตุ้นให้โปรโตพลาสต์ดูดดีเอ็นเอเข้าไปภายในเซลล์ หลังจากนั้น 15-20 นาทีก็นำไปคัดเลือกเซลล์ที่ได้รับยีนถ่ายทอด การถ่ายยีนวิธีนี้กระทำได้สำเร็จในพืชหลายชนิด เช่น สตรอเบอรี ข้าว ข้าวสาลี ข้าวโพด และคาโนลา ฯลฯ (สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย, 2548)

2.14.2 การตรวจสอบประสิทธิภาพของการถ่ายยีน

เมื่อเซลล์พืชได้รับยีน หรือดีเอ็นเอจากภายนอกเข้าไปสู่ภายในเซลล์ ภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง สามารถตรวจสอบการแสดงออกของยีน หรือดีเอ็นเอที่อยู่ในเซลล์ได้ในแบบที่เรียกว่า transient expression ซึ่งนิยมตรวจดูจาก screenable marker เช่น ยีน uid A หรือ GUS; ยีนของ jellyfish protein (GFP) หรือตรวจสอบโปรตีนที่เป็นผลผลิตจากยีนด้วยเทคนิคทางซีรั่มวิทยา

2.14.2.1 การเพาะเลี้ยงและคัดเลือกเซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายยีน

เซลล์พืชที่ได้รับการถ่ายยีนจะมี selectable marker บางชนิดที่แสดงออกได้ในเซลล์พืช และทำให้เซลล์ดังกล่าวเจริญได้ในอาหารเพาะเลี้ยงที่เติมสารบางชนิดที่สอดคล้องกับคุณสมบัติของ marker เช่น เจริญได้ในอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ซึ่งเป็นผลจากยีน *NPT II* หรือเจริญได้ในอาหารที่เติมสารเคมีกำจัดวัชพืช Bialaphos ซึ่งเป็นผลมาจากยีน *bar* เป็นต้น ปัจจุบันมีการใช้ selectable marker ชนิดอื่นอีก เช่น ยีนควบคุมการใช้น้ำตาลบางชนิด เซลล์ที่เจริญได้จะพัฒนาเป็นลำดับเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการพัฒนาเซลล์ และเนื้อเยื่อจนเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงขึ้นกับชนิดพืช ซึ่งมักจะใช้เวลาไม่น้อยกว่า 2-3 เดือน

2.14.2.2 การตรวจสอบต้นพืชดัดแปลงพันธุกรรม

ต้นพืชที่พัฒนามาจากเซลล์ และเนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีนเข้ามา จัดเป็นพืชดัดแปลงพันธุกรรม หรือพืชจำลองพันธุ์รุ่นแรก (R0) การตรวจสอบทำได้ทั้งการใช้วิธีการทางอณูชีววิทยาและชีววิทยา การวิเคราะห์และตรวจสอบว่าพืช R0 แต่ละต้นมียีนเป้าหมายสอดแทรกอยู่ในโครโมโซมหรือไม่ นิยมทำโดยการสกัดดีเอ็นเอจากโครโมโซมของพืช แล้วย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จากนั้นแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็คโตรโฟรรีซิส แล้วใช้เทคนิค Southern blot ย้ายดีเอ็นเอจากเจลไปสู่แผ่นเมมเบรน เพื่อตรวจหาแถบดีเอ็นเอที่มียีนเป้าหมายอยู่โดยใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบ (DNA probe) นอกจากนี้ อาจตรวจหายีนเป้าหมายบนโครโมโซมพืชด้วยเทคนิค PCR ได้อีกวิธีหนึ่ง

การตรวจสอบผลผลิตของยีนเป้าหมาย ในพืช R0 ทำได้จากการตรวจสอบ mRNA ด้วยเทคนิค Northern hybridization หรือเทคนิค RT-PCR และทำได้โดยการตรวจสอบโปรตีนที่เป็นผลผลิตยีนด้วยเทคนิค ELISA และ Western blot analysis หรือตรวจหาเอนไซม์ที่เป็นผลผลิตของยีนด้วยเทคนิคทางชีวเคมี ในกรณีที่ต้องการตรวจสอบคุณภาพของพืชดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้ว่ามีลักษณะทางพันธุกรรมเปลี่ยนไปตรงตามความประสงค์ อาจจำเป็นต้องใช้วิธีทดสอบทางชีววิทยา เช่น การตรวจดูความต้านทานโรค แมลงศัตรูพืช โดยการปลูกเชื้อสาเหตุโรคพืชให้กับพืชที่ได้รับการถ่ายยีน หรือให้แมลงดูดกิน กัดกินพืชที่ได้รับการถ่ายยีน แล้วประเมินคุณภาพพืชที่ได้รับการถ่ายยีนว่าดีกว่าพืชที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนหรือไม่ อย่างไร (ศรีเมฆ ชาวโพงพาง และ เจษฎาพร พิทักษ์สุธีพงศ์, 2545)

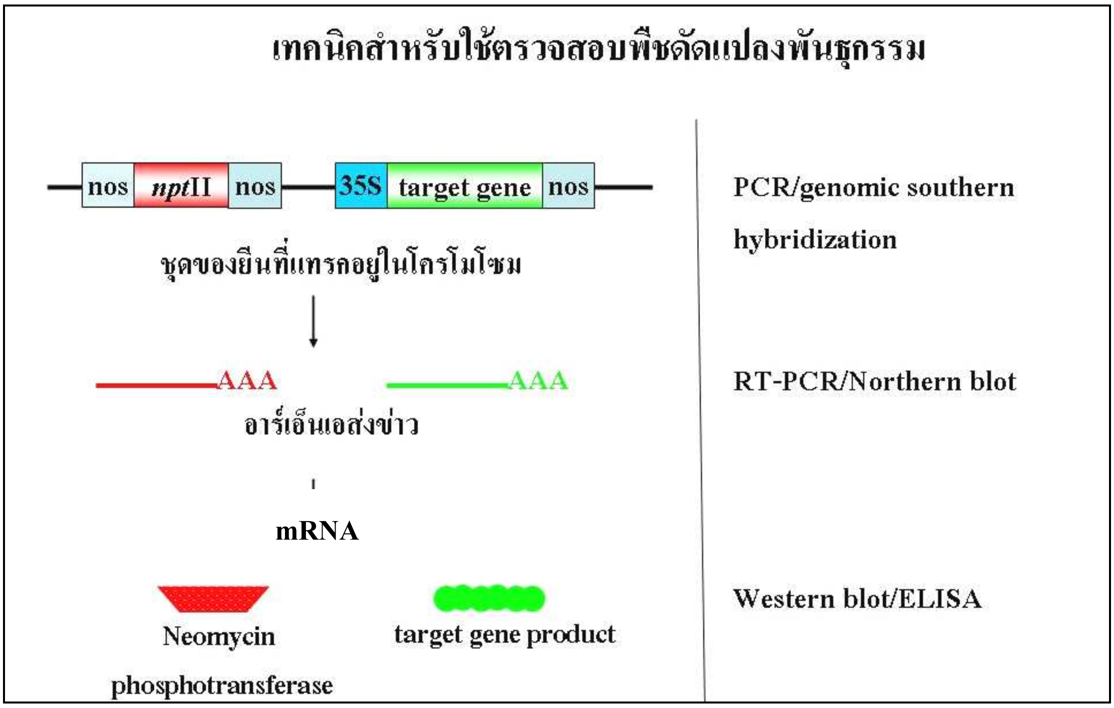
2.14.2.3 การตรวจสอบการถ่ายทอดพันธุกรรมจากพืชรุ่น R0 ไปสู่รุ่น R1 และ R2

ใช้วิธีการทางอณูชีววิทยาเช่นเดียวกับการตรวจสอบพืชรุ่น R0 รวมทั้งการทดสอบการกระจายตัวของยีนตามกฎของเมนเดล ซึ่งอาจตรวจสอบจาก screenable marker หรือ selectable marker หรือ ตรวจคุณภาพของพืชที่ได้รับการถ่ายยีน โดยที่พืชที่ได้รับการถ่ายยีนรุ่นลูก เช่น รุ่น R1 และ R2 จะต้องได้มาจากการผสมตัวเองของพืชรุ่น R0 และ R1 ตามลำดับ (Register, 1997)

2.14.2.4 การตรวจวิเคราะห์ยีนในพืชดัดแปลงพันธุกรรม (ภาพที่ 14)

การตรวจวิเคราะห์ยีนในพืชดัดแปลงพันธุกรรมนั้นทำได้ง่ายโดยตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ยีน และดีเอ็นเอต่างๆ ที่เข้าไปสอดแทรกในโครโมโซมของพืช เรียกว่า ทรานส์ยีน ซึ่งได้แก่ ดีเอ็นเอที่ทำหน้าที่เป็นโปรโมเตอร์ ดีเอ็นเอของยีนเป้าหมาย ยีนคัดเลือก หรือยีนรายงานผล และดีเอ็นเอส่วนที่ทำหน้าที่เป็นเทอร์มิเนเตอร์ โปรโมเตอร์ และเทอร์มิเนเตอร์นั้นมีหลายชนิด ควรจะเลือกใช้ให้เหมาะสมกับชนิดพืช เนื้อเยื่อพืชและยีนเป้าหมาย โดยทั่วไปที่นิยมใช้ในการถ่ายยีนได้แก่ CaMV 35S promoter, nos promoter และ nos terminator ส่วนยีนคัดเลือกที่ใช้กันทั่วไป ได้แก่ ยีน *npt*II (Neomycin phosphotransferase II) ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมลักษณะความต้านทานต่อยา

ปฏิชีวนะกานามัยซิน หรือใช้ยีน *bar* ที่ต้านทานต่อยาปราบวัชพืช bialaphos การตรวจสอบยีนเป้าหมายและยีนคัด เลือกจะสามารถตรวจสอบได้ หากทราบรายละเอียดของยีนนั้น ๆ เช่น ในมะละกอดัดแปลงพันธุกรรมจะตรวจวิเคราะห์หายีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัส (Coat protein gene) และยีน *npt II* (Neomycin phosphotransferase II) เป็นต้น นอกจากการใช้เทคนิค PCR แล้ว ยังสามารถใช้เทคนิค DNA dot blot hybridization ในการตรวจสอบยีนในพืชดัดแปลงพันธุกรรมได้ด้วย ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก และรวดเร็ว ในการระบุว่ามี หรือไม่มีทรานส์ยีน ทั้งสองวิธีนี้สามารถตรวจสอบยีนได้จากต้นพืชที่ยังเล็ก และอยู่ในขวดเพาะเลี้ยง เทคนิคอื่นที่ใช้ในการตรวจสอบทรานส์ยีนเพื่อบอกจำนวนซ้ำของยีนที่สอดแทรกอยู่ในโครโมโซมพืช คือ เทคนิค Genomic Southern hybridization ส่วนการตรวจสอบถึงการแสดงออกของยีน ในระดับ mRNA ทำได้โดยใช้เทคนิค Reverse Transcription-PCR โดยมักจะทำหลังจากที่ต้นพืชมีขนาดใหญ่ขึ้น (ศรีเมฆ ชาวโพงพาง และเจษฎาพร พิทักษ์สุธีพงศ์, 2545)



ภาพที่ 14 แผนภูมิแสดงการตรวจสอบยีนเป้าหมายในพืชดัดแปลงพันธุกรรม
(ศรีเมฆ ชาวโพงพาง และเจษฎาพร พิทักษ์สุธีพงศ์, 2545)

บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้แบ่งเป็น 4 ส่วน คือ

1. **การโคลนยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* จากผลสุกมะเขือเทศ** สำหรับใช้ทดลองในขั้นตอนต่อไป

2. **การถ่ายยีนและศึกษาการแสดงออกของยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* ในเซลล์สิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก ได้แก่ ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) และ แบคทีเรีย (*Escherichia coli*)** เพื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกเบื้องต้นโดยเปรียบเทียบระดับ ADH activity หรือปริมาณ ADH ในเซลล์ยีสต์ และแบคทีเรีย

3. **การโคลนยีน และสร้าง constructs สำหรับใช้ถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศ** เพื่อให้ได้ยีนที่สมบูรณ์พร้อมสำหรับการถ่ายเข้าสู่มะเขือเทศ

4. **การถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศ** เพื่อให้ได้ต้นมะเขือเทศที่มียีน *Le-scADH1* และยีน *Le-scADH2* สำหรับใช้ทดสอบหน้าที่ของยีนต่อไป

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง วิเคราะห์ และทดสอบคุณสมบัติทั้งหมด มีดังนี้

1. มะเขือเทศ (*Solanum lycopersicum* cv. Microtom)
2. ยีสต์ (*S. cerevisiae*) สายพันธุ์ INVSc1
3. แบคทีเรีย (*E. coli*) สายพันธุ์ BL21 (Novagen, Darmstadt, Germany)
4. แบคทีเรีย (*E. coli*) สายพันธุ์ DH5-α (GBF lab, Toulouse)
5. แบคทีเรีย (*E. coli*) สายพันธุ์ TOP10F’ (Invitrogen, Paisely, UK)
6. แบคทีเรีย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 (GBF lab, Toulouse, France)
7. pGEM-T Vector (Promega, Madison, USA)
8. pYES 2.1 TOPO Vector (Invitrogen, Paisely, UK)
9. pET 15b vector (Novagen, Darmstadt, Germany)
10. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)

11. เครื่องดูดถ่ายสารละลายชนิดปรับปริมาตร (adjustable pipettes)
12. เครื่องเขย่าสารละลาย (shaker)
13. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
14. เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer)
15. เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง
16. เครื่องส่องดูเจล (UV transluminator)
17. เครื่องแยกขนาดดีเอ็นเอแนวนอน (horizontal gel electrophoresis apparatus)
18. เครื่องแยกขนาดโปรตีน (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis apparatus)
19. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (thermal cycler)
20. เครื่องย้ายโปรตีนจากเจลไปสู่เมมเบรน (Western blot apparatus)
21. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
22. เครื่องปั่นสูญญากาศ (speed vacuum)
23. ชั้นสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
24. ชั้นสำหรับเพาะเลี้ยงต้นไม้
25. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ

3.2 สถานที่ทำการวิจัย

ศูนย์วิจัย UMR 990 INRA-INP/ENSAT, Genomics and Biotechnology of Fruit labora-tory (GBF lab) ณ Pole de Biotechnologie Vegetable, Chemin de Borde-Rouge, BP 42617, Auzeville, 31326, Castanet Tolosan เมืองตูลูส ประเทศฝรั่งเศส

3.3 ระยะเวลาการทดลอง

มกราคม 2549-พฤษภาคม 2550

3.4 วิธีการทดลอง

ปลูกมะเขือเทศพันธุ์ Microtom ซึ่งเป็นพันธุ์แคระที่นิยมนำมาใช้เป็นต้นแบบ (Meissner et al., 1997) ด้วยวัสดุปลูก คือ peat moss ในห้องเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้น 80 เปอร์เซ็นต์ และช่วงเวลาการให้แสงสว่างต่อความมืด 16/8 ชั่วโมง

ในการทดลองยีน sc*ADH* นี้ เริ่มต้นจากการศึกษางานของ Manriquez et al. (2006) ซึ่งได้ศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของยีน *ADH* ในระหว่างการสุกของแคนตาลูป และการควบคุมการแสดงออกโดยเอทธิลีนโดยพบยีน *CmADH1* และ *CmADH2* โดยยีน*CmADH1* เป็นยีนที่ควบคุมการ

สร้าง medium chain ADH ที่มีลำดับเบสบางส่วนคล้ายคลึงกับยีน *LeADH2* ในมะเขือเทศ ในขณะที่ยีน *CmADH2* เป็นสมาชิกของกลุ่มยีน *ADH* ที่ควบคุมการสร้าง short chain ADH และเร่งปฏิกิริยาแบบ oxidation-reduction โดยมีสารอัลดีไฮด์ และแอลกอฮอล์เป็นซับสเตรท เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบส โดยการค้นหาฐานข้อมูล EST ของมะเขือเทศ และปรับปรุง single contig ของมะเขือเทศให้ใกล้เคียงกับยีน *CmADH2* มากขึ้น สามารถคัดเลือกยีน *Le-scADH1* สำหรับนำมาใช้ในการทดลองได้ สำหรับยีนที่สอง คณะผู้วิจัยใช้ประโยชน์จากฐานข้อมูลการแสดงออกในมะเขือเทศของ Alba et al. (2005) โดยได้ทำการพิสูจน์และคัดเลือกยีนที่สอง (*Le-scADH2*) ที่มีลักษณะการแสดงออกอย่างเด่นชัดในการพัฒนาของผล

3.4.1 การโคลนยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* จากผลสุกของมะเขือเทศ

การโคลนยีนใช้เทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจจากอาร์เอ็นเอแม่แบบ โดยมี 3 ขั้นตอนหลัก คือ 1) การสกัดอาร์เอ็นเอให้มีความบริสุทธิ์ 2) การสังเคราะห์ cDNA โดยกระบวนการ reverse transcription 3) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (พีซีอาร์; PCR) โดยอาศัย cDNA เป็นต้นแบบ ดังมีวิธีการดังต่อไปนี้

3.4.1.1 การสกัดอาร์เอ็นเอจากผลสุกของมะเขือเทศ มี 2 ขั้นตอนหลัก ดังต่อไปนี้

1. สกัดอาร์เอ็นเอจากเนื้อเยื่อผลสุกของมะเขือเทศ โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Hamilton et al. (1990) ดังมีรายละเอียดต่อไปนี้ บดเนื้อเยื่อผลสุกของมะเขือเทศ ปริมาณ 5 กรัม ในสาร liquid nitrogen ให้ละเอียด เติม extraction buffer [(1% (w/v) SDS, 6 % (w/v) 4-amino salicylic acid, 5% (v/v) phenol)] ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer (vortex) นาน 30 วินาที จนกระทั่งสารผสมเข้ากันเป็นอย่างดี เติมสารละลาย phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1 (v/v)) pH 4.5 (Eurobio, France) ปริมาตร 15 มิลลิลิตร และ vortex นาน 30 วินาที วางบนน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที ตกตะกอนชิ้นส่วนพืช โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,600 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ดูดสารแขวนลอยย้ายลงในหลอดใหม่ เติม 1/10 volume ของ 3 M sodium acetate (NaAc) pH 4.5 และ 1 volume ของ isopropanol ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ตกตะกอนอาร์เอ็นเอโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,600 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เทสารละลายทิ้ง เติมเอทธานอล 70% เย็นจัด ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,600 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เทเอทธานอล 70% ทิ้ง นำตะกอนอาร์เอ็นเอไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่องปั่นสุญญากาศ และละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยน้ำกลั่นดีไอออไนซ์ (deionized water; dH_2O) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เติม 1 volume ของ 2x extraction CTAB buffer (2% (w/v) CTAB, 100 mM Tris HCl pH 8, 20 mM EDTA pH 8, 1.4 M NaCl) และ เติม 2 volume ของ 1x CTAB buffer (1% (w/v) CTAB, 50 mM Tris HCl

pH 8, 10 mM EDTA pH 8) ผสมโดยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ ตกตะกอนอาร์เอ็นเอโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,600 รอบต่อนาที นาน 45 นาที เทสารละลายทิ้ง ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย dH_2O ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และเติม 1 volume ของ 2x extraction CTAB buffer (2% (w/v) CTAB, 100 mM Tris HCl pH 8, 20 mM EDTA pH 8, 1.4 M NaCl) และเติม 2 Volume ของ 1x CTAB buffer (1% (w/v) CTAB, 50 mM Tris HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8) ผสมโดยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ ตกตะกอนอาร์เอ็นเอโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,600 รอบต่อนาที นาน 30 นาที เทสารละลายทิ้ง ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 1.4 mM sodium chloride (NaCl) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วเติม 2.5 volume ของเอทธานอล 100% ที่เย็นจัด บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,600 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เทสารละลายทิ้ง เติมเอทธานอล 70% เย็นจัด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วย้ายลงหลอด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทสารละลายทิ้ง นำตะกอนอาร์เอ็นเอไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่องปั่นสูญญากาศ และละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยน้ำ dH_2O ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เก็บสารละลายอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

2. กำจัดการปนเปื้อนของดีเอ็นเอในสารละลายอาร์เอ็นเอ โดยเติมสารละลายอาร์เอ็นเอ และสารกำจัดดีเอ็นเอ (Boehringer Mannheim-Roche, Spain) ดังนี้

RNA	400	ไมโครลิตร
RNAsin	1	ไมโครลิตร
10X DNase buffer	45	ไมโครลิตร
DNase, Rnase-free (10 U/μl)	10	ไมโครลิตร

บ่มสารละลายที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เติม 1 volume ของสาร phenol chloroform (25:24 (v/v)) แล้ว vortex นาน 30 วินาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที ย้าย supernatant ไปหลอดใหม่ เติม 1 volume ของสาร chloroform และ vortex นาน 30 วินาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที ย้ายสารแขวนลอยไปหลอดใหม่ เติม 1 volume ของสาร 6 M lithium chloride ($LiCl_2$) เย็นจัด บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทสารแขวนลอยทิ้งไป เติมสารละลาย 3M lithium chloride ที่เย็นจัด ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทสารแขวนลอยทิ้ง นำตะกอนอาร์เอ็นเอไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่องปั่นสูญญากาศ และละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยสารละลาย 2% potassium acetate (KAc) ปริมาตร 400

ไมโครลิตร และเติมเอทธานอล 100% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้ว vortex นาน 10 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศา เซลเซียส นาน 30 นาที เทสารละลายทิ้ง ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยเอทธานอล 70% ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เทสารละลายทิ้ง ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยน้ำ dH_2O ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มบนน้ำแข็งนาน 30 นาที นำไปวัดปริมาณอาร์เอ็นเอด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ค่าการดูดกลืนแสง 260 นาโน เมตร (A_{260}) และที่ค่าการดูดกลืนแสง 280 นาโนเมตร (A_{280}) โดยทั่วไป $A_{260/280}$ ratio ประมาณ 1.8-2.0 แสดงถึงอาร์เอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูง

คำนวณปริมาณอาร์เอ็นเอจากค่า A_{260} ดังนี้

ปริมาณ RNA รวม (µg/ml) = (A_{260} x dilution factor x 40)

ค่า A_{260} = 1 มีค่าเท่ากับ RNA สายเดี่ยว 40 µg/ml (Sambrook et al., 1989)

3.4.1.2 การสังเคราะห์ cDNA

ใช้ mRNA เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ cDNA สายเดี่ยว และจาก cDNA สายเดี่ยวที่ได้จึงสังเคราะห์เป็นสายคู่ โดยใช้ oligo-dT primer และ Omni script reverse transcription kit (Qiagen, Valencia, USA) โดยมีวิธีการ ดังนี้ นำอาร์เอ็นเอที่มีความเข้มข้น 50 นา-โนกรัม ถึง 2 ไมโครกรัม ไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วตั้งหลอดอาร์เอ็นเอบนน้ำแข็ง ดูดอาร์เอ็นเอใส่ในสารละลายสำหรับสังเคราะห์ cDNA (1x buffer reverse transcription, 0.5 mM dNTP,1 µM Oligo-dT primer, 4 unit Omniscript reverse transcriptase และ 10 unit RNase inhibitor) ผสมอาร์เอ็นเอกับสารละลายสำหรับสังเคราะห์ cDNA ให้เข้ากันโดยใช้ปิเปตแมน (pipett man) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที เก็บดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4.1.3 การเพิ่มปริมาณยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* และการตรวจสอบความถูกต้องของยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเวคเตอร์ pYES 2.1/V5-His-TOPO เพื่อทดสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์ยีสต์ และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเวคเตอร์ pET 15b เพื่อทดสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์แบคทีเรีย (ตารางที่ 3) และใช้ Taq DNA polymerase ที่มีความแม่นยำในการทำปฏิกิริยาสูง คือ Isis DNA polymerase (QBiogene, California, USA) เพื่อหลีกเลี่ยงความผิดพลาดในการจับของเบส

ในช่วงการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณใช้ reaction mixture 50 µl/reaction ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 50 ng, 1x Isis incubation buffer, 2 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP, 0.4 µM primer และ 1 unit Isis DNA Polymerase โดยใช้สภาวะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนี้

94 °ซ	นาน 5 นาที	1 รอบ
94 °ซ	นาน 30 วินาที	
52 °ซ	นาน 30 วินาที	39 รอบ
72 °ซ	นาน 1.30 นาที	
72 °ซ	นาน 7 นาที	1 รอบ

หลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้ว ให้เติม 5 mM dATP ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ 1 unit ของ Taq DNA polymerase (normal Taq, GBF lab, Toulouse, France) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตรวจสอบขนาดของท่อนดีเอ็นเอที่ต้องการโดยการแยกด้วยวิธีอิเล็คโตรโฟเรซิส ใน 1% (w/v) อะกาโรสเจล, 0.5x TAE buffer ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที ตรวจสอบแถบของท่อนดีเอ็นเอ โดยการย้อมเจลด้วยสีย้อมเอทธิเดียมโบรไมด์ แล้วส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต ภายใต้เครื่อง UV transluminator เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA marker) ขนาด 1 kb และ 100 bp (Promega, Madison, USA) เมื่อได้ขนาดของท่อนดีเอ็นเอที่ถูกต้องแล้ว ทำการตัดแถบดีเอ็นเอ และสกัดท่อนดีเอ็นเอออกจากเจลอะกาโรส โดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, USA) ซึ่งมีวิธีการดังนี้ ตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการออกจากเจลอะกาโรส ชั่งน้ำหนักของเจลที่ตัดมา เติม 3 volumes ของ QG buffer ต่อ 1 volume ของเนื้อเจล บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที vortex ทุก 2-3 นาที เติม 1 Volume ของ isopropanol ผสมให้เข้ากัน ดูดสารละลายใส่ใน QIAquick column tube นำไปปั่นเหวี่ยงนาน 1 นาที เทสารละลายทิ้ง เติม QG buffer ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงนาน 1 นาที เทสารละลายทิ้ง เติม PE buffer ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงนาน 1 นาที เทสารละลายทิ้ง และปั่นแยกอีกครั้งนาน 1 นาที เทสารละลายทิ้ง ใส่ QIAquick column ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม dH_2O ปริมาตร 80 ไมโครลิตร เพื่อละลายดีเอ็นเอจาก QIAquick column เก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4.1.4 การเชื่อมต่อเวคเตอร์ pGEM-T กับดีเอ็นเอของยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* มีวิธีดังนี้

1. นำดีเอ็นเอของยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* ที่ได้จากข้อ 3.4.1.2 มาเชื่อม

ต่อกับเวคเตอร์ pGEM-T (Promega, Madison, USA) (ภาคแผนวกที่ 1ข) โดยเตรียมสารแต่ละชนิด วางไว้บนน้ำแข็ง โดยเฉพาะสาร 2X Rapid Ligation Buffer ต้องทำการ vortex ก่อนใช้ทุกครั้ง และเติมสารละลายต่าง ๆ ดังนี้

ดีเอ็นเอ	2	ไมโครลิตร
2X Rapid Ligation Buffer	5	ไมโครลิตร
pGEM-T vector (50 ng)	1	ไมโครลิตร
T4 DNA Ligase (3 U/μl)	1	ไมโครลิตร
dH_2O	1	ไมโครลิตร

ผสมสารละลาย และดีเอ็นเอให้เข้ากันโดยใช้ปิเปตแมน วนไปมาอย่างเบา ๆ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วย้ายสารละลายมาบ่มต่อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2. นำพลาสมิดสายผสม (เวคเตอร์ pGEM-T กับดีเอ็นเอของยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2*) ย้ายเข้า (clone) สู่เซลล์ของแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5-α (GBF lab, Toulouse, France) โดยมีวิธี ดังนี้ ใส่พลาสมิดสายผสม ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ในหลอดที่มีเซลล์ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5-α ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มบนน้ำแข็ง นาน 30 นาที หลังจากนั้นทำการ heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 1.30 นาที แล้วตั้งบนน้ำแข็งทันที เติมอาหารเหลว (LB medium) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง ดูดเซลล์ของแบคทีเรีย ปริมาตร 100 ไมโครลิตร วางและเกลี่ยให้ทั่วบนอาหารแข็ง LB/Carb/IPTG/X-gal (LB agar medium, 50 mg/l carbenicillin เกลี่ยด้วย 100 mM IPTG ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ 50 mg/ml X-gal ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ก่อนนำมาใช้) จากนั้นนำอาหารแข็งคัดเลือกที่มีเซลล์ของแบคทีเรียมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีแบคทีเรียสีขาว และสีฟ้าที่เกิดขึ้นบนอาหารแข็งคัดเลือก คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวสีขาวของแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB/Carb (LB medium, 50 mg/l carbenicillin) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ของแบคทีเรีย

3. นำเซลล์ของแบคทีเรียมาสกัดพลาสมิดสายผสม โดยใช้ Wizard Plus SV Mini-preps DNA Purification Kit (Invitrogen, Paisely, UK) มีวิธีการดังนี้ นำอาหารที่มีเซลล์แบคทีเรียมาใส่ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทสารแขวนลอยทิ้ง แล้วทำซ้ำอีกรอบ ละลายตะกอนเซลล์ของแบคทีเรียด้วย cell resuspension

solution ปริมาตร 250 ไมโครลิตรโดยการ vortex ให้ตะกอนของแบคทีเรียละลายเป็นเนื้อเดียวกับ cell resuspension solution และเติม cell lysis solution ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ เติม alkaline protease solution ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เติม neutralization solution ปริมาตร 350 ไมโครลิตร แล้วผสมโดยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำสารละลายส่วนใสด้านบนใส่ในหลอดที่มี spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที เทสารละลายทิ้ง เติม wash solution ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที เทสารละลายทิ้ง และเติม wash solution ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที เทสารละลายทิ้ง ย้าย spin column ไปไว้ในหลอดใหม่ เติม dH_2O ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที นำ spin column ทิ้งไป เก็บพลาสมิดสายผสมไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

4. ทดสอบความถูกต้องของพลาสมิดสายผสม โดยการตัดพลาสมิดสายผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ดังนี้ พลาสมิดสายผสมของยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 1 unit, plasmid DNA 200 ng, 1x buffer และเติม dH_2O จนครบ 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปในพลาสมิดโดยการแยกด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิส ใน 1% (w/v) อะกาโรสเจล, 0.5x TAE buffer ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที ตรวจสอบแถบของท่อนดีเอ็นเอโดยการย้อมเจลด้วยสีย้อมเอทธิเดียมโบรไมด์ แล้วส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตภายใต้เครื่อง UV transluminator เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb และนำพลาสมิดสายผสมที่มีขนาดดีเอ็นเอถูกต้อง ไปตรวจสอบความถูกต้องของลำดับเบสโดยใช้เครื่องวิเคราะห์หาลำดับเบสบนดีเอ็นเอ ใช้ไพรเมอร์ M13 forward และ M13 reverse และนำลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ได้มาทำการวิเคราะห์ข้อมูลของลำดับเบสดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ หลังจากได้ลำดับเบสนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank (http://www.ncbi.hlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) ของมะเขือเทศ

ตารางที่ 3 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* เพื่อทดสอบการแสดงออกในเซลล์ยีสต์ และแบคทีเรีย

	Primer sequence (5' - 3')
ไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณในยีสต์ (pYES vector)	
Le- scADH1	
ADH1 up	ATGGAAAATCCTGGAAAGAAGG
ADH1 low	CATATATGAGCGCATTCGGGG
Le-scADH2	
ADH2 up	ATGGCCACCCCTTCTCTTCA
ADH2 low	AATAAGAATCTGCATAATTTGAATGG
ไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณในแบคทีเรีย (pET vector)	
Le- scADH1	
ADH1-Nup	AGGCATATGGAAAATCCTGGAAAGAAGG
ADH1-Xlow	ATGAAGCTTCATATATGAGCGCATTCGCGG
Le-scADH2	
ADH2-Nup	ACGCATATGGCCACCCCTTCTCTTCA
ADH2-Xlow	AGTCTCGAGAATAAGAATCTGCATAACTTGATTGG

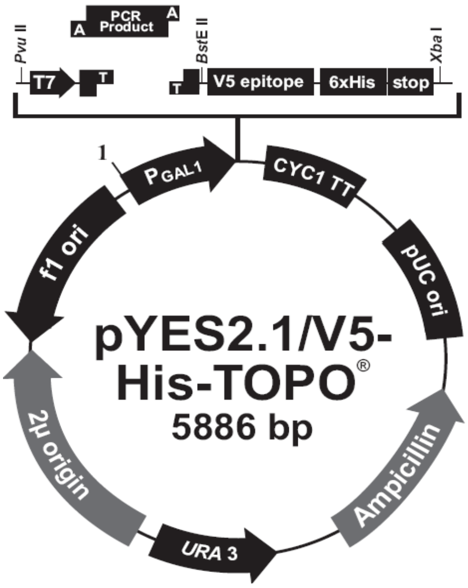
3.4.2 การถ่ายยีนและศึกษาการแสดงออกของยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* ในเซลล์สิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก ได้แก่ ยีสต์ และแบคทีเรีย

3.4.2.1 การถ่ายยีนและศึกษาการแสดงออกของยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH* ในเซลล์ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*)

เวคเตอร์ pYES 2.1/V5-His-TOPO ได้รับการออกแบบเพื่อชักนำการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ยีสต์ (*S. cerevisiae*) โดยมียีน *URA3* เป็นยีนควบคุมการอยู่รอดของเซลล์ยีสต์ การคัดเลือกเซลล์ยีสต์ที่มีพลาสมิดสายผสม อาศัยหลักการของ uracil prototrophy หมายถึง การที่เซลล์ยีสต์ที่เป็นผู้รับเป็น auxotroph ไม่มียีน *URA3* ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เบสยูราซิล (uracil) ดังนั้นเซลล์ยีสต์ชนิดนี้จึงไม่สามารถเจริญบนอาหารคัดเลือกได้ แต่เมื่อเซลล์ยีสต์ได้รับพลาสมิดสายผสมซึ่งมียีน *URA3* อยู่ ก็จะสามารถเจริญบนอาหารคัดเลือกได้

เวคเตอร์ pYES2.1/V5-His-TOPO (ภาพที่ 15; ภาคผนวกที่ 3ข) ประกอบด้วยส่วนสำคัญต่อการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ยีสต์ ดังนี้ (1) 2μ origin of replication สำหรับผลิตพลาสมิดให้มีจำนวนมาก (high copy plasmid) และรักษาสภาพของเซลล์ให้เซลล์ยีสต์อยู่ได้ (2) ยีน

URA3 เป็นยีนคัดเลือก สำหรับใช้คัดเลือกเซลล์ยีสต์ที่มีพลาสมิด ด้วยการแสดงลักษณะทางจีโนไทป์ของยีน *URA3* คือ มีการสังเคราะห์เบสยูราซิลได้เอง (3) C-terminal V5 eptitope and polyhistidine tag สำหรับการตรวจสอบแถบโปรตีนที่สนใจ และการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์โดยใช้ metal-chelating resin (4) Ampicillin resistance gene เป็นเครื่องหมายคัดเลือกในเซลล์ของแบคทีเรีย (5) Yeast GALI promoter สำหรับควบคุมให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ยีสต์ให้สูงขึ้น เมื่อใช้สารละลายกาแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน และหยุดการแสดงออกเมื่อใช้สารละลายกลูโคส (West et al., 1984, Giniger et al., 1985)



ภาพที่ 15 แผนที่ของเวคเตอร์ pYES2.1/V5-His-TOPO (Invitrogen, Paisely, UK)

การถ่ายยีนและศึกษาการแสดงออกของยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* ในเซลล์ยีสต์ มีขั้นตอนสำคัญ 5 ขั้นตอน ได้แก่

1. การเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับเวคเตอร์และเพิ่มปริมาณพลาสมิด

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.4.1.2 เชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pYES2.1/V5-His-TOPO (Invitrogen, Paisely, UK) ซึ่งเป็นเวคเตอร์ที่ควบคุมการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ยีสต์ โดยมีส่วนประกอบ (Invitrogen, Paisely, UK) ดังนี้

ดีเอ็นเอ	3	ไมโครลิตร
pYES2.1/V5-His-TOPO vector	1	ไมโครลิตร

salt solution 1 ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำพลาสมิดสายผสมถ่ายเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ TOP10F (Invitrogen, Paisely, UK) ดังนี้ ใส่ พลาสมิดสายผสม ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ในหลอดที่มีเซลล์ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ TOP10'F (Invitrogen, Paisely, UK) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มบนน้ำแข็ง นาน 20 นาที แล้วทำการ heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที แล้วปักบนน้ำแข็งทันที เติมอาหารเหลว S.O.C (S.O.C medium, Invitrogen, Paisely, UK) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง ดูดเซลล์ของแบคทีเรีย ปริมาตร 100 ไมโครลิตร วางและเกลี่ยเซลล์ของแบคทีเรียให้ทั่วบนอาหารแข็ง LB/Carb บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีสีขาวที่เกิดขึ้นบนอาหารแข็งคัดเลือก นำโคโลนีเดี่ยวสีขาวของแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB/Carb บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์ของแบคทีเรียมาสกัดพลาสมิดสายผสม โดยใช้ Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Kit (Invitrogen, Paisely, UK) ทดสอบความถูกต้องของพลาสมิดสายผสม โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยพลาสมิดสายผสมของ Le-scADH1 ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Eco*RI และ พลาสมิดสายผสมของ Le-scADH2 ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III และ *Xba*I และทำเช่นเดียวกับหัวข้อ 3.4.1.4 และนำพลาสมิดสายผสมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีขนาดของดีเอ็นเอถูกต้อง ไปทดสอบความถูกต้องโดยการหาลำดับเบสโดยใช้เครื่องวิเคราะห์หาลำดับเบสบนดีเอ็นเอ ใช้ไพรเมอร์ GAL I และ V5 และนำลำดับเบสที่ได้มาทำการวิเคราะห์ข้อมูลของลำดับ ดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ ซึ่งโปรแกรมนี้ใช้เปรียบเทียบข้อมูลและจัดหาลำดับเบสของมะเขือเทศที่ศึกษา หลังจากได้ลำดับเบสนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank (http://www.ncbi.hlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) ของมะเขือเทศ

2. การถ่ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ยีสต์

ยีสต์ (*S. cerevisiae*) สายพันธุ์ INVSc1 (Invitrogen, Paisely, UK) มีลักษณะแบบ auxotrophic for uracil คือ เซลล์ยีสต์ที่ไม่มียีน *URA3* ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เบสยูราซิล ดังนั้นเซลล์ยีสต์ชนิดนี้ ซึ่งไม่สามารถเจริญบนอาหารคัดเลือกที่ไม่มีสารยูราซิล (SC-U medium) ได้

การถ่ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ยีสต์ ใช้วิธีการของ UMR990-GBF INRA/INP-ENSAT (GBF lab, Toulouse, France) โดยมีหลักการว่าเมื่อนำเซลล์ยีสต์มาใส่ในสารละลายเกลือลิเธียม (Li) และสาร polyethylene glycol (PEG) ลิเธียมไอออนและสาร PEG จะทำให้ผนังเซลล์มีสภาพที่สามารถรับสารจากภายนอกเข้าไปได้ มีรายละเอียด ดังนี้

การเตรียมเซลล์ยีสต์ โดยการเลี้ยง yeast culture (wild type) ในอาหารเหลว YPD/ Glucose (YPD medium ใส่สารละลายกลูโคสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (OD_{600}) ทำการเจือจาง yeast culture ให้มีค่า OD_{600} เท่ากับ 2 ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทสารแขวนลอยทิ้ง ละลายตะกอนของเซลล์ยีสต์ด้วย 0.1M Lithium acetate (LiAc) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วย้ายสารละลายไปไว้ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที เทสารละลายทิ้ง ละลายตะกอนด้วย 0.1 M LiAc ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วดูดสารละลายปริมาตร 50 ไมโครลิตร ไปไว้ในหลอดใหม่ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที เทสารละลายทิ้ง จะได้ตะกอนของเซลล์ยีสต์ที่พร้อมรับการถ่ายพลาสมิด

การถ่ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ยีสต์ โดยการเติมส่วนประกอบต่าง ๆ ลงในหลอดที่มีตะกอนของเซลล์ยีสต์ ดังนี้

50% PEG (m/v)	240	ไมโครลิตร
1 M LiAc	36	ไมโครลิตร
Denatrued salmon sperm-DNA (2 mg/ml)	50	ไมโครลิตร
Plasmid	5	ไมโครลิตร
dH_2O	29	ไมโครลิตร

ละลายตะกอนของเซลล์ยีสต์กับสารละลายต่าง ๆ ให้เข้ากันโดยใช้ปิเปตแมนวนเบา ๆ แล้ว vortex นาน 1 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 120 รอบต่อนาที นาน 30 นาที บ่มต่อที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นปักบนน้ำแข็ง นาน 10 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที เทสารละลายทิ้ง และละลายตะกอนของเซลล์ยีสต์ด้วย dH_2O ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เกลี่ยบนอาหารแข็ง SC-U/Glucose/amino acid (SC-U agar medium, 2% glucose, 10x amino acid) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศา-เซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีสีขาวของยีสต์ที่เกิดขึ้น

การตรวจสอบโคโลนีของยีสต์ โดยการเลือกโคโลนีเดี่ยวสีขาวของเซลล์ยีสต์ มาทำการ streak บนอาหารแข็งคัดเลือก SC-U/Glucose/amino acid เพื่อแยกเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง แล้วเลือกโคโลนีของยีสต์มาทดสอบโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเวคเตอร์ pYES2.1/V5-His-TOPO และดีเอ็นเอของยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* ดังนี้ ไพรเมอร์ Gal I, V5, ADH1low, ADH2low (ภาคผนวกที่ 5ข)

ตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยการแยกด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิสใน 1% (w/v) อะกาโรส เจล, 0.5x TAE buffer ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที ตรวจสอบแถบของท่อนดีเอ็นเอโดยการย้อมด้วยสีย้อมเอทธิเดียมโบรไมด์ แล้วส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตภายใต้เครื่อง UV transluminator เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ขนาด 1 kb เมื่อได้โคโลนีของยีสต์ที่มีพลาสมิดสายผสมแล้ว นำไปทดสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์ยีสต์ต่อไป

3. การชักนำการแสดงออกของยีนในเซลล์ยีสต์

นำโคโลนียีสต์ที่มีพลาสมิดสายผสม ไปเลี้ยงในอาหารเหลว SC-U เพื่อเพิ่มปริมาณของเซลล์ยีสต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ยีสต์ และละลายตะกอนด้วยอาหารเหลว SC-U เจือจาง yeast culture จนวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD_{600}) ได้เท่ากับ 0.2 ก่อนทำการกระตุ้นให้เกิดการชักนำการแสดงออกของยีน ด้วยการเติมสารละลายกาแลคโตสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ โดยวัดค่าที่ OD_{600} และเก็บเซลล์ก่อนเติมกาแลคโตส และหลังเติมกาแลคโตส ที่ระยะเวลา 0, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที หลังจากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทสารละลายทิ้ง ละลายตะกอนของเซลล์ยีสต์ด้วยน้ำ dH_2O ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทสารละลายทิ้ง ละลายตะกอนของเซลล์ยีสต์ด้วยบัฟเฟอร์ (50 mM sodium phosphate, 10% glycerol, 2 mM β-mercaptoethanol) เพื่อรักษาสภาพของเอนไซม์ไว้ ทำการ vortex และแช่แข็งตะกอนยีสต์ด้วย liquid nitrogen แล้วทำการบดตะกอนของเซลล์ยีสต์ด้วยลูกเหล็ก (เครื่องบดแบบใช้ลูกเหล็ก) โดยใช้ liquid nitrogen ให้ละเอียด และเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อรอนำไปสกัดโปรตีนต่อไป

4. การสกัดโปรตีนและหาความเข้มข้นของโปรตีน

4.1 สกัดโปรตีน โดยการนำตะกอนของเซลล์ยีสต์วางบนน้ำแข็ง แล้วรอจนตะกอนของเซลล์ยีสต์ละลาย นำตะกอนไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 18,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แยกตะกอนทิ้งไป และเก็บสารแขวนลอยไว้ ในระหว่างรอการปั่นแยกตะกอนของเซลล์ยีสต์ ทำการเตรียมสารละลาย resin ซึ่งการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์นี้จะใช้ BD-cobalt affinity resin (BD Talon metal affinity resin, Clonetech, Chalfont, UK) เพื่อดักจับโปรตีนที่สนใจ โดยใส่สารละลาย resin ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร เติม buffer (50 mM sodium phosphate pH 7.5, 10% glycerol, 2 mM β-mercaptoethanol) ปริมาตร 35 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดที่มีสารละลาย resin แล้ว vortex ให้เข้ากัน และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที เทสารละลายทิ้ง ทำซ้ำแบบเดิม 2 ครั้ง แล้วเติมสาร

แขวนลอยที่ได้จากการปั่นแยกตะกอนของเซลล์ยีสต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในหลอดสารละลาย resin ทำการ vortex และวางหลอดบนน้ำแข็ง (ในขั้นตอนนี้ดูดสารแขวนลอยออกมา 50 ไมโครลิตร ใส่ไว้ในหลอดใหม่ และปักบนน้ำแข็ง) เขย่าบนเครื่องเขย่านาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที เทสารละลายทิ้ง เติมบัฟเฟอร์ ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร ทำการ vortex และวางหลอดบนเครื่องเขย่านาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศา-เซลเซียส นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที เทสารละลายทิ้ง แล้วทำเหมือนเดิมอีกหนึ่งครั้ง แต่เขย่าเพียง 5 นาที เทสารละลายทิ้ง ขั้นตอนต่อไปเป็นการล้างโปรตีนที่ต้องการออกจากสารละลาย resin โดยใช้ Imidazol buffer (50 mM sodium phosphate pH 7.5, 10% glycerol, 150 mM Imidazol) เติม Imidazol buffer ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่มีตะกอนโปรตีนและสารละลาย resin ทำการ vortex นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใส่สารแขวนลอยทั้งหมดลงในหลอดที่มี column filter ทิ้งไว้นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะได้ homogenate ที่มีโปรตีน นำ homogenate มาตรวจหาความเข้มข้นของโปรตีนรวม

4.2 ตรวจหาความเข้มข้นของโปรตีนรวม โดยวิธีของ Bradford (1976) มีขั้นตอน ดังนี้ เตรียม BSA standard ที่ความเข้มข้น 0.5, 0.75, 1 และ1.5 mg/ml และเตรียม homogenate ที่สกัดได้จากแต่ละขั้นตอน เพื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรตีน ดูด BSA standard และ homogenate แต่ละความเข้มข้นมาใส่หลอดใหม่ ตัวอย่างละ 400 ไมโครลิตร เติม protein assay dye reagent concentrate (Bio-rad Laboratories, Inc., CA) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ดูดใส่หลอดวัดค่าการดูดกลืนแสง ปริมาตร 200 ไมโครลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectro photometer สร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของ BSA และ ค่าการดูดกลืนแสง หาสมการความสัมพันธ์เชิงเส้น (linear regression) คำนวณหาปริมาณโปรตีนในแต่ละตัวอย่างโดยแทนค่าลงในสมการความสัมพันธ์เชิงเส้น (linear regression) แล้วจึงนำมาคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีน โดยใช้สูตร

$$\text{ความเข้มข้นของโปรตีน } (\mu g/\mu l) = \frac{\text{ปริมาณโปรตีน } (\mu g)}{\text{ปริมาตรของ homogenate } (\mu l)}$$

5. การตรวจสอบโปรตีน ADH ด้วยวิธี Western analysis

5.1 การแยกขนาดโปรตีนด้วยวิธี SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) เตรียม stacking gel ประกอบด้วย 5% polyacrylamide gel [สารละลาย polyacrylamide (29% (w/v) acrylamide และ 1% (w/v) *N,N'*-methyllene-bis-acrylamide), 0.126M Tris-HCl pH 8, 0.1% SDS,

0.1% ammonium persulfate และ 0.05x TEMED] และเตรียม separating gel ประกอบด้วย 12% polyacrylamide gel [สารละลาย polyacrylamide (29% (w/v) acrylamide และ 1% (w/v) N,N'-methyllene-bis-acrylamide), 0.375 M Tris-HCl pH 8, 0.1% SDS, 0.1% ammonium persulfate และ 0.05% TEMED] นำตัวอย่างโปรตีนผสมกับ loading dye (250 mM Tris pH 6.8, 30% glycerol, 2% SDS, 11.2% 2-ME, 0.1% bromophenol blue) นำไปต้มในน้ำเดือด นาน 5 นาที นำตัวอย่างโปรตีนใส่ลงไปในหลุมของแผ่นเจล (polyacrylamide gel) โดยใช้เครื่อง Mini-protein 12 ช่อง (Bio-RAD) และแยกด้วยกระแสไฟฟ้า 150 โวลต์ ใน 1x Tris-glycine pH 8.3 SDS buffer นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้อมแถบของโปรตีนด้วยสีย้อม colloidal blue นาน 1 ชั่วโมงหรือจนกระทั่งแถบของโปรตีนปรากฏ เปรียบเทียบขนาดของแถบโปรตีนกับโปรตีนมาตรฐาน (Prestained Protein Marker Broad Rang P77085) (BioLabs, Hercules, USA) และโปรตีนของ alcohol acyltransferase (AAT) ซึ่งใช้เป็น positive control

5.2 การตรวจสอบแถบโปรตีน ADH โดยใช้ Western blotting

ย้ายโปรตีนจากเจลไปยังแผ่น nitrocellulose membrane โดยการแช่แผ่นเจลลงใน blotting buffer (25 mM Tris, 125 mM glycine, 0.25% SDS, 5% methanol) และทำการย้ายโปรตีนจากเจลไปยัง nitrocellulose membrane (Hybond ECL, Amersham Pharmacia Biotech) โดยใช้เครื่อง electroblotting apparatus (BioRAD) หลังจากทำการย้ายโปรตีนเข้าสู่แผ่น nitrocellulose membrane แล้ว ให้นำแผ่น nitrocellulose membrane มาแช่ใน 1x TBS buffer (200 mM Tris-base, 1.37 M NaCl, 3% gelatin) เขย่าที่ความเร็ว 110 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ล้างแผ่น nitrocellulose membrane ด้วย 1x TBS buffer บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 110 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และแช่ nitrocellulose membrane ใน blocking solution (1x TBS buffer, 0.1% Tween 20, 1% gelatin) บ่มร่วมกับ 1^{o} antibody solution (Anti-V5) เขย่าที่ความเร็ว 110 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้าง nitrocellulose membrane ใน 1x TBS buffer (1x TBS buffer, 0.1% Tween 20) เขย่าที่ความเร็ว 110 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แช่ nitrocellulose membrane ใน blocking solution บ่มร่วมกับ 2^{o} antibody solution (Horseradish peroxidase; HRP) และเขย่าที่ความเร็ว 110 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้าง nitrocellulose membrane ใน 1x TBS buffer เขย่าที่ความเร็ว 110 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 3 ครั้ง และล้าง nitrocellulose membrane ใน 1x TBS buffer เขย่าที่ความเร็ว 110 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที หลังจากนั้นนำแผ่น nitrocellulose membrane มาผึ่งให้แห้ง และนำไปติดบนแผน X-ray film แล้วปิดทับด้วย plastic warp ทำ autoradiograph ด้วยการใส่ Koduk XAR-5 film และปิดทับด้วย

intensify screen ภายใน cassette ในห้องมืด เก็บ cassette ไว้ที่อุณหภูมิ -7 องศาเซลเซียส ข้ามคืน แล้ว develop X-ray film ด้วยน้ำยาล้างฟิล์ม จะได้แผ่นฟิล์มที่มีแถบโปรตีนที่ต้องการ

6. การตรวจวัด ADH activity

การตรวจวัดระดับ ADH activity (ปฏิกิริยา reductase และ dehydrogenase) ใช้วิธีของ Molina et al. (1987) โดยแบ่งเป็น 2 การทดสอบ (ตารางที่ 4) ได้แก่ 1) การทดสอบ reductase activity (การที่เอนไซม์ ADH เปลี่ยนสารพวกอัลดีไฮด์ให้เป็นสารพวกแอลกอฮอล์ โดยใช้ NADH หรือ NADPH เป็นโคแฟกเตอร์) โดยใช้สารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย โปรตีนบริสุทธิ์ (1–2 ไมโครกรัม) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร, 200 mM aldehyde ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, 50 mM NADH/NADPH ปริมาตร 4.8 ไมโครลิตร, 50 mM sodium phosphate buffer (pH 5.8) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และ 2) การทดสอบ dehydrogenase activity (การที่เอนไซม์ ADH เปลี่ยนสารพวกแอลกอฮอล์ให้เป็นสารพวกอัลดีไฮด์ โดยใช้ NAD หรือ NADH เป็นโคแฟกเตอร์) โดยใช้สารละลายปริมาตร 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย โปรตีนบริสุทธิ์ (1–2 ไมโครกรัม) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร, 200 mM alcohol ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, 5 mM NAD/NADH ปริมาตร 4.8 ไมโครลิตร, 50 mM sodium phosphate buffer (pH 5.8) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ตรวจวัดระดับซับสเตรท ที่ถูกใช้ไปในการทำปฏิกิริยาต่อหนึ่งหน่วยเวลา (1 นาที) โดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง วัดค่าที่ 340 นาโนเมตร ทุก ๆ 1 นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วบันทึกการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสง นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟเส้นเพื่อคำนวณหาค่า ADH activity จากสมการความสัมพันธ์เชิงเส้น และใช้วิธีของ Lineweaver and Burk Kinetic คำนวณ kinetic parameter (K_m และ V_{max}) ของ ADH โดยการใช้ความเข้มข้นของ acetaldehyde/ethanol ที่แตกต่างกัน นำมาสร้างกราฟเส้น (ภาพภาคผนวกที่ 1ก-5ก)

ตารางที่ 4 องค์ประกอบในการทดสอบ ADH activity

ปฏิกิริยา	ส่วนผสม			
	สารตั้งต้น	**โคแฟกเตอร์**	**บัฟเฟอร์**	**โปรตีนบริสุทธิ์**
Reductase activity	Acetaldehyde Caponaldehyde Tran-2-hexanal Benzaldehyde Butiraldehyde	NADH	50 mM sodium phosphate buffer (pH 5.8)	*Le-scADH1*, *Le-scADH2*
Dehydrogenase activity	Ethanol Benzyl alcohol Tran-2-hexanol Hexan-1-ol Isoamyl alcohol	NAD^+	Glycine-NaOH buffer (pH 9.4)	*Le-scADH1*, *Le-scADH2*

3.4.2.2 การถ่ายยีนและศึกษาการแสดงออกของยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* ในเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21

มีขั้นตอนสำคัญ 5 ขั้นตอน ได้แก่

1. การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ Le-scADH1 และ Le-scADH2 กับเวคเตอร์ pET 15b และเพิ่มปริมาณพลาสมิด

นำพลาสมิดสายผสมของยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* (เวคเตอร์ pGEM-T และดีเอ็นเอของยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2*) ที่ได้จากข้อ 3.4.1.4 และเวคเตอร์ pET 15b (Novagen, ภาพภาคผนวกที่ 7ข) ซึ่งเป็นเวคเตอร์ที่ควบคุมการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยเวคเตอร์ pET 15b และพลาสมิดของยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I และ *Xho*I โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 1 unit , plasmid DNA 200 ng, 1x buffer และเติม dH_2O จนครบ 10 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ตรวจสอบขนาดของท่อนดีเอ็นเอโดยการแยกด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิสใน 1% (w/v) อะกาโรสเจล, 0.5x TAE buffer ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที ตรวจ สอบท่อนดีเอ็นเอ โดยการย้อมเจลด้วยสีย้อมเอทธิเดียมโบรไมด์ แล้วส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตภายใต้เครื่อง UV transluminator เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb และ 100 bp เมื่อได้ขนาดของท่อนดีเอ็นเอที่ถูกต้องแล้ว ทำการตัดแถบดีเอ็นเอและสกัดท่อนดีเอ็นเอที่ต้องการจากเจลอะกาโรส แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit ซึ่งได้อธิบายวิธีการไว้แล้วในข้อ 3.4.1.3 ตรวจสอบขนาดของท่อนดีเอ็นเอของเวคเตอร์ pET 15b, ดีเอ็นเอ Le-scADH1 และ Le-scADH2โดยการแยกด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิสอีกครั้ง เมื่อได้ขนาดของเวค เตอร์และดีเอ็นเอที่ถูกต้องแล้วนำมาเชื่อมต่อเข้าด้วยกัน โดยมีองค์ประกอบต่าง ๆ (Promega, Madison, USA) ดังนี้

dH_2O	9	ไมโครลิตร
10x buffer T4 DNA ligase	2	ไมโครลิตร
Vector (pET 15b) purified	3	ไมโครลิตร
DNA purified	5	ไมโครลิตร
T4 DNA ligase (3 U/µl)	1	ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำพลาสมิดสายผสมปริมาตร 2 ไมโครลิตร ถ่ายเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5-α ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มบนน้ำแข็ง นาน 30 นาที หลังจากนั้นทำการ heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 1.30 นาที แล้วปักบนน้ำแข็งทันที เติมอาหารเหลว LB ปริมาณ 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศา

เซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง ดูดเซลล์ของแบคทีเรีย ปริมาตร 100 ไมโครลิตร วางและเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB/Carb สังเกตโคโลนีของแบคทีเรียที่เกิดขึ้น นำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB/Carb นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง นำเซลล์ของแบคทีเรียมาสกัดพลาสมิดสายผสม โดยใช้ Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Kit ทดสอบความถูกต้องของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่อยู่ในพลาสมิด โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I และ *Xho*I โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 1 unit, plasmid DNA 200 ng, 1x buffer และ dH_2O จนครบ 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปในพลาสมิดโดยการแยกด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิสใน 1% (w/v) อะกาโรสเจล, 0.5x TAE buffer ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที ตรวจสอบแถบของท่อน ดีเอ็นเอโดยการย้อมด้วยสีย้อมเอทธิเดียมโบรไมด์ แล้วส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต ภายใต้เครื่อง UV transluminator เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb และ 100 bp และนำพลาสมิดสายผสมที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีขนาดดีเอ็นเอถูกต้อง มาตรวจยืนยันโดยดูลำดับเบสด้วยวิธี DNA sequencer โดยใช้ไพรเมอร์ M13 forward และ M13 reverse ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ

2. การถ่ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21

การถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 มีวิธีการเหมือนกับการถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5-α เมื่อได้โคโลนีของแบคทีเรียที่มีพลาสมิดสายผสม นำไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB/Carb บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 3 ชั่วโมง วัดค่า OD_{600} และเจือจาง bacteria cell culture ให้มีค่า OD_{600} ประมาณ 0.5-1 จึงทำการชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีนด้วยการเติม 0.5 mM IPTG โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และเก็บเซลล์ก่อนเติม IPTG และหลังเติม IPTG ทุก 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบ หลังจากนั้นนำเซลล์ของแบคทีเรียมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทสารละลายทิ้ง แช่ตะกอนแบคทีเรียใน liquid nitrogen และเก็บตะกอนแบคทีเรียไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3. การสกัดโปรตีนและเอนไซม์ ใช้วิธีการเดียวกับการทดลองในเซลล์ยีสต์

4. การตรวจสอบ ADH activity การตรวจวัด ADH activity โดยตรวจวัดจากปฏิกิริยา reductase และ dehydrogenase โดยใช้วิธีการเดียวกับการทดสอบในเซลล์ยีสต์

3.4.3 การโคลนยีนและสร้าง constructs เพื่อถ่ายยีนเข้ามะเขือเทศ

3.4.3.1 การโคลนยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2*

นำ cDNA ที่ได้จากการทำ RT-PCR มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีการออกแบบให้มีตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะอยู่ส่วนหัวและท้ายของตำแหน่ง anitsense และ sense (ตารางที่ 5 และตารางภาคผนวกที่ 1ก) และใช้ Isis DNA polymerase ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณใช้ reaction mixture 50 µl/reaction ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 50 ng, 1x Isis incubation buffer, 2 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs, 0.4 µM primer และ 1 unit Isis DNA polymerase โดยใช้สภาวะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนี้

94 °ซ	นาน 5 นาที	1 รอบ
94 °ซ	นาน 30 วินาที	39 รอบ
52 °ซ	นาน 30 วินาที	
72 °ซ	นาน 1.30 นาที	
72 °ซ	นาน 7 นาที	1 รอบ

หลังจากเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้วจึงเติม 5 mM dATP ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ 1 unit Taq DNA polymerase บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอ โดยการแยกด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิสใน 1% (w/v) อะกาโรสเจล, 0.5x TAE buffer ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที ตรวจสอบแถบของท่อนดีเอ็นเอ โดยการย้อมเจลด้วยสีย้อมเอทธิเดียมโบรไมด์ แล้วส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตภายใต้เครื่อง UV transluminator เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb เมื่อได้ขนาดของดีเอ็นเอที่ถูกต้องแล้ว ทำการตัดแถบดีเอ็นเอและสกัดท่อนดีเอ็นเอจากเจลอะกาโรส แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit ซึ่งได้อธิบายวิธีการไว้แล้วในข้อ 3.4.1.3

ตารางที่ 5 ไพรเมอร์ตำแหน่ง antisense และ sense ของยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2*

ยีน	ตำแหน่ง antisense	ตำแหน่ง sense
Le-scADH1	LeADH1-Nco I (up1)	LeADH1-Pst I (up2)
	LeADH1-Xba I (low1)	LeADH1-EcoR I (low2)
Le-scADH2	LeADH2-Nco I (up1)	LeADH2-Pst I (up2)
	LeADH2-Xba I (low1)	LeADH2-EcoR I (low2)

3.4.3.2 การตรวจสอบความถูกต้องของดีเอ็นเอ Le-scADH1 และ Le-scADH2 ที่เพิ่มปริมาณได้ มีวิธีการดังนี้

1. นำท่อนดีเอ็นเอที่สกัดได้เชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pGEM-T ซึ่งได้อธิบายวิธีการไว้แล้วในข้อ 3.4.1.4

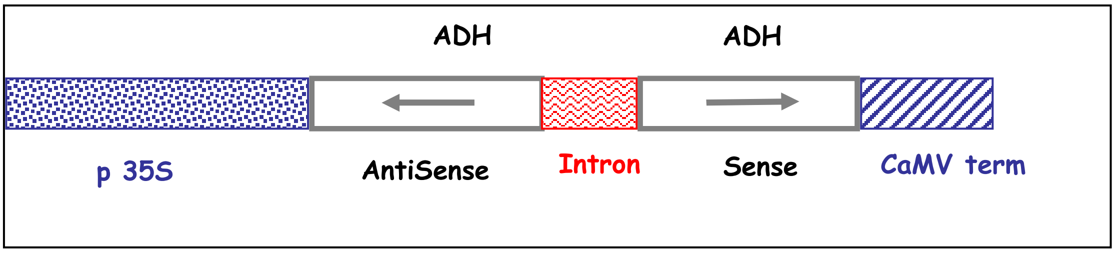
2. นำพลาสมิดสายผสมถ่ายเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5-α ซึ่งได้อธิบายวิธีการไว้แล้วในข้อ 3.4.1.4

3. นำเซลล์ของแบคทีเรียมาสกัดพลาสมิดสายผสม โดยใช้ Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Kit ซึ่งได้อธิบายวิธีการไว้แล้วในข้อ 3.4.1.4

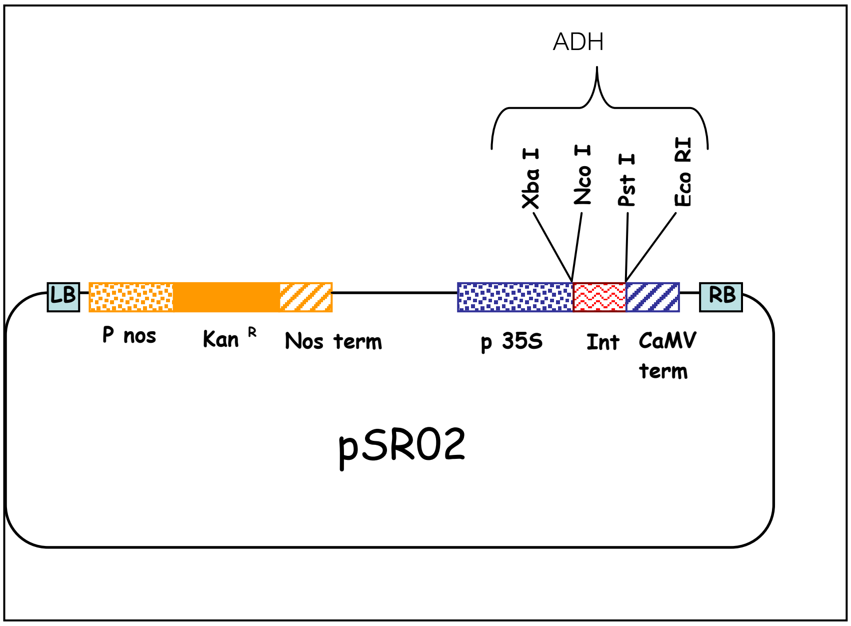
4. ทดสอบความถูกต้องของพลาสมิดสายผสม โดยนำพลาสมิดของ Le-scADH1 และ Le-scADH2 ส่วน antisense ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I และ *Xba*I และ พลาสมิดของ Le-scADH1 และ Le-scADH2 ส่วน sense ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I และ *Eco*RI โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 1 unit, plasmid DNA 200 ng, 1x buffer และเติม dH_2O จนครบ 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ตรวจสอบขนาดของท่อนดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปในพลาสมิด โดยการแยกด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิสใน 1% (w/v) อะกาโรสเจล, 0.5x TAE buffer ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที ตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยการย้อมด้วยสีย้อมเอทธิเดียมโบรไมด์ แล้วส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตภายใต้เครื่อง UV transluminator เปรียบเทียบขนาดของแถบ ดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb

3.4.3.3 การสร้าง construct

การสร้าง construct ใช้ expression cassette ซึ่งมีโปรโมเตอร์ CaMV 35S และ CaMV polyadenylation signal ตัดต่ออยู่ใน pGreen029 binary vector (Hellens et al., 2000) โดยมี intron ขนาด 300 bp (Vaneanneyt et al., 1990) คั่นระหว่าง CaMV 35S promoter และ CaMV polyadenylation signal หลังจากนั้นนำพลาสมิดส่วน antisense และ sense ไปวางตามตำแหน่งของ RNA interference (RNAi) (ภาพที่ 16 และ 17)



ภาพที่ 16 รูปแบบของ RNAi construct (GBF lab, Toulouse, France)



ภาพที่ 17 การจัดวางตำแหน่งของยีนในเวคเตอร์ pSRO2 (GBF lab, Toulouse, France)

การสร้าง construct มีวิธีการดังต่อไปนี้

1. การเชื่อมต่อเวคเตอร์ pSRO2 กับดีเอ็นเอส่วน antisense ของ Le-scADH1 และ Le-scADH2

การทดลองนี้ใช้เวคเตอร์ pSRO2 เป็นเวคเตอร์หลักในการสร้าง construct โดยนำเวคเตอร์ pSRO2 และพลาสมิดสายผสมส่วน antisense ของ Le-scADH1 และ Le-scADH2 (เวคเตอร์ pGEM-T และดีเอ็นเอ Le-scADH1 และ Le-scADH2) ที่ได้จากข้อ 3.4.3.2 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัด-จำเพาะ *Nde*I และ *Xba*I โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 1 unit, plasmid DNA 200 ng, 1x buffer และเติม dH_2O จนครบ 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปในพลาสมิดโดยการแยกด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิสใน 1% (w/v) อะกาโรสเจล, 0.5x TAE buffer ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที ตรวจสอบขนาดของท่อนดีเอ็นเอโดยการย้อมด้วยสีย้อมเอทธิเดียมโบรไมด์ แล้วส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตภายใต้เครื่อง UV transluminator เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb จะได้ท่อนดีเอ็นเอและท่อนเวคเตอร์ที่ต้องการ ทำการตัดแถบดีเอ็นเอและสกัดท่อนดีเอ็นเอจากเจลอะกาโรส โดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit ซึ่งได้อธิบายวิธีการไว้แล้วในข้อ 3.4.1.3 นำท่อนเวคเตอร์และ ดีเอ็นเอมาเชื่อมต่อกัน โดยมีองค์ประกอบ (Promega, Madison, USA) ดังนี้

dH_2O	9	ไมโครลิตร

10x buffer T4 DNA ligase	2	ไมโครลิตร
pSRO2 vector purify	3	ไมโครลิตร
DNA purify	5	ไมโครลิตร
T4 DNA ligase (3 U/μl)	1	ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายพลาสมิดสายผสม (เวคเตอร์ pSRO2 และดีเอ็นเอของ Le-scADH1 และ Le-scADH2) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เข้าไปในเซลล์ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5-α ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดสายผสม บ่มบนน้ำแข็ง นาน 30 นาที หลังจากนั้นทำ heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที ปักบนน้ำแข็งทันที นาน 2 นาที เติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง ปิเปตเซลล์ของแบคทีเรียปริมาตร 100 ไมโครลิตร เกลี่ยให้ทั่วบนอาหารแข็ง LB/Kana (LB agar medium, 100 mg/l kanamycin) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีสีขาวและสีฟ้าของแบคทีเรียที่เกิดขึ้น นำโคโลนีเดี่ยวสีขาวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB/Kana บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มปริมาณของเซลล์แบคทีเรีย แล้วนำเซลล์แบคทีเรียมาสกัดพลาสมิดสายผสม โดยวิธี Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System ทดสอบความถูกต้องของพลาสมิดสายผสม โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I และ *Xba*I โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 1 unit, plasmid DNA 200 ng, 1x buffer และเติม dH_2O ครบ 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปในพลาสมิดโดยการแยกด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิสใน 1% (w/v) อะกาโรสเจล, 0.5x TAE buffer ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที ตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยการย้อมด้วยสีย้อมเอทธิเดียมโบรไมด์ แล้วส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตภายใต้เครื่อง UV transluminator เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb พลาสมิดสายผสมที่ได้จากขั้นตอนนี้แทนด้วยสัญลักษณ์ ดังนี้

pSRO2 + Le-scADH1 (NcoI-XbaI)	=	pB1
pSRO2 + Le-scADH2 (NcoI-XbaI)	=	pB2

2. การเชื่อมต่อพลาสมิด pB1 และ pB2 กับดีเอ็นเอส่วน sense ของ Le-scADH1 และ Le-scADH2

ใช้พลาสมิด pB1 และ pB2 และพลาสมิดสายผสมส่วน sense ของ Le-scADH1 และ Le-scADH2 (เวคเตอร์ pGEM-T และดีเอ็นเอ Le-scADH1 และ Le-scADH2) ที่ได้จากข้อ

3.4.3.2 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I และ *Eco*RI โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 1 unit, 200 ng plasmid DNA, 1x buffer และ dH_2O บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปในพลาสมิด โดยการแยกด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิสใน 1% (w/v) อะกาโรสเจล, 0.5x TAE buffer ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที ตรวจสอบขนาดของแถบ ดีเอ็นเอโดยการย้อมด้วยสีย้อมเอทธิเดียมโบรไมด์ แล้วส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตภายใต้เครื่อง UV transluminator เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ขนาด 1 kb จะได้ท่อน ดีเอ็นเอและท่อนเวคเตอร์ตามที่ต้องการ ทำการตัดแถบดีเอ็นเอและสกัดท่อนดีเอ็นเอและเวคเตอร์จากเจลอะกาโรส โดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit ซึ่งได้อธิบายวิธีการไว้แล้วในข้อ 3.4.1.3 นำมาเชื่อมต่อกันโดยมีองค์ประกอบ (Promega, Madison, USA) ดังนี้

dH_2O	9	ไมโครลิตร
10x buffer T4 DNA ligase	2	ไมโครลิตร
pB1, pB2 vector purified	3	ไมโครลิตร
DNA purified	5	ไมโครลิตร
T4 DNA ligase (3 U/μl)	1	ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายพลาสมิดสายผสม pB1+ *Le-scADH*1 (Pst I-EcoR I) และ pB2+ *Le-scADH*2 (Pst I-EcoR I)) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใส่เข้าไปในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5-α ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดสายผสม บ่มบนน้ำแข็ง นาน 30 นาที หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที แล้วตั้งบนน้ำแข็ง นาน 2 นาที เติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง ดูดเซลล์แบคทีเรียปริมาตร 100 ไมโครลิตร เกลี่ยให้ทั่วบนอาหารแข็ง LB/Kana บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีสีขาวและสีฟ้าของแบคทีเรียที่เกิดขึ้น นำโคโลนีเดี่ยวสีขาวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB/Kana บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ของแบคทีเรีย แล้วนำเซลล์ของแบคทีเรียมาสกัดพลาสมิดสายผสม โดยวิธี Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System ทดสอบความถูกต้องของพลาสมิดสายผสม โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I และ *Eco*RI โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 1 unit, plasmid DNA 200 ng, 1x buffer และ dH_2O บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ใส่เข้าไปในพลาสมิดโดยการแยกด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิสใน 1% (w/v) อะกาโรสเจล, 0.5x TAE buffer ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที ตรวจสอบขนาดของแถบดี-เอ็นเอโดยการย้อมด้วยสี

ย้อมเอทธิเดียมโบรไมด์ แล้วส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตภายใต้เครื่อง UV transluminator เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb พลาสมิดสายผสมที่ได้จากขั้นตอนนี้แทนด้วยสัญลักษณ์ ดังนี้

pB1 + Le-scADH1 (PstI-EcoRI)	=	pB3
pB2 + Le-scADH2 (PstI-EcoRI)	=	pB4

3.4.3.4 การถ่ายชิ้นส่วน constructs เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *A. tumefaciens*

นำ construct pB3 และ pB4 ถ่ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 โดยใช้วิธี freeze-thaw (feeze ใน liquid nitrogen และ thaw ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส) (Holsters et al., 1978) ดังนี้ เลี้ยงเซลล์ของแบคทีเรีย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA 4404 ในอาหารเหลว LB/Rif/Tetra (LB medium, 50 mg/ml rifampicin, 5 mg/ml tetracycline) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 48 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที เทสารละลายทิ้ง ละลายตะกอนแบคทีเรียด้วยสารละลาย 20 mM calcium chloride ($CaCl_2$) ที่เย็นจัด ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แบ่งหลอดออกเป็น 2 หลอด ๆ ละ 100 ไมโครลิตร วางบนน้ำแข็ง นำ construct ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดเดียวกับแบคทีเรีย *A. tumefaciens* แล้วนำหลอดที่มีทั้ง construct และแบคทีเรีย *A. tumefaciens* แช่ใน liquid nitrogen นาน 1 นาที และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที เติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่มี construct และ *A. tumefaciens* บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศา เซลเซียส ที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที นาน 4 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยง เทสารละลายทิ้ง ละลายตะกอนด้วยอาหารเหลว LB นำสารละลายไปเกลี่ยไว้บนอาหารแข็ง LB/Rif/Tetra/Kana (LB medium, 50 mg/L rifampicin , 5 mg/ml tetracycline, 50 mg/L kanamycin) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศา เซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นำโคโลนีของแบคทีเรียที่ได้มาตรวจสอบการมี construct โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ และใช้ไพรเมอร์จำเพาะ โดยโคโลนีของแบคทีเรียที่มี construct pB3ใช้ไพรเมอร์จำเพาะ 2 คู่ คือ 1) LeADH1-Xba low และ LeADH1 Eco low สำหรับตรวจสอบการมีท่อนดีเอ็นเอของ antisense, intron และ sense ซึ่งขนาดที่ได้ควรมีขนาดเท่ากับ 400 bp + 300 bp + 400 bp เท่ากับ 1,100 bp และ 2) LeADH1-Pst up และ LeADH1 Eco low สำหรับตรวจสอบว่ามีท่อนดีเอ็นเอของ sense (400 bp) และในโคโลนีของแบคทีเรียที่มี construct pB4 ใช้ไพรเมอร์จำเพาะ 2 คู่ คือ 1) LeADH2-Xba low และ LeADH2 Eco low สำหรับตรวจสอบว่ามีท่อน ดีเอ็นเอของ antisense, intron และ sense ซึ่งขนาดที่ได้ควรมีขนาดเท่ากับ 400 bp + 300 bp + 400 bp เท่ากับ 1100 bp และ 2) LeADH2-Pst up และ LeADH2-Eco low สำหรับตรวจสอบว่ามีท่อนดีเอ็นเอของ sense (400 bp) ตรวจสอบ

ขนาดของดีเอ็นเอโดยการแยกด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิสใน 1% (w/v) อะกาโรสเจล, 0.5x TAE buffer ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที ตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยการย้อมด้วยสีย้อมเอทธิเดียมโบรไมด์ แล้วส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตภายใต้เครื่อง UV transluminator เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb

3.4.4 การถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศ

เมื่อได้โคโลนีของแบคทีเรีย *A. tumefaciens* ที่มี construct แล้ว นำมาถ่ายเข้าสู่มะเขือเทศ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Ling (1998) ดังต่อไปนี้

3.4.4.1 การเตรียมชิ้นส่วนพืช

ฟอกเมล็ดมะเขือเทศพันธุ์ Microtom ด้วยสารละลาย 20% (v/v) Clorox, (2% (w/v) sodium hypochlorite) นาน 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง นำเมล็ดมะเขือเทศไปเพาะบนอาหารแข็ง MS (MS agar) (ตารางภาคแผนวกที่ 2ก) หุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 4 วัน หลังจากวันที่ 4 ให้เปิดอลูมิเนียมฟอยล์ออก แล้วบ่มต่อไปอีก 3 วัน จะเริ่มเห็นลำต้นอ่อน และใบเลี้ยง ซึ่งต้นกล้าอายุประมาณ 7-10 วัน เป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีน

3.4.4.2 การเตรียมอาหารเพื่อใช้ในการถ่ายยีน

ก่อนวันที่จะตัดลำต้นอ่อน และใบเลี้ยง ให้เตรียมอาหารแข็ง MSrk ก่อน (ตารางภาคแผนวกที่ 2ก) และใส่เซลล์ยาสูบ (tobacco cell suspension) ไว้บนหน้าอาหาร MSrk เกลี่ยเซลล์ยาสูบให้ทั่ว บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 1 คืน หลังจากทำการบ่มแล้ว ให้นำกระดาษกรองที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วมาวางทับบนเซลล์ยาสูบอีกที

3.4.4.3 การตัดชิ้นส่วนใบเลี้ยงและลำต้นอ่อน

นำต้นกล้ามะเขือเทศที่มีอายุระหว่าง 7–10 วัน มาตัดลำต้นอ่อน และใบเลี้ยงเป็นท่อน ๆ ละประมาณ 1 เซนติเมตร วางบนกระดาษกรองที่วางอยู่บนอาหารแข็ง MSrk บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน

3.4.4.4 การเตรียมเซลล์ของแบคทีเรีย *A. tumefaciens* ที่มี construct เพื่อเตรียมถ่ายเข้าสู่ใบเลี้ยงและลำต้นอ่อนของมะเขือเทศ

เลี้ยงเซลล์ของแบคทีเรีย *A. tumefaciens* ที่มี construct ในอาหารเหลว LB/Rif/ Kana ปริมาตร 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที นาน 48 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทสารละลายทิ้งไป และละลายตะกอนแบคทีเรียด้วยอาหารเหลว MSl (ตารางภาคแผนวกที่ 2ก) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 3

3.4.4.5 การถ่ายยีนเข้าสู่ใบเลี้ยงและลำต้นอ่อนของมะเขือเทศ

นำลำต้นอ่อน และใบเลี้ยง ใส่ลงในอาหารเหลว MSl ที่มีเซลล์ของแบคทีเรีย *A. tumefaciens* เขย่าบน rotary shaker ที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำลำต้นอ่อน และใบเลี้ยง มาวางผึ่งไว้บนกระดาษกรองเพื่อซับสารละลายส่วนเกินออก และนำกลับมาวางบนอาหาร MSrk จานเดิม บ่มนาน 2 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

3.4.4.6 การชักนำยอดและราก

มื่อครบกำหนด 2 วันจึงย้ายชิ้นส่วนลำต้นอ่อน และใบเลี้ยงลงบนอาหารแข็งชักนำยอด MSt (MS agar, 2 mg/l zeatin, ticarcilline, 150 mg/l ticarcilline และ 50 mg/l kanamycin) (ตารางภาคแผนวกที่ 2ก) ทำการเปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์ เมื่อลำต้นอ่อน และใบเลี้ยงแตกยอด จึงตัดยอดแล้วย้ายลงในอาหารแข็งชักนำราก MSr (MS agar, 0.5 mg/l IAA, 150 mg/l ticarcilline และ 50 mg/l kanamycin) (ตารางภาคแผนวกที่ 2ก) เมื่อได้ต้นกล้ามะเขือเทศที่สมบูรณ์ จึงทำการคัดเลือกต้นกล้ามะเขือเทศที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาตรงตามข้อกำหนด แล้วย้ายต้นกล้ามะเขือเทศที่ผ่านการคัดเลือกลงปลูกในวัสดุปลูก และนำไปเลี้ยงไว้ในห้องเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้น 80 เปอร์เซ็นต์ และ ช่วงเวลาการให้แสงสว่างต่อความมืด 16/8 ชั่วโมง

3.4.4.7 การเก็บเมล็ด

เมื่อมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมติดผล และผลแก่เต็มที่แล้วจึงเก็บเมล็ด ทำความสะอาดและผึ่งเมล็ดให้แห้ง เก็บใส่ซองข้อมูล เมื่อได้เมล็ดมากพอ จึงแบ่งเมล็ดมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมส่วนหนึ่งมาทดสอบในอาหารแข็ง MS/Kana (MS agar, 30 mg/l kanamycin) โดยการฟอกเมล็ดมะเขือเทศด้วยสารละลาย 20% (v/v) Clorox, (2% (w/v) sodium hypochlorite) นาน 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง นำเมล็ดไปเพาะบนอาหารแข็ง MS/Kana บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส รอจนกระทั่งเมล็ดมะเขือเทศงอกเป็นต้นกล้า จึงนำมาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา แล้วย้ายต้นกล้ามะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาครบตามที่กำหนดลงปลูกในวัสดุปลูก และปล่อยให้ต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมผสมตัวเอง ทำการเก็บเมล็ด และนำเมล็ดมาปลูกทดสอบเพื่อทำการคัดเลือกในรุ่นต่อไป

3.4.4.8 การประเมินลักษณะของต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม

การประเมินลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทำการคัดเลือกเมื่อเมล็ดเจริญเติบโตเป็นต้นกล้า โดยต้นกล้ามะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ดีจะมีลักษณะ 3 ประการ ดังนี้ 1) มีรากหลักและรากแขนงมาก 2) มีลำต้นอ่อนสีเขียว 3) มียอดหลักที่พร้อมจะพัฒนา (อ้างอิงจาก GBF Lab, Toulouse, France) โดยจะทำการประเมินต้นกล้าทุกครั้งก่อนนำไปปลูกลงในวัสดุปลูก

การประเมินโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ โดยนำต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม pB3 และ pB4 (T0-generation) มาทดสอบเพื่อหาต้นมะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายยีนเข้ามาจริง โดยการสกัดดีเอ็นเอจากใบ (GBF lab, Toulouse, France) นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ ขั้นตอนการ

เพิ่มปริมาณใช้ reaction mixture (50 µl/reaction) ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 50 ng, 1x buffer, 2 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP, 0.4 µM primer และ 1 unit taq DNA Polymerase โดยใช้สภาวะในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนี้

94 °ซ	นาน 5 นาที	1 รอบ
94 °ซ	นาน 30 วินาที	39 รอบ
52 °ซ	นาน 30 วินาที	
72 °ซ	นาน 1.30 นาที	
72 °ซ	นาน 7 นาที	1 รอบ

ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอโดยการแยกด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิสใน 1% (w/v) อะกาโรสเจล, 0.5x TAE buffer ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที ตรวจสอบขนาดของแถบ ดีเอ็นเอโดยการย้อมด้วยสีย้อมเอทธิเดียมโบรไมด์ แล้วส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตภายใต้เครื่อง UV transluminator เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb และดีเอ็นเอของมะเขือเทศปกติ

3.4.4.9 การเก็บข้อมูล

เก็บข้อมูลโดยบันทึกเปอร์เซ็นต์ชิ้นส่วนมะเขือเทศที่สามารถพัฒนาเป็นต้นได้ บันทึกลักษณะของต้นมะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายยีนเข้าไป และบันทึกลักษณะของต้นกล้ามะเขือเทศที่นำมาทดสอบบนอาหารแข็งคัดเลือกพร้อมทั้งเปอร์เซ็นต์ต้นที่มียีนอยู่

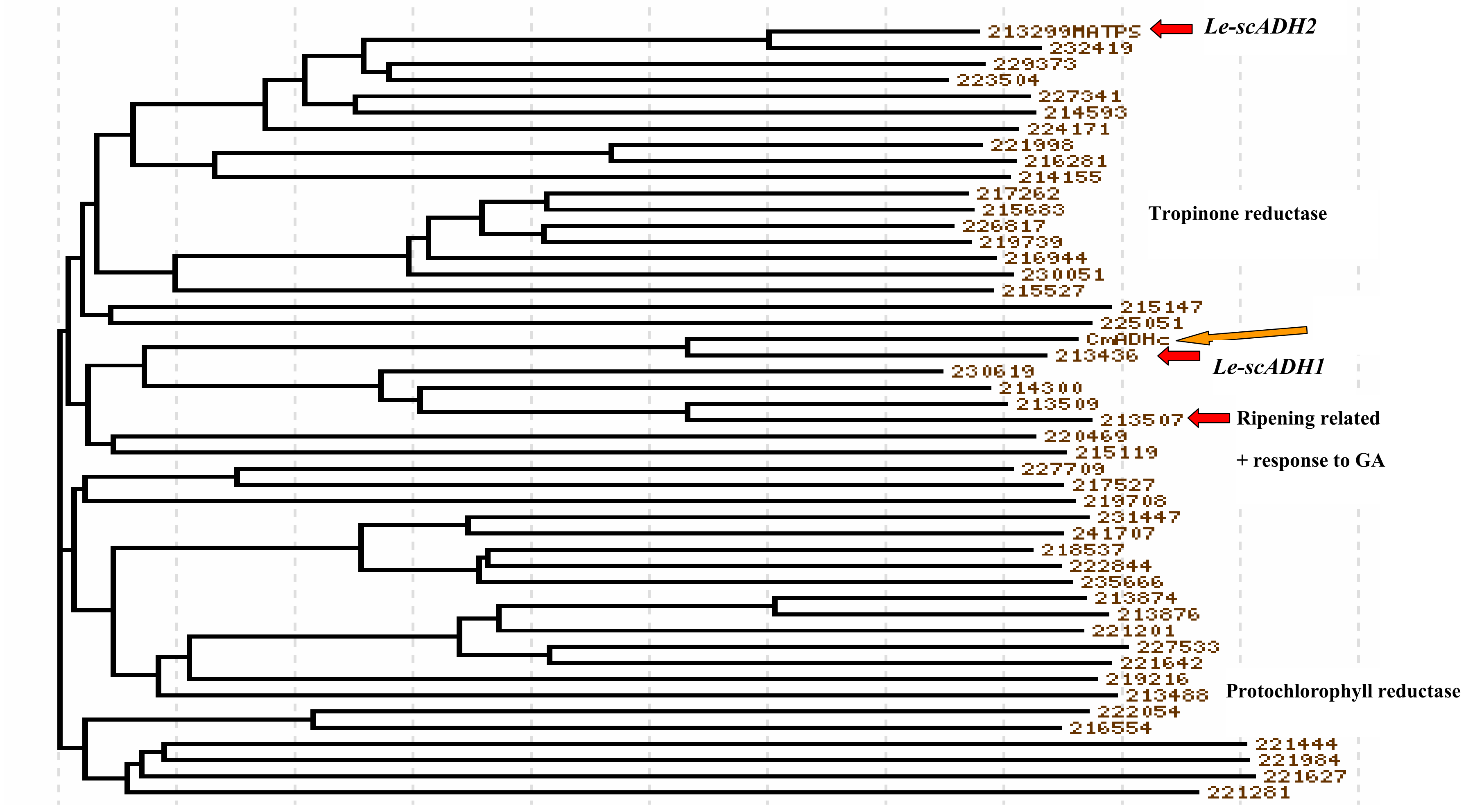
บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การโคลนยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* จากผลสุกของมะเขือเทศ

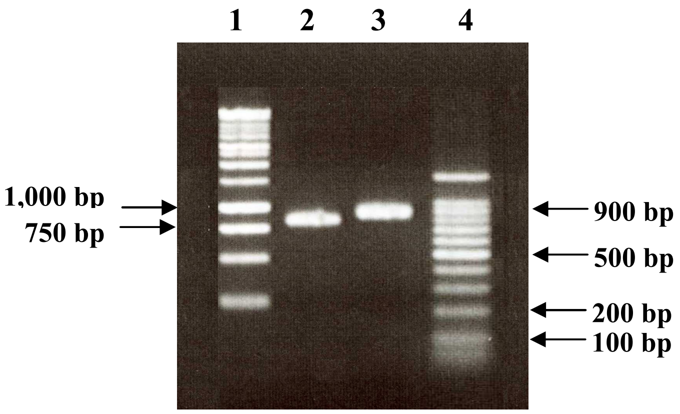
การทดลองนี้เริ่มต้นจากการศึกษางานของ Manriquez et al. (2006) ซึ่งได้ศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของยีน ADH ในระหว่างการสุกของแคนตาลูป และการควบคุมการแสดงออกโดยเอทธิลีนโดยพบยีน ADH จำนวน 2 ยีน คือ ยีน *CmADH1* เป็นยีนที่ควบคุมการสร้าง medium chain ADH ที่มีลำดับเบสบางส่วนคล้ายคลึงกับยีน *LeADH2* ที่พบในมะเขือเทศ และยีน *CmADH2* เป็นสมาชิกของกลุ่มยีน *ADH* ที่เป็น short chain ADH และเร่งปฏิกิริยาแบบ oxidation-reduction โดยมีแอลกอฮอล์ และอัลดีไฮด์เป็นซับสเตรทที่สำคัญ เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสโดยการค้นหาฐานข้อมูล Expression Sequence Taq (EST) ของ มะเขือเทศ (http://www.sgn.cornell.edu) และปรับปรุง single contig ของมะเขือเทศให้ใกล้เคียงกับยีน *CmADH2* มากขึ้น สามารถคัดเลือกยีน *Le-scADH1* สำหรับนำมาใช้ในการทดลองได้ และยีนที่สองได้จากการใช้ฐานข้อมูลการแสดงออกในมะเขือเทศของ Alba et al. (2005) คัดเลือกยีนที่สอง (*Le-scADH2*) ที่มีลักษณะการแสดงออกอย่างเด่นชัดในการพัฒนาของผล เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของทั้งสอง contig (Le-scADH1 และ Le-scADH2) แล้วพบว่ายีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* เป็นสมาชิกของกลุ่มยีน *ADH* ที่เป็น short chain ADH และมีความสัมพันธ์กับยีน *CmADHs* ดังแสดงในภาพที่ 18

4.1.1 การเพิ่มปริมาณยีน

จากผลสุกของมะเขือเทศ ทำการเพิ่มปริมาณยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* จากอาร์เอ็นเอต้นแบบที่สกัดจากผลสุกของมะเขือเทศ โดยใช้เทคนิค RT-PCR ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 798 bp ใน Le-scADH1 และ 864 bp ใน Le-scADH2 (ภาพที่ 19) ซึ่งนำไปทดสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์ยีสต์ (*S. cerevisiae* สายพันธุ์ INVSc1) และได้แถบดีเอ็นเอขนาด 801 bp ใน Le-scADH1 และ 867 bp ใน Le-scADH2 (ภาพที่ 20) ซึ่งนำไปทดสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์แบคทีเรีย (*E. coli* สายพันธุ์ BL21) ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้มีความสอดคล้องกับที่คาดการณ์จาก EST ซึ่งมาจาก SGN EST database ของมะเขือเทศ (http://www.sgn.cornell.edu/about/tomato_project/)



ภาพที่ 18 แผนผัง Tree phylogenetic family ของ *scADH* ในมะเขือเทศ (GBF lab, France)



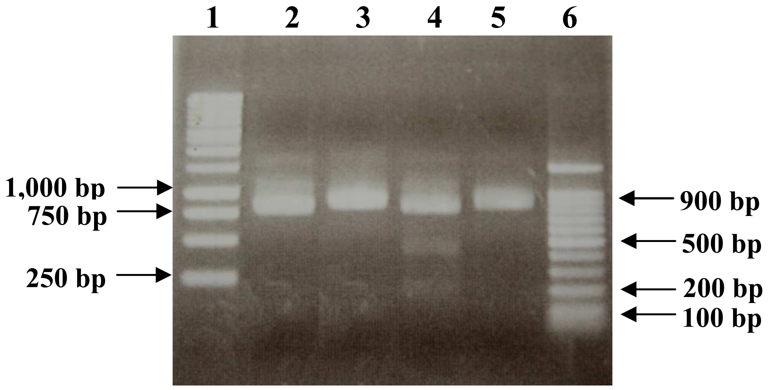
ภาพที่ 19 ขนาดท่อนดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ของยีน *Le-scADH1* และยีน *Le-scADH2* ที่นำไปทดสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์ยีสต์

ช่อง 1 : 1 kb marker

ช่อง 2 : *Le-scADH1* ขนาด 798 bp

ช่อง 3 : *Le-scADH2* ขนาด 864 bp

ช่อง 4 : 100 bp DNA marker



ภาพที่ 20 ขนาดท่อนดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ของยีน *Le-scADH1* และยีน *Le-scADH2* ที่นำไปทดสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์แบคทีเรีย

ช่อง 1 : 1 kb DNA marker

ช่อง 2 และ 4 : *Le-scADH1* ขนาด 801 bp

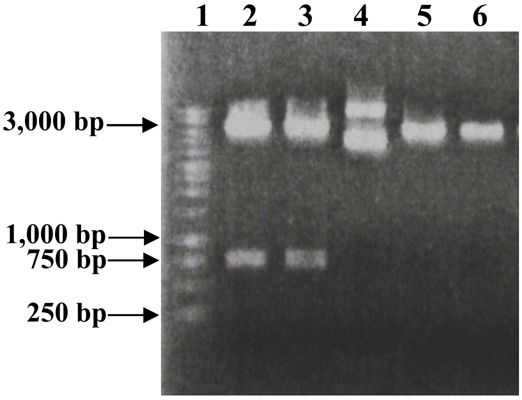
ช่อง 3 และ 5 : *Le-scADH2* ขนาด 867 bp

ช่อง 6 : 100 bp DNA marker

4.1.2 การตรวจสอบความถูกต้องของดีเอ็นเอ

เมื่อได้แถบดีเอ็นเอที่ถูกต้อง ตัดแถบดีเอ็นเอ และสกัดท่อนดีเอ็นเอจากเจลอะกาโรส ตรวจสอบความถูกต้องของท่อนดีเอ็นเอโดยการเชื่อมต่อท่อนดีเอ็นเอเข้ากับเวคเตอร์ pGEM-T โดยใช้เอนไซม์ ไลเกสได้พลาสมิดสายผสม และถ่ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5-α คัดเลือกพลาสมิดสายผสมโดยวิธี color indicator พบว่า โคโลนีของแบคทีเรียมีทั้งสีฟ้า และสีขาวเกิดขึ้นกระจายทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวสีขาวของแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB/Carb เพื่อคัดเลือกเฉพาะเซลล์แบคทีเรียที่มีพลาสมิดสายผสม และป้องกันการปนเปื้อนของเชื้ออื่น พบว่า หลังจาก 24 ชั่วโมง อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อมีสีเหลืองขุ่น แสดงว่า แบคทีเรียสามารถเจริญในอาหารเหลวนี้ได้เพราะมีพลาสมิดสายผสมแทรกอยู่ หลังจากสกัดพลาสมิดสายผสมออกจากเซลล์แบคทีเรีย และทดสอบความถูกต้องของแต่ละพลาสมิดด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI พบว่า ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 798 และ 864 bp ใน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* ตามลำดับ ภาพที่ 21 และ 22 แสดงพลาสมิดสายผสมที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ 1) แถบดีเอ็นเอขนาดใหญ่ประกอบด้วยเวคเตอร์ และดีเอ็นเอที่ต้องการบางส่วน 2) แถบดีเอ็นเอขนาดเล็กประกอบด้วยส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ ขนาดของท่อน ดีเอ็นเอที่ได้ขึ้นอยู่กับตำแหน่งการตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ตัวอย่างเช่น ภาพที่ 22 แสดงการคัดเลือก พลาสมิดที่มีดีเอ็นเอ Le-scADH1 ในเวคเตอร์ pGEM-T จากโคโลนีที่ 1-5 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI ซึ่งมีตำแหน่งการตัดบนดีเอ็นเอที่ต้องการ โคโลนีที่ 1 และ 2 ได้แถบดีเอ็นเอขนาดใหญ่มีขนาดเท่ากับ 3,000 bp ซึ่งเป็นแถบของเวคเตอร์ pGEM-T และแถบดีเอ็นเอขนาดเล็กมีขนาดเท่ากับ 798 bp ซึ่งมีขนาดตรงกับดีเอ็นเอที่คาดการณ์ไว้ (ช่องที่ 2 และ 3) ส่วนโคโลนีที่ 4 และ 5 มีแถบดีเอ็นเอขนาดใหญ่ตรงกับช่อง 2 และ 3 แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาดเล็กที่ต้องการ (ช่องที่ 5 และ 6) และโคโลนีที่ 3 มีแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ แต่มีขนาดแถบดีเอ็นเอไม่ตรงกับที่ต้องการ (ช่องที่ 4) จึงเลือกเฉพาะโคโลนีที่ 1 และ 2 สำหรับดำเนินการทดลองต่อไป

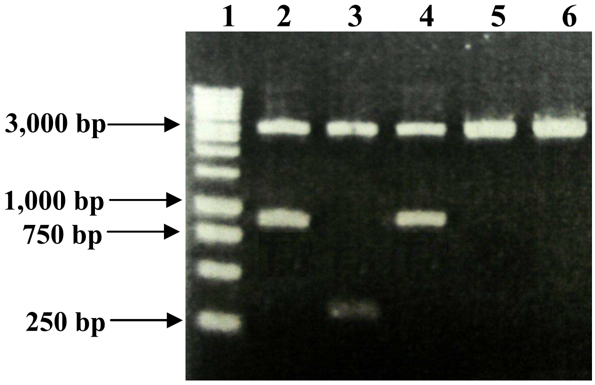


ภาพที่ 21 การคัดเลือกพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอ Le-scADH1 ในเวคเตอร์ pGEM-T โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

ช่อง 1 : 1 kb DNA marker

ช่อง 2 -3 : พลาสมิดที่มีดีเอ็นเอ Le-scADH1 จากโคโลนีที่ 1 และ 2 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI

ช่อง4 -6 : พลาสมิดที่ไม่มีดีเอ็นเอ Le-scADH1 จากโคโลนีที่ 3, 4 และ 5 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI



ภาพที่ 22 การคัดเลือกพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอ Le-scADH2 ในเวคเตอร์ pGEM-T โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

ช่อง 1 : 1 kb DNA marker

ช่อง 2 และ 4 : พลาสมิดที่มีดีเอ็นเอ Le-scADH2 จากโคโลนีที่ 1 และ 3 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI

ช่อง 3, 5 และ 6 : พลาสมิดที่ไม่มีดีเอ็นเอ Le-scADH1 จากโคโลนีที่ 2, 4 และ 5 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI

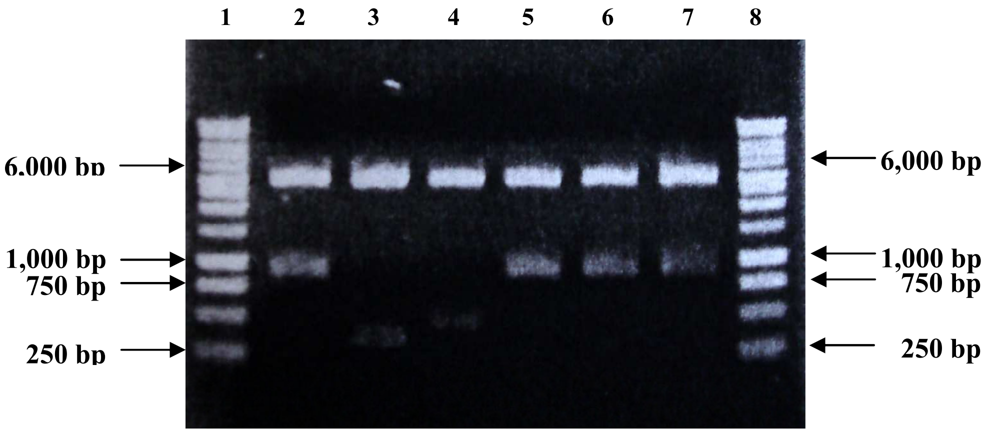
4.2 การถ่ายยีนและการศึกษาการแสดงออกของยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* ในเซลล์สิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก

4.2.1 การถ่ายยีนและศึกษาการแสดงออกของยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* ในเซลล์ยีสต์ (*S. cerevisiae*)

4.2.1.1 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ Le-scADH1 และ Le-scADH2 กับเวคเตอร์ pYES 2.1/V5-His-TOPO และเพิ่มปริมาณพลาสมิดสายผสม

เชื่อมต่อดีเอ็นเอ Le-scADH1 และ Le-scADH2 กับเวคเตอร์ pYES 2.1/V5-His-TOPO และถ่ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ TOP10F คัดเลือกโดยใช้ยีนคัดเลือกที่ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินที่มีอยู่ในเวคเตอร์ pYES 2.1/V5-His-TOPO พบว่า มีเฉพาะโคโลนีสีขาวของแบคทีเรียเกิดขึ้นกระจายทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทำการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวสีขาวของแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB/Carb และสกัดพลาสมิดสายผสมออกจากเซลล์แบคทีเรีย ทดสอบความถูกต้องของแต่ละพลาสมิดด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ภาพที่ 23 แสดงการคัดเลือกพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอ Le-scADH2 ในเวคเตอร์ pYES 2.1/V5-His-TOPO จากโคโลนีที่ 1-6 โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III ซึ่งมีตำแหน่งการตัดบนดีเอ็นเอที่ต้องการ และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I ซึ่งมีตำแหน่งการตัดบนเวคเตอร์ pYES 2.1/V5-His-TOPO เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วได้แถบดีเอ็นเอขนาดใหญ่มีขนาดเท่ากับ 5,759 bp และแถบดีเอ็นเอขนาดเล็กมีขนาดเท่ากับ 1,000 bp (โคโลนีที่ 1, 4, 5 และ 6) ซึ่งมีขนาดตรงกับที่คาดการณ์ไว้ (ช่องที่ 2, 5, 6 และ 7) ส่วนโคโลนีที่ 2 และ 3 มีแถบดีเอ็นเอขนาดใหญ่ตรงกับช่อง 2, 5, 6 และ 7 แต่มีแถบดีเอ็นเอขนาดเล็กไม่ตรงกับที่คาดการณ์ (ช่องที่ 3 และ 4) จึงคัดเลือกเฉพาะโคโลนีที่ 1, 4, 5 และ 6 สำหรับดำเนินการทดลองต่อไป



ภาพที่ 23 การคัดเลือกพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอ Le-scADH2 ในเวคเตอร์ pYES 2.1/V5-His-TOPO โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III และ *Xba*I

ช่อง 1 และ 8 : 1 kb DNA marker

ช่อง 2, 5, 6 และ 7: พลาสมิดที่มีดีเอ็นเอ Le-scADH2 จากโคโลนีที่ 1, 4, 5 และ6 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III และ *Xba*I

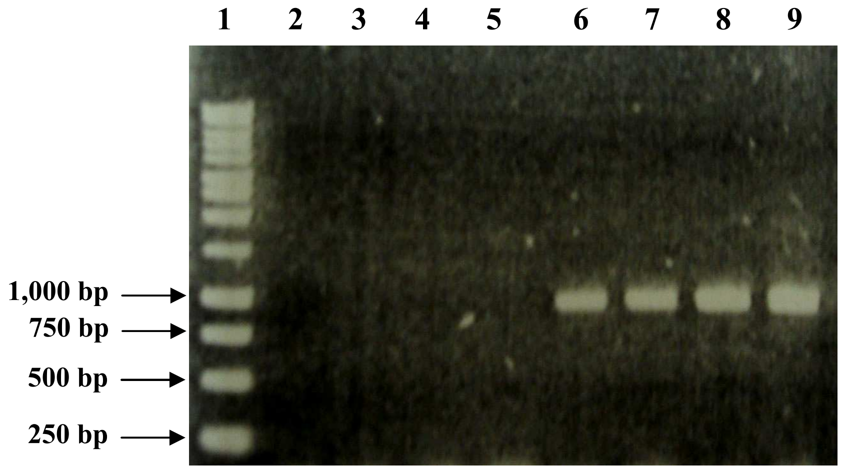
ช่อง 3 และ 4 : พลาสมิดที่ไม่มีดีเอ็นเอ Le-scADH2 จากโคโลนีที่ 2 และ3 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind*III และ *Xba*I

4.2.1.2 การถ่ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ยีสต์และชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* ในเซลล์ยีสต์

เมื่อทำการถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์ยีสต์แล้ว นำไปเลี้ยงในอาหารคัดเลือก SC-U/Glu/Amino (SC-U medium, 2% glucose, 1x amino acid) พบว่า มีโคโลนีสีขาวของยีสต์เกิดขึ้นกระจายทั่วอาหารคัดเลือก การคัดเลือกโคโลนีของยีสต์ที่ได้รับการถ่ายพลาสมิดในอาหารแข็ง SC-U/Glu/Amino ที่ไม่ใส่สารยูราซิล ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในการเจริญของเซลล์ยีสต์ ยีสต์ที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นสายพันธุ์ประเภทที่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่ขาดสารยูราซิลได้ (auxotrophic for uracil) แต่ในเวคเตอร์ pYES 2.1/V5-His-TOPO ที่นำมาใช้มียีน *URA3* ซึ่งสามารถสร้างสารยูราซิลได้ ดังนั้นเฉพาะยีสต์ที่ได้รับการถ่ายพลาสมิดสายผสมที่มียีน *URA3* เท่านั้นที่สามารถสร้างสารยูราซิลเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตของยีสต์ และยังส่งเสริมให้เกิด uracil prototrophy ได้อีกด้วย

ทำการคัดเลือกโคโลนีของยีสต์มาทดสอบความถูกต้องด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเวคเตอร์ pYES 2.1 TOPO และต่อยีน *Le-scADH1* และยีน *Le-scADH2* ได้แก่ GAL I และ ADH1 low หรือ ADH2 low ตามลำดับ พบว่า ได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากับที่คาดการณ์ไว้

(798 และ 864 bp ตามลำดับ) การตรวจสอบพลาสมิดสายผสมในโคโลนีของยีสต์ที่มียีน *Le-scADH2* โดยการเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ พบว่า โคโลนีที่ 5, 6, 7 และ 8 (ช่อง 6-9) มีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น และมีขนาดดีเอ็นเอตรงตามที่คาดการณ์ไว้ แสดงว่าโคโลนีเหล่านี้มีพลาสมิดที่มียีนที่ต้องการแทรกอยู่ ส่วนโคโลนีที่ 1, 2, 3 และ 4 (ช่อง 2, 3, 4, และ 5) ไม่พบแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น แสดงว่าไม่มีพลาสมิดที่ต้องการสอดแทรกอยู่ (ภาพที่ 24)



ภาพที่ 24 การคัดเลือกโคโลนีของยีสต์ที่มีพลาสมิดของเวคเตอร์ pYES 2.1 TOPO และ *Le-scADH2* โดยการเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ GAL I และ Le-ADH2 low

ช่อง 1 : 1 kb DNA marker

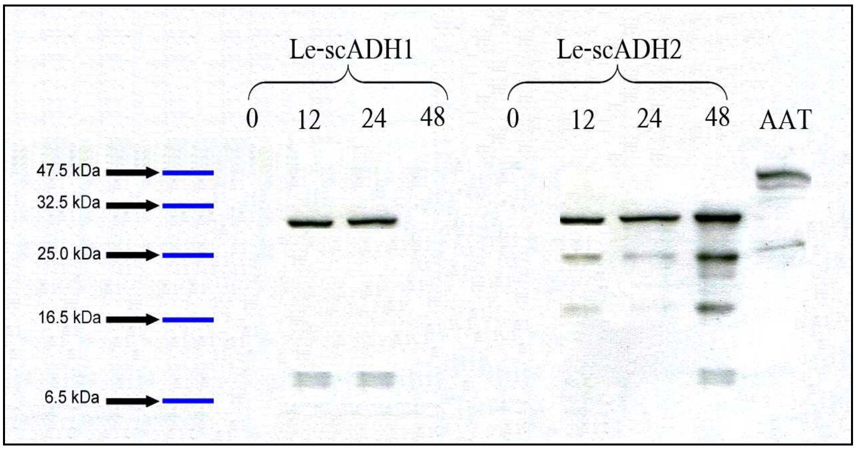
ช่อง 2 - 5 : พลาสมิดที่มีดีเอ็นเอ Le-scADH2 จากโคโลนีที่ 1, 2, 3, และ 4 ที่เพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์

ช่อง 6 - 9 : พลาสมิดที่ไม่มีดีเอ็นเอ Le-scADH2 จากโคโลนีที่ 5, 6, 7 และ 8 ที่เพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์

4.2.1.3 การตรวจสอบโปรตีนที่เกิดจากการแสดงออกของยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2*

เมื่อคัดเลือกโคโลนีของยีสต์ที่มีพลาสมิดสายผสมแล้ว นำไปทดสอบการชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* โดยการกระตุ้นด้วยสารละลายกาแลคโตส ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน คือ 0, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง โดยมี alcohol acyltransferase (AAT) เป็น positive control พบว่ายีน *Le-scADH1* มีการแสดงออกเฉพาะที่ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง ในขณะที่ยีน *Le-scADH2* มีการแสดงออกทุกระยะเวลาที่ทำการ

ทดสอบ และแถบโปรตีนที่ได้มีขนาด 29.5 kDa และ 30.4 kDa ตามลำดับ เมื่อทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ด้วย affinity resin และตรวจสอบด้วยวิธี Bradford พบว่าที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* ให้ค่าการดูดกลืนแสงและปริมาณโปรตีนสูงที่สุด โดยมีปริมาณโปรตีน 2.4 และ 3.2 ไมโครกรัมต่อเซลล์ยีสต์ 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 25) ส่วน *Le-scADH1* ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ไม่ปรากฏแถบโปรตีน สันนิษฐานว่าอาจเกิดจากการสลายตัวของโปรตีนเนื่องจากระยะเวลาการชักนำนานเกินไป ซึ่งจากการทดสอบหลาย ๆ ครั้ง พบว่าการเก็บรักษาโปรตีนที่อุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียส ไม่สามารถยับยั้งการสลายตัวของโปรตีน และเอนไซม์ได้ ดังนั้นหากทำการสกัดโปรตีนควรทำการทดสอบเอนไซม์ทันที เพื่อให้เกิดความคลาดเคลื่อนน้อยที่สุด



ภาพที่ 25 การทดสอบช่วงเวลาที่ใช้ในการชักนำการแสดงออกของยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* ในเซลล์ยีสต์บน Western blot ที่ระยะเวลา 0, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง

4.2.1.4 การตรวจสอบ ADH activity

การทดสอบ enzyme activities (reductase และ dehydrogenase activites) พบว่าเอนไซม์ Le-scADH1 และ Le-scADH2 ใช้ NADH เป็นโคแฟกเตอร์หลัก และจากการใช้สารตั้งต้นหลายชนิดทั้งในกลุ่มอัลดีไฮด์ และแอลกอฮอล์ พบว่า เอนไซม์จะมีความเฉพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้น 3 ชนิด คือ acetaldehyde, ethanol และ capronaldehyde (ตารางที่ 6) โดยเอนไซม์ Le-scADH1 มีประสิทธิภาพในการใช้สารตั้งต้นเพียง 2 ชนิด คือ acetaldehyde และ capronaldehyde แต่ไม่พบ activities ในการใช้ ethanol และมีประสิทธิภาพสูงในปฏิกิริยา dehydrogenase (เปลี่ยน acetaldehyde ให้เป็น alcohol) ดังเห็นได้จากค่า V_{max} ที่สูง (126.58 U.E.) ในขณะที่เอนไซม์ Le-scADH2 มีความสามารถในการใช้สารตั้งต้นทั้ง 3 ชนิด โดยที่ acetaldehyde มีค่า V_{max} สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารตั้งต้นอีกสองชนิด แต่พบว่า K_m ของ acetaldehyde (23.89 mM) มีค่าสูงกว่าค่า K_m ของ ethanol

(0.39 mM) ถึง 60 เท่า เมื่อพิจารณาค่า catalytic efficiency (V_{max}/K_m) พบว่าเอนไซม์ Le-scADH2 มีประสิทธิภาพสูงในปฏิกิริยา reduction เปลี่ยนแอลกอฮอล์เป็นอัลดีไฮด์ และเมื่อเปรียบเทียบเอนไซม์ ADH ทั้งสอง ในปฏิกิริยา dehydrogenation โดยใช้ acetaldehyde เป็นสารตั้ง ต้น พบว่าเอนไซม์ Le-scADH1 มีประสิทธิภาพสูงกว่าเอนไซม์ Le-scADH2 เนื่องจากมีค่า V_{max} ที่สูงกว่าและค่า K_m ต่ำกว่า เมื่อนำข้อมูล ADH activities ไปเปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่น เช่น แคนตาลูป พบว่า ค่า K_m สำหรับ acetaldehyde ของเอนไซม์ Le-scADH1 และเอนไซม์ Le-scADH2 (23.89 mM และ 16.9 mM) สูงกว่าค่า K_m สำหรับเอนไซม์ Cm-ADH2 (0.24 mM) มาก เมื่อใช้โคแฟกเตอร์เดียวกัน (Manriquez et al., 2006) และค่า V_{max} ของเอนไซม์ Cm-ADH2 (588 U.E.) สูงกว่าเอนไซม์ Le-scADH1 (126.58 U.E.) และเอนไซม์ Le-scADH2 (54.35 U.E.) มาก ซึ่งผลที่ได้ใน แคนตาลูปสอดคล้องกับในองุ่นที่ Tesniere et al. (2004) รายงานว่ามีค่า K_m สำหรับ acetaldehyde ของเอนไซม์ Vv-ADH2 เท่ากับ 0.45 mM ซึ่งใกล้เคียงกับในแคนตาลูป และมีค่า V_{max} สำหรับ acetaldehyde ของเอนไซม์ Vv-ADH2 (300 U.E.) ใกล้เคียงกับเอนไซม์ Cm-ADH2 (588 U.E.) ซึ่งส่วนหนึ่งอาจเป็นผลมาจากปริมาณโปรตีนที่ผลิตได้จากเซลล์ยีสต์ค่อนข้างต่ำ และการสลายตัวของเอนไซม์ค่อนข้างรวดเร็ว ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทดสอบการแสดงออกใน prokaryotic system เช่น แบคทีเรีย ควบคู่กันไปด้วย

ตารางที่ 6 Specific activities ของเอนไซม์ Le-scADH1 และ Le-scADH2

Substrate	**Le-scADH1**		**Le-scADH2**	
	V_{max} (U.E.)	K_m (mM)	V_{max} (U.E.)	K_m (mM)
Acetaldehyde	126.58	16.9	54.35	23.89
Ethanol	nd	nd	10.95	0.39
Capronaldehyde	9.45	1.2	11.25	6.18

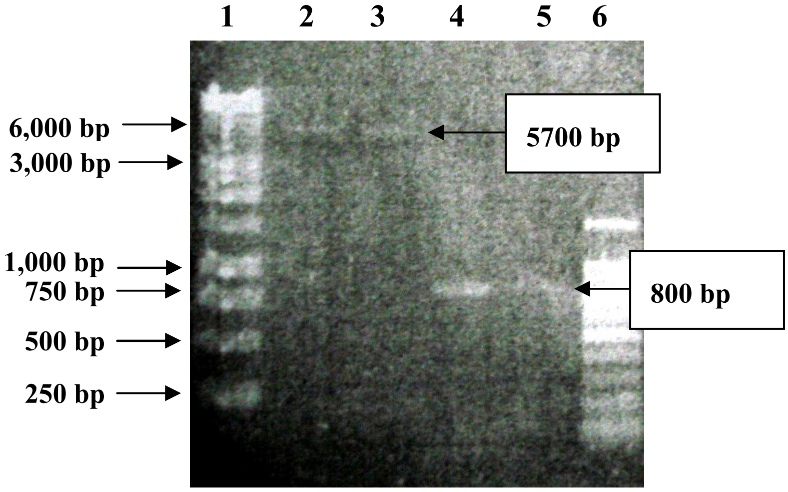
nd = non detectable

4.2.2 การถ่ายยีนและศึกษาการแสดงออกของยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* ในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21

4.2.2.1 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ Le-scADH1 และ Le-scADH2 กับเวคเตอร์ pET 15 และเพิ่มปริมาณพลาสมิดสายผสม

ในการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ Le-scADH1 และ Le-scADH2 ในเซลล์ยีสต์ พบว่า ให้ผลการทดลองยังไม่ชัดเจน จึงทำการทดสอบการแสดงออกของยีนทั้งสองในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 โดยการนำดีเอ็นเอ Le-scADH1 และ Le-scADH2 และเวคเตอร์

pET 15b ซึ่งเป็นเวคเตอร์ที่ควบคุมการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I และ *Xho*I (ภาพที่ 26 และ 27) สกัดท่อนดีเอ็นเอและเวคเตอร์ที่ต้องการออกจากเจลอะกาโรส นำท่อนดีเอ็นเอมาทำให้บริสุทธิ์ และเชื่อมต่อท่อนดีเอ็นเอกับท่อนเวคเตอร์ ถ่ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5-α เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์แบคทีเรีย ทำการคัดเลือกบนอาหารแข็ง LB/Carb พบว่า มีโคโลนีสีขาวของแบคทีเรียเกิดขึ้นกระจายทั่วอาหารคัดเลือก ทำการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวสีขาวของแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB/Carb และสกัดพลาสมิดสายผสมออกจากเซลล์แบคทีเรีย ทดสอบความถูกต้องของแต่ละพลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ภาพที่ 26 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดเวคเตอร์ pET 15b และดีเอ็นเอ Le-scADH1 ตามลำดับ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I และ *Xho*I พบว่า การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I ซึ่งมีตำแหน่งการตัดบนดีเอ็นเอ และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho*I ซึ่งมีตำแหน่งการตัดบนเวคเตอร์ pET 15b ได้ท่อนดีเอ็นเอขนาดใหญ่มีขนาดเท่ากับ 5,700 bp (โคโลนีที่ 1 และ 2) ซึ่งมีขนาดตรงกับที่คาดการณ์ไว้ (ช่องที่ 2 และ 3) ส่วนโคโลนีที่ 3 และ 4 ได้ท่อนดีเอ็นเอขนาดเล็กมีขนาดเท่ากับ 800 bp (ช่องที่ 4 และ 5) จึงคัดเลือกโคโลนีที่ 1, 2, 3 และ 4 สำหรับดำเนินการทดลองต่อไป



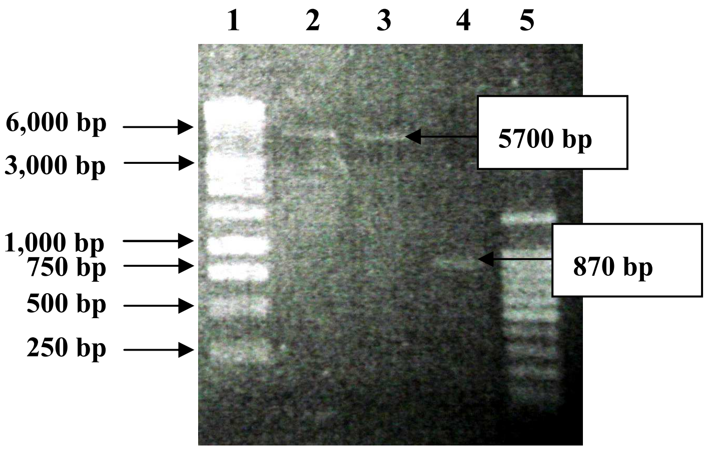
ภาพที่ 26 ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดเวคเตอร์ pET 15b และดีเอ็นเอ Le-scADH1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I และ *Xho*I

ช่อง 1 : 1 kb DNA marker

ช่อง 2 และ 3 : เวคเตอร์ pET 15b ขนาด 5,700 bp

ช่อง 4 และ 5 : ดีเอ็นเอ Le-scADH1 ขนาด 800 bp

ช่อง 6 : 100 bp DNA marker



ภาพที่ 27 ขนาดของท่อนดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดเวคเตอร์ pET 15b และ *Le-scADH2* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nde*I และ *Xho*I

ช่อง 1 : 1 kb DNA marker

ช่อง 2 และ 3 : เวคเตอร์ pET 15b ขนาด 5,700 bp

ช่อง 4 : ดีเอ็นเอ Le-scADH2 ขนาด 870 bp

ช่อง 5 : 100 bp DNA marker

4.2.2.2 การสกัดโปรตีนและเอนไซม์

เมื่อเชื่อมต่อท่อนดีเอ็นเอที่ได้กับเวคเตอร์ pET 15b และถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 แล้วทดสอบการชักนำการแสดงออกของยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* ด้วย 0.5 mM IPTG ไม่พบการเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีนเมื่อวัดด้วยวิธี Bradford และเมื่อตรวจสอบด้วยการแยกแถบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และย้อมสีแถบโปรตีนทั้งหมดด้วยสาร colloidal blue พบว่าไม่ปรากฏแถบโปรตีนที่ต้องการทั้งใน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* และเมื่อย้ายโปรตีนจากเจลอะคริลาไมด์ไปยังแผ่น nitrocellulose membrane เพื่อนำไปวิเคราะห์ Western blot ก็ไม่ปรากฏแถบโปรตีนที่ต้องการ ดังนั้นจึงไม่สามารถวิเคราะห์ activity ของเอนไซม์ได้

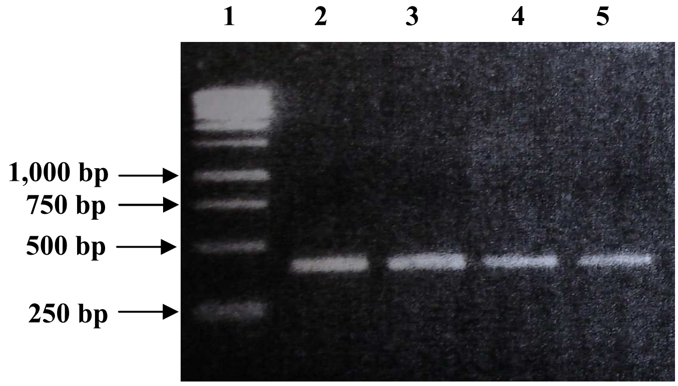
ทำการแก้ปัญหาโดยการใช้ IPTG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (0.1-5 mM) และใช้เวลาบ่มที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน (0-10 ชั่วโมง) แต่ไม่พบปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้น ซึ่ง IPTG ทำหน้าที่กระตุ้นการ transcription ของยีน *ADH* โดยไปแย่งจับกับโมเลกุล repressor ใน lac operon (Sambrook and Maniatis, 1989). Van Der Rest et al. (2006) ทำการทดสอบหาโปรตีนที่สนใจจากยีน *cinnamoyl-CoA* ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 โดยใช้ IPTG ที่ความเข้มข้น 0.2 mM เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบโปรตีนที่สนใจและมี activity เกิดขึ้นมาก และ Sugantha P.S. (2010) ได้ทดสอบ

ยีน *Glutathione S-Transferase* (*GSTs*) ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 โดยใช้ IPTG ที่ความเข้มข้น 0.1 mM บ่มนานข้ามคืน พบโปรตีนที่สนใจ แต่พบ activity เกิดขึ้นน้อยมาก อาจเป็นเพราะการบ่มนานข้ามคืน ทำให้เซลล์แบคทีเรียเกิดการสลายตัวได้ นอกจากนี้ยังใช้การสกัดโปรตีนวิธีอื่น ๆ เช่น การนำตะกอนไป sonicate หรือการทำให้เซลล์แตกด้วยวิธี freeze-thaw ก่อนนำตะกอนมาทำให้บริสุทธิ์ แต่ก็ไม่พบโปรตีนที่สนใจ ซึ่งปัญหาและอุปสรรคที่สำคัญอีกประการหนึ่ง คือ รูปร่างของเซลล์อาจยากต่อการสกัดโปรตีนออกมา สำหรับการสกัดโปรตีนภายใต้สภาวะ non-denaturing โดยใช้ detergents และ sonication สามารถช่วยสกัดโปรตีนออกมาได้ แต่อาจทำให้ได้ผลผลิตต่ำลง ส่วนการสกัดโปรตีนภายใต้สภาวะ denaturing โดยการใช้ยูเรียก็เป็นที่นิยมใช้ แต่วิธีการนี้มีข้อเสีย คือ โปรตีนอาจสูญเสียโครงสร้าง และ activity จึงจำเป็นต้องทำการ refolding (http://www.molecula .com /new/inducer.html) ดังนั้นการเลือกใช้เวคเตอร์และ/หรือสายพันธุ์แบคทีเรียจึงเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องพิจารณาสำหรับการทดลองในอนาคต

4.3 การโคลนยีนและสร้าง construct เพื่อถ่ายยีนเข้ามะเขือเทศ

4.3.1 การโคลนยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2*

เพิ่มปริมาณยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* ด้วยไพรเมอร์จำเพาะสำหรับสร้าง construct ตามวิธี RNAi ซึ่งใน 1 ยีน ประกอบด้วย 2 ส่วน ได้แก่ ส่วน antisense และ ส่วน sense ผลการทดลองพบแถบดีเอ็นเอของ *Le-scADH1* (antisense) และ *Le-scADH1* (sense) มีขนาด 400 bp (ภาพที่ 28) และแถบดีเอ็นเอของ *Le-scADH2* (antisense) และ *Le-scADH2* (sense) มีขนาด 400 bp (ภาพที่ 28) ซึ่งขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้มีความสอดคล้องกับที่คาดการณ์ไว้จาก EST (Express Sequence Taq) ซึ่งมาจาก SGN EST database ของมะเขือเทศ (http://www.sgn.cornell.edu/about/tomato_project/)



ภาพที่ 28 ขนาดของท่อนดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่มียีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* สำหรับสร้าง construct ตามวิธี RNAi

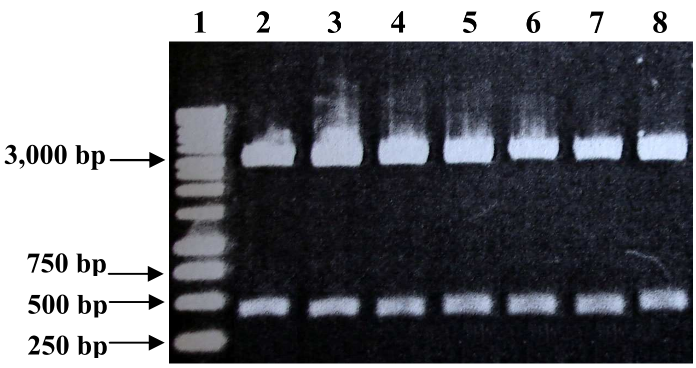
ช่อง 1 : 1 kb DNA marker

ช่อง 2 และ 3 : โคโลนีที่ 1 และ 2 ที่มีดีเอ็นเอ Le-scADH1 (antisense) และ Le-scADH1 (sense) ขนาด 400 bp

ช่อง 4 และ 5 : โคโลนีที่ 3 และ 4 ที่มีดีเอ็นเอ Le-scADH2 (antisense) และ Le-scADH2 (sense) ขนาด 400 bp

4.3.2 การตรวจสอบความถูกต้องของดีเอ็นเอ

เมื่อได้ขนาดของท่อนดีเอ็นเอที่ถูกต้องแล้ว ตัดแถบดีเอ็นเอ และสกัดท่อนดีเอ็นเอจากเจลอะกาโรส เชื่อมต่อท่อนดีเอ็นเอกับเวคเตอร์ pGEM-T และถ่ายเข้าสู่แบคทีเรียสายพันธุ์ DH5-α คัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียโดยใช้วิธี color indicator พบว่า มีโคโลนีสีฟ้า และสีขาวของแบคทีเรียเกิดขึ้นกระจายทั่วอาหารคัดเลือกเชื้อ จากนั้นคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวสีขาวของแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB/Carb สกัดพลาสมิดสายผสมออกจากเซลล์แบคทีเรีย และทดสอบความถูกต้องของแต่ละพลาสมิดโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยดีเอ็นเอส่วน antisense ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I และ *Xba*I (ภาพที่ 29) และดีเอ็นเอส่วน sense ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I และ *EcoR*I (ภาพที่ 30) ภาพที่ 29 แสดงการคัดเลือกพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอ Le-scADH1 (antisense) ในเวคเตอร์ pGEM-T โคโลนีที่ 1-3 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I และ *Xba*I ซึ่งมีตำแหน่งการตัดบนดีเอ็นเอห่างกัน 400 bp และการคัดเลือกพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอ Le-scADH1 (sense) ในเวคเตอร์ pGEM-T โคโลนีที่ 4-7 ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I และ *Eco*RI ซึ่งมีตำแหน่งการตัดบนดี เอ็นเอห่างกัน 400 bp เช่นเดียวกัน จากโคโลนีที่ 1-7 ได้แถบดีเอ็นเอขนาดใหญ่มีขนาดเท่ากับ 3,000 bp ซึ่งเป็นแถบของเวคเตอร์ pGEM-T และแถบดีเอ็นเอขนาดเล็กมีขนาดเท่ากับ 400 bp ซึ่งมีขนาดตรงกับดีเอ็นเอที่คาดการณ์ไว้ (ช่องที่ 2-8) จึงเลือกโคโลนีที่ 1-7 สำหรับดำเนินการทดลองต่อไป

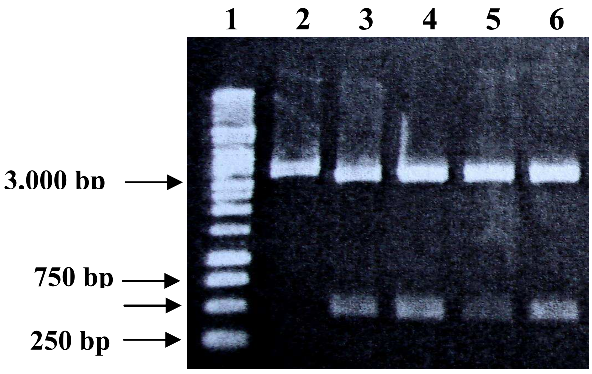


ภาพที่ 29 การคัดเลือกพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอ Le-scADH1 (antisense) และ Le-scADH1 (sense) ในเวคเตอร์ pGEM-T โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I, *Xba*I และ *Pst*I, *Eco*RI

ช่อง 1 : 1 kb DNA marker

ช่อง 2 – 4 : ดีเอ็นเอ Le-scADH1 (antisense) ในเวคเตอร์ pGEM-T โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I และ *Xba*I

ช่อง 5 – 8 : ดีเอ็นเอ Le-scADH1 (sense) ในเวคเตอร์ pGEM-T โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I และ *Eco*RI



ภาพที่ 30 การคัดเลือกพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอ Le-scADH2 (antisense) และ Le-scADH2 (sense) ในเวคเตอร์ pGEM-T โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I, *Xba*I และ *Pst*I, *Eco*RI

ช่อง 1 : 1 kb DNA marker

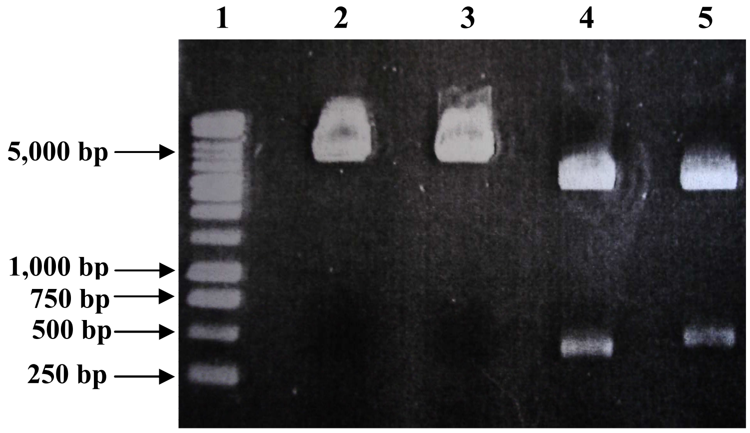
ช่อง 2 - 4 : โคโลนีที่ 1-3 ที่มีดีเอ็นเอ Le-scADH2 (antisense) ในเวคเตอร์ pGEM-T โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I และ *Xba*I

ช่อง 5 - 6 : โคโลนีที่ 4 และ 5 ที่มีดีเอ็นเอ Le-scADH2 (sense) ในเวคเตอร์ pGEM-T โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I และ *Eco*RI

4.3.3. การเชื่อมต่อเวคเตอร์ pGreen0029 กับยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2*

4.3.3.1 การเชื่อมต่อเวคเตอร์ pGreen0029 กับส่วน antisense ของยีน *Le-scADH1* และยีน *Le-scADH2*

ในการทดลองนี้ใช้เวคเตอร์ pGreen0029 เป็นเวคเตอร์หลักในการสร้าง construct โดยนำพลาสมิด pSRO2 ซึ่งเป็นพลาสมิดในการทำ RNAi ดีเอ็นเอ Le-scADH1 (antisense) และดีเอ็นเอ Le-scADH2 (antisense) ที่อยู่ในเวคเตอร์ pGEM-T มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I และ *Xba*I เพื่อให้ได้ขนาดที่เหมาะแก่การเชื่อมต่อ คือ 400 bp พบว่า ได้ขนาดตามที่ต้องการ (ภาพที่ 31)



ภาพที่ 31 การตัดพลาสมิด pSRO2 และดีเอ็นเอ Le-scADH1 (antisense) และ Le-scADH2 (antisense) ในเวคเตอร์ pGEM-T ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I และ *Xba*I

ช่อง 1 : 1 kb DNA marker

ช่อง 2 – 3 : พลาสมิด pSRO2 ขนาด 5,200 bp

ช่อง 4 : ดีเอ็นเอ Le-scADH1 (antisense) ขนาด 400 bp

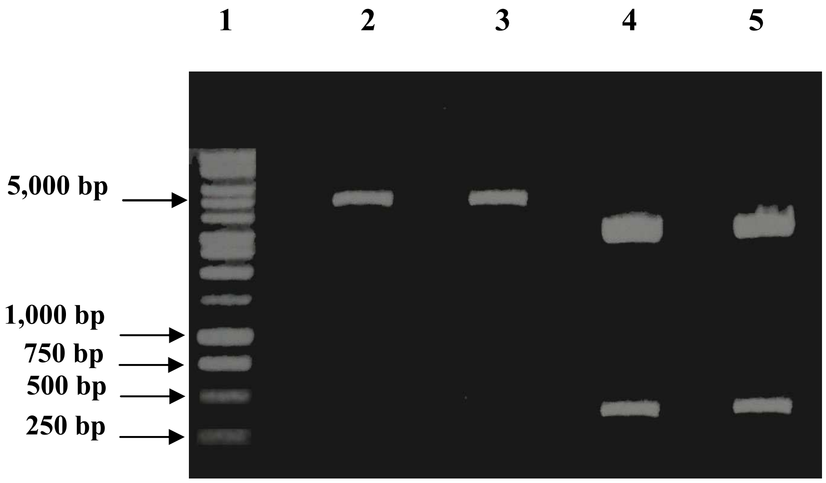
ช่อง 5 : ดีเอ็นเอ Le-scADH2 (antisense) ขนาด 400 bp

เมื่อได้ท่อนของดีเอ็นเอกับพลาสมิดแล้ว นำมาเชื่อมต่อกัน และเพิ่มปริมาณพลาสมิดสายผสมในเซลล์ของแบคทีเรีย ทดสอบความถูกต้องของพลาสมิดสายผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco*I และ *Xba*I จะได้แถบดีเอ็นเอจำนวน 2 แถบ ได้แก่ แถบดีเอ็นเอขนาดใหญ่ คือ พลาสมิด pSRO2 ขนาด 5200 bp และแถบดีเอ็นเอขนาดเล็ก คือ ยีนส่วน antisense ขนาด 400 bp แทนด้วยสัญลักษณ์ ดังนี้

- pSRO2 + Le-scADH1 (antisense) = pB1
- pSRO2 + Le-scADH2 (antisense) = pB2

4.3.3.2 การเชื่อมต่อพลาสมิด pB1 และ pB2 กับส่วน sense ของยีน *Le-scADH1* และยีน *Le-scADH2*

ใช้พลาสมิด pB1 และ pB2 กับดีเอ็นเอ Le-scADH1 (sense) และ Le-scADH2 (sense) ในเวคเตอร์ pGEM-T นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I และ *Eco*RI เพื่อให้ได้ขนาดที่เหมาะแก่การเชื่อมต่อ คือ 400 bp พบว่า ได้ขนาดตามที่ต้องการ (ภาพที่ 32)



ภาพที่ 32 การตัดพลาสมิด pB1, pB2 และดีเอ็นเอ Le-scADH1 (sense) และ Le-scADH2 (sense)ในเวคเตอร์ pGEM-T ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I และ *EcoR*I

ช่อง 1 : 1 kb DNA marker

ช่อง 2 : พลาสมิด pB1 ขนาด 5,600 bp

ช่อง 3 : พลาสมิด pB2 ขนาด 5,600 bp

ช่อง 4 : ดีเอ็นเอ Le-scADH1 (sense) ขนาด 400 bp

ช่อง 5 : ดีเอ็นเอ Le-scADH2 (sense) ขนาด 400 bp

เมื่อได้ชิ้นส่วนพลาสมิดส่วนแรกกับดีเอ็นเอที่ต้องการแล้ว นำมาเชื่อมต่อกัน และเพิ่มปริมาณพลาสมิดสายผสมในเซลล์ของแบคทีเรีย ทดสอบความถูกต้องของพลาสมิดสายผสม โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I และ *Eco*RI จะได้แถบดีเอ็นเอจำนวน 2 แถบ ได้แก่ แถบดีเอ็นเอขนาดใหญ่ประกอบด้วย พลาสมิด pSRO2 และดีเอ็นเอส่วน antisense ขนาด 5600 bp และแถบดีเอ็นเอขนาดเล็ก คือ ดีเอ็นเอส่วน sense ขนาด 400 bp แทนด้วยสัญลักษณ์ ดังนี้

- pB1 + Le-scADH1 (sense) = pB3
- pB2 + Le-scADH2 (sense) = pB4

4.3.4 การสร้าง construct

นำพลาสมิด pB3 และ pB4 มาจัดวางตามตำแหน่งที่ระบุไว้ในภาพที่ 6 ซึ่งอยู่ระหว่าง CaMV 35S promoter และ intron ขนาด 300 bp และปิดท้ายด้วย CaMV polyadenylation signal terminator เมื่อเชื่อมต่อให้อยู่ในรูปแบบของ RNAi construct ได้แล้ว ได้ลำดับเบสของทั้ง construct ดังแสดงในภาพที่ 33 และ 34 หลังจากนั้นนำไปถ่ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *A. tumefaciens* เพื่อถ่ายเข้ามะเขือเทศต่อไป

ลำดับเบสของ construction เรียงลำดับ ดังนี้ 35S promoter *Nde*I antisense *Xba*I intron *Pst*I sense *Eco*RI terminator

5’CGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGTACCCCTACTCCAAAAATGTCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCTATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATTTCGGGAAAC

CTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTCATCGAAAGGACAGTAGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCTATCATTCAAGATGCCTCTG

CCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGACATCTCCACTGACGTAAGGGATG

ACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCATTTGGAGAGGACAGCCCAAGCTTCGAC**TCTAGA**

GTCTCGCATTCTGTTACCGATACATTTCAACAGGTACCATCCAGCCATAAAATTTATTTTGACAATTTTTTTGAACTCGTCATCAATTAGCTGCAGTGGATCTTGCATTTTCCCTTCATAAGC

ATAGCAGTGTACCAAGGCATCCAACTTCCCAAATATCTTCCATGCCTTGTCCACAGCTTCATCAAAAGCAGTTTCTCTATCCTCCGTCATATCCAATCCCACAACTTCTACGGCAACACTAC

CCTTTAGTGATTGCTTTATATTCTCCGCTACACTCTTCAATTGGCGCTCATTTCCCATCAAAACCAATTGGCAACCCCTCTGAGCTAAATGGTACGCAATGTTGTTGCAAATTTCATCACCGT

TGGAGGTAAGCAACAC

CCATGGGTAAGTTTCTGCTTCTACCTTTGATATATATATAATAATTATCATTAATTAGTAGTAATATAATATTTCAAATATTTTTTTCAAAATAAAAGAATGTAGTATATAGCAATTGCTTTT

CTGTAGTTTATAAGTGTGTATATTTTAATTTATAACTTTTCTAATATATGAACAAAATTTGTTGATGTGCAG**CTGCAG**

GTGTTGCTTACCTCCAACGGTGATGAAATTTGCAACAACATTGCGTACCATTTAGCTCAGAGGGGTTGCCAATTGGTTTTGATGGGAAATGAGCGCCAATTGAAGAGTGTAGCGGAGAATA

TAAAGCAATCACTAAAGGGTAGTGTTGCCGTAGAAGTTGTGGGATTGGATATGACGGAGGATAGAGAAACTGCTTTTGATGAAGCTGTGGACAAGGCATGGAAGATATTTGGGAAGTTGG

ATGCCTTGGTACACTGCTATGCTTATGAAGGGAAAATGCAAGATCCACTGCAGCTAATTGATGACGAGTTCAAAAAAATTGTCAAAATAAATTTTATGGCTGGATGGTACCTGTTGAAATG

TATCGGTAACAGAATGCGAGAC

GAATTCGGTACGCTGAAATCACCAGTCTCTCTCTACAAATCTATCTCTCTCTATTTTCTCCATAAATAATGTGTGAGTAGTTTCCCGATAAGGGAAATTAGGGTTCTTATAGGGTTTCGCTC

ATGTGTTGAGCATATAAGAAACCCTTAGTATGTATTTGTATTTGTAAAATACTTCTATCAATAAAATTTCTAATTCCTAAAACCAAAATCCAGTACTAAAATCCAGATCGATCCTTGACAGG

ATATATTGGCGGGTAAACTAAGTCGCTGTATGTGTTTGTTTGAGATCTCATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTC

CGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTT3’

ภาพที่ 33 ลำดับเบสของยีน *Le-scADH1* (pB3) ในรูปแบบ RNAi construct

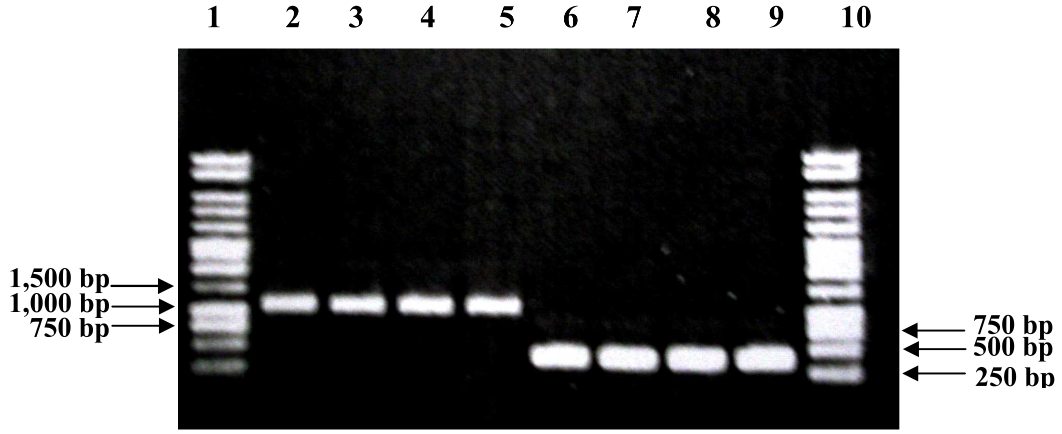
ลำดับเบสของ construction เรียงลำดับ ดังนี้ 35S promoter *NdeI* antisense *XbaI* intron *PstI* sense *EcoRI* terminator

5’CGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGTACCCCTACTCCAAAAATGTCAAAGATACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCTATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATTTCGGGAAAC
CTCCTCGGATTCCATTGCCCAGCTATCTGTCACTTCATCGAAAGGACAGTAGAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCTATCATTCAAGATGCCTCTG
CCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGACATCTCCACTGACGTAAGGGAT
GACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCATTTGGAGAGGACAGCCCAAGCTTCGAC**TCTAGA**
ATGCCGCATAAGAATGTGGGACGATACCATATACTACCGTTGCCGCACTTGTCGTGAAAATAATTGAACCTTTTGTATGACTCGAAATCATCACTCTAGCAGCATGTTTCGCGCATAAAAA
TGCCCCAACGACATTTACATCGAACACGTTTTTAATTATATCGGTATCTACGTCTAAAATACTGGAAATCGACTTACCAGCTACACCAGCGTTACTGAACATTATGTCAAGCTTACCAAATT
TGGCAACCGTTGCATCAACCACATTTTGAACGTCTGATTCAATCGCGACATCACAATGGACGAACATTAGGTGTTCATTTTCTTTTACTAATGAATTTACAAGGTCGTCCTGAATATCTGCA
ATTGTTACTTTTGCACCATGTTGAATAAAAAGTCTAGCTGTAGCTAGTCCTATGCCACTAGCACCACCAGTT
CCATGGGTAAGTTTCTGCTTCTACCTTTGATATATATATATAATAATTATCATTAATTAGTAGTAATATAATATTTCAAATATTTTTTTCAAAATAAAAGAATGTAGTATATAGCAATTGCTTTT
CTGTAGTTTATAAGTGTGTATATTTTAATTTATAACTTTTCTAATATATGAACAAAATTTGTTGATGTGCAG**CTGCAG**
AACTGGTGGTGCTAGTGGCATAGGACTAGCTACAGCTAGACTTTTTATTCAACATGGTGCAAAAGTAACAATTGCAGATATTCAGGACGACCTTGTAAATTCATTAGTAAAAGAAAATGA
ACACCTAATGTTCGTCCATTGTGATGTCGCGATTGAATCAGACGTTCAAAATGTGGTTGATGCAACGGTTGCCAAATTTGGTAAGCTTGACATAATGTTCAGTAACGCTGGTGTAGCTGGT
AAGTCGATTTCCAGTATTTTAGACGTAGATACCGATATAATTAAAAACGTGTTCGATGTAAATGTCGTTGGGGCATTTTTATGCGCGAAACATGCTGCTAGAGTGATGATTTCGAGTCATA
CAAAAGGTTCAATTATTTTCACGACAAGTGCGGCAACGGTAGTATATGGTATCGTCCCACATTCTTATGCGGCAT
GAATTCGGTACGCTGAAATCACCAGTCTCTCTCTACAAATCTATCTCTCTCTATTTTCTCCATAAATAATGTGTGAGTAGTTTCCCGATAAGGGAAATTAGGGTTCTTATAGGGT
TTCGCTCATGTGTTGAGCATATAAGAAACCCTTAGTATGTATTTGTATTTGTAAAATACTTCTATCAATAAAATTTCTAATTCCTAAAACCAAAATCCAGTACTAAAATCCAGAT
CGATCCTTGACAGGATATATTGGCGGGTAAACTAAGTCGCTGTATGTGTTTGTTTGAGATCTCATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTT
GCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTT3’

ภาพที่ 34 ลำดับเบสของยีน *Le-scADH2* (pB4) ในรูปแบบ RNAi construct

4.3.4 การถ่าย constructs เข้าสู่แบคทีเรีย *A. tumefaciens*

เมื่อได้ constructs pB3 และ pB4 ที่ต้องการ นำมาถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *A. tumefaciens* ด้วยวิธี freeze-thaw พบว่า มีโคโลนีสีขาวของแบคทีเรียเกิดขึ้นกระจายทั่วอาหารคัดเลือก และนำโคโลนีสีขาวของแบคทีเรีย มาตรวจสอบการมี construct โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ และใช้ไพรเมอร์จำเพาะ สำหรับโคโลนีของแบคทีเรียที่มี construct pB3 พบว่า เมื่อไพรเมอร์ LeADH1-Xba low กับ LeADH1 Eco low ตรวจสอบท่อนดีเอ็นเอของ antisense, intron และ sense พบว่า โคโลนีที่ 1-4 มีแถบ ดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากับ 1,100 bp (ภาพที่ 35, ช่องที่ 2-5) ซึ่งมีขนาดตรงกับดีเอ็นเอที่คาดการณ์ไว้ (400 bp + 300 bp + 400 bp) และเมื่อใช้ไพรเมอร์ LeADH1-Pst up กับ LeADH1 Eco low ตรวจสอบท่อน ดีเอ็นเอของ sense พบว่า โคโลนีที่ 5-8 ได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากับ 400 bp (ภาพที่ 35, ช่องที่ 6-9) ซึ่งมีขนาดตรงกับดีเอ็นเอที่คาดการณ์ไว้ (400 bp)



ภาพที่ 35 การตรวจสอบโคโลนีของแบคทีเรีย *A.tumefaciens* ที่มี construct pB3 โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์

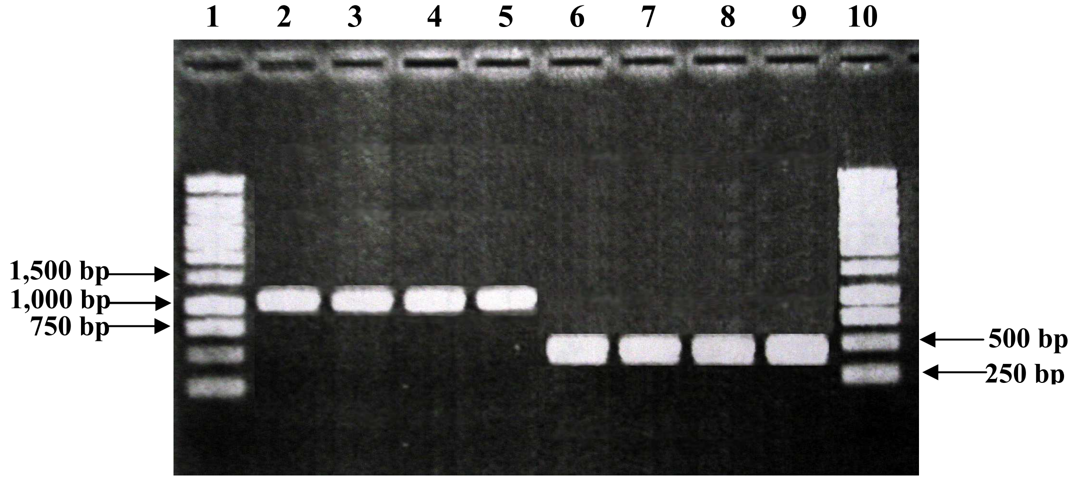
ช่อง 1 และ 10 : 1 kb DNA marker

ช่อง 2 – 5 : โคโลนีที่ 1-4 ที่มี construct pB3 ใช้ไพรเมอร์ LeADH1-Xba low และ LeADH1 Eco low ขนาด 1,100 bp

ช่อง 6 – 9 : โคโลนีที่ 1-4 ที่มี construct pB3 ใช้ไพรเมอร์ LeADH1-Pst up และ LeADH1 Eco low ขนาด 400 bp

และในโคโลนีแบคทีเรีย *A. tumefaciens* ที่มี construct pB4 พบว่า เมื่อใช้ไพรเมอร์ LeADH2-Xba low กับ LeADH2 Eco low ตรวจสอบท่อนดีเอ็นเอของ antisense, intron และ sense พบว่า โคโลนีที่ 1-4 มีแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากับ 1,100 bp (ภาพที่ 36, ช่องที่ 2-5) ซึ่งมีขนาดตรงกับดีเอ็น

เอที่คาดการณ์ไว้ (400 bp + 300 bp + 400 bp) และไพรเมอร์ LeADH2-Pst up กับ LeADH2 Eco low ตรวจสอบท่อนดีเอ็นเอของ sense พบว่า โคโลนีที่ 5-8 มีแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากับ 400 bp (ภาพที่ 36, ช่องที่ 6-9) ซึ่งมีขนาดตรงกับดีเอ็นเอที่คาดการณ์ไว้เท่ากับ (400 bp)



ภาพที่ 36 การตรวจสอบโคโลนีของแบคทีเรีย *A. tumefaciens* ที่มี construct pB4 โดยการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์

ช่อง 1 และ 10 : 1 kb DNA marker

ช่อง 2 – 5 : โคโลนีที่ 1-4 ที่มี construct pB4 ใช้ไพรเมอร์ LeADH2-Xba low และ LeADH2-Eco low ขนาด 1,100 bp

ช่อง 6 – 9 : โคโลนีที่ 1-4 ที่มี construct pB4 ใช้ไพรเมอร์ LeADH2-Pst up และ LeADH2-Eco low ขนาด 400 bp

4.4 การถ่ายยีนเข้าสู่มะเขือเทศ

4.4.1 การชักนำยอดและรากของชิ้นส่วนมะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายยีน

หลังจากถ่าย construct pB3 และ pB4 เข้าสู่ลำต้นอ่อน และใบเลี้ยงของมะเขือเทศ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Ling (1998) พบว่า จำนวนของชิ้นส่วนของมะเขือเทศที่รอดชีวิตหลังจากถ่ายยีนในระยะต่าง ๆ มีค่าแตกต่างกัน (ตารางที่ 7) ซึ่งพบว่าความสามารถในการชักนำให้เกิดยอดมีค่า 53% (160/300) และ 40% (120/300) ใน pB3 และ pB4 ตามลำดับ ในระยะแรกลำต้นอ่อน และใบเลี้ยงจะมีการพัฒนาเร็ว และเริ่มเปลี่ยนจากสีเขียวเข้มเป็นสีเขียวอ่อน หรือสีเหลือง (ภาพที่ 37ก) แต่บางชิ้นจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอย่างรวดเร็ว เนื่องจากถูกเชื้อแบคทีเรีย *A. tumefaciens* เข้าทำลายอย่างรุนแรง หรือมีเชื้อแบคทีเรีย *A. tumefaciens* ตกค้างบนชิ้นส่วนมะเขือเทศมากเกินไป นอกจากนั้นยัง

พบว่าลำต้นอ่อน และใบเลี้ยงมะเขือเทศมีการพัฒนาเป็นยอดโดยตรงมากกว่าการพัฒนาเป็นแคลลัส สังเกตได้จากระยะเวลาในการเกิดยอดที่สมบูรณ์ กล่าวคือ ถ้าพัฒนาเป็นยอดโดยตรงจะใช้เวลาน้อยกว่าชิ้นส่วนที่พัฒนาเป็นแคลลัสก่อน แล้วค่อยนำมาชักนำยอดอีกครั้ง

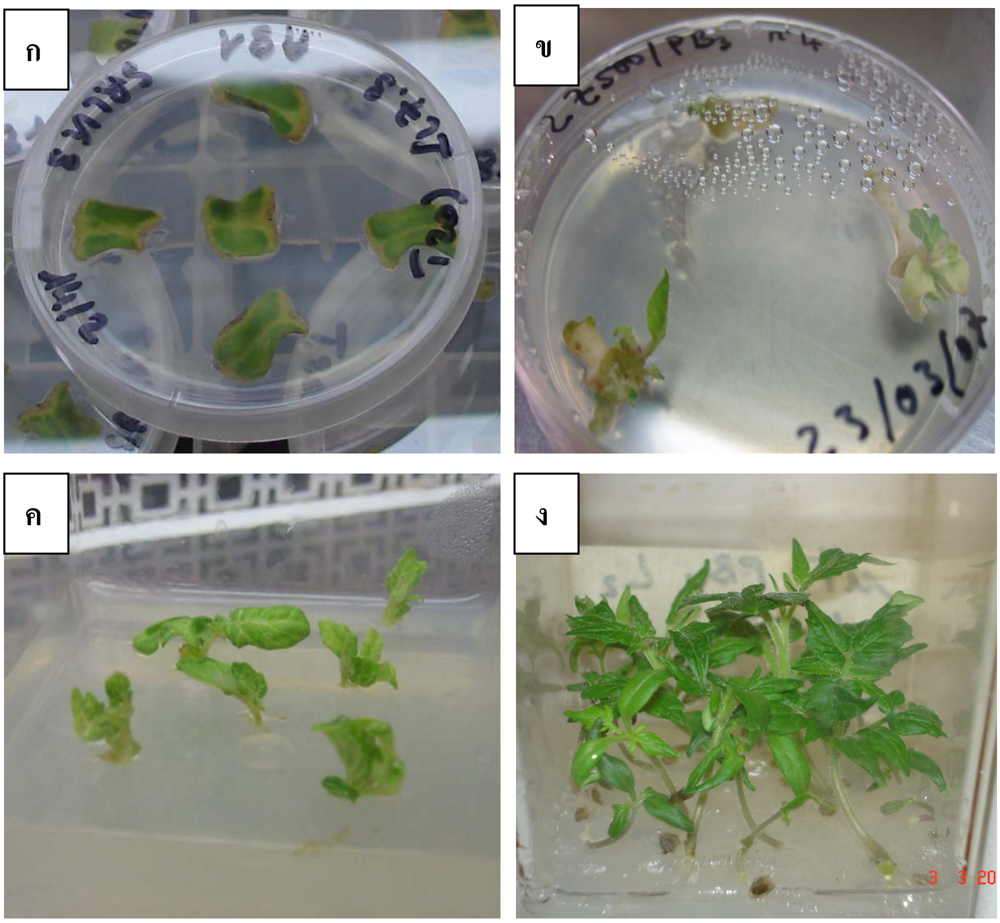
หลังจาก 1-2 เดือน ชิ้นส่วนแต่ละชิ้นจะมีการพัฒนาของยอดจำนวนมาก ภาพที่ 37ข แสดงส่วนลำต้นอ่อนที่มีการพัฒนาของยอด แต่เมื่อปล่อยให้ยอดเจริญเติบโต พบว่ามีจำนวนยอดที่สมบูรณ์น้อย โดยมียอดที่สามารถอยู่รอดได้ประมาณ 41% (124/300) และ 32% (96/300) ใน pB3 และ pB4 ตามลำดับ เมื่อยอดมีใบจริง 2-3 ใบ จึงย้ายจากจานอาหารเลี้ยงคัดเลือก (MSt) มาใส่ในกล่องอาหารเลี้ยงคัดเลือก (MSr) (ภาพที่ 37ค) ซึ่งในขั้นตอนนี้ พบว่าบริเวณส่วนยอดจะอวบและมีความยาวมากขึ้น และมีใบจริงและลำต้นผลิออกมาจำนวนมาก หลังจากนี้ประมาณ 1-2 เดือน จะเกิดขนรากแตกออกมาเป็นเส้นเล็ก ๆ สีขาว และมีรากแขนงแตกออกมาจนเต็มกล่องอาหาร MSr แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างอัตราการเกิดยอดกับราก พบว่า อัตราการเกิดรากมีค่าต่ำที่ 13.3% (40/100) และ 10% (30/100) เนื่องจากมียอดบางส่วนที่ไม่สามารถพัฒนาให้มีรากได้ คือสามารถเจริญเติบโต มีใบลำต้นแตกแขนงได้ แต่ไม่มีรากเกิดขึ้น ซึ่งอาจเกิดจากชิ้นส่วนนั้นได้รับยีนไม่ครอบคลุมทั่วชิ้นส่วน ทำให้ไม่สามารถต้านทานต่อสารกานามัยซิน ซึ่งเป็นสารคัดเลือกได้ อีกทั้งบางต้นมีรากเกิดขึ้นแต่มีในปริมาณน้อย ไม่สามารถเจริญเติบโตในโรงเรือนได้ นอกจากนี้ยังพบว่าการเจริญของรากที่ความเข้มข้นของกานามัยซินเท่ากับ 100 mg/l เกิดขึ้นน้อย อย่างไรก็ตามเมื่อลดความเข้มข้นของกานามัยซินลงเหลือ 50 mg/l รากมีการเจริญเติบโตมากขึ้น และอีกเหตุผลหนึ่ง อาจเกิดจากอิทธิพลของการยับยั้งการแสดงออกของยีน *Le-scADH* ในรากของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม pB3 และ pB4 เนื่องจากยีนดังกล่าวเป็นยีน *ADH2* ซึ่งนอกจากจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการสุกในผลแล้ว ยังถูกชักนำในต้นกล้า รากและลำต้นของมะเขือเทศในสภาวะ anaerobic ด้วย (Tansksley and Jones, 1981) เช่น ในสภาวะที่ดินมีน้ำขัง รากของพืชได้รับออกซิเจนน้อย ทำให้เกิดการยับยั้งกิจกรรม metabolism และการสร้าง ATP (Saglio et al., 1980) ซึ่งลดการเจริญเติบโตของราก และลำต้น ดังนั้นพืชจำเป็นต้องหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน โดยออกซิไดซ์กลูโคสเป็น pyruvic acid โดยกระบวนการ glycolysis และ pyruvic acid ที่เกิดขึ้นจะถูกเปลี่ยนให้เป็น acetaldehyde ซึ่งเป็นพิษต่อพืช ดังนั้นพืชจึงต้องเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยน acetaldehyde เป็น ethanol โดยใช้เอนไซม์ ADH จึงอยู่รอดได้ (ลิลลี่ และคณะ, 2548) Shiao et al. (2001) พบว่า การเพิ่มขึ้นของ ADH และ pyruvate decarboxylase สามารถช่วยให้รากต้านทานต่อสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำได้ ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม pB3 และ pB4 ที่มีระดับ ADH ในรากต่ำ อาจทำให้เซลล์รากสะสม actadehyde และเกิดการตายในสภาวะเครียดจากการเติมสารกานามัยซิน จึงพบอัตราการเกิดรากที่ต่ำกว่ามะเขือเทศที่ไม่ได้รับการดัดแปลงพันธุกรรมมาก (ไม่ได้แสดงข้อมูล) อย่างไรก็ตามการเพิ่มระดับกิจกรรมของเอนไซม์ ADH2 ในระหว่างการสุกของผล ทำให้เกิดสารพวกแอลกอฮอล์เป็นปริมาณมาก ซึ่งเมื่อมีการนำแอลกอฮอล์ไป

ใช้ในการสังเคราะห์น้ำตาล จะทำให้ผลไม้มีรสชาติที่ดีขึ้นด้วย (Speirs et al., 2002)

ทำการคัดเลือกต้นมะเขือเทศที่มีการเจริญเติบโตครบถ้วน คือ มีรากจำนวนมาก มียอดหลักที่สมบูรณ์ และมีใบแท้ 2-3 ใบ (ภาพที่ 37ง) และย้ายต้นกล้ามะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ผ่านการคัดเลือกลงปลูกในวัสดุปลูก (ภาพที่ 37ง) สุดท้ายจะได้ต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม pB3 จำนวน 24 ต้น และ pB4 จำนวน 15 ต้น ซึ่งมีการเลี้ยงในโรงเรือนต่อไปเพื่อเก็บเมล็ด และทดสอบลักษณะต่าง ๆ

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของชิ้นส่วนมะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* ที่ระยะการเจริญเติบโตต่าง ๆ กัน

ระยะการเจริญเติบโต	**Co-cultivation (pB3)**		**Co-cultivation (pB4)**	
	จำนวนที่รอด/จำนวนทั้งหมด	**เปอร์เซ็นต์ (%)**	**จำนวนที่รอด/จำนวนทั้งหมด**	**เปอร์เซ็นต์ (%)**
การได้รับยีน (co-cutivation)	300/300	100.0	300/300	100.0
การชักนำให้เกิดยอด (shoot initiation)	160/300	53.0	120/300	40.0
การพัฒนาของยอด (shoot elongation)	124/300	41.0	96/300	32.0
การเกิดราก (rooting)	40/300	13.3	30/300	10.0
การได้ต้นที่สมบูรณ์ (establishment in peat moss)	24/300	8.0	15/300	5.0



ภาพที่ 37 พัฒนาการของลำต้นอ่อนและใบเลี้ยงของมะเขือเทศที่เจริญเติบโตบนอาหาร MS ชนิดต่าง ๆ

ก : ใบเลี้ยงที่มีอายุ 1 สัปดาห์หลังจากถ่ายยีน

ข : ส่วนยอดที่เกิดจากการชักนำจากส่วนลำต้นอ่อนบนอาหารชักนำยอด (MSt)

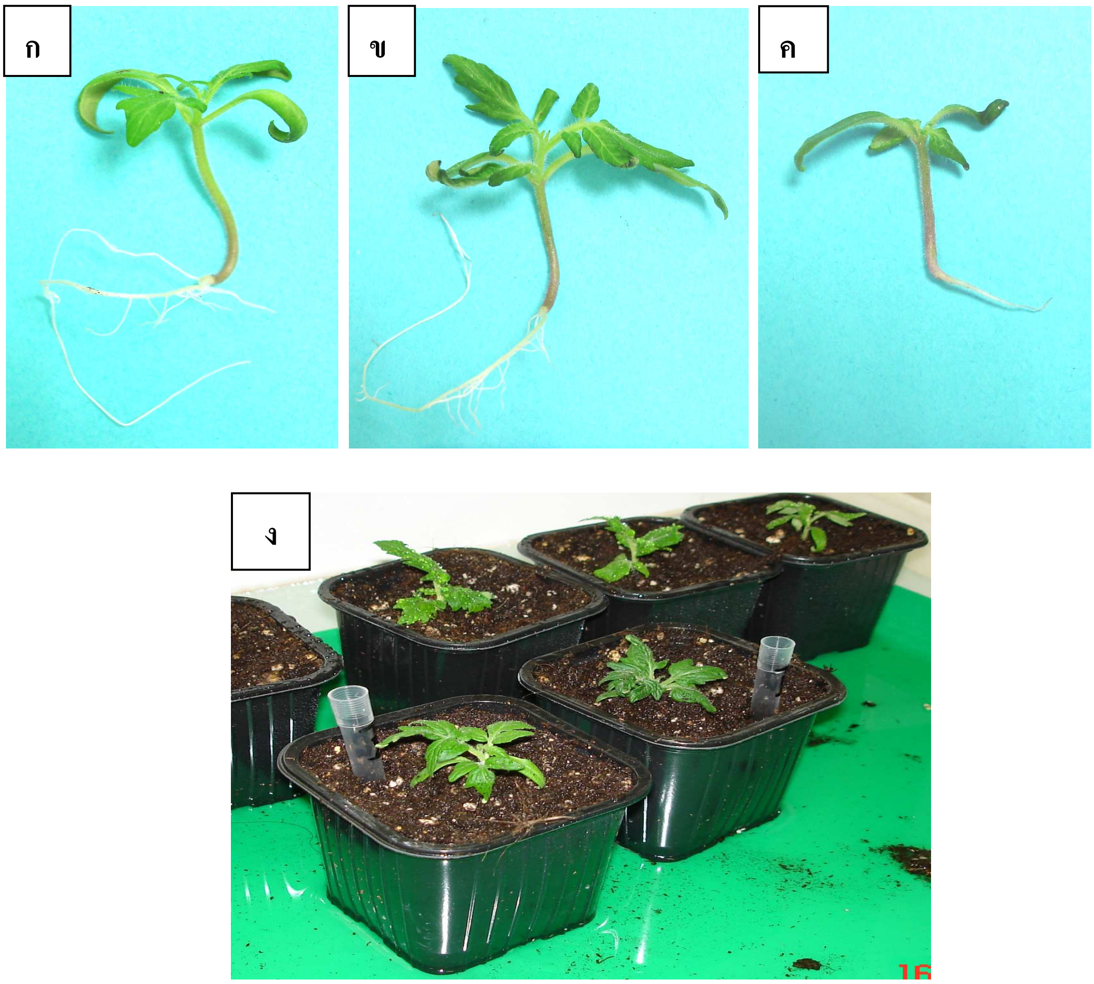
ค : ส่วนยอดที่นำมาเลี้ยงบนอาหารชักนำราก (MSr)

ง : ต้นกล้ามะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่มียอด ใบ และรากสมบูรณ์

4.4.2 การประเมินลักษณะของต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม

ประเมินลักษณะของต้นกล้ามะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมโดยสังเกตจากลักษณะ 3 ประการ ดังนี้ 1) มีรากหลักและรากแขนงมาก 2) มีลำต้นอ่อนสีเขียว 3) มียอดหลักที่พร้อมจะพัฒนา (อ้างอิงจาก GBF Lab, Toulouse, France) ภาพที่ 38 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะของต้นกล้ามะเขือเทศทั้ง 3 ประเภท ได้แก่ ต้นกล้ามะเขือเทศปกติ (ภาพที่38ก) ต้นกล้ามะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายยีน *Le-scADH2* ที่มีลักษณะสมบูรณ์ตามลักษณะที่กล่าวไว้ข้างต้น (ภาพที่ 38ข) และต้นกล้ามะเขือเทศที่

ได้รับการถ่ายยีน *Le-scADH2* แต่มีลักษณะไม่สมบูรณ์ (ภาพที่ 38ค) กล่าวคือ มีรากน้อยหรือไม่มีเลย มีลำต้นอ่อนสีม่วง และยอดไม่พัฒนา จึงไม่สามารถเจริญ และพัฒนาเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้ เมื่อคัดเลือกต้นกล้ามะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมได้แล้ว จึงย้ายต้นกล้าลงปลูกในวัสดุปลูกต่อไป (ภาพที่ 38ง)

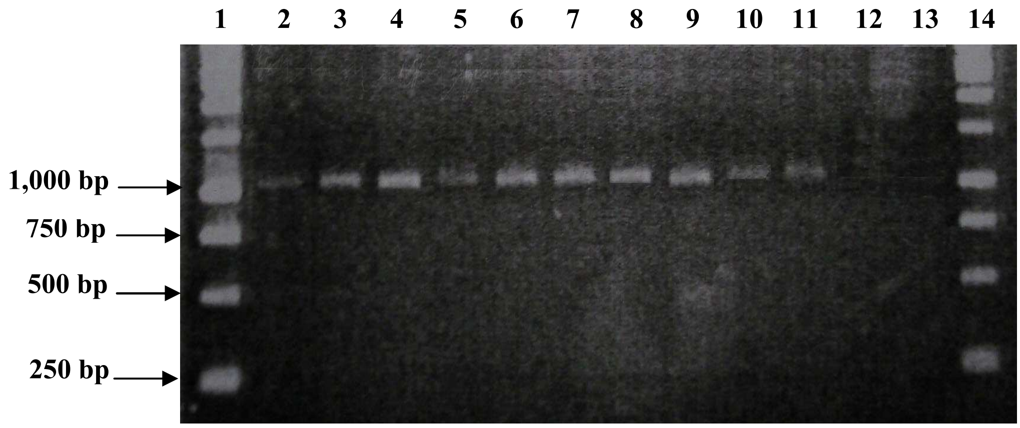


ภาพที่ 38 การตรวจสอบต้นกล้ามะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม

ก : ต้นกล้ามะเขือเทศปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน

ข : ต้นกล้ามะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายยีนและมีลักษณะสมบูรณ์

เมื่อได้ต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม pB3 และ pB4 (T0-generation) แล้ว นำมาทดสอบเบื้องต้นเพื่อคัดเลือกต้นที่ได้รับการถ่ายยีน โดยการสกัดดีเอ็นเอจากใบ และลำต้น นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ พบแถบดีเอ็นเอขนาด 1,100 bp ทั้งใน pB3 และ pB4 ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่าต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมเหล่านี้ได้รับการถ่ายยีนเข้ามาในต้นจริง เมื่อเปรียบเทียบกับต้นมะเขือเทศปกติที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจะไม่พบแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น (ภาพที่ 39) อย่างไรก็ตามเพื่อให้ได้ผลที่แน่ชัด ต้องนำไปทดสอบด้วยวิธี southern hybridization เพื่อยืนยันผลทางการทดลองต่อไป



ภาพที่ 39 การคัดเลือกมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์

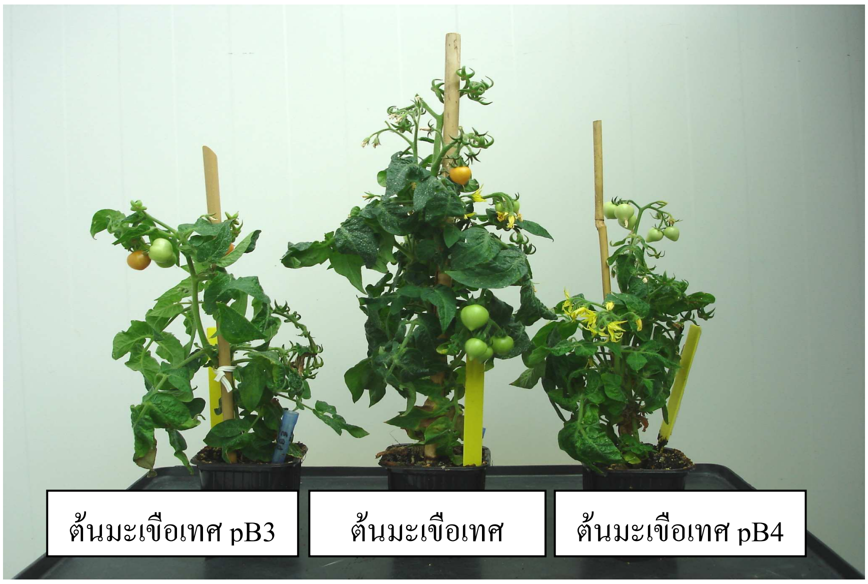
ช่อง 1 และ 14 : 1 kb DNA marker

ช่อง 2 – 6 : มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม pB3 ต้นที่ 1, 2, 3, 4 และ 5

ช่อง 7– 11 : มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม pB4 ต้นที่ 1, 2, 3, 4 และ 5

ช่อง 12– 13 : มะเขือเทศที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ต้นที่ 1 และ 2

หลังจากนำมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่นแรก (T0) ไปเลี้ยงในโรงเรือน ปล่อยให้มีการผสมตัวเอง สังเกตการเจริญเติบโตและการติดผล และเก็บเมล็ดเพื่อนำเมล็ดไปปลูกทดสอบต่อไป พบว่า ต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม pB3 และ pB4 มีการเจริญเติบโตและลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่แตกต่างจากต้นมะเขือเทศปกติ นอกจากนี้ความสามารถในการติดผลและขนาดของผลก็ใกล้เคียงกันอีกด้วย (ภาพที่ 40)



ภาพที่ 40 การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของต้นมะเขือเทศปกติ และต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม pB3 และ pB4 (T0-generation)

เก็บเมล็ดมะเขือเทศจากผลที่สุกเต็มที่มาปลูกทดสอบในอาหารแข็งคัดเลือก MS/Kan (MS agar, 30 mg/l kanamycin;) เพื่อคัดเลือกต้นกล้ามะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายทอดชุดยีน RNAi construct โดยต้นกล้ามะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่ได้รับชุดยีน RNAi construct เท่านั้นจึงสามารถต้านทานต่อสารกานามัยซิน และเจริญเติบโตบนอาหารคัดเลือกได้ เมื่อต้นกล้ามะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมมีใบจริงประมาณ 3-4 ใบ และมีรากแขนงประมาณ 3-5 อัน นำต้นกล้ามะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่นที่สอง (T1-generation) ไปคัดเลือกลักษณะเบื้องต้นทางสัณฐานวิทยาดังวิธีการที่กล่าวไว้ข้างต้น แล้วจึงย้ายลงในวัสดุปลูกและเลี้ยงในโรงเรือนต่อไป

4.4.3 การกระจายตัวของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม

การศึกษาการกระจายตัวของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่นสอง พบว่า ต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม pB3 line ที่ 2, 3, 5, 7 และ 8 มีประสิทธิภาพดี คือ มีจำนวนต้นมาก และมีเปอร์เซ็นต์ต้นกล้าที่สามารถอยู่รอดสูง ส่วนมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม pB4 line 1, 2, 3 และ 7 ก็มีประสิทธิภาพดีเช่นเดียวกัน แต่ได้จำนวนต้นรวมน้อย ดังนั้นจึงได้ต้นที่มีชีวิตรอดน้อยด้วย ซึ่งสาเหตุที่ได้ต้นกล้าจำนวนน้อยนี้อาจเกิดจากการยับยั้งการแสดงออกของยีน *scADH* ทำให้ไม่มีรากหรือมีรากน้อยจนไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ซึ่งต้องมีการทดสอบการควบคุมการแสดงออกของยีนต่อไป ผลของการกระจายตัวของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่นสองแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ประชากรรุ่นลูกของ pB3 และ pB4

Transgenic plants (T0)	T1 (transgenic plant/ total)
pB3 line1	15/25 (60.00%)
pB3 line2	20/28 (71.43%)
pB3 line3	23/32 (71.88%)
pB3 line4	19/30 (60.00%)
pB3 line5	25/30 (83.33%)
pB3 line6	10/30 (33.33%)
pB3 line7	25/30 (83.33%)
pB3 line8	22/30 (73.33%)
pB4 line1	10/15 (66.67%)
pB4 line2	12/20 (60.00%)
pB4 line3	14/20 (70.00%)-
pB4 line4	4/10 (40.00%)
pB4 line5	5/10 (50.00%)
pB4 line6	3/10 (30.00%)
pB4 line7	9/15 (60.00%)
pB4 line8	5/10 (50.00%)

สำหรับการเจริญเติบโต และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่นที่สอง (T1-generation) พบว่า มีการเจริญเติบโต และลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างจากต้นมะเขือเทศปกติอย่างเห็นได้ชัดเจนทั้งในต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม pB3 และ pB4 กล่าวคือ ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม pB3 ประชากรส่วนใหญ่ (80%) จะมีการเจริญเติบโตใกล้เคียงกับมะเขือเทศปกติ (ภาพที่ 41ข) และมีส่วนน้อย (20%) ที่มีการพัฒนาทางการเจริญเติบโตช้า แต่มีพัฒนาการทางสรีรวิทยาอย่างรวดเร็ว คือ ออกดอกทั้งที่ต้นยังมีขนาดเล็ก (แคระแกร็น) ทำให้ผลที่ได้มีขนาดเล็ก และมีเมล็ดน้อย (ภาพที่ 41ค) ส่วนมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม pB4 พบว่าประชากรทั้งหมดจะมีลักษณะแคระแกร็น ใบมีขนาดเล็ก และม้วนงอ มีสีใบเข้มกว่าใบปกติมาก ยอดสั้น และออกดอกเร็ว ทำให้ผลมะเขือเทศที่ได้มีขนาดเล็กมาก และมีเมล็ดน้อยหรือไม่มีเลย (ภาพที่ 42ข) เมล็ดที่ได้จะมีลักษณะลีบไม่สามารถพัฒนาเจริญเป็นต้นได้ ซึ่งในกรณีของต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม pB4 ที่ไม่มีเมล็ดนี้จำเป็นต้องขยายพันธุ์ด้วยวิธีปักชำกิ่ง การที่ต้นมะเขือเทศ

ดัดแปลงพันธุกรรม pB4 มีลักษณะแคระแกร็นกว่า pB3 มากทั้งที่การยับยั้งการแสดง
สมบูรณ์ แสดงว่า ยีน *Le-scADH2* ที่นำมาทดลองอาจเป็นยีนที่มีบทบาทเกี่ยวกับการเจ
ของต้นพืช เมื่อถูกยับยั้งจึงทำให้การเจริญเติบโตของมะเขือ-เทศดัดแปลงพันธุกรรมผิดปกติมาก แต่การที่ลักษณะเหล่านี้ไม่ปรากฏในต้นมะเขือเทศรุ่นแรกอาจเป็นเพราะ RNAi construct ที่ถ่ายเข้าไปในมะเขือเทศยังอยู่ในสภาพ heterozygous จึงทำให้การเจริญเติบโตยังเป็นปกติ และจากการทดสอบปฏิกิริยา dehydrogenase และ reduction ในเซลล์ยีสต์เบื้องต้นนั้น จะเห็นว่าในยีน *Le-scADH1* มีปฏิกิริยา dehydrogenase เกิดขึ้นสูงมาก (เปลี่ยนสารอัลดีไฮด์ให้เป็นแอลกอฮอล์) แต่ไม่พบปฏิกิริยา reduction เกิดขึ้น ในขณะที่ยีน *Le-scADH2* พบทั้งสองปฏิกิริยา แต่พบว่ามีประสิทธิภาพในปฏิกิริยา reduction เปลี่ยนแอลกอฮอล์เป็นสารอัลดีไฮด์สูงกว่าปฏิกิริยา dehydrogenase มาก ซึ่งถ้าอัตราการเปลี่ยนแอลกอฮอล์เป็นอัลดีไฮด์สูงกว่าการเปลี่ยนอัลดีไฮด์ให้เป็นแอลกอฮอล์ อาจทำให้เกิดการสะสมสารอัลดีไฮด์ในเนื้อเยื่อพืชทำให้เกิดความเป็นพิษ และต้นพืชตายได้ (ลิลลี่ และคณะ, 2548)

ภาพที่ 41 ต้นมะเขือเทศปกติและมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม pB3 (T1 generation)

ก : ต้นมะเขือเทศปกติ

ข : ต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม pB3 ที่มีการเจริญเติบโตปกติ

ค : ต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม pB3 ที่มีการเจริญเติบโตแบบแคระแ

ภาพที่ 42 ต้นมะเขือเทศปกติและมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม pB4 (T1 generation)

ก : ต้นมะเขือเทศปกติ

ข : ต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม pB4 ที่มีการเจริญเติบโตแบบแคระแกร็น

ค : ต้นมะเขือเทศปกติและต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม pB4 ที่ติดผล

จากการสังเกตและทดสอบเบื้องต้น พบว่า ต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมรุ่นสอง (T1 generation) ของ pB3 และ pB4 ส่วนใหญ่ได้รับการถ่ายทอดยีนเข้ามาในต้นจริง จัดเป็นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม (transgenic plant) แต่ต้องมีการทดสอบการทำงานของ RNAi construct ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* เนื่องจากมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมบางต้นอาจได้รับการถ่ายยีนเข้ามา แต่ยีนไม่สามารถทำหน้าที่นั้นได้ ซึ่งคล้ายกับการศึกษาของ Rezaian et al. (1988) ที่สร้างแตงกวาดัดแปลงพันธุกรรม antisense จำนวน 3 ยีน ที่ต้านทานต่อโรค cucumber mosaic virus (CMV) และเมื่อนำไปทดสอบการปลูกเชื้อ พบว่า มีเพียงยีนเดียวที่ต้านทานต่อโรค CMV ส่วนอีกสองยีนมีความอ่อนแอต่อโรคเช่นเดียวกับต้นแตงกวาปกติ ซึ่งแสดงว่ายีนสองยีนนี้ได้รับการถ่ายยีนเข้ามา แต่ทำหน้าที่ต้านทานโรคไม่ได้ เนื่องจากการศึกษามะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมครั้งนี้ให้ผลการทดลองไม่เป็นไปตามความคาดหมาย จึงต้องมีการทดสอบหน้าที่ของยีนทั้งสองในต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมเพื่อยืนยันประสิทธิภาพ โดยทางกลุ่มวิจัยได้ทดสอบการแสดงออกของยีนทั้งสองนี้ ด้วยการนำผลของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม pB3 (T1 genera tion) ระยะสีผลเปลี่ยนที่ 7 วัน (breaker+7) และลำต้นของมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม pB4 (T1 generation) มาสกัดอาร์เอ็นเอ จากนั้นนำมาวัดระดับการแสดงออกของยีนด้วย Real Time PCR พบว่า ประชากรรุ่นสองส่วนใหญ่ (T1 generation) ของ pB3 สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนได้จริง ซึ่งหมายถึงว่าได้รับการถ่ายทอด RNAi construct อย่างสมบูรณ์ แต่ใน pB4 พบว่า ประชากรรุ่นสองส่วนใหญ่ (T1 generation) ของ pB4 ยังมีการแสดงออกของยีนมาก ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการถ่ายทอด construct RNAi เป็นไปอย่างไม่สมบูรณ์ จึงไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีนได้เต็มที่ ซึ่งผลของการแสดงออกบางส่วนก็ทำให้ต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม pB4 มีการเจริญเติบโตที่ผิดปกติ คือ มีลักษณะแคระแกร็น ใบเล็กหงิก ถ้าการยับยั้งการแสดงออกสมบูรณ์อาจทำให้ต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมตายได้ เนื่องจากขาดเอนไซม์ Le-scADH2 ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่ายีน *Le-scADH1* อาจมีบทบาทเฉพาะช่วงระยะการสุกของผล แต่ยีน *Le-scADH2* อาจมีบทบาทที่ทุกระยะการพัฒนาของพืช จากการทดสอบที่กล่าวมาข้างต้นสามารถสรุปเบื้องต้นได้ว่า มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม pB3 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการแสดงออกของยีน *Le-scADH1* ในผลได้ดี และให้ต้นที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ สามารถให้ผล และเมล็ดได้ ซึ่งในทางตรงกันข้าม พบว่า มะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม pB4 ไม่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน *Le-scADH2* ได้สมบูรณ์ และเนื่องจากต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม pB4 ที่ได้มีลักษณะแคระแกร็น ไม่ให้ผล จึงยังไม่สามารถทดสอบการยับยั้งการแสดงออกของ Le-scADH2 ในผลได้ ดังนั้นการทดลองในอนาคตจึงควรเปลี่ยนโปรโมเตอร์จาก CaMV 35S ที่ควบคุมการแสดงออกของยีนทุกระยะการเจริญเติบโตของพืช เป็นโปรโมเตอร์ที่ควบคุมให้มีการแสดงออกเฉพาะช่วงที่ผลสุก (fruit ripening specific promoter) เช่น p2A11 ซึ่งโปรโมเตอร์ชนิดนี้จะทำให้ต้นมะเขือเทศดัดแปลง

พันธุกรรมมีการเจริญเติบโตปกติ และมีการแสดงออกของยีนเฉพาะในช่วงที่ผลสุก ซึ่งอาจทำให้ได้ผลที่มีขนาดใหญ่และมีเมล็ดสมบูรณ์ เพื่อขยายพันธุ์ต่อไป อย่างไรก็ตามลักษณะแคระแกร็นที่เกิดขึ้นนี้เป็นผลกระทบอย่างแรกที่พบ ส่วนผลกระทบด้านอื่น ๆ จำเป็นต้องทำการศึกษาต่อไป เช่น การมีขนใบมากขึ้น ใบหนาขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lewinsohn et al. (2007) ซึ่งศึกษาเกี่ยวกับการสังเคราะห์กลิ่นในเส้นทาง terpenoid โดยทดสอบการเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน *geraniol synthase* (*GES*) จากมะนาว ในมะเขือเทศ ซึ่งยีน *GES* นี้จะควบคุมการสร้างเอนไซม์สำหรับผลิตสาร geraniol (แอลกอฮอล์ประเภท acyclic monoterpene) ที่ทำให้มีกลิ่นเพิ่มขึ้นในดอกกุหลาบ การประเมินผลวัดจากระดับการเพิ่มขึ้นของสาร geraniol และสารระเหยชนิดอื่น ๆ ในมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรม พบว่าการสะสมสาร monoterpene ทำให้ปริมาณการสะสม lycopene ลดลงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ผลมะเขือเทศมีสีแดงลดน้อยลง แต่มีกลิ่นมากขึ้น ข้อมูลนี้ชี้ให้เห็นว่าการปรับปรุงกลิ่นโดยการใช้พันธุวิศวกรรมในมะเขือเทศสามารถเป็นไปได้ แต่ต้องระวังถึงผลกระทบต่อลักษณะคุณภาพด้านอื่น ๆ ด้วย เช่น สี และรสชาติ เป็นต้น

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการโคลนยีน *Le-scADH* จากผลสุกมะเขือเทศจำนวน 2 ยีน ได้แก่ ยีน *Le-scADH1* และยีน *Le-scADH2* แล้วนำยีนมาเพิ่มปริมาณเพื่อทำการทดสอบการแสดงออกของยีนทั้งสองในเซลล์ยีสต์ และแบคทีเรีย พบว่า ในเซลล์ยีสต์ ยีนทั้งสองจะมีปริมาณโปรตีนสูงที่สุดที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง และจากการวัดค่า Michaelis constant (Km) และ maximum velocity (Vmax) พบว่า เอนไซม์ Le-scADH1 และ Le-scADH2 สามารถเร่งปฏิกิริยาในเซลล์ยีสต์ได้ดี โดยเอนไซม์ Le-scADH1 มีประสิทธิภาพสูงในปฏิกิริยา dehydrogenation แต่ไม่พบปฏิกิริยา reduction (เอนไซม์ Le-scADH1 สามารถเปลี่ยนอัลดีไฮด์ให้เป็นแอลกอฮอล์ได้ แต่ไม่สามารถเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้กลับเป็นอัลดีไฮด์ได้) ในขณะที่เอนไซม์ Le-scADH2 มีประสิทธิภาพในทั้งสองปฏิกิริยา แต่สามารถเร่งปฏิกิริยา reduction ได้ดีกว่าปฏิกิริยา dehydrogenation โดยมีค่า Km ต่ำกว่าถึง 60 เท่า แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ Le-scADH2 สามารถเปลี่ยนแอลกอฮอล์ให้เป็นอัลดีไฮด์ได้ดีกว่าเปลี่ยนอัลดีไฮด์ให้เป็นแอลกอฮอล์ ส่วนการทดสอบในเซลล์แบคทีเรียไม่พบโปรตีนของทั้งสองยีน จึงไม่สามารถวัดค่าปฏิกิริยาได้

และเมื่อนำยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* มาถ่ายเข้าสู่ชิ้นส่วนมะเขือเทศในรูปแบบ RNA interference (RNAi) เพื่อทดสอบการแสดงออกของยีนทั้งสองนี้ พบว่า สามารถชักนำใบเลี้ยงและลำต้นอ่อนให้พัฒนาเป็นยอด และมีราก จนได้เป็นต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่สมบูรณ์ โดยมีการเจริญเติบโต และให้ผลที่สมบูรณ์ ต้นมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมที่คัดเลือกไว้มียีนที่ต้องการทุกต้น เมื่อผสมพันธุ์แบบเปิด พบว่า ประชากรมะเขือเทศรุ่นลูกมีการกระจายตัวทางฟีโนไทป์อย่างเห็นได้ชัดเจน คือ ประชากรของยีน *Le-scADH1* (pB3) ส่วนมากจะมีลักษณะต้นที่ปกติและมีบางส่วนที่มีลักษณะแคระแกร็น และติดผลเร็ว ทำให้ผลมะเขือเทศที่ได้ไม่มีคุณภาพและไม่ติดเมล็ด ส่วนประชากรส่วนมากของยีน *Le-scADH2* (pB4) มีลักษณะแคระแกร็น และติดผลน้อยมาก ซึ่งอาจเป็นผลจากการลดระดับของ scADH2 ในช่วงพัฒนาการของพืช และเมื่อนำมะเขือเทศดัดแปลงพันธุกรรมทั้งสองลักษณะไปทดสอบการแสดงออกของยีนโดยใช้วิธี Real Time (RT) PCR พบว่า ประชากรของยีน *Le-scADH1* ได้รับการถ่ายทอด RNAi construct อย่างสมบูรณ์ เนื่องจากมีการยับยั้งการแสดงออกของยีน *Le-scADH1* อย่างเห็นได้ชัดเจน ในขณะที่ประชากรของยีน *Le-scADH2* ยังมีการแสดงออกมาก จึงเป็นไปได้ว่าการถ่ายทอด RNAi construct ไม่สมบูรณ์ ดังนั้นจึงต้องมีการทดสอบทางชีวเคมี และการประเมินลักษณะทางฟีโนไทป์ในรุ่นลูกต่อไปเพื่อศึกษาหน้าที่

ของยีนทั้งสองในอนาคต ความรู้ที่ได้นี้อาจนำมาใช้ปรับปรุงพันธุ์มะเขือเทศหรือพืชชนิดอื่นที่มีกลิ่นให้มีกลิ่นเพิ่มขึ้นหรือน้อยลงด้วยวิธีพันธุวิศวกรรม หรือวิธีดั้งเดิม โดยใช้ระดับ ADH activity เป็นตัวคัดเลือก เพื่อเพิ่มมูลค่าทางการตลาด และเพิ่มทางเลือกให้แก่ผู้บริโภค

รายการอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. (2542). มะเขือเทศ. [ออนไลน์]. ได้จาก : http://www.doae.go.th/library/html/detail/tomato/detail_2.htm#head1

กระทรวงการคลัง. โรงงานยาสูบ. (2543). กำจัดแมลงโดยวิธีธรรมชาติ [ออนไลน์]. ได้จาก : http://www.thaitobacco.or.th/บทความทั่วไป

กองกีฏและสัตววิทยา. (2542). **แมลงศัตรูผัก**. โรงพิมพ์ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ. 97 หน้า.

เกียรติเกษตร กาญจนพิสุทธิ์. (2538). **มะเขือเทศ.** ศูนย์ผลิตตำราเกษตรเพื่อชนบท. นนทบุรี. 63 หน้า.

จานุลักษณ์ ขนบดี. (2541). **การผลิตเมล็ดพันธุ์ผัก**. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ. 260 หน้า.

พิสสวรรณ เจียมสมบัติ. (2545). ยีนและการตัดต่อยีน. **ใน เอกสารประกอบการฝึกอบรมหลักสูตร "เทคนิคการสร้างพืชดัดแปรพันธุกรรม".** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เมฆ จันทน์ประยูร. (2548). **ผักสวนครัว ก้าวสำคัญแห่การพึ่งตนเอง.** พิมพ์ครั้งที่ 6. สำนักพิมพ์มิติใหม่. กรุงเทพฯ. 136 หน้า.

ลิลลี่ กาวีต๊ะ, มาลี ณ นคร, ศรีสม สุวรรณวงศ์ และ สุรียา ตันติวิวัฒน์. (2549). **สรีรวิทยาของพืช**. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 261 หน้า.

ศรีมฆ ชาวโพงพาง และ เจษฎาพร พิทักษ์สุธีพงศ์. (2545). เทคนิคการสร้างพืชดัดแปรพันธุกรรม. **ใน เอกสารประกอบการฝึกอบรมหลักสูตร "เทคนิคการสร้างพืชดัดแปรพันธุกรรม".** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ.

ศูนย์ข้อมูลโรคติดเชื้ออุบัติใหม่ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. (2549). กลไกการทำงานของ RNA interference (RNAi). [ออนไลน์]. ได้จาก : http://www.cueid.rog

ศูนย์สารสนเทศ สำนักงานฐานเศรษฐกิจการเกษตร. (2552). ข้อมูลสินค้ามะเขือเทศ. [ออนไลน์]. ได้จาก : http://www.oae.go.th

ศูนย์สารสนเทศการเกษตร สำนักเศรษฐกิจการเกษตร (2552). สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปีเพาะปลูก 2550/52. [ออนไลน์]. ได้จาก : http://www.oae.go.th

สถิต วิมล. (2542). **การปลูกมะเขือเทศ**. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยแม่โจ้. เชียงใหม่.

สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย. (2548). **สาระน่ารู้อณูพันธุศาสตร์.** สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีกรุงเทพฯ. บริษัทเท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด.

อร่าม คุ้มทรัพย์. (2543). **เกษตรธรรมชาติแบบไทยไทย**: พืชผัก. โรงพิมพ์อักษรไทย (น.ส.พ. ฟ้าเมืองไทย). กรุงเทพฯ. 144 หน้า.

Abanda-Nkpwatt, D., Krimm, U., Coiner, H.A., Schreiber, L., and Schwab, W. (2006a). Plant volatiles can minimize the growth suppression of epiphytic bacteria by the phytopathoge nic fungus *Botrytis cinerea* in co-culture experiments. **Environ. Exp. Bot**. 56: 108-119.

Aharoni, A., Giri, A.P., Deuerlein, S., Griepink, F., De Kogel, W.J., Verstappen, F.W.A., Verhoeven, H.A., Jongsma, M.A., Schwab, W., and Bouwmeester, H.J. (2003). Terpenoid methabolism in wild-type and transgenic Arabidopsis plants. **Plant Cell**. 15: 2866-2884.

Aharoni, A., Keizer, L.C.P., Bouwmeester, H.J., Sun, Z., Alvarez-Huerta, M., Verhoeven, H.A., Blass, J., Van Houwelingen, A.M.M.L., De Vos, R.C.H., Van der Voet, H., Jansen, R.C., Guis, M., Mol, J., Davis, R.W., Schena, M., Van Tunen, A.J., and O'Connell, A.P. (2000). Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays. **Plant Cell**. 12: 647-661.

Alba, R., Payton, P., Fei, Z., McQuinn, R., Debbie, P., Martin, G.B., Tanksley, S.D., and Giovannoni, J.J. (2005). Transcriptome and selected metabolite analyses reveal multiple points of ethylene control during tomato fruit development. **Plant Cell**. 17: 2954-2965.

Alexander, L., and Grierson, D. (2002). Ethylene biosynthesis and action in tomato : a model for climacteric fruit ripening. **J. Experimental Botany**. 53: 2039-2055.

Anon, P. (1971). Nutritive Value of Food". **USDA Home and Garden Bulletin**. No12.

Baldwin, E.A., Scott, J.W., Shewmaker, C.K., and Schuch, W. (2000). Flavor trivia and tomato aroma : biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components. **Hort Science**. 35(6): 1013-10225.

Beekwilder, J., Alvarez-Huerta, M., Neef, E., Verstappen, F.W.A., Bouwmeester, H.J., and Aharoni, A. (2004). Functional characterization of enzymes forming volatile esters from strawberry and banana. **Plant Physiol**. 135: 1865-1878.

Bicsak, T.A., Kann, L.R., Reiter, A., and Chase, Jr. (1982). Tomato alcohol dehydrogenase : purification and substrate specificity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 216: 605-615.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**. 72: 248-254.

Brauss, M.S., Linforth, R.S.T., and Taylor, A.J. (1998). Effect of variety, time of eating, and fruit-to-fruit variation on volatile release during eating of tomato fruit (*Lycopericon esculentum*). **J. Agricultural and Food Chemistry**. 46: 2287-2291.

Bucher, M., Brander, K.A., Sbicego, S., Mande, T., and Kuhlemeier, C. (1995). Aerobic fermentation in tobacco pollen. **Plant Molecular Biol**. 28: 739-750.

Buttery, R.G., and Ling, L.C. (1993). Volatile components of tomato fruit and plant parts: relationship and biogenesis. **In: Bioactive Volatile Compounds from Plants**. (Eds : Teranishi, R., Buttery, R.G., and Sugisawa, H.), ACS, Washington, D.C. 22-33.

Buttery, R.G., Teranishi, R., Ling, L.C., Flath, R.A., and Stern, D.J. (1988). Quantitative studies on origins of fresh tomato volatiles. **J Agric Food Chem**. 36: 1247-1250.

Chase, T. (1999). Alcohol dehydrogenases: identification and names for gene families. **Plant Mol Biol Rep**. 17: 333-350.

Chen, A.R., Hahn, M., and Walbot, M.C. (1993). Alcohol dehydrogenase 2 and pyruvate decarboxylase induction in ripening and hypoxy tomato fruit. Plant Physiol. 31: 875-885.

Christie, P.J., Hahn, M., and Walbot, V. (1991). Low-temperature accumulation of alcohol dehydrogenase-1 mRNA and protein activity in maize and rice seedling. **Plant physiol**. 95: 699-706.

Conley, T.R., Peng, H.P., and Shih, M.C. (1999). Mutations affecting induction of glycolytic and fermentative genes during germination and environmental stresses in *Arabidopsis*. **Plant Physiol**. 119: 599-608.

Croteau, R., and Karp, F. (1991). Origin of natural odorants. **In perfumes. Art, Science and technology (Muller, P.M. and Lamparsky, D., eds).** London: Elsevier Applied Science. 101-126 pp.

De Bruxelles, G.L., and Robert, M.R. (2001). Signals regulating multiple responses to wounding and herbivores. Crit. Rev. **Plant Sci**. 20: 487-521.

Dudareva, N., and Pichersky, E. (2000). Biochemical and molecular genetic aspects of floral scents. **Plant Physiol**. 122: 627-633.

Dudareva, N., Pichersky, E., and Gershenzon, J. (2004). Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physiol**. 135: 1893-1902.

El-Sharkawy, I., Manriquez, D., Flores, F.B., Regad, F., Bouzayen, M., Latche, A., and Pech, J.C.

(2005). Functional characterization of a melon alcohol acyl-transferase gene family involved in the biosyntheis of ester volatiles. Identification of the crucial role of a threonine residue for enzyme activity. **Plant molecular biology**. 59: 345-362.

Feussner, I., and Wasternack, C. (2002). The lipoxygenase pathway. **Annual review of plant biology**. 53: 275-297.

Flores, F., El-Yahyaoui, F., De Billerbeck, G., Romojaro, F., Latche, A., Giovannoni, J.J., Pech, J.C., and Bouzayen, M. (2002). Role of ethylene in the biosynthetic pathway of aliphatic ester aroma volatiles in Charentais Cantaloupe melons. **J Experimental Botany**. 53: 201-206.

Fonseca, S., Hackler, L., Zvara, A., Ferreira, S., Balde, A., Dudits, D., Pais, M.S., and Puskas, L.G. (2004). Monitoring gene expression along pear fruit development, ripening and senescence using cDNA microarrays. **Plant Science**. 167: 457-469.

Gerlach, W.L., Pryor, A.J., Dennis, E.S., Ferl, A.J., Sacha, M.M., and Peacock, W.J. (1982). cDNA cloning and induction of the alcohol dehydrogenase gene (ADH1) of maize. Proc Natl Acad Sci USA. 79: 2981-2985.

Geyt, J.V. (2003). Mode of inheritance and some general characteristics of sugarbeet alcohol dehydrogenase. **Plant Science**. 46(2): 143-149.

Giniger, E., Barnum, S.M., and Ptashne, M. (1985). Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. **Plant Cell.** 40: 767-774.

Goff, S.A., and Klee, H.J. (2006). Plant volatile compounds: sensory vues for health and nutritional value. **Science**. 311: 815-819.

Guentert, M. (2007). The Flavor and fragrance industry- past, present and future. *In Flavors and Fragrances* (Berger.R.G., ed). Berlin : Springer, 1-13 pp.

Hamilton, A.J., Lycett, G.W., and Grierson, D. (1990). Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. **Nature**. 346: 284-287.

Hellens, R.P., Edwards, E.A., Leyland, N.R., Bean, S., and Mullineaux, P.M. (2000). pGreen : a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. **Plant Mol Biol**. 42: 819-832.

Holsters, M., De Waaele, D., Depicker. A., Messens, E., Van Montagu, M., and Schell, J. (1978). Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. **Molecular and General Genetics**. 163: 181-187.

Ingersoll, J.C., Rothenberg, M., Liedl, B.E., Folkerts, K., Garvin, D., Hanson, M.R., Doyle, J.J., and Mutschler, M.A. (1994). A novel anther-ecpressed *Adh*-homologous gene in *Lycopersicon esculentum*. **Plant Moleuclar Biol**. 26: 1875-1891.

Ismond, K.P., Dolferus, R., De Pauw, M., Dennis, E.S., and Good, A.G. (2003). Enhanced low oxygen survival in *Arabidopsis* through increased metabolic flux in the fermentative pathway. **Plant physiol**. 132: 1292-1302.

Jone, J. (1999). **Tomato plant culture: in the field, green house and home garden**. CRC Press LLC. Florida, USA. 199 pp.

Lewinsohn, E., Sitrit, Y., Bar, E., Azulay, Y., Meir, A., Zamir, D., and Tadmor, Y. (2005). Carotenoid pigmentation affects the volatile composition of tomato and watermelon fruits, as revealed by comparative genetic analyses. **J. Agric Food Chem**. 53: 3142-3148.

Ling, H.Q., Kriseleit, D., and Ganal, M.W. (1998). Effect of ticarcillin/potassium clavulanate on callus growth and shoot regeration in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **Plant Cell Reports**. 17: 843-847.

Longhurst, T.J., Lee, E., Hinde, R., Brady, C., and Speirs, J. (1994). Structure of the tomato Adh2 gene and Adh2 pseudogenes, and a study of Adh2 gene expression in fruit. **Plant Mol. Biol**. 26: 1073-1084.

Longhurst, T.J., Tung, H.F., and Brady, C.J. (1990). Developmental regulation of the expression of alcohol dehydrogenase in ripening tomato fruit. **J. Food Biochemistry**. 14: 421-433.

Lucchetta, L., Manriquez, D., El-Sharkawy, I., Flores, E.B., Sanchez-Bel, P., Zouine, M., Ginies, C., Bouzayen, M., Rombaldi, C., Pech, J.C., and Latche, A. (2007). Biochemical and catalytic properties of three recombinant alcohol acyltransferases of melon, sulfur containing ester formation, regulatory role of CoA-SH in activity, and sequence elements conferring substrate preference. **J. Agric. Food Chem.** 55: 5213-5220.

Mallory, A.C., Ely, L., Smith, T.H., Marathe, R., Anandalakshmi, R., Fagard, M., Vaucheret, H., Pruss, G., Bowman, L., and Vance, V.B. (2001). HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile silencing signal. **Plant Cell**. 13: 571-583.

Manriquez, D., El-Sharkawy, I., Flores, F.B., Yahyaoui, F., Regad, F., Bouzayen, M., Latche, A., and Pech, J.C. (2006). Two highly divergent alcohol dehydrogenases of melon exhibit fruit ripening

specific expression and distinct biochemical characteristics. **Plant Mol Biol**. 61: 675-685.

Mathieu, S., Dal-Cin, V., Fei, Z., Li, H., Bliss, P., Taylor, M.G., and Klee, H.J. (2009). Flavour compounds in tomato fruits : identification of loci and potential pathways affecting volatile composition. **J. Experimental Botany**. 60(1): 325-337.

Matton, D.P., Constabel, P., and Brisson, N. (1990). Alcohol dehydrogenase gene expression in potato following elicitor and stress treatment. **Plant Molecular Biol**. 14 : 775-783.

Meissner, R., Jacobson, Y., Melamed, D., Levyatuv, S., Shalev, G., Ashri, A., Elkind, Y., and Levy, A.A. (1997). A new model system for tomato genetics. **The Plant Journal**. 12: 1465-1472.

Molina, I., Nicolas, M., and Crouzet, J. (1986). Grape alcohol dehydrogenase. II. Kinetics studies : Isolation and characterization. **Am J Enol Vitic**. 37: 169–173.

Molina, I., Salles, C., Nicolas, M., and Crouzet, J. (1987). Grape alcohol dehydrogenase. II Kinetics studies: mechanism, substrate and coenzyme specificity. **Am J Enol Vitic**. 38: 60–64.

Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Plant Physiol**. 15: 473–497.

Nelson, D.L., and Cox, M.M. (2000). Lehninger principle of biochemistry. Worth publisher, New York.

Pichersky, E., and Gershenzon, J. (2002). The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. Curr. Opin. **Plant Biol**. 5: 237-243.

Pichersky, E., Noel, J.P., and Dudareva, N. (2006). Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**. 311: 808-811.

Picton, S., Gray, J., Barton, S., AbuBakar, U., Lowe, A., and Grierson, D. (1993). cDNA cloning and characterization of novel ripening related mRNAs with altered patterns of accumulation in the ripening inhibitor (rin) tomato ripening mutant. **Plant Molecular Biol**. 23: 193-207.

Potrykus, I., and Spangenlserg, G. (1995). Gene transfer to plants. Springer-verlag. Berlin Heidelberg, Germany. 361 pp.

Register, J.C. (1997). Approaches to evaluating the transgenic status of transformed plants. **TIBTECH**. 151: 141-146.

Rezaian, A.M., Skene, K.G.M., and Ellis, J.G. (1988). Anti-sense RNAs of cucumber mosaic virus in transgenic plants assessed for control of the virus. **Plant Molecular Biol**. 11: 463-471.

Saglio, P.H., Raymond, P., and Pradet, A. (1980). Metabolic activity and energy charge of excised maize root tips under anoxia. **Plant Physiol**. 66: 1053-1057.

Sambrook, J., Fritsch, E.E., and Maniatis, T. (1989). **Molecular cloning: a laboratory manual (2nd ed)**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schwab, W., Davidovich-Rikanati, R., and Lewinsohn, E. (2008). Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. **The Plant Journal**. 54: 712-732.

Shiao, T., Ellis, M.H., Dolferus, R., Dennis, E.S., and Doram, P.M. (2002). Overexpression of alcohol dehydrogenase or pyruvate decarboxylase improves the growth of hairy rots under hyoxia. **Biotech and Bioen**. 77: 455-461.

Speirs, J., Corel, R., and Cain, P. (2002). Relationship between ADH activity, ripeness and softness in six tomato cultivars. **Scientia Horticulturae**. 93: 137-142.

Speirs, J., Lee, E., Holt, K., Yong-Duk, K., Steele, N., Loveys, B., and Schuch, W. (1998). Genetic manipulation of alcohol dehydrogenase levels in ripening tomato fruit affects the balance of some flavor aldehydes and alcohols. **Plant Physiol**. 117: 1047-1058.

Steeghs, M., Bais, H.P., De Fouw, J., Goldan, P., Kuster, W., Northway, M., Fall, R., and Vivanco, J.M. (2004). Proton-transfer-reaction mass spectrometry as a new tool for real time analysis of root-secreted volatile organic compounds in Arabidopsis. **Plant Physiol**. 135: 47-58.

Sugantha, P.S., Gowri, S.J., Thirumalaisamy, R., Kavitha, P., Prakash, B., Arunachalam, G., and Selvamuthukumar, S. (2010). Over expression of IPTG inducible GST protein in *E. coli* BL21. J. **Biomed Sci and Res**. 2(1): 46-51.

Surburg, H., and Panten, J.(eds). (2005). **Common Fragrance and Flavor Materials: preparation, properties and uses**. Weinheim, Germany : Wiley-VCH.

Tanksley, S.D. (1979). Linkage, chromosomal association and expression of Adh-1 and Pgm-2 in tomato. **Biochem Genet**. 17: 1159-1167.

Tanksley, S.D., and Jone, R.A. (1981). Effects of O_2 stress on tomato alcohol dehydrogenase activity: description of a second ADH coding gene. **Biochem Genet**. 19: 397-409.

Tasin, M., Backman, A.C., Coracini, M., Casado, d., Loriatti, C., and Witzgall, P. (2007). Synergism and redundancy in a plant volatile blend attracting grapevine moth females. **Photochemistry.** 68: 203-304.

Tesnière, C., and Verriès, C. (2000). Molecular cloning and expression of cDNAs encoding alcohol dehydrogenases from *Vitis vinifera* L. during berry development. **Plant Science**. 157: 77-88.

Tesnière, C., Pradal, M., El-Kereamy, A., Torregrosa, L., Chatelet, P., Roustan, J.P., and Chervin, C. (2004). Involvement of etylene signalling in a non-climacteric fruit : new elements regarding the regulation of ADH expression in grapevine. **J. Exp Bot**. 55: 2235-2240.

Theodore-Chase, J.R. (1999). Alcohol dehydrogenases : Identification and names for gene families. Plant Molcular Biology Report. 17: 333-350.

Tihanyi, K., Fontanell, A., and Thirion, J. (1989). Gene regulation during anaerobiosis in soya roots. **Biochem Genet**. 27: 719-730.

Van der Rest, B., Danoun, S., Boudet, A-M., and Rochange, S.F. (2006). Down-regulation of cinnamoyl-CoA reductase in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) induces dramatic changes in soluble phenolic pools. J. **Experimental Botany**. 57: 1399-1411.

Van der Straeten, D., Rodrigues Pousada, R.A., Gielen, J., and Van Montagu, M. (1991). Tomato alcohol dehydrogenase expression during fruit ripening and under hypoxic conditions. **FEBS Lett**. 295: 39-42.

Vancanneyt, G., Schmidt, R., O'Connor-Sznchez, A., Willmitzer, L., and Rocha-Sosa, M. (1990). Construction of an intron-containing marker gene: splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. **Molecular and General Genetics**. 220: 245-250.

Wang, M.B., Wesley, S.V., Finnegan, E.J., Smith, N.A., and Waterhouse, P.M. (2001). Replicating satellite RNA induces sequence-specific DNA methylation and truncated transcripts in plants. **RNA**. 7: 16-28.

West, R.W.J., Yocum, R., and Ptashne, M. (1984). *Saccharomyces cerevisiae* GAL1-GAL10 divergent promoter region: location and function of the upstream activator sequence UAS_G. **Mol Cell Biol**. 4: 2467-2478.

Yahyaoui, F., Wongs-Aree, C., Latche, A., Hackett, R., Grierson, D., and Pech, J.C. (2002). Molecular and biochemical characteristics of a gene encoding an alcohol acyl transgerase involved in the generation of aroma volatiles esters during melon ripening. **Eur J Biochem**. 269: 2359-2366.

Yilmaz, E. (2001). Oxylipin pathway in the biosynthesis of fresh tomato volatiles. **Turk J Biol**. 25: 351-360.

ภาคผนวก ก

ตารางภาคผนวกที่ 1ก ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน *Le-scADH1* และ *Le-scADH2* เพื่อถ่ายเข้าสู่มะเขือเทศ

รายชื่อ	**ลำดับเบส (5’ ⟶ 3’)**
Le-scADH1	
LeADH1-NcoI (up1)	ATCCATGGGTGTTGCTTACCTCCAACGG
LeADH1-Xba I (low1)	AGTCTAGAGTCTCGCATTCTGTTACCGA
LeADH1-PstI (up2)	ATCTGCAGGTGTTGCTTACCTCCAACGG
LeADH1-EcoRI (low2)	ATGAATTCGTCTCGCATTCTGTTACCGA
Le-scADH2	
LeADH2-NcoI (up1)	ATCCATGGAACTGGTGGTGCTAGTGGCA
LeADH2-XbaI (low1)	AGTCTAGAATGCCGCATAAGAATGTGGG
LeADH2-PstI (up2)	ATCTGCAGAACTGGTGGTGCTAGTGGCA
LeADH2-EcoRI (low2)	ATGAATTCATGCCGCATAAGAATGTGGG

ตารางภาคผนวกที่ 2ก สูตรอาหารที่ใช้ในการถ่ายยีน

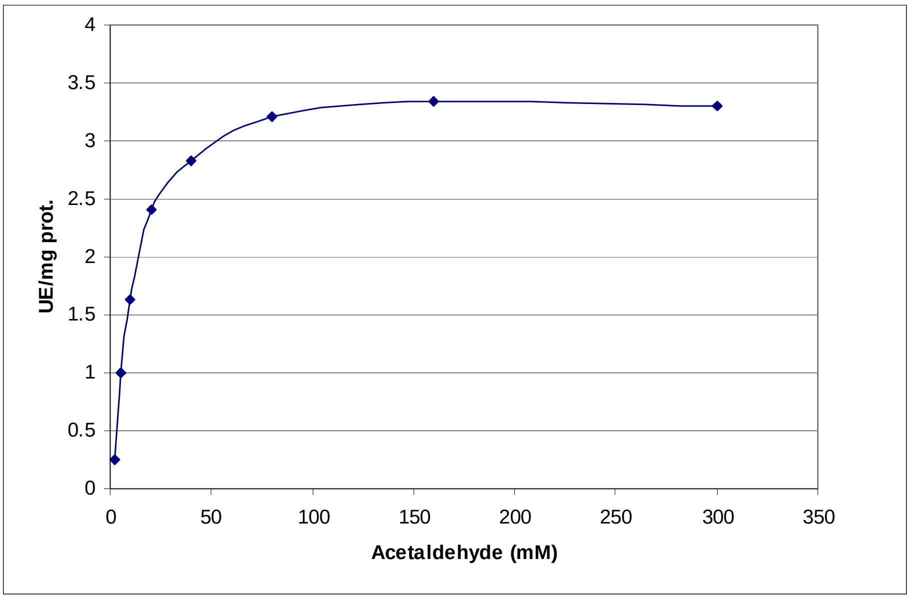
Medium	MSa	MSl	MSrk	MSt	MSr
MS mixture [a] (g/l)	4.3	4.3	4.3	4.3	4.3
Sucrose (g/l)	30	30	30	30	30
Plant agar (g/l)	8	-	8	8	8
pH	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8
Vitamin (Nitch) (ml/l)	1	1	1	1	1
NAA (mg/l)	-	-	0.1	-	-
BAP (mg/l)	-	-	1	-	-
Zeatine (mg/l)	-	-	-	2	-
IAA (mg/l)	-	-	-	-	0.5
Ticarcillin [b] (mg/l)	-	-	-	150	150
Kanamycin [c] (mg/l)	-	-	-	100	30

[a] Murashige and Skoog (1962) medium basal salt mixture (Eurobio)

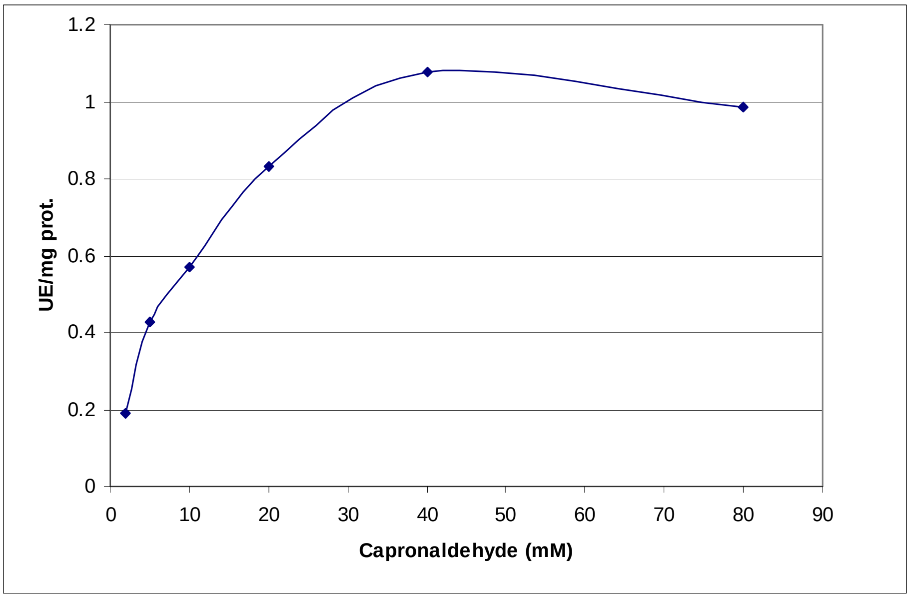
[b] Stock solution at a concentration of 150 mg/ml in water stored at -20°C

[c] Stock solution at a concentration of 100 mg/ml in water stored at -20°C

การตรวจวัดเอนไซม์ Le-scADH1 โดยใช้ acetaldehyde และ capronaldehyde

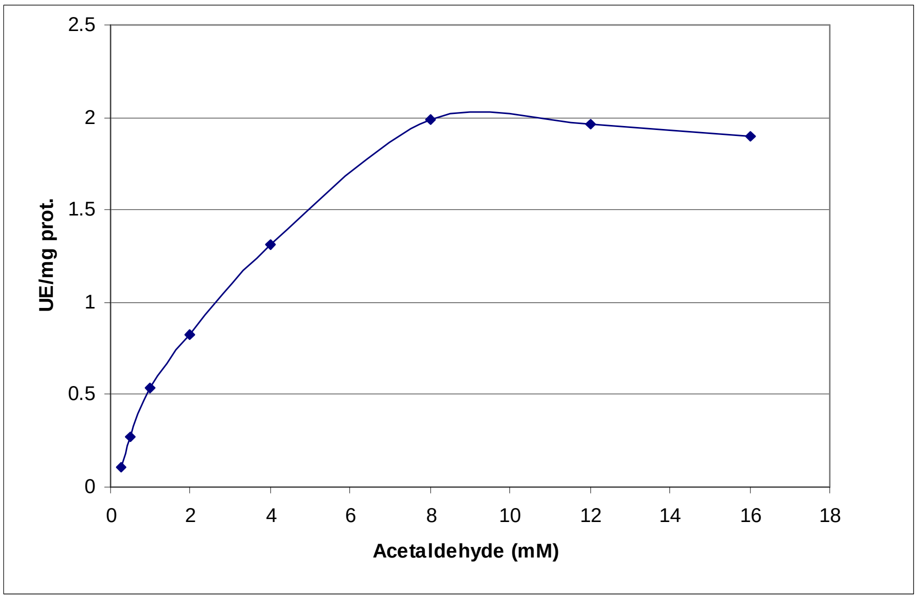


ภาพภาคผนวกที่ 1ก Activity ของเอนไซม์ Le-scADH1 โดยใช้ acetaldehyde ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

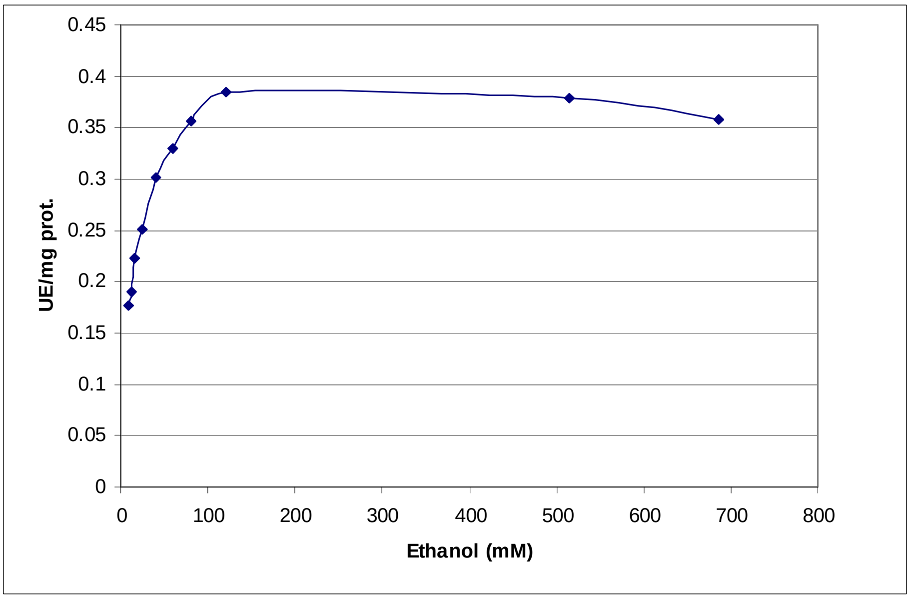


ภาพภาคผนวกที่ 2ก Activity ของเอนไซม์ Le-scADH1 โดยใช้ capronaldehyde ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

การตรวจวัดเอนไซม์ Le-scADH2 โดยใช้ acetaldehyde, ethanol และ capronaldehyde

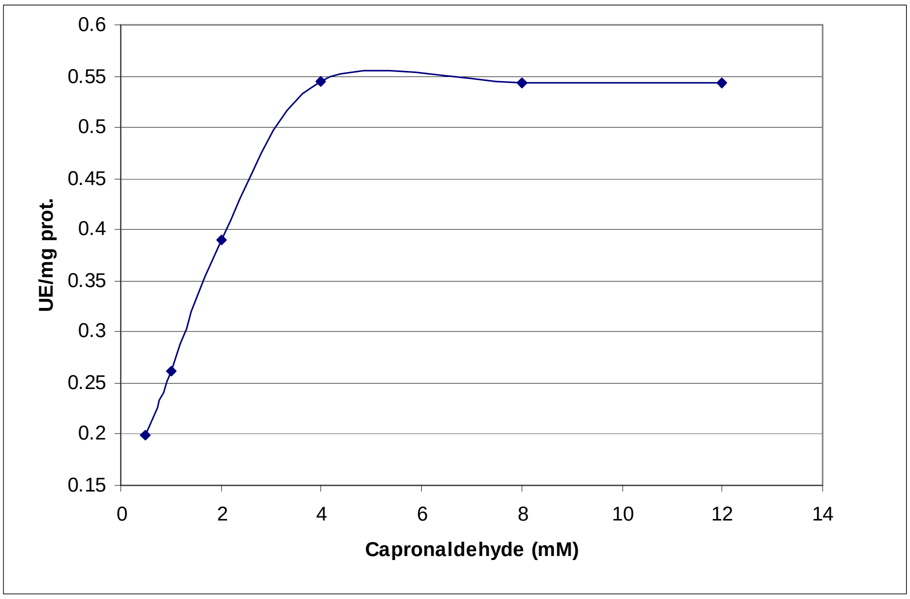


ภาพภาคผนวกที่ 3ก Activity ของเอนไซม์ Le-scADH2 โดยใช้ acetaldehyde ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



ภาพภาคผนวกที่ 4ก Activity ของเอนไซม์ Le-scADH2 โดยใช้ ethanol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

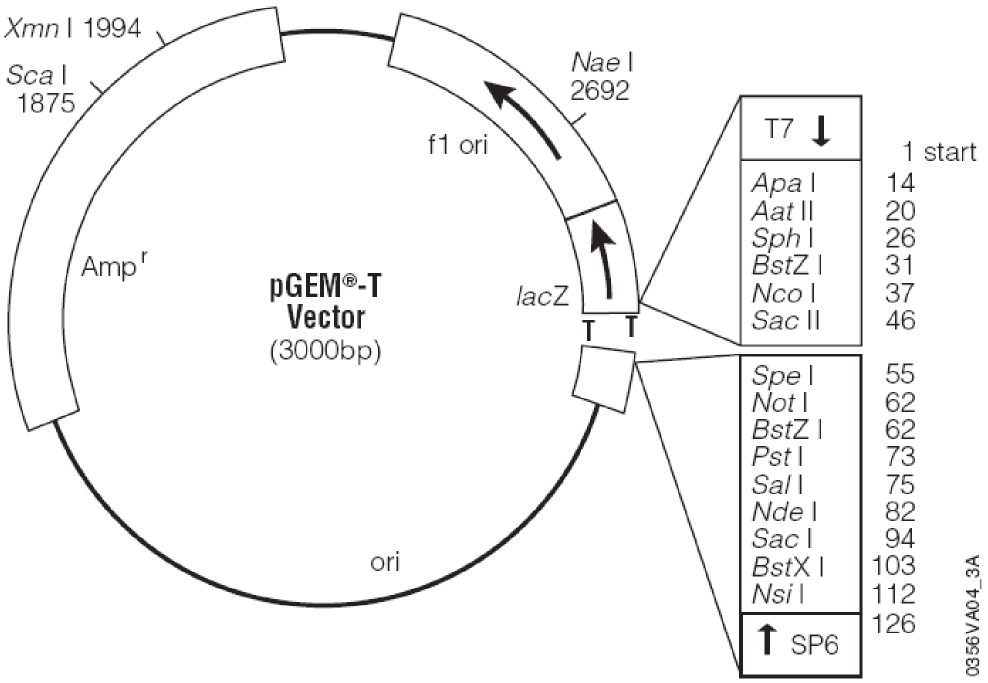
การตรวจวัดเอนไซม์ Le-scADH2 โดยใช้ acetaldehyde, ethanol และ capronaldehyde (ต่อ)



ภาพภาคผนวกที่ 5ก Activity ของเอนไซม์ Le-scADH2 โดยใช้ capronaldehyde ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ภาคผนวก ข

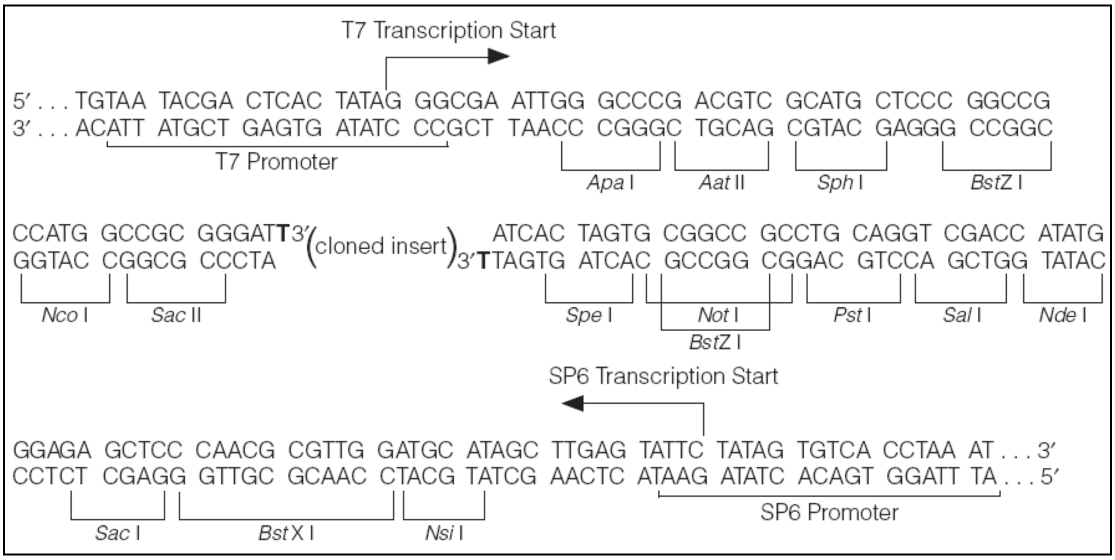
Plasmid maps



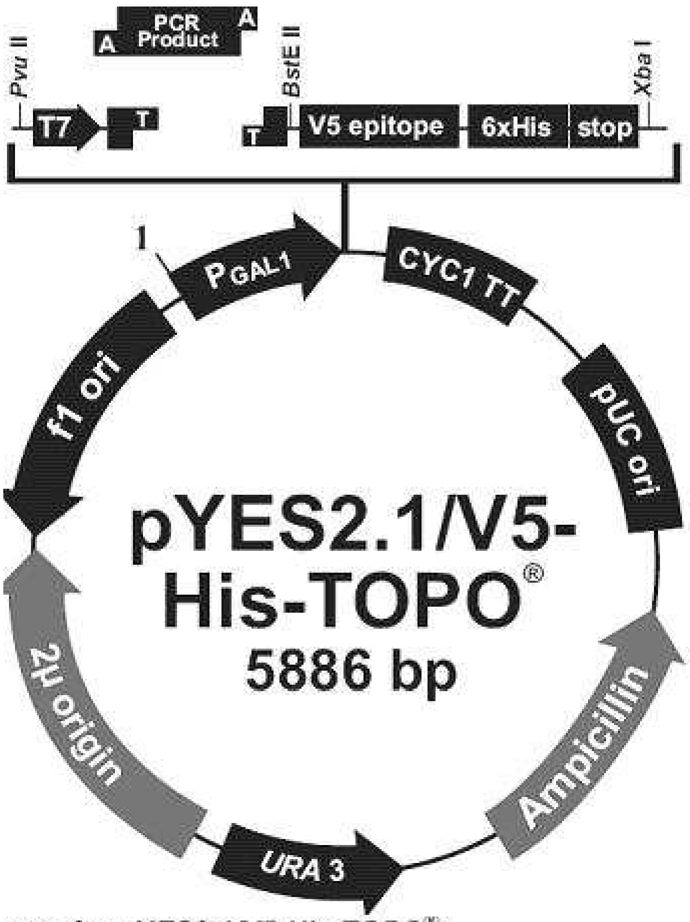
pGEM®-T Vector sequence reference points:

T7 RNA polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10–113
SP6 RNA polymerase promoter (–17 to +3)	124–143
SP6 RNA polymerase transcription initiation site	126
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	161–177
*lac*Z start codon	165
lac operator	185–201
β-lactamase coding region	1322–2182
phage f1 region	2365–2820
lac operon sequences	2821–2981, 151–380
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2941–2957
T7 RNA polymerase promoter (–17 to +3)	2984–3

ภาพภาคผนวกที่ 1ข แผนที่และส่วนประกอบที่สำคัญของ pGEM-T vector



ภาพภาคผนวกที่ 2ข ลำดับเบสของเวคเตอร์ pGEM-T Vector



Comments for pYES2.1/V5-His-TOPO®:
5886 nucleotides

GAL1 promoter: bases 1-451
GAL1 Forward priming site: bases 414-437
T7 promoter: bases 475-494
TOPO® Cloning site: bases 512-513
V5 epitope: bases 543-584
V5 C-term Reverse priming site: bases 552-572
Polyhistidine (6xHis) region: bases 594-611
CYC1 transcription termination signal: bases 633-886
pUC origin: bases 1068-1741
Ampicillin resistance gene: bases 1886-2746 (complementary strand)
URA3 promoter: bases 3647-3872 (complementary strand)
URA3 gene: bases 2764-3645 (complementary strand)
2μ origin: bases 3875-5346
f1 origin: bases 5414-5869 (complementary strand)

ภาพภาคผนวกที่ 3ข แผนที่และส่วนประกอบที่สำคัญของเวคเตอร์ pYES 2.1/V5-His-/TOPO

TOPO® Cloning Site of pYES2.1/ V5-His-TOPO®

The diagram below is supplied to help you design appropriate PCR primers to correctly clone and express your PCR product. Restriction sites are labeled to indicate the actual cleavage site. The vector is supplied linearized between base pair 512 and 513. This is the TOPO® Cloning site. For a map and a description of the features of pYES2.1/V5-His-TOPO®, refer to the **Appendix**, pages 26-27. **The complete sequence of pYES2.1/V5-His-TOPO® is available for downloading from our Web site (www.invitrogen.com) or by contacting Technical Service (see page** Error! Bookmark not defined.**).**

```
      5′ end of GAL1 promoter
                 TATA box
300  TTAACAGATA TATAAATGCA AAAACTGCAT AACCACTTTA ACTAATACTT TCAACATTTT

                                               start of transcription
360  CGGTTTGTAT TACTTCTTAT TCAAATGTAA TAAAAGTATC AACAAAAAAT TGTTAATATA

                         3′ end of GAL1 promoter
     GAL1 Forward priming site                                 Pvu II
420  CCTCTATACT TTAACGTCAA GGAGAAAAAA CCCCGGATCG GACTACTAGC AGCTGTAATA

     T7 promoter
480  CGACTCACTA TAGGGAA TAT TAA GCT CGC CCT T  PCR   AAG GGC GAG CTT
                        ATT CGA GCG GGA A Product TTC CCG CTC GAA
                        *** Ala Arg Pro           Lys Gly Glu Leu
                                               V5 epitope
        BstE II                                V5 C-term Reverse priming site
525  CGA GGT CAC CCA TTC GAA GGT AAG CCT ATC CCT AAC CCT CTC CTC GGT CTC
     Arg Gly His Pro Phe Glu Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu

                                Polyhistidine region           Xba I
576  GAT TCT ACG CGT ACC GGT CAT CAT CAC CAT CAC CAT TGA GTTTC TAGAGGGCCG
     Asp Ser Thr Arg Thr Gly His His His His His His ***

630  CATCATGTAA TTAGTTATGT CACGCTTACA TTCACGCCCT CCCCCCACAT CCGCTCTAAC
```

ภาพภาคผนวกที่ 4ข ลำดับเบสของเวคเตอร์ pYES 2.1/V5-His-/TOPO

Sequencing Primers	The table below provides the sequence and total pmoles supplied of the *GAL1* Forward and the V5 C-term Reverse sequencing primers. Two micrograms of each primer are supplied.

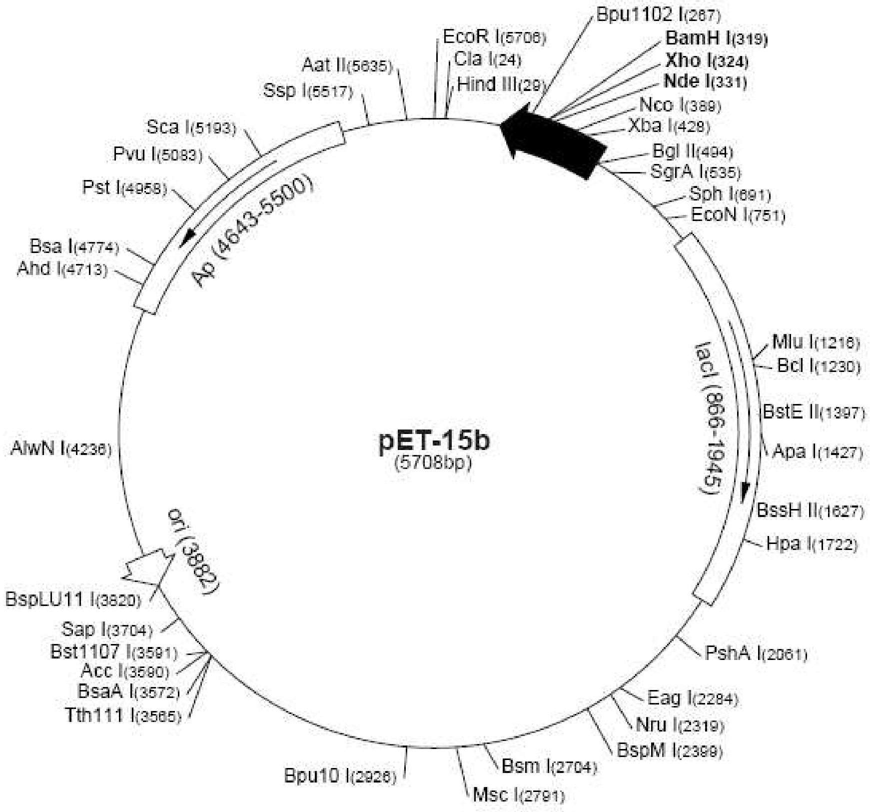
Primer	Sequence	pMoles Supplied
GAL1 Forward	5′-AATATACCTCTATACTTTAACGTC-3′	332
V5 C-term Reverse	5′-ACCGAGGAGAGGGTTAGGGAT-3′	278

ภาพภาคผนวกที่ 5ข ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบลำดับเบสในเวคเตอร์ pYES 2.1/V5-His-/TOPO

Detection of Recombinant Proteins	Once cloned into pYES2.1/V5-His-TOPO®, expression of your PCR product can be detected using an antibody to the protein itself or to the appropriate epitope. The table below describes the antibodies available for use with pYES2.1/V5-His-TOPO®. Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibodies allow one-step detection using colorimetric or chemiluminescent detection methods. The amount of antibody supplied is sufficient for 25 Western blots.

Antibody	Epitope	Catalog no.
Anti-V5	Detects 14 amino acid epitope derived from the P and V proteins of the paramyxovirus, SV5 (Southern *et al.*, 1991): GKPIPNPLLGLDST	R960-25
Anti-V5-HRP		R961-25
Anti-His(C-term)	Detects the C-terminal polyhistidine tag (requires the free carboxyl group for detection) (Lindner *et al.*, 1997): HHHHHH-COOH	R930-25
Anti-His(C-term)-HRP		R931-25

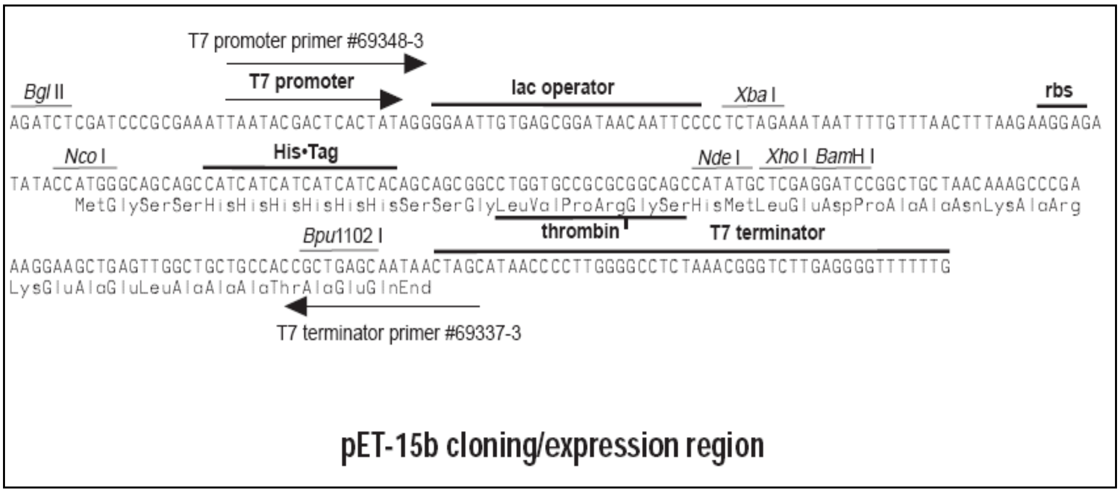
ภาพภาคผนวกที่ 6ข รายชื่อแอนติบอดี้ที่ใช้ในการตรวจสอบโปรตีนในเวคเตอร์ pYES 2.1/V5-His-/TOPO



pET-15b sequence landmarks

T7 promoter	463-479
T7 transcription start	452
His• Tag coding sequence	362-380
Multiple cloning sites	
(*Nde* I - *Bam*H I)	319-335
T7 terminator	213-259
lacI coding sequence	(866-1945)
pBR322 origin	3882
bla coding sequence	4643-5500

ภาพภาคผนวกที่ 7ข แผนที่และส่วนประกอบที่สำคัญของเวคเตอร์ pET-15b



ภาพภาคผนวกที่ 8ข ลำดับเบสของเวคเตอร์ pET-15b

ประวัติผู้เขียน

นางสาวจุฑามาศ ตรงชื่น เกิดเมื่อวันที่ 25 มีนาคม พ.ศ. 2522 ที่อำเภอแกลง จังหวัดระยอง ศึกษาระดับประถมศึกษาปีที่ 1-6 ที่โรงเรียนวัดบุนนาค ระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนต้นและตอนปลาย ที่โรงเรียนสุนทรภู่พิทยา อำเภอแกลง จังหวัดระยอง และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา เมื่อปี พ.ศ. 2544 และได้ทำงานเป็นผู้ช่วยนักวิจัยในโครงการของรองศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา ตันตสวัสดิ์ จนถึงปี พ.ศ. 2548 จากนั้นศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยขณะศึกษาได้รับทุนเรียนดีระดับบัณฑิตศึกษา

ผลงานวิจัย : ได้นำเสนอผลงานวิจัย ในการประชุมวิชาการ งานวันเกษตรแห่งชาติ ประจำปี พ.ศ. 2551 เรื่อง การแสดงออกของยีนแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสของมะเขือเทศในเซลล์ยีสต์