แบบรายงานเรื่องเต็ม ผลการวิจัยที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2560

1. แผนงานวิจัย แผนงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร

2. โครงการวิจัย การค้นหาและศึกษาหน้าที่ของยีนเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่
กิจกรรมที่ 2 การโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของยีนในสิ่งมีชีวิตต้นแบบ

3. ชื่อการทดลอง 2.6 (ภาษาไทย) การโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของยีน *calreticulin* และ *calmodulin* เพื่อให้ทนต่อสภาวะขาดน้ำและสภาวะเค็มในพืชต้นแบบ

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) Gene Cloning and Expression of Gene *Calreticulin* and *Calmodulin* for Drought and Salt Stress in Model Plant

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	นางสาวสุภาวดี ง้อเหรียญ	**สังกัด**	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
ผู้ร่วมงาน	นางสาวภรณี สว่างศรี	**สังกัด**	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางสาวภุมรินทร์ วณิชชนานันท์	**สังกัด**	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางสาวอัจฉราพรรณ ใจเจริญ	**สังกัด**	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
	นางสาวอรุโณทัย ซาววา	**สังกัด**	สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

Abstract

Calreticulin (*CRT*) *and calmodulin* (*CaM*) genes are involved in the regulation of cellular functions, including the regulation of immune system, signal transduction pathways, gene expression, cell adhesion and inhibit the destruction of the complement system. In addition, these are also a gene involved in the maintaining of calcium ion concentration within cells. When plants are under an environment stimuli both biotic and abiotic stress. Ca^{2+} within the cell increases, resulting in the activation of various enzymes in excessive levels can cause death of cells. So, plants need to balance calcium ions inside the cell to survive under abiotic stress conditions. In this study, a full-length genomic DNA sequences of corn (*Zea mays* L.) encoding *calreticulin* (*CRT*) and *calmodulin* (*CaM*) have been isolated from four corn variety names TAKFA 1, TAKFA 3, NAKORNSAWAN 3 and NAKORNSAWAN 1 via PCR – based method. The gene sequence contains a fragment of 3,699 bp and 2,472 bp, including with 14 exons and 2 exons, a 1,263 bp and 450 bp complete ORF, plus a polyA signal AAATAA motif in *CaM* gene. *CRT* and *CaM* gene encoding the 421 and 150 amino acid polypeptide. The highly conserved region of the gene is calreticulin and colmodulin which are also found in monocots *Zea mays* (L.) (EU961008.1, NM_001111985.2) and *Sorghum bicolor* (L.) XM_021453764.1, XM_002441253.2) with 99% and 95% (*CRT* gene) and 99% and 98% (*CaM* gene) of homology respectively.

บทคัดย่อ

การโคลนยีน *calreticulin* (*CRT*) และ *calmodulin* (*CaM*) ในข้าวโพด มีวัตถุประสงค์เพื่อโคลนยีนและศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการทนต่อสภาวะขาดน้ำและสภาวะเค็มในพืช สำหรับนำไปใช้ในการพัฒนาพันธุ์พืชให้มีศักยภาพในการให้ผลผลิตและสามารถทนต่อสภาวะเครียดเนื่องจากการขาดน้ำและดินเค็มได้ โดย *CRT* และ *CaM* เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของเซลล์ในส่วนของระบบภูมิคุ้มกัน โดยทำหน้าที่ในการรับส่งสัญญาณ (signal transduction) การควบคุมการแสดงออกของยีน (gene expression) การจับตัวของเซลล์ (cell adhesion) และการยับยั้งขบวนการทำลายของระบบ complement นอกจากนี้ยังเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการรักษาระดับความเข้มข้นของแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ภายในเซลล์ ซึ่งพบว่าเมื่อพืชอยู่ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมหรือถูกกระตุ้นจากภายนอกเซลล์ จะทำให้ระดับความเข้มข้นของ Ca^{2+} ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นเอนไซม์ต่างๆ ในระดับที่เกินปกติจนอาจทำให้เซลล์ตายได้ ดังนั้น พืชจำเป็นต้องมีการปรับสมดุลแคลเซียมไอออนภายในเซลล์เพื่อให้มีชีวิตอยู่ได้ภายใต้สภาวะเครียดดังกล่าว งานวิจัยนี้ได้ทำการโคลนยีน *CRT* และ *CaM* จากข้าวโพด โดยทำการออกแบบไพรเมอร์ในบริเวณที่มีความเหมือนของลำดับพันธุกรรมอย่างสูง (conserved region) จากยีน *CRT* และ *CaM* ในพืชชนิดต่างๆ ที่ค้นหาได้จากฐานข้อมูล NCBI นำมาทำปฏิกิริยา PCR กับจีโนมิกดีเอ็นเอของข้าวโพด 4 พันธุ์ ได้แก่ ตากฟ้า 1 ตากฟ้า 3 นครสวรรค์ 3 และนครสวรรค์ 1 ได้ยีนขนาด 3,699 และ 2,472 คู่เบส ตามลำดับ นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์โครงสร้างของยีนโดยใช้โปรแกรม Software GenScan Version 1.0 พบว่า ยีน *CRT* และ *CaM* ที่ได้มีส่วนประกอบครบทั้งยีน ซึ่งประกอบด้วย ลำดับเบสในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน Open Reading Frame (ORF) จำนวน 14 และ 2 exon ตามลำดับ จากนั้นทำการโคลนยีน ในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน โดยการทำปฏิกิริยา RT–PCR กับอาร์เอ็นเอรวมของข้าวโพดทั้ง 4 พันธุ์ ร่วมกับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน ซึ่งได้เติมตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อบังคับทิศทางของการแปลรหัส ได้ยีน *CRT* และ *CaM* มีขนาดเท่ากับ 1,263 และ 450 คู่เบส ตามลำดับ สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนของยีนได้เท่ากับ 421 และ 150 amino acids ตามลำดับ เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ยีน *CRT* ที่โคลนได้จากข้าวโพดมีความเหมือนอย่างสูงกับยีน *calreticulin* (*CRT*) ที่พบในข้าวโพด (*Zea mays* L.) (EU961008.1) และ ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor* L.) (XM_021453764.1) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 99% และ 95% ตามลำดับ และยีน *CaM* ที่โคลนได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน *calmodulin* (*CaM*) ที่พบในข้าวโพด (*Zea mays* L.) (NM_001111985.2) และ ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor* L.) (XM_002441253.2) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 99% และ 98% ตามลำดับ

คำนำ

ปัญหาภัยแล้งอันเกิดจากสภาพการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศ (climate change) หรือที่เรียกว่า ภาวะโลกร้อน (global warming) เป็นปัญหาสำคัญและพบว่ามีความรุนแรงมากยิ่งขึ้น ส่งผลกระทบต่อการดำรงอยู่ของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะผลผลิตทางการเกษตร เนื่องจากน้ำเป็นปัจจัยหลักที่สำคัญที่สุดต่อการงอกและการเจริญเติบโตของพืช การเกิดสภาวะขาดน้ำ (drought stress) ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย เช่น ปริมาณน้ำในดินน้อย อัตราการระเหยของน้ำสูง สภาพอากาศที่หนาวเย็นหรือแห้งแล้ง ปริมาณน้ำฝนน้อย หรือสภาพดินเค็ม ซึ่งองค์ประกอบของพืชส่วนใหญ่คือ น้ำ และน้ำยังเป็นตัวกลางในการเกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่สำคัญภายในเซลล์พืช ดังนั้น เมื่อพืชเกิดสภาวะขาดน้ำจะทำให้พืชเกิดความผิดปกติต่างๆ เช่น แรงดันเต่งภายในเซลล์ลดลง และพืชจะแสดงอาการเหี่ยว อัตราการเจริญเติบโตช้าลง เซลล์ใหม่ที่เกิดขึ้นมีขนาดเล็ก กระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ ของโปรตีนและกรดอะมิโนจะค่อยๆ ถูกทำลายในที่สุด การปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้ทนต่อสภาวะเครียดอันเกิดจากการขาดน้ำและสภาวะดินเค็ม โดยอาศัยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วยในการพัฒนาพันธุ์พืช ซึ่งเป็นการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการค้นหายีน การศึกษาหน้าที่และกลไกการทำงานของยีนหรือกลุ่มยีน และการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะขาดน้ำและสภาวะดินเค็ม โดยการนำยีนและข้อมูลยีนที่ได้มาใช้ในการพัฒนาพันธุ์พืชเพื่อให้พืชสามารถเจริญเติบโตและให้ผลผลิตได้เมื่อต้องอยู่ภายใต้สภาวะเครียดดังกล่าว ซึ่งนับว่าเป็นพืชทางเลือกหนึ่งในการช่วยลดปัญหาอันเกิดจากภาวะโลกร้อน อีกทั้งยังเป็นการช่วยเร่งรัดกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชอีกทางหนึ่งด้วย

calreticulin (*CRT*) เป็นโปรตีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของเซลล์โดยเฉพาะในส่วนของระบบภูมิคุ้มกัน โดยมีหน้าที่ในการรับส่งสัญญาณ การควบคุมการทำงานของยีน (gene expression) การจับตัวของเซลล์ (cell adhesion) และยับยั้งขบวนการทำลายของระบบ complement (สถาพร และคณะ, 2557) นอกจากนี้ *calreticulin* (*CRT*) และ *calmodulin* (*CaM*) เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการรักษาภาวะสมดุลของแคลเซียมไอออนภายในเซลล์ ซึ่ง calcium ion (Ca^{2+}) ทำหน้าที่ในกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) และกระบวนการทางสรีรวิทยา (physiology) เช่น การเจริญเติบโต การทำงานของเซลล์ การแสดงออกของยีน ดังนั้นเซลล์จำเป็นต้องมีกลไกการรักษาภาวะคงที่ของ Ca^{2+} ภายในเซลล์ ซึ่งในบางกระบวนการอาจต้องใช้พลังงาน ถ้าเซลล์สูญเสียการรักษาภาวะคงที่ของ Ca^{2+} ไม่ว่าจะมาจากสาเหตุใดก็ตามจะทำให้ Ca^{2+} ภายในเซลล์เพิ่มขึ้นส่งผลให้เกิดการกระตุ้นเอนไซม์ต่างๆ ในระดับที่เกินปกติจนอาจทำให้เซลล์ตายได้ ซึ่งในการรักษาภาวะคงที่ของ Ca^{2+} โดยปกติเซลล์รักษาระดับ Ca^{2+} ในเซลล์ให้มีค่าประมาณ 100 nmol/L หรือน้อยกว่าความเข้มข้นของ Ca^{2+} ที่อยู่นอกเซลล์ประมาณ 10 เท่า แต่เมื่อมีสิ่งเร้าหรือ สิ่งกระตุ้น เช่น ฮอร์โมน (hormones), สภาวะเครียด (stress), แสง (light) หรือ เชื้อก่อโรค (pathogenesis) จะทำให้กลไกการรักษาภาวะคงที่ของ Ca^{2+} เสียไป ดังนั้นเซลล์จึงมีกลไกในการรักษาภาวะของ Ca^{2+} ให้คงที่ทั้งภายในเซลล์และไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ซึ่งส่งผลทำให้พืชสามารถปรับสมดุลแคลเซียมไอออนภายในเซลล์เพื่อให้มีชีวิตอยู่ได้ภายใต้เครียดจากการขาดน้ำและสภาวะดินเค็มได้ จากรายงานพบว่า ยีน *calreticulin* (*CRT*) ถูกแยกได้ครั้งแรกจากข้าวบาร์เลย์ (Chen Chandler *et al*., 1994), ผักขม (Menegazzi *et al*., 1993), ยาสูบ (Denecke *et al*., 1993), ข้าวโพด (Kwiatkowski *et al*., 1995,

Dresselhaus *et al*., 1996), Arabidopsis (Nelson *et al*., 1997) และ ข้าว (Li and Komatsu, 2000) นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาการแสดงออกของยีน *calreticulin* ในพืช โดยการถ่ายฝากยีน *calreticulin* จากข้าวโพดเข้าสู่พืชอะราบิดอพซิส พบว่า เมื่อพืชอยู่ในสภาวะเครียดจะมีการสะสม Ca^{2+} เพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับพันธุ์ wide type (Wyatt *et al*., 2002) เมื่อถ่ายฝากยีน *calreticulin* จากข้าวสาลีเข้าสู่ยาสูบ พบว่า ยาสูบที่มียีน *calreticulin* เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะขาดน้ำสามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่ายาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายฝากยีน (Jia *et al*., 2008) และเมื่อถ่ายฝากยีน *calreticulin* ที่แยกได้จากข้าวโพดเข้าสู่มะเขือเทศ พบว่า มะเขือเทศที่ได้รับการถ่ายยีนมีปริมาณของแคลเซียม คลอโรฟิลล์ และผลผลิตเมล็ดเพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะขาดน้ำโดยเปรียบเทียบกับพืช wild type สำหรับการศึกษาการแสดงออกของยีน *calmodulin* (*CaM*) ในพืชนั้น ได้มีการศึกษาวิจัยโดยการสร้างข้าวดัดแปลงพันธุกรรมจากยีน *OsCam1-1* ที่ควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ 35SCaMv ภายในเวกเตอร์ pCAMBIA1301 โดยวิธีอะโกรแบคทีเรีย พบว่า ข้าวแปลงพันธุ์ดังกล่าวมีอัตราการเจริญเติบโตและความสามารถในการทนเค็มสูงกว่าข้าวที่เป็นชุดควบคุม อีกทั้งยังมีปริมาณ ABA สูงกว่าข้าวที่เป็นชุดควบคุมเมื่อปลูกในภาวะปกติและภาวะที่ได้รับความเครียดจากความเค็มอีกด้วย (Buaboocha, 2009)

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงได้นำเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วยในการโคลนยีน และศึกษาการแสดงออกของยีนเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะขาดน้ำและสภาวะเค็ม หากสามารถโคลนยีน *calreticulin* และ *calmodulin* ได้ และยีนที่ได้มีการแสดงออกในลักษณะทนต่อสภาวะขาดน้ำและสภาวะเค็มในพืชต้นแบบ (ยาสูบ) จะเป็นข้อมูลสำคัญที่จะนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชเศรษฐกิจเพื่อให้ทนทานต่อสภาวะเครียดดังกล่าวได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1, ตากฟ้า 3, นครสวรรค์ 3 และ นครสวรรค์ 1 (ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์)

2. ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน calreticulin (*CRT*) และ *calmodulin* (*CaM*) คือ GCRT (forward) GCRT (reverse) GCaM (forward) และ GCaM (reverse) ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน *CRT* และ *CaM* คือ CCRT (forward) CCRT (reverse) CCaM (forward) และ CCaM (reverse)

3. อุปกรณ์ในการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ โกร่ง เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบสูงแบบควบคุมอุณหภูมิต่ำได้ (Refrigerated Centrifuge) หลอดใส่ตัวอย่างขนาดต่างๆ และอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath)

4. เครื่องมือที่ใช้สำหรับวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) PERKIN ELMER รุ่น MBA 2000

5. เครื่องมือที่ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Polymerase Chain Reaction) GeneAmp® PCR System 9700 ของ Applied Biosystems

6. เครื่องมือที่ใช้สำหรับถ่ายภาพและวิเคราะห์สารพันธุกรรม (Gel Documentation) BIORAD รุ่น Gel Doc 2000 พร้อมเครื่องพิมพ์

7. เครื่องมือที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI Prism 310® DNA Sequencer

8. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอ (MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit) ของ Epicentre® Biotechnologies

9. สารเคมีที่ใช้ในการทำ Electrophoresis และ Molecular Weight Marker

10. สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง HotStart Taq Master Mix Kit ของ QIAGEN

11. สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา RT – PCR SuperScript™ III One-Step RT – PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase Kit ของ Invitrogen

12. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit ของ QIAGEN

13. สารเคมีที่ใช้ในการโคลนยีน TA Cloning Kits® ของ Invitrogen

14. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit) ของ Fermentas

15. เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน (Competent Cells) *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α

16. สารเคมีสำหรับใช้กับเครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI Prism 310® DNA Sequencer

17. การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปและโปรแกรมบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต
    - โปรแกรม BLAST จากเว็บไซต์ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Blast/
    - โปรแกรม ClustalW Multiple Alignment จากเว็บไซต์ http://www.ebi.ac.uk/clustalw/
    - โปรแกรม DNAStar software analysis (DNASTAR, Inc, USA)
    - โปรแกรม CromasPro version 1.33 จากเว็บไซต์ http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมตัวอย่างพืช

คัดเลือกพันธุ์ข้าวโพดที่มีลักษณะทนแล้ง ได้แก่ พันธุ์ตากฟ้า 1, ตากฟ้า 3, นครสวรรค์ 3 และ นครสวรรค์ 1 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าวโพดจากศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ โดยนำเมล็ดพันธุ์มาปลูกในกระถางที่เตรียมไว้ รดน้ำ 2 – 3 วัน/ครั้ง เมื่ออายุประมาณ 30 วัน นำใบอ่อนมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อหาส่วนของยีนทั้งจีโนม และเมื่ออายุประมาณ 45 วัน งดให้น้ำ นำใบอ่อนมาสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อหาส่วนของยีนที่มีการแสดงออก

2. ออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีน *Calreticulin* (*CRT*) *และ Calmodulin* (*CaM*)

ทำการศึกษาและค้นหายีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการทนต่อสภาวะขาดน้ำในข้าวโพด ได้แก่ ยีน *CRT* และ *CaM* ที่มีรายงานในพืชชนิดต่างๆ จากฐานข้อมูลทางอินเทอร์เน็ต (www.ncbi.nim.nih.gov/) นำมาวิเคราะห์ลำดับเบสที่มีความเหมือนกันอย่างสูง (conserve region) โดยใช้โปรแกรม ClustalW2 Multiple Alignment (European Bioinformatics Institute, UK) ออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีนคือ GCRT (forward) GCRT (reverse) GCaM (forward) และ GCaM (reverse) ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนในส่วนที่มีการ

แสดงออกของยีนคือ CCRT (forward) CCRT (reverse) CCaM (forward) และ CCaM (reverse) CRTXbaI (forward) CRTKpnI (reverse) CaMBamHI (forward) และ CaMKpnI (reverse) **(ตารางที่ 1)**

3. การโคลนยีน *Calreticulin* (*CRT*) *และ Calmodulin* (*CaM*) ในส่วนของยีนที่สมบูรณ์

3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

ตัวอย่างพันธุ์ข้าวโพดที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ตากฟ้า 1, ตากฟ้า 3, นครสวรรค์ 3 และ นครสวรรค์ 1 เมื่ออายุได้ 1 เดือน นำมาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัด Genomic DNA Extraction Kit (RBC Bioscience, Taiwan) ตัดใบอ่อนของอ้อยประมาณ 50–100 กรัม บดในโกร่งพร้อมกับไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงแป้ง ย้ายตัวอย่างลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม GP1 buffer หรือ GPX1 buffer 400 ไมโครลิตร และ RNase A (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 5 ไมโครลิตร ผสมโดยการเอียงหลอดไปมาเบาๆ บ่มที่อุณหภูมิ 65°C นาน 10 นาที เขย่าทุกๆ 5 นาที เติม GP2 buffer 100 ไมโครลิตร ผสมโดยการเอียงหลอดไปมาเบาๆ วางตัวอย่างบนน้ำแข็งนาน 3 นาที วาง Filter column ลงใน Collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร และย้ายตัวอย่างลงใน Filter column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 3 นาที ทิ้ง Filter column และย้ายน้ำใสลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม GP3 buffer 750 ไมโครลิตร (1.5 เท่าของสารละลาย DNA ที่ได้) เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน นาน 5 วินาที วาง GD column ลงใน Collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร และย้ายตัวอย่างลงใน GD column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที ทิ้งน้ำใสใน Collection tube และเก็บ GD column ไว้ (ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที อีกครั้ง นาน 2 นาที ทิ้งน้ำใสใน Collection tube เติม W1 buffer 400 ไมโครลิตร ลงใน GD column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 30 วินาที เทน้ำใสทิ้ง และวาง GD column ลงใน Collection tube อีกครั้ง เติม Wash buffer 600 ไมโครลิตร ลงใน GD column นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 30 วินาที เทน้ำใสทิ้ง และวาง GD column ลงใน Collection tube อีกครั้ง (ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที อีกครั้ง นาน 3 นาที เพื่อให้ Column แห้ง ย้าย GD column ที่แห้งแล้วลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Preheat Elution buffer 100 ไมโครลิตร ลงตรงกลางของ Column matrix ทิ้งไว้นาน 3 – 5 นาที จนกระทั่ง Elution buffer ถูกดูดซับโดย matrix ได้มากที่สุด นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 30 วินาที จะได้สารละลายดีเอ็นเอที่มีคุณภาพ เก็บสารละลาย DNA (original) ที่ –20°C จนกว่าจะนำไปใช้ นำสารละลาย DNA ที่ได้ไปวัดค่าความเข้มข้น (Optical Density : OD) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer และนำมาเจือจางด้วย TE (Tris-EDTA) buffer หรือน้ำ ให้ได้ความเข้มข้น 60 นาโนกรัม เพื่อนำไปทำ PCR ต่อไป

3.2 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ จาก genomic DNA โดยวิธี PCR Amplification

นำดีเอ็นเอของข้าวโพดที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการในหลอดทดลองกับไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน *CRT* และ *CaM* ที่ออกแบบไว้จำนวน 2 คู่ ได้แก่ GCRT (forward) GCRT (reverse) GCaM

(forward) และ GCaM (reverse) ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยใช้ Hot Start Taq Master Mix Kit (QIAGEN, USA) ในปริมาตรของปฏิกิริยาพอลิเมเรสทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม, 0.5U HotStart Taq Master Mix, 0.4 μM Gene Specific Primer (forward), 0.4 μM Gene Specific Primer (reverse) ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำโดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre–Denature 93°C 15 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denature 94°C 30 วินาที, Anneal 60°C 30 วินาที, Extend 68°C 1 นาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วยขั้นตอน 72°C 10 นาที อีก 1 รอบ หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วเก็บตัวอย่างไว้ที่ 4°C และตรวจวิเคราะห์ผล โดยนำผลผลิต PCR ที่ได้มาตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอด้วย 1% Agarose gel electrophoresis เทียบขนาดแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder marker (Fermentas, USA) นำไปย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel-Doc Transluminator (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) พร้อมบันทึกภาพและเก็บตัวอย่างที่เหลือไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

3.3 การโคลนยีน *CRT และ CaM* เข้าสู่เวกเตอร์ และการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

นำผลผลิต PCR มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) นำมาแยกด้วย 0.8% low melting gel แล้วย้อมด้วย Gel Star (Cambrex Bio Science Rockland, Inc) จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอบนเครื่อง Dark Reader Transilluminators ใส่ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชั่งน้ำหนักเจลที่ได้เติม QG Buffer 3 เท่าของน้ำหนักเจล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50°C นาน 1 ชั่วโมง เขย่าแรงๆ ทุก 2 นาที จนเจลละลายหมด เติม Isopropanol 1 เท่าของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากัน ย้ายสารละลายทั้งหมดใส่ใน Binding Column บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม PE Buffer 750 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ย้าย Binding Column วางลงบนหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม EB Buffer (อุ่นที่อุณหภูมิ 50 - 60°C) 30 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 15 – 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที ตรวจสอบคุณภาพด้วย 1.5% Agarose gel electrophoresis นำดีเอ็นเอที่ได้มาทำปฏิกิริยา ligation โดยใช้ TA Cloning Kit (Invitrogen, USA) ในปริมาตรของปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย Gel-purified PCR product 4 ไมโครลิตร, pCR®2.1 vector 2 ไมโครลิตร, 5X ExpressLink™T4 DNA Ligase Buffer 2 ไมโครลิตร, ExpressLink™T4 DNA Ligase 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ ผสมปฏิกิริยาทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4°C นานข้ามคืน จากนั้นทำการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดยนำปฏิกิริยา ligation จำนวน 2 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดคอมพิเทนต์เซลล์ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และแช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไป heat – shock ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 30 วินาที (ไม่ต้องเขย่า) นำไปแช่บนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที เติม S.O.C. medium 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบ

ต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไป spread บนอาหารแข็ง LB (เตรียม 1 ลิตร : 10 กรัม NaCl, 10 กรัม Tryptone, 5 กรัม Yeast extract, 15 กรัม Bacto-Agar, ddH_2O) เติมสารปฏิชีวนะ amplicillin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มเพลทไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นานข้ามคืน

3.4 การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ และการตรวจสอบการปรากฏของยีน

คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่มีชิ้น insert ของยีน นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ amplicillin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบ/นาที นาน 12–16 ชั่วโมง นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้ GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, USA) นำเซลล์ที่เลี้ยงไว้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ เทอาหารทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วย Resuspension Solution 250 ไมโครลิตร เขย่าให้เซลล์ละลาย เติม Lysis Solution 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดขึ้นลง 4 – 6 ครั้ง เติม Neutralization Solution 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดขึ้นลง 4 – 6 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที จากนั้นย้ายสารละลายเซลล์ลงใน GeneJET™ spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม Wash Solution 500 ไมโครลิตร เพื่อล้าง column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) ย้าย GeneJET™ spin column วางบนหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Elution Buffer 50 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้นาน 15 – 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1% Agarose gel electrophoresis และเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

การตรวจสอบการปรากฏของยีน *CRT* และ *CaM* โดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I + *Kpn*I (*CRT*) และ *Bam*HI + *Apa*I (*CaM*) ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 100 – 200 นาโนกรัม, 1X FastDigest Buffer, 0.5U FastDigest Enzyme ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80°C นาน 5 นาที นำมาตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอด้วย 1% Agarose gel electrophoresis

3.5 การวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA Sequencing)

นำตัวอย่างพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของยีน *CRT* และ *CaM* มาเป็นต้นแบบในการวิเคราะห์ลำดับเบส โดยใช้สารเคมี ABI PRISM® BigDye® Terminator Cycle Sequencing V3.1 Kit (Perkin-Elmer) ร่วมกับไพรเมอร์ M13 (forward) 5′ – GTA AAA CGA CGG CCA GT – 3′ และ M13 (reverse) 5′ –GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG G – 3′ ในการทำปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม, BigDye™ 2 ไมโครลิตร, Ready Reaction buffer 1 ไมโครลิตร, 5 ไมโครโมล ไพรเมอร์ Forward / Reverse และ ddH_2O 3.4 ไมโครลิตร นำปฏิกิริยา cycle sequencing ที่ได้ เข้าเครื่อง Thermal Cycler 9700 โดยตั้ง

รอบปฏิกิริยาดังนี้ Denaturation 96°C 10 วินาที, Annealing 50°C 5 วินาที, Extention 60°C 4 นาที จำนวน 25 รอบ และ Hold ที่ 4°C infinity (α) หลังจากนั้นทำการล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน โดยนำผลผลิตที่ได้ใส่ลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Solution A (ddH_2O 16 ไมโครลิตร: 95% ethanol 64 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงทุก 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0°C ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70% Ethanol 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0°C ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนแห้งในที่มืด จากนั้นละลายตะกอนด้วย Hidi-formamide 10 ไมโครลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากันในหลอด นำไปปั่นให้ดีเอ็นเอตกที่ก้นหลอด นำตัวอย่างใส่หลอด Septa บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 2 นาที และแช่ไว้บนน้ำแข็งทันที นำตัวอย่าง load เข้าเครื่อง ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบส จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าต่างๆ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปและโปรแกรมบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต

4. การโคลนยีน *Calreticulin* (*CRT*) *และ Calmodulin* (*CaM*) ในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน

4.1 การสกัดอาร์เอ็นเอรวม

ตัวอย่างพันธุ์ข้าวโพดที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ตากฟ้า 1, ตากฟ้า 3, นครสวรรค์ 3 และ นครสวรรค์ 1 เมื่ออายุได้ 45 วัน งดให้น้ำ นำมาสกัดอาร์เอ็นเอรวม โดยใช้ MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit (BIONEER Corporation) ตัดใบอ่อนของข้าวโพดประมาณ 5 มิลลิกรัม บดในโกร่งพร้อมกับไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงแป้ง ย้ายตัวอย่างลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Tissue and Cell Lysis Solution 300 ไมโครลิตร ผสมโดยการเอียงหลอดไปมาเบาๆ บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 65°C นาน 15 นาที เขย่าทุกๆ 5 นาที วางตัวอย่างบนน้ำแข็งนาน 3 – 5 นาที เติม MPC Protein Precipitation Reagent 150 ไมโครลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน นาน 10 วินาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ย้ายส่วนใสใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Isopropanol 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 30 – 40 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที เทส่วนใสออกให้หมด ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย DNaseI Solution 200 ไมโครลิตร บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 37°C นาน 10 – 30 นาที เติม MPC Protein Precipitation Reagent 200 ไมโครลิตร เขย่าส่วนผสมให้เข้ากัน นาน 10 วินาที วางตัวอย่างบนน้ำแข็ง นาน 3 – 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ย้ายสารละลายอาร์เอ็นเอที่ได้ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Isopropanol 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา 30 – 40 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4°C นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 75% Ethanol 300 ไมโครลิตร (ทำ 2 ครั้ง) เอา Ethanol ออกให้หมดโดยใช้ไปเปตละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย TE buffer 35 ไมโครลิตร แล้วเติม Script Guard RNase Inhibitor 1 ไมโครลิตร เพื่อยับยั้งไม่ให้อาร์เอ็นเอถูกย่อย

วัดค่าความเข้มข้น (O.D.) ของสารละลายอาร์เอ็นเอที่ได้ โดยใช้เครื่อง spectrophotometer เก็บสารละลายอาร์เอ็นเอที่ -80°C จนกว่าจะใช้งาน

4.2 การสังเคราะห์ cDNA จาก total RNA โดยวิธี RT–PCR

ทำการสังเคราะห์ cDNA จากอาร์เอ็นเอรวมของข้าวโพดทั้ง 4 พันธุ์ โดยใช้ SuperScrip™ III One–Step RT–PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) ด้วยวิธี One–Step RT–PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *CRT* และ *CaM* คือ CCRT (forward) CCRT (reverse) CCaM (forward) และ CCaM (reverse) ในปริมาตรของปฏิกิริยาพอลิเมเรสทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย สารละลาย total RNA 10 นาโนกรัม – 1 ไมโครกรัม, 10 μM Gene Specific Primer (forward), 10 μM Gene Specific Primer (reverse), 2X Reaction Mix, 2U SuperScript™III RT/Platinum Taq Mix นำปฏิกิริยาเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม PCR (Thermal Cycle 9700) โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ Pre–Denature 55°C 30 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย 94°C 2 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denature 94°C 15 วินาที, Anneal 60°C 30 วินาที, Extend 68°C 3 นาที จำนวน 40 รอบ ตามด้วยขั้นตอน 68°C 5 นาที อีก 1 รอบ หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วเก็บตัวอย่างไว้ที่ 4°C และนำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1% agarose gel electrophoresis และเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

4.3 การเชื่อมต่อชิ้นยีน *CRT และ CaM* เข้ากับเวกเตอร์ และการตรวจสอบการปรากฏของยีน

4.3.1 การเชื่อมต่อชิ้นยีน *CRT และ CaM* เข้ากับเวกเตอร์ และการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

นำผลผลิต PCR มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) นำมาแยกด้วย 0.8% low melting gel แล้วย้อมด้วย Gel Star (Cambrex Bio Science Rockland, Inc) จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอบนเครื่อง Dark Reader Transilluminators ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชั่งน้ำหนักเจลที่ได้เติม QG Buffer 3 เท่าของน้ำหนักเจล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50°C นาน 1 ชั่วโมง เขย่าแรงๆ ทุก 2 นาที จนเจลละลายหมด เติม Isopropanol 1 เท่าของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากัน ย้ายสารละลายทั้งหมดใส่ใน Binding Column บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม PE Buffer 750 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ย้าย Binding Column วางลงบนหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม EB Buffer (อุ่นที่อุณหภูมิ 50 – 60°C) 30 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 15 – 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที ตรวจสอบคุณภาพด้วย 1.5% Agarose gel electrophoresis จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยา ligation โดยใช้ TA Cloning Kit (Invitrogen, USA) ในปริมาตรของปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย Gel-purified PCR product 4 ไมโครลิตร, pCR®2.1 vector 2 ไมโครลิตร, 5X ExpressLink™T4 DNA Ligase Buffer 2 ไมโครลิตร, ExpressLink™T4 DNA Ligase 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ ผสมปฏิกิริยาทั้งหมดให้

เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4°C นานข้ามคืน จากนั้นทำการถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดยนำปฏิกิริยา ligation จำนวน 2 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดคอมพิเทนต์เซลล์ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และแช่บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไป heat – shock ที่อุณหภูมิ 42°C เป็นเวลา 30 วินาที (ไม่ต้องเขย่า) นำไปแช่บนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที เติม S.O.C. medium 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไป spread บนอาหารแข็ง LB (เตรียม 1 ลิตร : 10 กรัม NaCl, 10 กรัม Tryptone, 5 กรัม Yeast extract, 15 กรัม Bacto-Agar, ddH_2O) เติมสารปฏิชีวนะ amplicillin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มเพลทไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นานข้ามคืน

4.3.2 การตรวจสอบการปรากฏของยีน *CRT และ CaM* ในเวกเตอร์

คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่มีชิ้นส่วนของยีนสอดแทรกอยู่ นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมสารปฏิชีวนะ amplicillin ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าที่ความเร็ว 220 รอบต่อนาที นาน 12–16 ชั่วโมง นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ โดยใช้ GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, USA) นำเซลล์ที่เลี้ยงไว้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ เทอาหารทิ้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วย Resuspension Solution 250 ไมโครลิตร เขย่าให้เซลล์ละลาย เติม Lysis Solution 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดขึ้นลง 4 – 6 ครั้ง เติม Neutralization Solution 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดขึ้นลง 4 – 6 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที จากนั้นย้ายสารละลายเซลล์ลงใน GeneJET™ spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม Wash Solution 500 ไมโครลิตร เพื่อล้าง column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) ย้าย GeneJET™ spin column วางบนหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Elution Buffer 50 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้นาน 15 – 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วย 1% agarose gel electrophoresis และเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

การตรวจสอบการปรากฏของยีน *CRT* และ *CaM* โดยนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I + *Kpn*I (*CRT*) และ *Bam*HI + *Apa*I (*CaM*) ในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 100 – 200 นาโนกรัม, 1X FastDigest Buffer, 0.5U FastDigest Enzyme ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80°C นาน 5 นาที นำมาตรวจสอบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis

4.5 การวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA Sequencing)

นำตัวอย่างพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของยีน *CRT* และ *CaM* มาเป็นต้นแบบในการวิเคราะห์ลำดับเบส โดยใช้สารเคมี ABI PRISM® BigDye® Terminator Cycle Sequencing V3.1 Kit (Perkin-Elmer) ร่วมกับไพรเมอร์

M13 (forward) 5′ – GTA AAA CGA CGG CCA GT – 3′ และ M13 (reverse) 5′ –GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG G – 3′ ในการทำปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย พลาสมิดดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม, BigDye™ 2 ไมโครลิตร, Ready Reaction buffer 1 ไมโครลิตร, 5 ไมโครโมล ไพรเมอร์ Forward / Reverse และ ddH_2O 3.4 ไมโครลิตร นำปฏิกิริยา cycle sequencing ที่ได้เข้าเครื่อง Thermal Cycler 9700 โดยตั้งรอบปฏิกิริยาดังนี้ Denaturation 96°C 10 วินาที, Annealing 50°C 5 วินาที, Extention 60°C 4 นาที จำนวน 25 รอบ และ Hold ที่ 4°C infinity (α) หลังจากนั้นทำการล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน โดยนำผลผลิตที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Solution A (ddH_2O 16 ไมโครลิตร: 95% ethanol 64 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 15 นาที ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงทุก 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0°C ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70% Ethanol 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 0°C ความเร็ว 14,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนแห้งในที่มืด จากนั้นละลายตะกอนด้วย Hidi-formamide 10 ไมโครลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากันในหลอด นำไปปั่นให้ดีเอ็นเอตกที่ก้นหลอด นำตัวอย่างใส่หลอด Septa บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 2 นาที และแช่ไว้บนน้ำแข็งทันที นำตัวอย่าง load เข้าเครื่อง ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer เพื่อวิเคราะห์ลำดับเบส จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าต่างๆ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปและโปรแกรมบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาทำการทดลอง เดือน ตุลาคม 2559 – เดือน กันยายน 2560

สถานที่ทำการทดลอง สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อ. ธัญบุรี จ. ปทุมธานี

ผลการทดลองและวิจารณ์

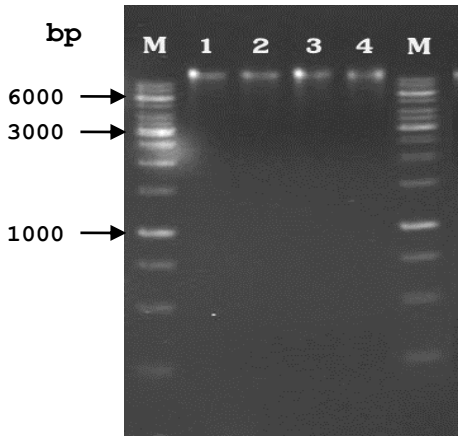
1. การโคลนยีน *Calreticulin* (*CRT*) *และ Calmodulin* (*CaM*) ในส่วนของยีนที่สมบูรณ์

จากการโคลนยีน *Calreticulin (CRT) และ Calmodulin (CaM)* ในส่วนของยีนทั้งจีโนม โดยทำการออกแบบไพรเมอร์บริเวณที่มีความเหมือนของลำดับพันธุกรรมอย่างสูง (conserved region) ที่มีรายงานในพืชชนิดต่างๆ จากฐานข้อมูลทางอินเทอร์เน็ต NCBI สามารถออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *CRT* และ *CaM* จำนวน 2 คู่ คือ GCRT (forward) GCRT (reverse) GCaM (forward) และ GCaM (reverse) **(ตารางที่ 1)** โดยนำไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ได้มาทำปฏิกิริยา PCR กับจีโนมิกดีเอ็นเอของข้าวโพดทั้ง 4 พันธุ์ **(ภาพที่ 1ก)** พบว่า สามารถทำปฏิกิริยาได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3.7 และ 2.5 กิโลเบส ตามลำดับ **(ภาพที่ 2ก และ 2ข)** นำดีเอ็นเอของยีน *CRT* และ *CaM* ที่ได้ไปเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ TA Cloning Kit และถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์

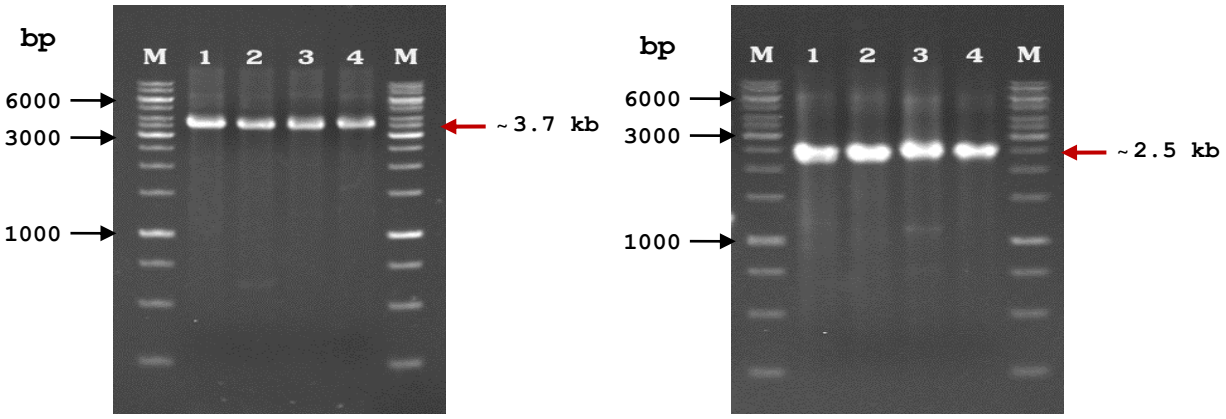
แบคทีเรียสายพันธุ์ DH5α คัดเลือกโคโลนีที่คาดว่ามียีน *CRT* และ *CaM* นำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ จำนวน 16 โคลน **(ภาพที่ 3ก และ 3ข)** และตรวจสอบโคโลนีที่ได้รับการถ่ายยีนโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I + *Kpn*I (*CRT*) และ *Bam*HI + *Apa*I (*CaM*) พบว่า รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของยีน *CRT* และ *CaM* ที่มีความถูกต้องจำนวน 2 แถบ คือ ขนาดประมาณ 3.9 กิโลเบส เป็นขนาดของเวกเตอร์ (vector) และขนาดประมาณ 3.7 กิโลเบส เป็นขนาดของยีน *CRT* และ ขนาดประมาณ 2.5 กิโลเบส เป็นขนาดของยีน *CaM* ตามลำดับ **(ภาพที่ 4ก และ 4ข)** นำพลาสมิดดีเอ็นเอโคลนที่มียีน *CRT* และ *CaM* ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer พบว่า ยีน *CRT* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 3,699 คู่เบส **(ภาพที่ 5)** และยีน *CaM* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 2,472 คู่เบส **(ภาพที่ 6)**

ตารางที่ 1 แสดงลำดับเบส, Melting temperature (Tm) และ % GC content ของคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR และ RT-PCR กับยีน *Calreticulin* (*CRT*) *และ Calmodulin* (*CaM*)

Primer name	Base sequence (5' → 3')	Size (bp)	Tm (°C)	GC content(%)
GCRT_F	GCT CGC TCT CCG CAG TGA CCG ATA GAA CAC G	31	67.3 (60)	61.3
GCRT_R	TGC AAA GTC CAC ACG CGT GAC GGA ACC AGT GC	32	69.3 (60)	59.4
GCaM_F	CAT CCG CTC AGG CCA ATC AAC AGA AGT G	28	63.0 (60)	53.6
GCaM_R	CCA GGT ATC TGA TGT CGC GTT CCC ATG	27	62.6 (60)	55.6
CCRT_F	ATG TCA GCT TCA CCG GCA ACG CCT TGT GCT CC	32	73.6 (60)	59.4
CCRT_R	TTA TGA AAA GGG GTT GTC AAA GCG TAT ACC	30	64.6 (60)	40.0
CCaM_F	ATG GCG GAC CAG CTC ACC GAC GAG C	25	68.6 (60)	68.0
CCaM_R	TCA CTT GGC CAT CAT AAC CTT GAC GA	26	60.1 (60)	46.2



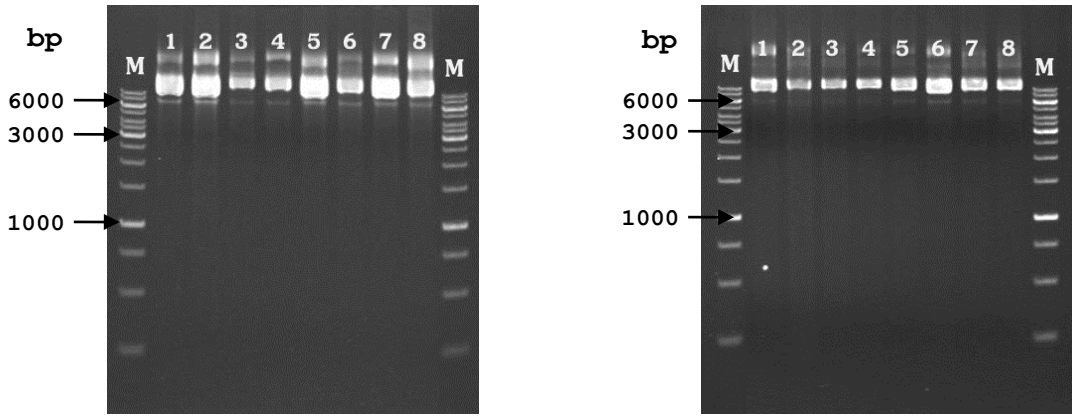
ภาพที่ 1 แสดงจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้าวโพด 4 พันธุ์, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = ข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 2 = ข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 3 = ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 4 = ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)



ก ข

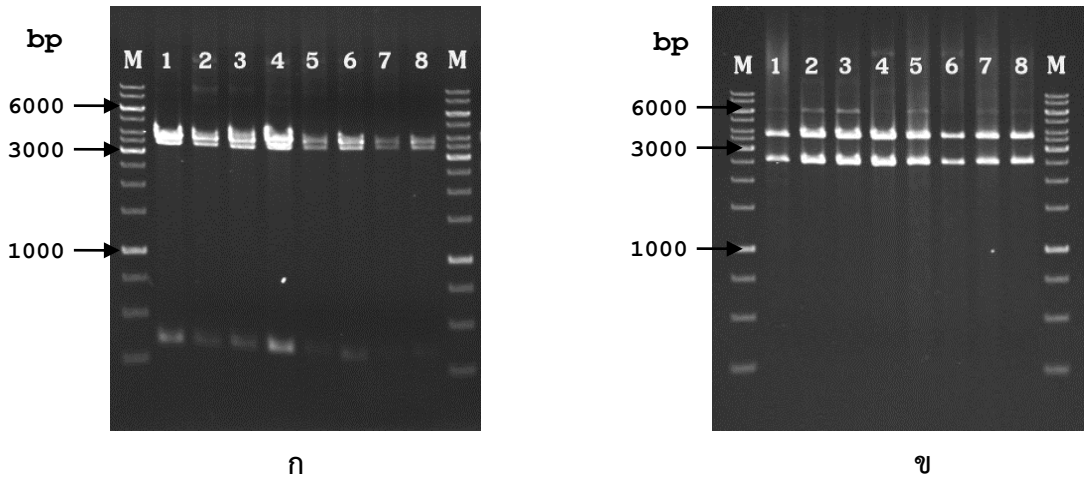
ภาพที่ 2 **ก.** แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน *calreticulin* (*CRT*) ที่เพิ่มปริมาณได้จากข้าวโพดทั้ง 4 พันธุ์ ร่วมกับคู่ไพรเมอร์ GCRT (forward) และ GCRT (reverse) ด้วยเทคนิค PCR, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = ข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 2 = ข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 3 = ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 4 = ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)

ข. แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน *calmodulin* (*CaM*) ที่เพิ่มปริมาณได้จากข้าวโพดทั้ง 4 พันธุ์ ร่วมกับคู่ไพรเมอร์ GCaM (forward) และ GCaM (reverse) ด้วยเทคนิค PCR, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = ข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 2 = ข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 3 = ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 4 = ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)



ภาพที่ 3 ก. แสดงรูปแบบพลาสมิดดีเอ็นเอของยีน *CRT*, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = พลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 3-4 = พลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 5-6 = พลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 7-8 = พลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)

ข. แสดงรูปแบบพลาสมิดดีเอ็นเอของยีน *CaM*, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = พลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 3-4 = พลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 5-6 = พลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 7-8 = พลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)



ภาพที่ 4 ก. แสดงรูปแบบแถบดีเอ็นเอของยีน *CRT* ที่ได้จากการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 3-4 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 5-6 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 7-8 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)

ข. แสดงรูปแบบแถบดีเอ็นเอของยีน *CaM* ที่ได้จากการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Apa*I, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 3-4 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 5-6 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 7-8 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)

```
   1  gctcgctctc cgcagtgacc gatagaacac gaccttaggg gttcagatcg gatcggaagc
  61  ttccataagt ttccatcggg cgtcgccggt atggcgatcc gcaaggggtc ttcgtacgcc
 121  gtcgcggcac ttctcgcgct cgcctctgtc gccgccgtcg caggggaggt cttcttccag
 181  gagaagttcg aaggtgattc ccttgatccc accactcgaa cagtgcgatc tggtctgttg
 241  cgatgcgccc tatgtcttgg cccgaccgcc cgaatgcagt gcgtgtgaaa tggtaggcat
 301  taatttcgtc ggaccagtgg gtttttggct cgttcatgcg atttaacagt gtgtaggtgt
 361  gtgacggtgg tcgagatttg ctcgtaagat ctggtggcat gtatatatgg tgttcggtac
 421  ttcagttatc tccgtatgca tggatcctgc ggttgtgatt tttcgtgtgg tagtttgggt
 481  aatctgttcg aatggtgttg cctttggtca gcattcatat tcggctgtat agtgcggtga
 541  atcttatggc atttctgctg aggcgatcaa attttatact atttgtaccc ttgacctgaa
 601  tgtgttttga tttgggatta tgtgttgatg tttatttcac ctagattagg aacatgtcgt
 661  gcagttctcc cgagtaagtt tggaccagct ggtggttcac attaggaatt ataggatctc
 721  caatactgac tgtcattttt gttgtaccgc gaagcatttt ctaattttga cattaccctt
 781  catgacattt tgcactgttg tgatggccag atggctggga aagtaggtgg gtcaagtctg
 841  agtggaagaa ggatgagaac atggctggtg aatggaacca cacctcggga aaatggaatg
 901  gagatgccga ggacaaaggt aaattccaaa acatcagaag attggtggtt tcagtttatt
 961  tatgagttgc tcaacgtgtt tcttgttgca ggtattcaaa cctccgagga ttacaggttc
1021  tatgccattt cagccgaata ccctgagttc agcaacaagg ataagaccct ggtgctgcag
```

ภาพที่ 5 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *calreticulin* (*CRT*) ในข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NSW 1)

```
1081  ttctctgtga agcacgagca gaagcttgac tgcggcggtg gctacgtcaa attgctgggt
1141  ggtgatgtag accagaagaa atttggtgga gacacatctt acaggtagac tttgaacaat
1201  attgttgcgc tccttctccc tatcatatct catcttgtac atgtaacctc attcttctgt
1261  actgcagcat tatgtttgga ccagatatct gtgggtacag caccaagaag gttcacacta
1321  tcctgaccaa ggatggcaag aaccacttga tcaagaagga tgtgccttgt gagactgatc
1381  agttgactca tgtttacact ttgatcatcc gtcctgatgc aacatacagc attctcattg
1441  ataatgaaga gaagcaaact ggcagcatct acgagcattg ggatattctt ccccctaaga
1501  aaatcaagga cccagaggct aagaaggtgt gaagagttaa tatttattat tgtgtttcaa
1561  tttctttgtt tgcacctgtt tggaaataat tgagatttat gtgttgattg cagcctgagg
1621  actgggatga caaggagtac attcctgacc ctgaggacaa gaagccagag gtagtgtttt
1681  atttcttgct tggcgcccta agcttatgtc tcttacctga ccacaattta agagcttcta
1741  ttgtatagta tttaatgaga aatttgctat tacgcaagtc actagtttcc ttaattttgt
1801  agaacagtac agctcattgc ctttttttcca ttactttcca gggctatgat gatattccca
1861  aggaaattcc tgaccctgat gctaagaagg tacttatgtg gttatttgtt atgtagtttc
1921  tgtcatatga ttaataacat gggtatataa attctaaaat gtccattgca gcctgaggac
1981  tgggacgatg aggaagatgg tgaatggact gcccctacca ttcccaaccc agaatacaag
```

```
2041  ggaccatgga aacaaaaggt atggcagttc ctttaaccta taaactgaca gcaattcgta
2101  ttctgatatc tgacaacatg ttgtttcact tgccagaaaa tcaagaaccc gaactaccag
2161  ggtaaatgga aggcacctat gattgacaac ccaggtatgt ttgcctgaaa cggatcctta
2221  tatcttctta ctgtttggct attactacgt cccttctcga atatttgtcg ctcgctagtt
2281  catttttgaa ctaaaacgcg acaaataaaa aagaaaggag tgagtagaat gttagtgctg
2341  aatctaattc ttgtgcatca cagattttaa ggatgatcca tacatttacg ccttcgacag
2401  cttgaagtac attggcattg agctgtggca ggtcggtgtt ggatagtgat tgtcggatct
2461  tcctctctct tgttcagaag gacatcacag ttatgcctct ctttttttg ttttctatg
2521  tacaggttaa atcgggcact ctgtttgaca acatcatcat cactgatgac cctgcgttgg
2581  ccaagacttt tgcagaggag acctggggca agcacaagga ggtgtgtttt tcctctcagt
2641  aacatctcac tcagtaactc atggtttatt caggcacatg cactaactat gcttgttctt
2701  aacaggcaga aaaggctgct tttgatgagg ccgagaaaaa gaaggaagaa gaggtatata
2761  tttaaacacc atatatagtg tttttgtgac gggtgtatgc atgtgtccct tatattgggt
2821  tttgctgtat gttgtgtctt tgccatgcat cctggtttat gttgacgtag ggaatagctt
2881  tgttaggttg aactgaatga actataacca gtggcaagtg catgtgagtt taacagataa
2941  aactatcgag tttaaccgtc cgttgtgttt ttttgtgtcc tgcatatcaa cagtttggct
3001  gaactcatct ttatgaacca caaggtctgt gcttttctgt tggaggtttg cacgtcgctg
3061  attgtgaatc gctttctctt gtcaacagga tgccgccaag ggtggggatg atgaggatga
3121  tgacctagag gtcagcattg catcttcata ttcttcatgg gccattacgt ttcatatatg
3181  cagcttaaat gatctaatca ataaattgta catggtatcg gtctcaggat gaggaagacg
3241  atgagaaggc agacgaggac aaggccgact ctgatgccga ggatagcaag gattctgatg
3301  atgagaagca gcacgtaaga aactctttct tgagacctga ccaagcattt gtcatgtctc
3361  tctctgtcta atgccctcac acgcctgttg tgatgaaatg ccatttgcag gacgagctct
3421  agatggcgag gatgatgttg cggccgctgg cctagattta tcagctctgc cactatgaag
3481  ttctttttt ttcccgtgac caccaagaat gtagaacact gctaataagc agatggacag
3541  tttgggtcgc cgtagcgctt tgtagtcatt tttcccatta aagccgataa cactgaacaa
3601  ggaggaagga tcttttgccc acgattgtta tctccctttc tgatgttaaa tgtgagcctt
3661  tgcgaaagca ctggttccgt cacgcgtgtg gactttgca
```

ภาพที่ 5 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *calreticulin* (*CRT*) ในข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NSW 1) (ต่อ)

```
   1  catccgctca ggccaatcaa cagaagtgac gcgagcacga gcacacatcc cctcccttct
  61  tcggttattc ctcgtcgcgt gccctcgccg cagacctctg ccatggcgga ccagctcacc
 121  gacgagcaga tcgcggagtt caaggaggcc ttcagcctct tcgataagga tggcgacggt
 181  acccacctgg ccccctccct tttcctccct gctaggctcc ttgatctcgc ggccggatcg
 241  ggatcgagct cccgtcccgc cccgatacag cacgaattgt ggggttcgtg taggagctgt
 301  tgctagtagg gctctagatc cggtcggccg tgtgctgtgg tgcttaggat ttggtgatct
 361  ctgagtcgat actcgatagg acattcgatg gtattttggg cgtatttgcg tgcagcgatt
 421  tagcacctgg ttatgtattt atttacggct accatctgtt tattgtataa gattttacca
 481  tcaggtggca gggcagtaaa atgatgtttt tgggagttct actcacggcg ggagaacgat
 541  ttgggatcga gaatttattg ccttacccta gcagggctgg aattcaaatg tctcgtaaag
 601  cattctaggg aatggacagc gaacgtagca tgatctgata attcaacttt gcgggtcagc
 661  ttatcagcgt ggttgcataa tctacgtatc tagtgccagt agatgtatcg actacgacta
 721  tctcgagcaa gcagcttatc catcccctat ccccatattc aaactccact ctgcgaatac
 781  tgctgcagtc tacttttcaa aatagtgttt tacacgggca tataattaag ctgctggagg
 841  cagtcagaga atgtgttgat gttggagcaa gatagctgag gatgtggatt ctagctatgc
 901  cttgaaataa agttgttaat ccggttgttg tctactaata tgttaagcag tagccattct
```

```
 961  ttgttttaga ttttttttct tttgtacatt ttctttaaat gtgtatcttt gtttgtgttt
1021  catcaatgta tgttttggta tatgatagct ttccagttgg tcgtaaagtg cttactgtgt
1081  agtcttagac caacccatga ttgtggagca ctcattatta gccacttcct atcactgata
1141  atctctggaa gctttttact gttctgttga ataattacta tagtactaac aagttgtaca
1201  cacaggctga actagtgcat gatttgtgcc atacctatta cacgttatca tttttatttt
1261  gttctacatc tgttctcgaa aatttgtcgc ccgctagttc atttttaat taaaacgcga
1321  caaataaaaa gaacggtggg agtattttac acattaatag ttggtaagca tggtgcttca
1381  ttaaagtgtc aggaaacaga ttgagtttat taaagctgtg atgcattaat ctcttcattt
1441  tacaccgtta gatggatggt ggtttttact atattgtttc cccaagtgtt catgatatta
1501  tgtgatatag atccataaat tgaccgcttg tatttggtag tggatgacca acatcattga
1561  tattttgtga aaatgactgt cactttacta tttcctcatg tacttgttta aataactttc
1621  atccttctgt tgtaatgcaa cattgtgcta gtttagatga ctccctccgg agcaatgtct
1681  gtttaccatt tttttcctgc tactgtaagt ttttgtttaa taagagcatg caagtgattt
1741  ggatgtgctg ctgaaagtga tgatggtgtc tccaaaatgt gcattttata agctgcgcat
1801  aatcttaaca gattcgccac tgtatttggc actttgttaa aacaaaccag tgatattgat
1861  ggaccccttg atgagaagat tgtttttttcc caatactaat ccaagtttgg tttactcacc
1921  ctctgcaggc tgcatcacta ccaaggagct tggaacggtg atgcgctccc ttggccagaa
1981  ccctaccgag gcagagctgc aggacatgat caacgaggtc gacgccgatg gcaatgggac
2041  catcgacttc ccggagttcc tgaacctgat ggcgaggaag atgaaggaca cggactcgga
2101  ggaggagctc aaggaggcct tccgcgtctt tgacaaggac cagaacggtt tcatctcagc
2161  tgccgagctc cgccatgtca tgaccaacct tggcgagaag ctgactgacg aggaggtcga
2221  cgagatgatc cgtgaggccg acgtcgacgg cgacggccag atcaactacg aggagttcgt
                                          PolyA signal
2281  caaggttatg atggccaagt ga ggagcggt ccccgtgaaa taagtatcta tggattgaag
2341  cgaattatca ggcacacaag ctgtactttg tcatgtccct ttgagttacg catcagtgtc
2401  atgcaggtgg taatgtcttg tagtggtccg tttaggcggt gtagtcatgg gaacgcgaca
2461  tcagatacct gg
```

ภาพที่ 6 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *calmodulin* (*CaM*) ในข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NSW 1)

เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์โครงสร้างของยีน โดยใช้โปรแกรม Software GenScan บนอินเทอร์เน็ต พบว่า ยีน *CRT* ที่ได้มีส่วนประกอบครบทั้งยีน ซึ่งประกอบด้วย ลำดับเบสในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน Open Reading Frame (ORF) จำนวน 14 exons **(ตารางที่ 2)** พบลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5′ ซึ่งไม่เกี่ยวกับการแปลรหัสโปรตีน (5′ Untranslated region หรือ 5′ URT) มีขนาดเท่ากับ 90 คู่เบส และทางปลาย 3′ ซึ่งไม่เกี่ยวกับการแปลรหัสโปรตีน (3′ Untranslated region หรือ 3′ URT) มีขนาดเท่ากับ 277 คู่เบส **(ภาพที่ 5)** และยีน *CaM* ที่ได้มีส่วนประกอบครบทั้งยีน ซึ่งประกอบด้วย ลำดับเบสในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน Open Reading Frame (ORF) จำนวน 2 exons **(ตารางที่ 3)** ลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5′ ซึ่งไม่เกี่ยวกับการแปลรหัสโปรตีน (5′ Untranslated region หรือ 5′ URT) มีขนาดเท่ากับ 102 คู่เบส และทางปลาย 3′ ซึ่งไม่เกี่ยวกับการแปลรหัสโปรตีน (3′ Untranslated region หรือ 3′ URT) มีขนาดเท่ากับ 170 คู่เบส และพบลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง PolyA signal (AAATAA) อยู่ในส่วนของ 3′UTR ระหว่างตำแหน่งของลำดับเบสที่ 2,318–2,323 **(ภาพที่ 6)**

ตารางที่ 2 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *calreticulin* (*CRT*) ในส่วนของยีนที่มีการแสดงออก (exon) บนอินเทอร์เน็ตโปรแกรม www.genes.mit.edu/GENSCAN.html

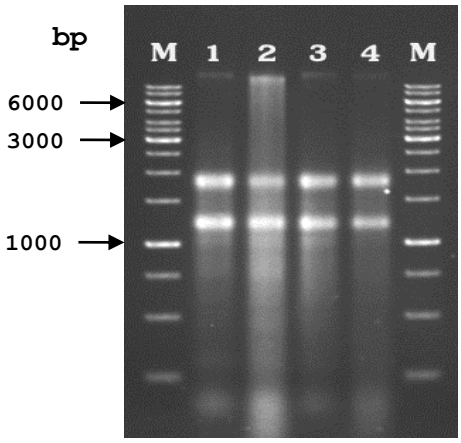
ลำดับที่	ชนิดของยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์เริ่มต้น (bp)	ลำดับนิวคลีโอไทด์สิ้นสุด (bp)	ความยาว exon (bp)
1.01	Initial exon (ATG to 5' splice site)	91	193	103
1.02	Internal exon (3' to 5'splice site)	811	918	108
1.03	Internal exon (3' to 5' splice site)	992	1184	193
1.04	Internal exon (3' to 5' splice site)	1268	1526	259
1.05	Internal exon (3' to 5' splice site)	1614	1670	57
1.06	Internal exon (3' to 5' splice site)	1842	1889	48
1.07	Internal exon (3' to 5' splice site)	1972	2058	87
1.08	Internal exon (3' to 5' splice site)	2137	2194	58
1.09	Internal exon (3' to 5' splice site)	2364	2431	68
1.10	Internal exon (3' to 5' splice site)	2526	2621	96
1.11	Internal exon (3' to 5' splice site)	2706	2753	48
1.12	Internal exon (3' to 5' splice site)	3089	3130	42
1.13	Internal exon (3' to 5' splice site)	3228	3314	87
1.14	Terminal exon (3'to stop codon)	3411	3422	12

ตารางที่ 3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *calmodulin* (*CaM*) ในส่วนของยีนที่มีการแสดงออก (exon) บนอินเทอร์เน็ตโปรแกรม www.genes.mit.edu/GENSCAN.html

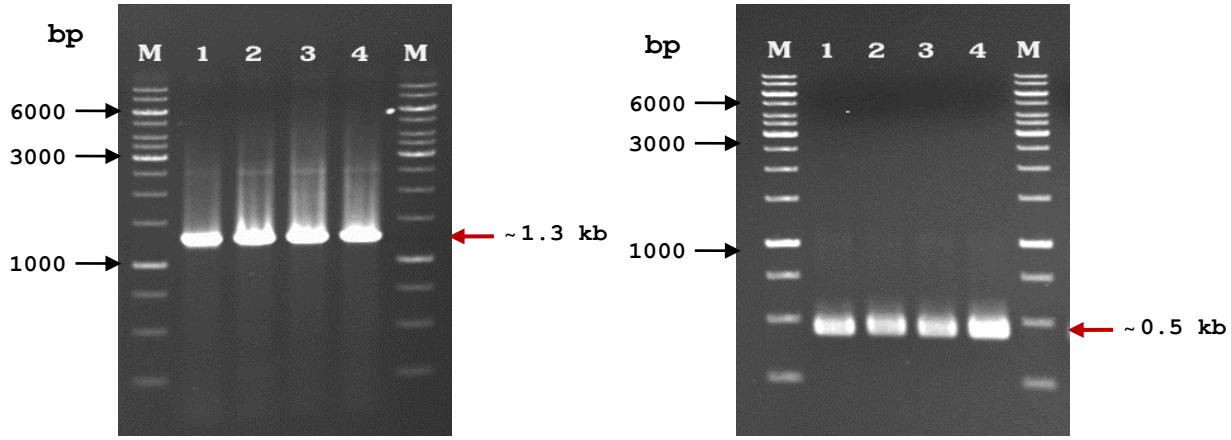
ลำดับที่	ชนิดของยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์เริ่มต้น (bp)	ลำดับนิวคลีโอไทด์สิ้นสุด (bp)	ความยาว exon (bp)
1.01	Internal exon (3' to 5'splice site)	94	178	85
1.02	Terminal exon (3'to stop codon)	1929	2302	374
1.03	PolyA signal	2318	2323	6

2. การโคลนยีน *Calreticulin* (*CRT*) *และ Calmodulin* (*CaM*) ในส่วนที่มีการแสดงออก

จากการโคลนยีน *CRT* และ *CaM* ในส่วนที่มีการแสดงออก โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *CRT* คือ CCRT (forward) และ CCRT (reverse) และไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับยีน *CaM* คือ CaM (forward) และ CaM (reverse) **(ตารางที่ 1)** โดยนำไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ไว้มาทำปฏิกิริยา RT-PCR กับอาร์เอ็นเอรวมของข้าวโพดทั้ง 4 พันธุ์ **(ภาพที่ 7)** พบว่า สามารถทำปฏิกิริยาได้แถบดีเอ็นเอของยีน *CRT* และ *CaM* ได้ยีนขนาดประมาณ 1.3 กิโลเบส และ 0.5 กิโลเบส ตามลำดับ **(ภาพที่ 8ก และ 8ข)** นำแถบดีเอ็นเอที่ได้ไปเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ TA Cloning Vector และถ่ายฝากยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียสายพันธุ์ DH5α ทำการคัดเลือกโคโลนีสีขาวนำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ **(ภาพที่ 9ก และ 9ข)** และตรวจสอบโคโลนีที่มีชิ้นส่วนของยีน *CRT* และ *CaM* โดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I + *Kpn*I (*CRT*) และ *Bam*HI + *Apa*I (*CaM*) พบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอของยีน *CRT* ที่มีความถูกต้องจำนวน 2 แถบ ได้แก่ ขนาดประมาณ 3.9 กิโลเบส เป็นขนาดของเวกเตอร์ (vector) และขนาดประมาณ 1.3 กิโลเบส เป็นขนาดของยีน (*CRT* Gene) และรูปแบบของแถบดีเอ็นเอของยีน *CaM* ที่มีความถูกต้องจำนวน 2 แถบ ได้แก่ ขนาดประมาณ 3.9 กิโลเบส เป็นขนาดของเวกเตอร์ (vector) และขนาดประมาณ 0.5 กิโลเบส (*CaM* Gene) **(ภาพที่ 10ก และ 10ข)** จากนั้นนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของยีนไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer พบว่ายีน *CRT* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 1,263 คู่เบส สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนของยีน *CRT* โดยใช้โปรแกรม ExPASy Bioinformatics Resource Portal บนอินเทอร์เน็ต จำนวน 421 amino acid และอยู่ภายใน Open reading frame ระหว่างตำแหน่งของลำดับดับเบสที่ 1 – 1,263 **(ภาพที่ 11)** และยีน *CaM* มีลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 450 คู่เบส สามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนของยีน *CaM* จำนวน 150 amino acid และอยู่ภายใน Open reading frame ระหว่างตำแหน่งของลำดับดับเบสที่ 1 – 450 **(ภาพที่ 12)** เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ยีน *CRT* ที่โคลนได้จากข้าวโพดมีความเหมือนอย่างสูงกับยีน *calreticulin* (*CRT*) ที่พบในข้าวโพด (*Zea mays*) (EU961008.1) และข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*) (XM_021453764.1) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 99% และ 95% ตามลำดับ และยีน *CaM* ที่โคลนได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน *calmodulin* (*CaM*) ที่พบในข้าวโพด (*Zea mays*) (NM_001111985.2) และข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*) (XM_002441253.2) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 99% และ 98% ตามลำดับ **(ตารางที่ 4) (ตารางที่ 5)**



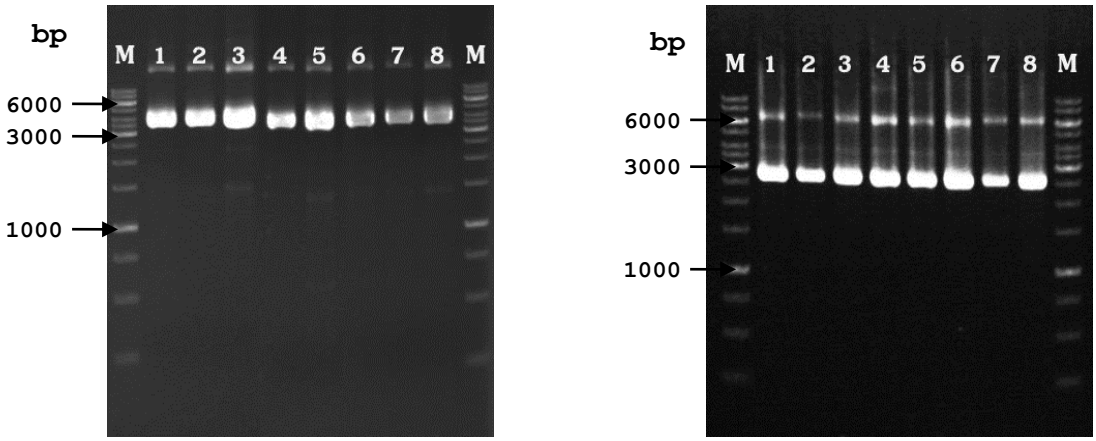
ภาพที่ 7 แสดงอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้จากข้าวโพด 4 พันธุ์, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = ข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 2 = ข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 3 = ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 4 = ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)



ก ข

ภาพที่ 8 **ก.** แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน *calreticulin* (*CRT*) ที่เพิ่มปริมาณได้จากข้าวโพดทั้ง 4 พันธุ์ ร่วมกับคู่ไพรเมอร์ CCRT (forward) และ CCRT (reverse) ด้วยเทคนิค RT-PCR, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = ข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 2 = ข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 3 = ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 4 = ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)

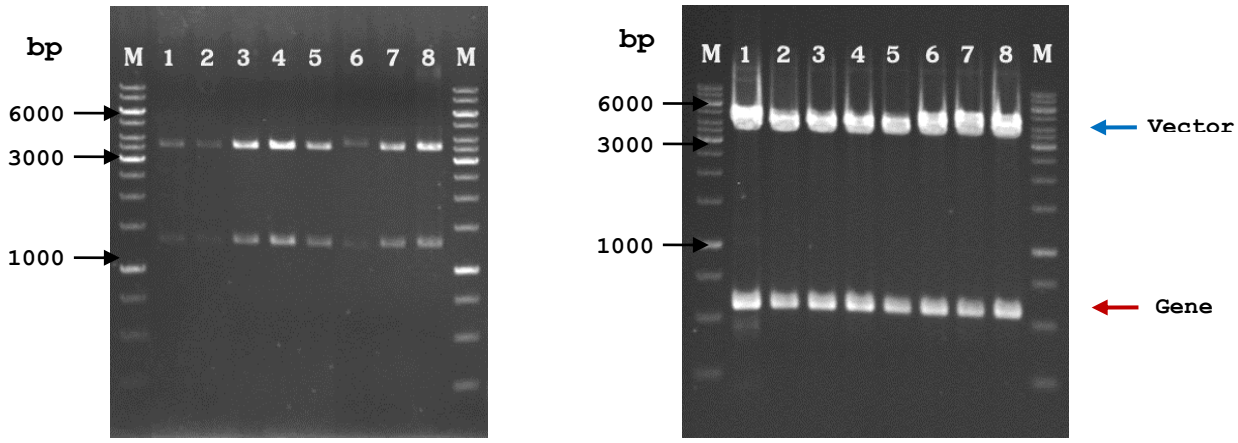
ข. แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน *calmodulin* (*CaM*) ที่เพิ่มปริมาณได้จากข้าวโพดทั้ง 4 พันธุ์ ร่วมกับคู่ไพรเมอร์ CCaM (forward) และ CCaM (reverse) ด้วยเทคนิค RT-PCR, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1 = ข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 2 = ข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 3 = ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 4 = ข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)



ก ข

ภาพที่ 9 ก. แสดงรูปแบบพลาสมิดดีเอ็นเอของยีน *CRT*, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = พลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 3-4 = พลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 5-6 = พลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 7-8 = พลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)

ข. แสดงรูปแบบพลาสมิดดีเอ็นเอของยีน *CaM*, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = พลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 3-4 = พลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 5-6 = พลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 7-8 = พลาสมิดดีเอ็นเอข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)



ก ข

ภาพที่ 10ก. แสดงรูปแบบแถบดีเอ็นเอของยีน *CRT* ที่ได้จากการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Kpn*I, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 3-4 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 5-6 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 7-8 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)

ข. แสดงรูปแบบแถบดีเอ็นเอของยีน *CaM* ที่ได้จากการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ *Kpn*I, Lane M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb DNA Ladder (Fermentas), Lane 1-2 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 1 (TF1), Lane 3-4 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์ตากฟ้า 3 (TF3), Lane 5-6 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) และ Lane 7-8 = แถบดีเอ็นเอของข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 1 (NS1)

```
   1  atggcgatccgcaaggggtcttcgtacgccgtcgcggcacttctcgcgctcgcctctgtc
      M  A  I  R  K  G  S  S  Y  A  V  A  A  L  L  A  L  A  S  V
  61  gccgccgtcgcaggggaggtcttcttccaggagaagttcgaagatggctgggaaagtagg
      A  A  V  A  G  E  V  F  F  Q  E  K  F  E  D  G  W  E  S  R
 121  tgggtcaagtctgagtggaagaaggatgagaacatggctggtgaatggaaccacacctcg
      W  V  K  S  E  W  K  K  D  E  N  M  A  G  E  W  N  H  T  S
 181  ggaaaatggaatggagatgccgaggacaaaggtattcaaacctccgaggattacaggttc
      G  K  W  N  G  D  A  E  D  K  G  I  Q  T  S  E  D  Y  R  F
 241  tatgccatttcagccgaataccctgagttcagcaacaaggataagaccctggtgctgcag
      Y  A  I  S  A  E  Y  P  E  F  S  N  K  D  K  T  L  V  L  Q
 301  ttctctgtgaagcacgagcagaagcttgactgcggtggtggctacgtcaagttgctgggt
      F  S  V  K  H  E  Q  K  L  D  C  G  G  G  Y  V  K  L  L  G
 361  ggtgatgtagaccagaaggaatttggtggagacacatcttacagcattatgtttggacca
      G  D  V  D  Q  K  E  F  G  G  D  T  S  Y  S  I  M  F  G  P
 421  gatatctgtgggtacagcaccaagaaggttcacactatcctgaccaaggatggcaaaaac
      D  I  C  G  Y  S  T  K  K  V  H  T  I  L  T  K  D  G  K  N
 481  cacttgatcaagaaggatgtgccttgtgagactgatcagttgactcatgtttacaccttg
      H  L  I  K  K  D  V  P  C  E  T  D  Q  L  T  H  V  Y  T  L
 541  atcatccgtcctgatgcaacatacagcattctcattgataatgaagagaagcaaactggc
      I  I  R  P  D  A  T  Y  S  I  L  I  D  N  E  E  K  Q  T  G
 601  agcatctacgagcattgggatattcttccccctaagaaaatcaaggacccagaggctaag
      S  I  Y  E  H  W  D  I  L  P  P  K  K  I  K  D  P  E  A  K
 661  aagcctgaggactgggatgacaaggagtacattcctgaccctgaggacaagaagccagag
      K  P  E  D  W  D  D  K  E  Y  I  P  D  P  E  D  K  K  P  E
 721  ggctatgatgatattcccaaggaaattcctgaccctgatgctaagaagcctgaggactgg
      G  Y  D  D  I  P  K  E  I  P  D  P  D  A  K  K  P  E  D  W
 781  gacgatgaggaagatggtgaatggactgcccctaccattcccaacccagaatacaaggga
      D  D  E  E  D  G  E  W  T  A  P  T  I  P  N  P  E  Y  K  G
 841  ccatggaaacaaaagaaaatcaagaacccgaactaccagggtaaatggaagacacctatg
      P  W  K  Q  K  K  I  K  N  P  N  Y  Q  G  K  W  K  T  P  M
 901  attgacaacccagattttaaggatgatccatacatttacgccttcgacagcttgaagtac
      I  D  N  P  D  F  K  D  D  P  Y  I  Y  A  F  D  S  L  K  Y
 961  attggcattgagctgtggcaggttaaatcgggcactctgttcgacaacatcatcatcact
      I  G  I  E  L  W  Q  V  K  S  G  T  L  F  D  N  I  I  I  T
1021  gatgaccctgcgttggccaagacttttgcagaggagacctggggcaagcacaaggaggca
      D  D  P  A  L  A  K  T  F  A  E  E  T  W  G  K  H  K  E  A
1081  gaaaaggctgcttttgatgaggccgagaaaaagaaggaagaagaggatgccgccaagggt
      E  K  A  A  F  D  E  A  E  K  K  K  E  E  E  D  A  A  K  G
1141  ggggatgatgaggatgatgacctagaggatgaggaagacgatgagaaggcagacgaggac
      G  D  D  E  D  D  D  L  E  D  E  E  D  D  E  K  A  D  E  D
1201  aaggccgactctgatgccgaggatggcaaggattctgatgatgagaagcacgacgagctc
      K  A  D  S  D  A  E  D  G  K  D  S  D  D  E  K  H  D  E  L
1261  taa
      *
```

ภาพที่ 11 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *calreticulin* (*CRT*) ในส่วนที่มีการแสดงออก

ภาพที่ 12 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *calreticulin* (*CRT*) ในส่วนที่มีการแสดงออก

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *calreticulin* (*CRT*) ที่โคลนได้จากข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) กับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank บนอินเทอร์เน็ตโปรแกรม www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST

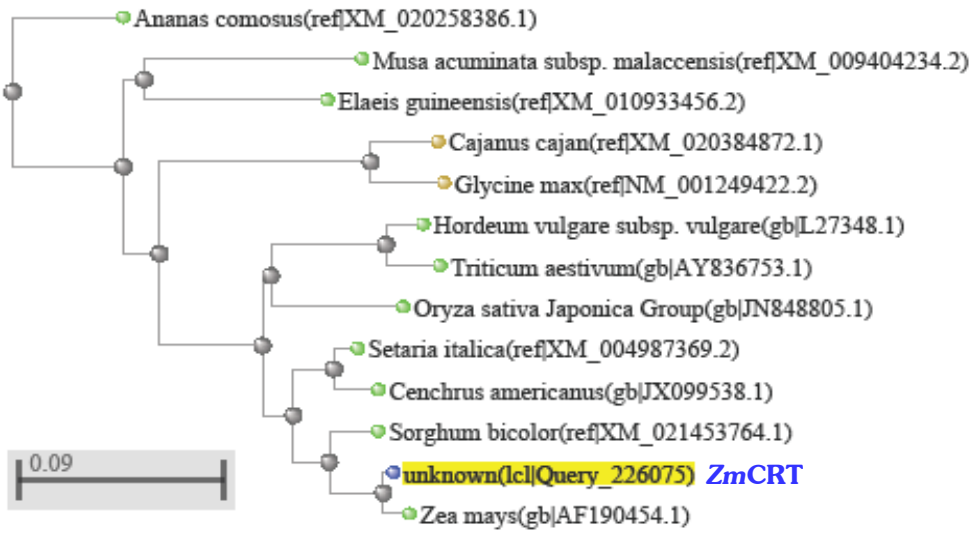
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Identities	Accession
Zea mays clone 230424 calreticulin precursor, mRNA, complete cds.	2232	2335	100%	0.0	99%	EU961008.1
Zea mays calreticulin (CRT) mRNA, complete cds.	2188	2292	100%	0.0	98%	AF190454.1
Sorghum bicolor calreticulin (LOC110432839), transcript variant X1, mRNA	1997	2106	100%	0.0	95%	XM021453764.1
Setaria italic calreticulin (LOC101774614), mRNA	1885	1987	100%	0.0	93%	XM004987369.2
Cenchrus americanus calreticulin (CRT) mRNA, complete cds.	1806	1908	99%	0.0	92%	JX099538.1

ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *calmodulin* (*CaM*) ที่โคลนได้จากข้าวโพดพันธุ์นครสวรรค์ 3 (NS3) กับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank บนอินเทอร์เน็ตโปรแกรม www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST

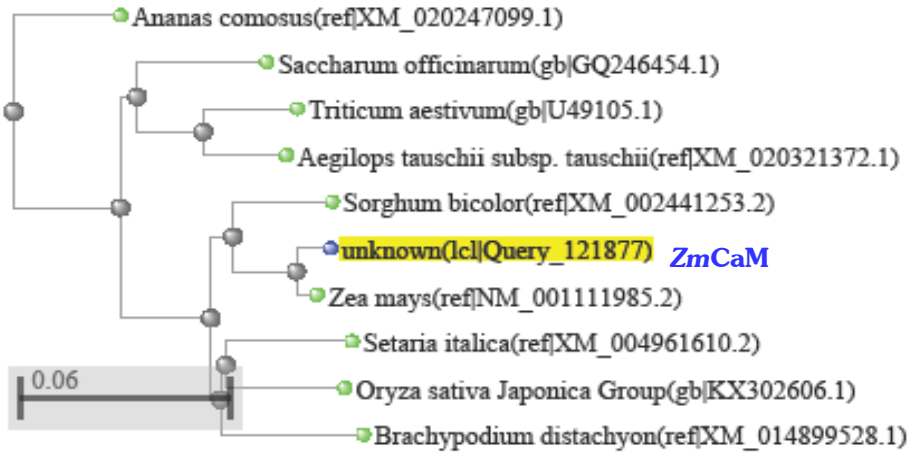
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Identities	Accession
Zea mays calmodulin, mRNA	780	882	100%	0.0	98%	NM001111985.2
Sorghum bicolor calmodulin (LOC8064169), mRNA	699	790	100%	0.0	94%	XM002441253.2
Brachypodium distachyon calmodulin (LOC100837560), mRNA	672	770	100%	0.0	93%	XM014899528.1
Setaria italic calmodulin (LOC101778363), mRNA	668	716	100%	0.0	93%	XM004961610.2

Oryza sativa clone KCB717D05 calreticulin-2 mRNA, complete cds.	654	696	100%	0.0	92%	KX302606.1

เมื่อนำข้อมูลยีน *calreticulin* (*CRT*) และ *calmodulin* (*CaM*) จากข้าวโพดมาศึกษาความสัมพันธ์กับยีน *CRT* และ *CaM* ในพืชชนิดต่างๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/treeView.cgi) พบว่า ยีน *CRT* ที่สังเคราะห์ได้จากข้าวโพด (*Zea mays* L.) มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับพืชกลุ่มใบเลี้ยงเดี่ยว ได้แก่ ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor* L.) และ ข้าวฟ่างหางหมา (*Setaria italic* L.) มากกว่าพืชกลุ่มใบเลี้ยงเดี่ยว ได้แก่ สับปะรด (*Ananas comosus* (L.) Merr.) และ กล้วย (*Musa acuminata* Colla) **(ภาพที่ 13)** ยีน *CaM* ที่สังเคราะห์ได้จากข้าวโพด (*Zea mays* L.) มีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับพืชกลุ่มใบเลี้ยงเดี่ยว ได้แก่ ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor* L.) และ พืชตระกูลหญ้า (*Brachypodium distachyon* L.) มากกว่าพืชกลุ่มใบเลี้ยงเดี่ยว ได้แก่ สับปะรด (*Ananas comosus* (L.) Merr.) และ อ้อย (*Saccharum officinarum* L.) **(ภาพที่ 14)**



ภาพที่ 13 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างยีน *calreticulin* (*CRT*) ที่โคลนได้จากข้าวโพด เปรียบเทียบกับพืชชนิดต่างๆ โดยใช้โปรแกรม www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/treeView.cgi



ภาพที่ 14 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างยีน *calmodulin* (*CaM*) ที่โคลนได้จากข้าวโพดเปรียบเทียบกับพืชชนิดต่างๆ โดยใช้โปรแกรม www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/treeview/treeView.cgi

สรุปผลการทดลอง

การโคลนยีน *cereticulin* (*CRT*) *และ calmodulin* (*CaM*) ในส่วนของยีนที่สมบูรณ์จากจีโนมิกดีเอ็นเอของข้าวโพด จำนวน 4 พันธุ์ ได้แก่ ตากฟ้า 1, ตากฟ้า 3, นครสวรรค์ 3 และ นครสวรรค์ 1 ด้วยเทคนิค PCR พบว่า ยีน *CRT* และ *CaM* ที่เพิ่มปริมาณได้มีขนาด 3,699 คู่เบส และ 2,472 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อนำไปวิเคราะห์โครงสร้างของยีนด้วยโปรแกรม Software GenScan บนอินเทอร์เน็ต พบว่า ยีน *CRT* และ *CaM* มีส่วนประกอบครบทั้งยีน ซึ่งประกอบด้วย ลำดับเบสในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน Open Reading Frame (ORF) จำนวน 14 exons และ 2 exons ตามลำดับ

การโคลนยีน *CRT* และ *CaM* ในส่วนของยีนที่มีการแสดงออกจากอาร์เอ็นเอรวมของข้าวโพดทั้ง 4 พันธุ์ ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยนำข้อมูลยีนที่ได้มาออกแบบไพรเมอร์ในส่วนของยีนที่มีการแสดงออกทางปลาย 5′ และ 3′ พบว่า ยีน *CRT* และ *CaM* ที่สังเคราะห์ได้มีขนาด 1,263 คู่เบส และ 450 คู่เบส ตามลำดับ และสามารถถอดรหัสเป็นกรดอะมิโนในส่วนที่มีการแสดงออกของยีน (ORF) ของยีน *CRT* และ *CaM* จำนวน 421 amino acid และ 150 amino acid ตามลำดับ เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับยีนชนิดเดียวกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่า ยีน *CRT* ที่ได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน *calreticulin* (*CRT*) ที่พบในข้าวโพด (*Zea mays*) และ ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 99% และ 95% ตามลำดับ และยีน *CaM* ที่ได้มีความเหมือนอย่างสูงกับยีน *calmodulin* (*CaM*) ที่พบในข้าวโพด (*Zea mays*) และ ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*) โดยมีค่า % Max Identities เท่ากับ 99% และ 98% ตามลำดับ

การนำไปใช้ประโยชน์

การโคลนยีน *cereticulin* (*CRT*) *และ calmodulin* (*CaM*) ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการทนต่อสภาวะขาดน้ำและสภาวะเค็ม สามารถยีนที่ได้ไปศึกษาการแสดงออกของยีนในพืชต้นแบบ เพื่อศึกษาข้อมูลของยีนในด้านต่างๆ ก่อนที่จะนำไปถ่ายฝากเข้าสู่พืชเศรษฐกิจ เช่น ถั่วเหลือง อ้อย มันสำปะหลัง ข้าวโพด เป็นต้น เพื่อเพิ่มศักยภาพในการให้ผลผลิตและสามารถทนทานต่อสภาวะเครียดจากการขาดน้ำและความเค็มสูงได้ อีกทั้งยังเป็นพืชทางเลือกในการเร่งรัดกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชในอนาคตได้

เอกสารอ้างอิง

สถาพร จิตตปาลพงศ์ ศราวรรณ ธนศิลป์ ธีระพล ศิรินฤมิตร และ ไพทูล แก้วหอม. 2557. การพัฒนาวัคซีนต่อต้านเห็บโค (*Boophilus microplus*) ในประเทศไทย. ภาควิชาปรสิตวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: http://www.rdi.ku.ac.th/kufair50/animal/05_animal/05_animal.html. 3 มิถุนายน 2557.

Buaboocha, T. 2009. Effect of transgenic expression in rice of a calmodulin on salt stress response. ResearchGate.

Chen F., P. M. Hayes, D. M. Mulrooney and A. Pan. 1994. Identification and characterization of cDNA clones encoding plant calreticulin in barley. The Plant Cell. Vol. 6: 835-843.

Denecke, J., B. Ek, M. Caspers, and K. M. C. Sinjorgo. 1993. Analysis of sorting signals responsible for the accumulation of soluble reticuloplasmins in the plant endoplasmic reticulum. *J. Exp. Bot*. 44: 213 – 221.

Dresselhaus, T, C. Hagel, H. Lorz and E. Kranz. 1996. Isolation of a full-length cDNA encoding calreticulin from a PCR library of in vitro zygotes of maize. *Plant Mol. Biol*. 31: 23 – 34.

Jia, X. Y., C. Y. Xu, R. L. Jing, R. Z. Li, X. G. Mao, J. P. Wang and X. P. Chang. 2008. Molecular cloning and characterization of wheat calreticulin (CRT) gene involved in drought-stressed responses. *Journal of Experimental Botany*. 59(4): 739 – 751.

Kwiatkowski, B. A., A. G. Zielinska-Kwiatkowska, A. Migdalski, and L. A. Kleczkowski. 1995. Cloning of two cDNAs encoding calnexin-like and calreticulin-like proteins from maize (*Zea mays*) leaves: identification of potential calcium-binding domains. *Gene.* 165: 219 – 222.

Li, Z. and S. Komatsu. 2000. Molecular cloning and characterization of calreticulin, a calcium-binding protein involved in the regeneration of rice cultured suspension cells. Eur. *J. Biochem*. 267: 737 – 745.

Menegazzi, P., F. Guzzo, B. Baldan and P. Mariani. 1993. Purification of calreticulin-like protein(s) from spinach leaves. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 190: 1130-1135.

Nelson, D. E., B. Glaunsinger and H. J. Bohnert. 1997. Abundant accumulation of the calcium-binding molecular chaperone calreticulin in specific floral tissues of Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol*. 114: 29 – 37.

Wyatt, S.E., P.L. Tsou and D. Robertson. 2002. Expression of the high capacity calcium-binding domain of calreticulin increase bioavailable calcium stores in plant. *Transgenic Res*. 11: 1–10.

Zea mays calreticulin (CRT) mRNA, complete cds

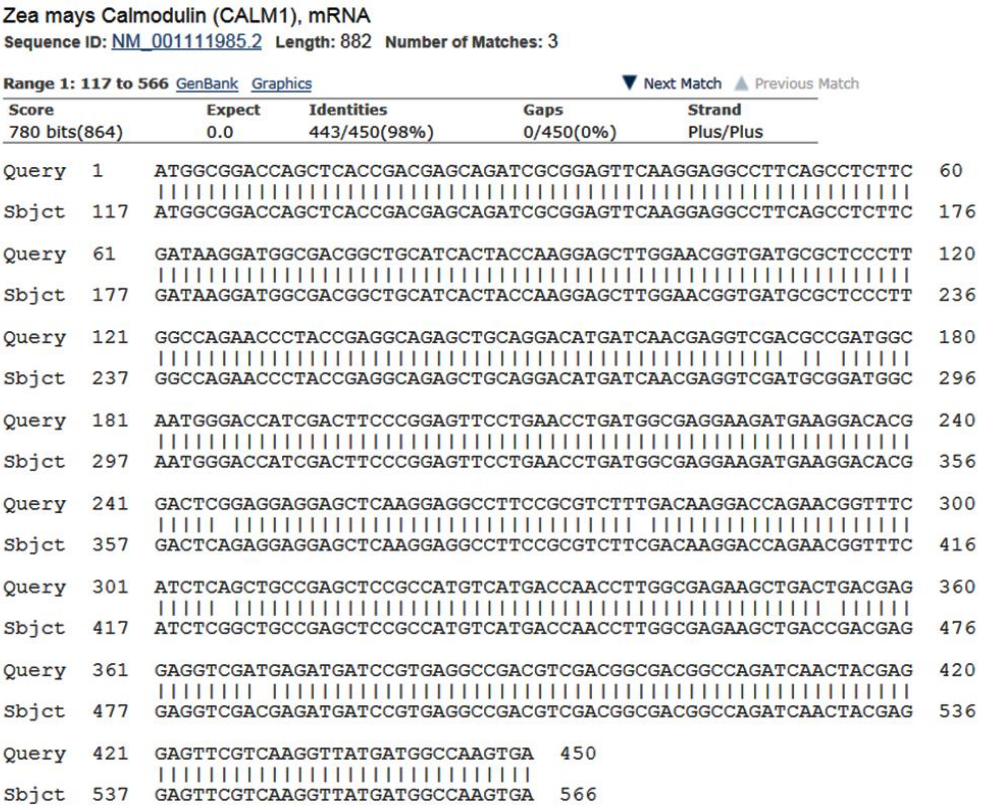
Sequence ID: AF190454.1 Length: 1545 Number of Matches: 3

Range 1: 78 to 1340 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2188 bits(2426)	0.0	1243/1263(98%)	0/1263(0%)	Plus/Plus

```
Query  1     ATGGCGATCCGCAAGGGGTCTTCGTACGCCGTCGCGGCACTTCTCGCGCTCGCCTCTGTC  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  78    ATGGCGATCCGCAAGGGGTCTTCGTACGCCGTCGCGGCACTTCTCGCGCTCGCCTCTGTC  137

Query  61    GCCGCCGTCGCAGGGGAGGTCTTCTTCCAGGAGAAGTTCGAAGATGGCTGGGAAAGTAGG  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||
Sbjct  138   GCCGCCGTCGCAGGGGAGGTCTTCTTCCAGGAGAAGTTCGAAGATGGCTGGGAAAGTCGG  197

Query  121   TGGGTCAAGTCTGAGTGGAAGAAGGATGAGAACATGGCTGGTGAATGGAACCACACCTCG  180
             |||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||
Sbjct  198   TGGGTCAAGTCCGAGTGGAAGAAGGATGAGAACATGGCTGGTGAATGGAACCACACATCT  257

Query  181   GGAAAATGGAATGGAGATGCCGAGGACAAAGGTATTCAAACCTCCGAGGATTACAGGTTC  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  258   GGAAAATGGAATGGAGATGCCGAGGACAAAGGTATTCAAACCTCCGAGGATTACAGGTTC  317

Query  241   TATGCCATTTCAGCCGAATACCCTGAGTTCAGCAACAAGGATAAGACCCTGGTGCTGCAG  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  318   TATGCCATTTCAGCCGAATACCCTGAGTTCAGCAACAAGGATAAGACCCTGGTGCTGCAG  377

Query  301   TTCTCTGTGAAGCACGAGCAGAAGCTTGACTGCGGTGGTGGCTACGTCAAGTTGCTGGGT  360
             |||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||
Sbjct  378   TTCTCTGTGAAGCACGAGCAGAAGCTTGACTGCGGCGGTGGCTACGTCAAGTTGCTGGGT  437

Query  361   GGTGATGTAGACCAGAAGGAATTTGGTGGAGACACATCTTACAGCATTATGTTTGGACCA  420
             ||||||||||||||||||  ||| |||||||||||||||||||||||| | | | |||||
Sbjct  438   GGTGATGTAGACCAGAAGACATTAGGTGGAGACACATCTTACAGCATTATCTCTCGCCCA  497

Query  421   GATATCTGTGGGTACAGCACCAAGAAGGTTCACACTATCCTGACCAAGGATGGCAAAAAC  480
             ||||||| | ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  498   GATATCTCTCGGTACAGCACCAAGAAGGTTCACACTATCCTGACCAAGGATGGCAAAAAC  557

Query  481   CACTTGATCAAGAAGGATGTGCCTTGTGAGACTGATCAGTTGACTCATGTTTACACCTTG  540
             |||||||||||||||||||| |||||| |||||||||||||||||||||||||||| ||
Sbjct  558   CACTTGATCAAGAAGGATGTCCCTTGTCAGACTGATCAGTTGACTCATGTTTACACTTTC  617

Query  541   ATCATCCGTCCTGATGCAACATACAGCATTCTCATTGATAATGAAGAGAAGCAAACTGGC  600
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||
Sbjct  618   ATCATCCGTCCTGATGCAACATACAGCATTCTCATTGATAATGAAGAGAAGCATACTGGC  677

Query  601   AGCATCTACGAGCATTGGGATATTCTTCCCCCTAAGAAAATCAAGGACCCAGAGGCTAAG  660
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  678   AGCATCTACGAGCATTGGGATATTCTTCCCCCTAAGAAAATCAAGGACCCAGAGGCTAAG  737

Query  661   AAGCCTGAGGACTGGGATGACAAGGAGTACATTCCTGACCCTGAGGACAAGAAGCCAGAG  720
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  738   AAGCCTGAGGACTGGGATGACAAGGAGTACATTCCTGACCCTGAGGACAAGAAGCCAGAG  797

Query  721   GGCTATGATGATATTCCCAAGGAAATTCCTGACCCTGATGCTAAGAAGCCTGAGGACTGG  780
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  798   GGCTATGATGATATTCCCAAGGAAATTCCTGACCCTGATGCTAAGAAGCCTGAGGACTGG  857

Query  781   GACGATGAGGAAGATGGTGAATGGACTGCCCCTACCATTCCCAACCCAGAATACAAGGGA  840
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  858   GACGATGAGGAAGATGGTGAATGGACTGCCCCTACCATTCCCAACCCAGAATACAAGGGA  917

Query  841   CCATGGAAACAAAAGAAAATCAAGAACCCGAACTACCAGGGTAAATGGAAGACACCTATG  900
             |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||
Sbjct  918   CCATGGAAACAAAAGAAAATCAAGAACCCGAACTACCAGGGTAAATGGAAGGCACCTATG  977

Query  901   ATTGACAACCCAGATTTTAAGGATGATCCATACATTTACGCCTTCGACAGCTTGAAGTAC  960
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  978   ATTGACAACCCAGATTTTAAGGATGATCCATACATTTACGCCTTCGACAGCTTGAAGTAC  1037

Query  961   ATTGGCATTGAGCTGTGGCAGGTTAAATCGGGCACTCTGTTCGACAACATCATCATCACT  1020
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1038  ATTGGCATTGAGCTGTGGCAGGTTAAATCGGGCACTCTGTTCGACAACATCATCATCACT  1097

Query  1021  GATGACCCTGCGTTGGCCAAGACTTTTGCAGAGGAGACCTGGGGCAAGCACAAGGAGGCA  1080
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1098  GATGACCCTGCGTTGGCCAAGACTTTTGCAGAGGAGACCTGGGGCAAGCACAAGGAGGCA  1157

Query  1081  GAAAAGGCTGCTTTTGATGAGGCCGAGAAAAAGAAGGAAGAAGAGGATGCCGCCAAGGGT  1140
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1158  GAAAAGGCTGCTTTTGATGAGGCCGAGAAAAAGAAGGAAGAAGAGGATGCCGCCAAGGGT  1217

Query  1141  GGGGATGATGAGGATGATGACCTAGAGGATGAGGAAGACGATGAGAAGGCAGACGAGGAC  1200
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1218  GGGGATGATGAGGATGATGACCTAGAGGATGAGGAAGACGATGAGAAGGCAGACGAGGAC  1277

Query  1201  AAGGCCGACTCTGATGCCGAGGATGGCAAGGATTCTGATGATGAGAAGCACGACGAGCTC  1260
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1278  AAGGCCGACTCTGATGCCGAGGATGGCAAGGATTCTGATGATGAGAAGCACGACGAGCTC  1337

Query  1261  TAG  1263
             |||
Sbjct  1338  TAG  1340
```

ภาพผนวกที่ 1 การวิเคราะห์ alignment ระหว่างลำดับเบสของยีน *calreticulin* (*CRT*) ของข้าวโพดที่ accession number AF190454.1 กับ ลำดับเบสของยีน *CRT* ที่โคลนได้



Zea mays Calmodulin (CALM1), mRNA

Sequence ID: NM_001111985.2 **Length:** 882 **Number of Matches:** 3

Range 1: 117 to 566 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
780 bits(864)	0.0	443/450(98%)	0/450(0%)	Plus/Plus

```
Query  1    ATGGCGGACCAGCTCACCGACGAGCAGATCGCGGAGTTCAAGGAGGCCTTCAGCCTCTTC  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  117  ATGGCGGACCAGCTCACCGACGAGCAGATCGCGGAGTTCAAGGAGGCCTTCAGCCTCTTC  176

Query  61   GATAAGGATGGCGACGGCTGCATCACTACCAAGGAGCTTGGAACGGTGATGCGCTCCCTT  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  177  GATAAGGATGGCGACGGCTGCATCACTACCAAGGAGCTTGGAACGGTGATGCGCTCCCTT  236

Query  121  GGCCAGAACCCTACCGAGGCAGAGCTGCAGGACATGATCAACGAGGTCGACGCCGATGGC  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| || ||||||
Sbjct  237  GGCCAGAACCCTACCGAGGCAGAGCTGCAGGACATGATCAACGAGGTCGATGCGGATGGC  296

Query  181  AATGGGACCATCGACTTCCCGGAGTTCCTGAACCTGATGGCGAGGAAGATGAAGGACACG  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  297  AATGGGACCATCGACTTCCCGGAGTTCCTGAACCTGATGGCGAGGAAGATGAAGGACACG  356

Query  241  GACTCGGAGGAGGAGCTCAAGGAGGCCTTCCGCGTCTTTGACAAGGACCAGAACGGTTTC  300
            ||||| ||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||
Sbjct  357  GACTCAGAGGAGGAGCTCAAGGAGGCCTTCCGCGTCTTCGACAAGGACCAGAACGGTTTC  416

Query  301  ATCTCAGCTGCCGAGCTCCGCCATGTCATGACCAACCTTGGCGAGAAGCTGACTGACGAG  360
            ||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||
Sbjct  417  ATCTCGGCTGCCGAGCTCCGCCATGTCATGACCAACCTTGGCGAGAAGCTGACCGACGAG  476

Query  361  GAGGTCGATGAGATGATCCGTGAGGCCGACGTCGACGGCGACGGCCAGATCAACTACGAG  420
            |||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  477  GAGGTCGACGAGATGATCCGTGAGGCCGACGTCGACGGCGACGGCCAGATCAACTACGAG  536

Query  421  GAGTTCGTCAAGGTTATGATGGCCAAGTGA  450
            ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  537  GAGTTCGTCAAGGTTATGATGGCCAAGTGA  566
```

ภาพผนวกที่ 1 การวิเคราะห์ alignment ระหว่างลำดับเบสของยีน *calmodulin* (*CaM*) ของข้าวโพดที่ accession number NM001111985.2 กับ ลำดับเบสของยีน *CaM* ที่โคลนได้