

## บทที่ 2

### ตรวจเอกสาร

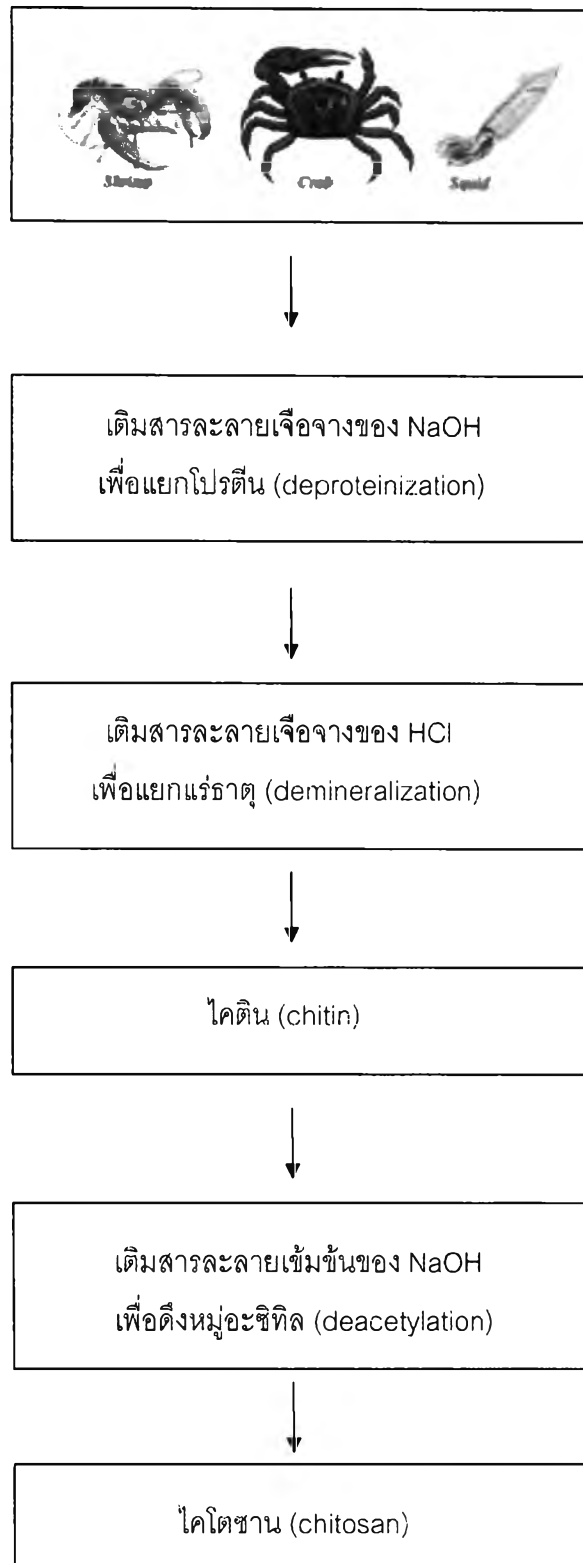


### ไคโตซาน

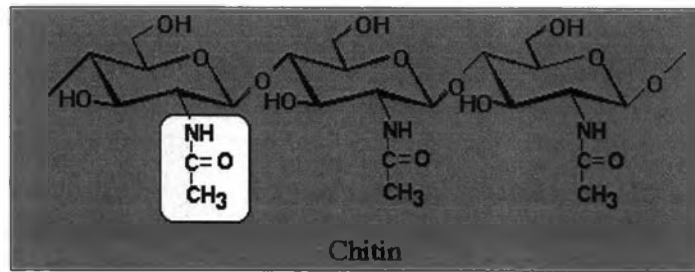
ไคโตซานมีชื่อทางเคมีว่า Poly [ $\beta$ -(1  $\rightarrow$  4)-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose] เป็นสารที่เกิดจากกระบวนการดึงหมู่อะซิทิลออก (deacetylation) จากไคติน ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของโครงสร้างที่ทำหน้าที่ให้ความแข็งแรงแก่เปลือกสัตว์ที่มีข้อปล้อง เช่น กุ้ง ปู และเป็นองค์ประกอบหนึ่งของผนังเซลล์ราอีกด้วย ไคโตซานสามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติ และมีความปลอดภัยที่จะนำมาประยุกต์ใช้กับมนุษย์ สัตว์ พืช และสิ่งแวดล้อม (Li และคณะ, 1997; รัฐ พิษณุบางกูร, 2547)

การผลิตไคติน-ไคโตซาน จากเปลือกกุ้ง ปู และแกนปลาหมึก (Hirano, 1997) สามารถทำได้โดยมีขั้นตอนดังแสดงในรูปที่ 1

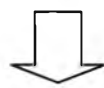
โครงสร้างของไคโตซานแตกต่างจากไคติน ที่อัตราส่วนของปริมาณน้ำตาล เอ็น-อะซิทิล-ดี-กลูโคซามีน (*N*-acetyl-D-glucosamine) และกลูโคซามีน (glucosamine) ในโมเลกุล เนื่องจากไคตินเป็นสารประกอบโพลีเมอร์ของน้ำตาล เอ็น-อะซิทิล-ดี-กลูโคซามีน เป็นส่วนใหญ่ เมื่อมีการดึงหมู่อะซิทิลออก จะเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคซามีน (รูปที่ 2) เมื่อสัดส่วนของน้ำตาลกลูโคซามีนเพิ่มขึ้นเป็น 50-100% จะทำให้โมเลกุลเหล่านี้ มีความสามารถละลายในกรดอินทรีย์ที่มีค่า pH ต่ำกว่า 6 ได้ดีขึ้น และจัดว่าเป็นไคโตซาน (รัฐ พิษณุบางกูร, 2547) ดังนั้นในการละลายไคโตซานส่วนใหญ่จึงใช้กรดแอซิติก (acetic acid) และกรดฟอร์มิก (formic acid) นอกจากนี้ความสามารถในการละลายของไคโตซานจะดีขึ้น เมื่อหมู่ *N*-acetyl มีจำนวนลดลง แต่อย่างไรก็ตามไคโตซานไม่สามารถละลายในน้ำ อัลคาไลด์ และสารละลายอินทรีย์ (Li และคณะ, 1997)



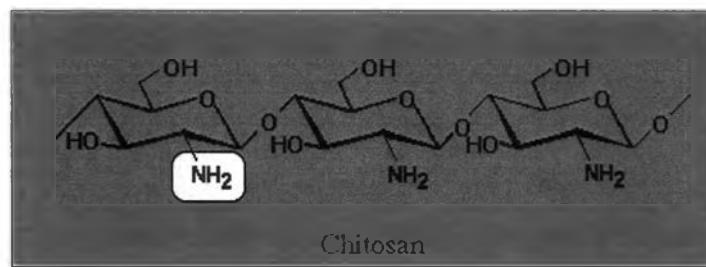
รูปที่ 1 ขั้นตอนการผลิตไคติน-ไคโตซาน ด้วยวิธีทางเคมี (แหล่งที่มา: Hirano, 1997)



Poly [ $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose]



deacetylation



Poly [ $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose]

รูปที่ 2 โครงสร้างของไคติน และไคโตซาน

(แหล่งที่มา: Dalwoo, 2002. [www.dalwoo.com/chitosan/structure.gif](http://www.dalwoo.com/chitosan/structure.gif))

ไคโตซานที่ผลิตเป็นการค้า ส่วนใหญ่มักใช้ไคโตซานที่นำมาจากเปลือกกุ้ง และปู โดยมี degree of deacetylation (DD) อยู่ในช่วง 70-95% ทั้งนี้การกำหนดคุณภาพ และสมบัติของไคโตซานที่ต้องการนั้นขึ้นอยู่กับการนำไปประยุกต์ใช้ จากการที่ไคโตซานเป็นสารธรรมชาติ ในปัจจุบันจึงมีการประยุกต์ใช้ไคโตซานในด้านต่างๆ เช่น เทคโนโลยีชีวภาพ การแพทย์ เกษษกรรม การบำบัดน้ำเสีย การพัฒนาคุณภาพกระดาษ และการเกษตร (Li และคณะ, 1997)

การใช้โคโตซานทางการเกษตรมีการประยุกต์ใช้กับพืชหลายชนิด เพื่อประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น การใช้โคโตซานเคลือบเมล็ดพืชเพื่อป้องกันเชื้อรา และเพิ่มความต้านทานโรคต่างๆ (Hirano และคณะ, 1990) นอกจากนี้โคโตซานสามารถออกฤทธิ์เป็นตัวกระตุ้น (elicitor) ต่อพืช ให้สังเคราะห์สารป้องกันตนเอง (Hirano, 1997) เช่น L-phenylalanine ammonia-lyase (PAL) ลิกนิน (Notsu และคณะ, 1994) โคติเนส (Akimoto และคณะ, 1999) และกลูคาเนส (Sathiyabama และ Balasubramanian, 1998) จากการศึกษาพบว่าโคโตซานสามารถเพิ่มปริมาณ salicylic acid (SA) ในต้นเกาส์ด (*Arachis hypogaea*) (Sathiyabama และ Balasubramanian, 1998) ซึ่ง SA นี้เป็นโมเลกุลสัญญาณในกระบวนการป้องกันตนเองของพืช (Klessing และ Malamy, 1994) ในการศึกษาในถั่วเหลืองพบว่าโคโตซานสามารถชักนำให้เกิดการร่วงของประจุไฟฟ้าบริเวณเมมเบรนของเซลล์ถั่วเหลือง (*Glycine max* cv Harosoy 63) ซึ่งมีผลให้มีการสังเคราะห์แคลโลสเพิ่มขึ้น (Köhle และคณะ, 1985)

ในด้านการเพาะปลูก เช่น การใช้โคโตซานในการเพาะเมล็ดข้าว พบว่าทำให้ข้าวมีอัตราการงอก และพัฒนาเป็นต้นกล้าได้มากขึ้น (Freepons, 1997) และเมื่อนำโคโตซานมาใช้กับต้นพืช ก็มีผลให้เกิดการเจริญทาง reproductive growth เร็วขึ้น และมีผลต่อการเพิ่มจำนวนของช่อดอก เช่นที่พบในกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอี้ยสกุล' (Limpanavech และคณะ, 2003) นอกจากนี้โคโตซานยังสามารถชักนำการปิดปากใบของต้นพริก (*Capsicum* sp.) ทำให้มีการคายน้ำลดลง ส่งผลให้ต้นพริกใช้น้ำในการเพาะปลูกลดลง ซึ่งเป็นผลดีต่อการปลูกพืชในพื้นที่ มีน้ำปริมาณจำกัด แม้ว่าผลผลิตที่ได้จะมีน้ำหนักและปริมาณลดลง แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดควบคุม (Bittelli และคณะ, 2001) นอกจากนี้การหรีของปากใบยังเป็นผลดีต่อการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อราผ่านทางปากใบอีกด้วย (Lee และคณะ, 1999)

ในด้านการยืดอายุของผลิตผลหลังการเก็บเกี่ยวของผลไม้ เช่น ลิ้นจี่ และลำไย โคโตซานมีผลต่อการลดอัตราการหายใจ และลดการสูญหายของน้ำหนักผลิตผล นอกจากนี้ยังทำให้ผลิตผลดังกล่าวสามารถเก็บรักษาได้นานขึ้น (Zhang และ Quantick, 1997; Jiang และ Li, 2001)

ในการศึกษาระดับยีน พบว่าโคโตซานสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารป้องกันตัวเองให้มีปริมาณเพิ่มขึ้น เช่น mRNA ของ PR protein ในต้นกล้าของข้าวมีปริมาณเพิ่มขึ้นหลังจากได้รับโคโตซานในช่วง 24 ชั่วโมง เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี northern blot analysis (Agrawal และคณะ, 2002) และ mRNA ของเซลล์ลิน (*Pinus elliottii* var. *elliottii* Engelm.) ที่มีลำดับเบส

คล้ายยีน cinnamic acid-4-hydroxylase และ chitinase มีปริมาณเพิ่มขึ้น หลังจากได้รับโคโตซานเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี differential display (Mason และ Davis, 1997) เป็นต้น การศึกษาผลของโคโตซานในระดับยีน พบว่ามีผู้ทำการทดลองน้อยมาก ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจศึกษาว่าโคโตซานน่าจะมีผลต่อการแสดงออกของยีนอะไร และอย่างไรในพืชชนิดต่างๆ

การส่งออกดอกกล้วยไม้สดมีมูลค่านับพันล้านบาทต่อปี และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องมาโดยตลอด ดังข้อมูลจากสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2548) (ตารางที่ 1) การศึกษาในครั้งนี้จึงได้เลือกกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอี้ยสกุล' ซึ่งเป็นกล้วยไม้ตัดดอกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยชนิดหนึ่ง (ครรรชิต ธรรมศิริ, 2547) เป็นพืชทดลอง นอกจากนี้ Limpanavech และคณะ (2003) พบว่าการประยุกต์ใช้โคโตซานในรูปแบบของโพลิโกเมอร์ที่มี degree of deacetylation ประมาณ 80% มีผลต่อการเพิ่มจำนวนช่อดอกของกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอี้ยสกุล' และมีการให้ผลผลิตเร็วขึ้น แต่อย่างไรก็ดียังไม่มียางานผลของโคโตซานในระดับยีนของกล้วยไม้ ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นในการศึกษาผลของโคโตซานที่มีต่อการแสดงออกของยีนต่างๆ ในกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอี้ยสกุล' โดยใช้วิธี differential display (Liang และ Pardee, 1992) ในการตรวจสอบระดับโมเลกุล ซึ่งผลที่ได้นี้อาจนำไปสู่การศึกษาหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการออกดอก นอกจากนี้อาจทำให้เข้าใจบทบาทของโคโตซานที่มีต่อพืชในแง่มุมอื่นๆ ได้ดียิ่งขึ้น



ตารางที่ 1 ปริมาณ และมูลค่าการส่งออกดอกกล้วยไม้สดรายเดือนของประเทศไทย

ปริมาณ : ตัน

มูลค่า : ล้านบาท

เดือน	2543		2544		2545		2546		2547		2548	
	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า
มค.	489	59.61	1,606	129.18	1,191	132.02	1,403	134.74	1,744	180.67	1,801	185.74
กพ.	616	64.43	1,085	116.26	1,282	137.57	1,262	139.24	1,419	151.38	1,828	189.78
มีค.	480	52.91	1,040	111.73	1,232	139.29	1,531	174.88	1,558	172.28	1,906	241.58
เมย.	1,261	91.33	974	111.08	965	106.12	1,294	142.22	1,411	159.25	1,573	175.61
พค.	869	105.33	1,060	119.8	1,145	136.54	1,223	155.12	1,218	153.71		
มิย.	756	75.68	868	101.49	953	109.46	1,051	132.43	1,064	132.09		
กค.	856	87.56	901	99.03	952	104.83	1,126	137.41	1,018	130.76		
สค.	1,065	107.9	1,146	128.14	1,219	138.2	1,368	162.93	1,429	181.31		
กย.	1,300	131.97	1,340	146.93	1,424	167.18	1,743	206.81	1,819	205.53		
ตค.	1,601	160.46	1,544	162.06	1,691	179.1	2,119	236.75	2,162	241.98		
พย.	1,140	128.3	1,164	124.91	1,348	143.16	1,524	159.6	1,847	206.27		
ธค.	1,345	165.75	1,213	143.97	1,569	159.58	1,776	203.3	1,937	220.83		
<b>รวม</b>	<b>11,778</b>	<b>1,231.23</b>	<b>13,941</b>	<b>1,494.58</b>	<b>14,971</b>	<b>1,653.05</b>	<b>17,420</b>	<b>1,985.43</b>	<b>18,626</b>	<b>2,136.06</b>	<b>7,108</b>	<b>792.71</b>

แหล่งที่มา: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร โดยความร่วมมือของกรมศุลกากร ปรับปรุงครั้งสุดท้ายเมื่อ 25/05/2005

## Differential Display

Differential display เป็นวิธีที่สามารถแยกความแตกต่างของยีนที่มีการแสดงออกต่างกันในแต่ละเซลล์ หรือภายใต้สภาวะที่ต่างกัน โดยใช้หลักการพื้นฐานของชีววิทยาระดับโมเลกุล คือ reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) DNA sequencing gel electrophoresis และ cDNA cloning ซึ่งวิธี differential display มีจุดมุ่งหมายเพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของ mRNA แต่ละเซลล์หรือเนื้อเยื่อ ภายใต้สภาวะที่ต่างกัน นอกจากนี้วิธีนี้ยังสามารถตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ที่แตกต่างได้ง่าย รวดเร็ว และสามารถเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้ในฐานข้อมูลสากลได้ทันที แถบ cDNA ที่เกิดขึ้นสามารถนำไปโคลน หรือใช้เป็นโพรบ (probe) สำหรับคัดแยกยีนที่ต้องการ หรือใช้ติดตามการแสดงออกของยีน และศึกษา gene organization ของยีนที่สนใจได้ (Liang และ Pardee, 1992)

หลักการของวิธี differential display (Liang และ Pardee, 1992) ดังรูปที่ 3

1. สังเคราะห์ cDNA สายแรก ด้วยวิธี reverse transcription (RT) โดยใช้ mRNA จากเซลล์หรือเนื้อเยื่อเป็น template ที่มี oligo dT ไพรเมอร์ ที่มีเบสต่างกันบริเวณปลาย 3' เป็นไพรเมอร์ในการสังเคราะห์
2. เพิ่มจำนวน cDNA ที่ได้ ด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ oligo dT ไพรเมอร์ ชนิดเดียวกับที่สังเคราะห์ cDNA สายแรก ร่วมกับ arbitrary primer ที่มีขนาดสั้น
3. เปรียบเทียบความแตกต่างของ cDNA ที่เกิดขึ้นจากตัวอย่างที่แตกต่างกันตามที่ต้องการ แบบ side by side ใน polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)
4. เพิ่มจำนวนแถบ cDNA ที่แตกต่างอีกครั้ง ด้วยไพรเมอร์คู่เดิม และโคลนชิ้นส่วน cDNA ดังกล่าว

mRNA population

5'-----NBAAAAAAAAAA-An 3'

I RT  
(Reverse Transcription)



3' NVTTTTTTTTTTT 5' (oligo dT<sub>11</sub>, VN primer)  
dNTPs, Reverse transcriptase

5'-----NBAAAAAAAAAA-An 3'  
3'←-----NVTTTTTTTTTTT 5'

II PCR  
(Polymerase Chain Reaction)



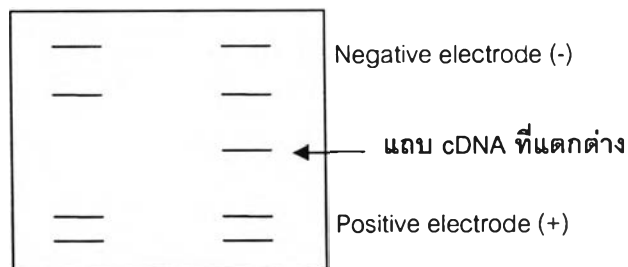
3' NVTTTTTTTTTTT 5' (oligo dT<sub>11</sub>, VN primer)  
5' XXXXXXXXXXXX 3' (arbitrary primer)  
dNTPs, DNA polymerase

5' XXXXXXXXXXXX → 3'  
3'-----NVTTTTTTTTTTT 5'  
5' XXXXXXXXXXXX ----- 3'  
3'←-----NVTTTTTTTTTTT 5'

III PAGE  
(Polyacrylamide Gel Electrophoresis)



Sample: X Y



IIII cDNA cloning

รูปที่ 3 หลักการของวิธี differential display

N : นิวคลีโอไทด์ A, T, C, G และ U

B : นิวคลีโอไทด์ C, G และ U

V : นิวคลีโอไทด์ A, G และ C

X และ Y : แถบ cDNA ของตัวอย่างที่ทำการศึกษา



Differential display เป็นวิธีที่นิยมใช้ศึกษาการแสดงออกของ mRNA แต่ละเซลล์หรือเนื้อเยื่อ ภายใต้สภาวะที่ต่างกัน ดังนั้นจึงมีผู้ศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี differential display โดยสามารถแบ่งเป็น 2 ปัจจัย ดังนี้ (Liang, 1998)

## 1. ปัจจัยหลัก

- จำนวนเบสบริเวณปลาย 3' ของ oligo dT

ส่วนใหญ่การทำ differential display มักใช้ จำนวนเบส 2 ตัวต่อจากบริเวณปลาย 3' ของ oligo dT เนื่องจาก Liang และ Pardee (1992) พบว่าการเพิ่มเบส 2 ตำแหน่ง ที่บริเวณปลาย 3' ของ oligo dT ที่มีความยาว 11 นิวคลีโอไทด์ สามารถเพิ่มจำนวนยีน murine thymidine kinase ได้ ในขณะที่การเพิ่มเบสเพียง 1 ตำแหน่ง ที่บริเวณปลาย 3' ของ oligo dT ที่มีความยาว 7 ถึง 11 นิวคลีโอไทด์ ไม่สามารถเพิ่มจำนวนยีนได้

- ความยาวของ arbitrary primer

ข้อสำคัญของการทำ differential display คือ การใช้ arbitrary primer สายสั้น ร่วมกับ oligo dT ไพรมเมอร์ เพื่อทำการเพิ่มจำนวน mRNA ส่วนใหญ่ในเซลล์ให้สามารถมองเห็นได้ และ arbitrary primer ต้องจับ cDNA ได้ 6-8 นิวคลีโอไทด์ ดังนั้นความยาวของ arbitrary primer ควรอยู่ที่ 9-13 นิวคลีโอไทด์ สำหรับ arbitrary primer ที่มีความยาว 20 นิวคลีโอไทด์ หรือมากกว่า มักใช้กับการเพิ่มจำนวนยีนที่จำเพาะเจาะจง ในขณะที่ arbitrary primer ที่มีความยาวน้อยกว่า 9 นิวคลีโอไทด์ ไม่สามารถเพิ่มจำนวนยีนได้ (Liang และ Pardee, 1992)

## 2. ปัจจัยรอง

คุณภาพของสารเคมี และเอนไซม์ การปิเปต เกณฑ์การคัดเลือกแถบ cDNA ที่แตกต่าง และการออกแบบการทดลอง เป็นต้น (Liang, 1998; Cho, Prezioso และ Liang, 2002)

ปัญหาของวิธี differential display คือ โคลนของ cDNA ที่ได้จากการทดลอง มักมีจำนวนมาก และอาจเป็น false positive จำนวนมากเช่นกัน ดังนั้นการยืนยันการแสดงออกของ cDNA ที่โคลนได้ทั้งหมดจากวิธี differential display โดยการทำ northern blot analysis จึงยุ่งยาก เปลืองเวลา และแรงงาน (Li และคณะ, 1994) ดังนั้น Vogeli-Lange และคณะ (1996) จึงคิดวิธีการคัดเลือกโคลน โดยการทำ reverse northern blot analysis ก่อนการวิเคราะห์การแสดงออกของ cDNA ที่โคลนได้ ด้วยวิธี northern blot analysis

การมี false positive จำนวนมากที่ได้จากการทำ differential display ทำให้ระยะหลังมีการนำวิธี microarrays มาใช้ในการศึกษาความแตกต่างของยีน แต่วิธีนี้ไม่สามารถพบยีนใหม่ที่อยู่ในจีโนมได้ เนื่องจากต้องทำ hybridization กับโพรบซึ่งเป็นยีนที่รู้บทบาทหน้าที่ ทำให้วิธีนี้ศึกษาได้เพียงบางยีนเท่านั้น ซึ่งต่างจาก differential display ที่มีโอกาสค้นพบยีนใหม่ๆ ได้ (Liang, 2002)

#### การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน โดยวิธี differential display ในพืช

ระยะเวลา 10 ปี ที่ผ่านมา วิธี differential display สามารถประยุกต์ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนต่างๆ ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ สิ่งมีชีวิตชั้นสูง และพืช เป็นต้น (Yamazaki และ Saito, 2002)

สำหรับในพืชได้มีการวิจัยที่หลากหลายในยีนที่เกี่ยวข้องกับสรีรวิทยาของพืช เช่น ยีนที่มีการตอบสนองต่อสารในกลุ่ม phytoalexin โดย Roux และคณะ (1998) ใช้วิธี differential display ในการศึกษาการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อสาร naphthalene acetic acid (NAA) ในต้นยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) พบว่ายีน G01513 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นหลังจากต้นยาสูบได้รับสาร NAA 1 $\mu$ M เป็นเวลา 30 นาที และยีนนี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายยีนของ SAUR X10A ในถั่วเหลืองที่ตอบสนองต่อสารออกซิน

นอกจากนี้ยังมีการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียดต่างๆ เช่น สภาวะแล้ง โดยทำการศึกษากการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะแล้งในต้นพริก (*Capsicum annuum* L. cv. Pukang) ที่ขาดน้ำ โดยเมื่อน้ำหนักสดของพืชลดลง 5-20% มีผลทำให้เกิดการแสดงออกของยีน *Ca-D14* เพิ่มขึ้น ยีนนี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายกับยีน *LEA* ในมะเขือเทศ ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการปรับกระบวนการของเซลล์ให้พร้อมรับสภาวะแล้ง (Park และคณะ, 2003)

ในการศึกษาที่ยีนที่ตอบสนองต่อความร้อนในผลส้ม (*Citrus paradisi* cv. 'Star Ruby') พบว่าหลังจากที่ผลส้มได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบการแสดงออกของยีน *cNHX1* เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งยีนนี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายยีน *NHX1* (vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter) ในพืชหลายชนิด และเมื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีนนี้ หลังจากผลส้มได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-6 สัปดาห์ พบการแสดงออกของยีนนี้เพิ่มขึ้นตามลำดับระยะเวลาที่เก็บ ดังนั้นจึงคาดว่ายีนดังกล่าวมีหน้าที่เกี่ยวกับการทำให้ผลไม่มีความทนทานต่อความเย็นได้ดีขึ้น (Porat และคณะ, 2002) เป็นต้น