



เลขที่อนุสิทธิบัตร 28702

อสป/200 - ข

อนุสิทธิบัตร

อาศัยอำนาจตามความในพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ. 2522
ซึ่งแก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2542
อธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญาออกอนุสิทธิบัตรฉบับนี้ให้แก่

มหาวิทยาลัยนเรศวร

สำหรับการประดิษฐ์ตามรายละเอียดการประดิษฐ์ ชื่อสิทธิ และรูปเขียน (ถ้ามี) ดังที่ปรากฏในอนุสิทธิบัตรนี้

เลขที่คำขอ 2103003498

วันขอรับอนุสิทธิบัตร 24 พฤศจิกายน 2564

ผู้ประดิษฐ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์พัทธมน แสงอินทร์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์ ชุดโปรแกรมสำหรับการเพิ่มปริมาณยีนอะซิติลโคเอนคาร์บอกซิเลสในผักเสี้ยนผี

ให้ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรนี้มีสิทธิและหน้าที่ตามกฎหมายว่าด้วยสิทธิบัตรทุกประการ

ออกให้ ณ วันที่ 14 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2569

หมดอายุ ณ วันที่ 23 เดือน พฤศจิกายน พ.ศ. 2570



(นายวิโรจน์ จงกลวานิชสุข)
รองอธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญา ปฏิบัติราชการแทน
อธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญา
ผู้ออกอนุสิทธิบัตร

พนักงานเจ้าหน้าที่

- หมายเหตุ
- ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรต้องชำระค่าธรรมเนียมรายปีเริ่มตั้งแต่ปีที่ 5 ของอายุอนุสิทธิบัตร มิฉะนั้น อนุสิทธิบัตรนี้จะสิ้นสุดอายุ
 - ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรจะขอชำระค่าธรรมเนียมรายปีล่วงหน้าโดยชำระทั้งหมดในคราวเดียวได้
 - ภายใน 90 วันก่อนวันสิ้นสุดอายุอนุสิทธิบัตร ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรมีสิทธิขอต่ออายุอนุสิทธิบัตรได้ 2 ครั้ง มีกำหนดคราวละ 2 ปี โดยยื่นคำขอต่ออายุ ต่อพนักงานเจ้าหน้าที่
 - การอนุญาตให้ใช้สิทธิตามอนุสิทธิบัตรและการโอนอนุสิทธิบัตรต้องทำเป็นหนังสือและจดทะเบียนต่อพนักงานเจ้าหน้าที่



Ref.256901093874561

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

ชุดไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณยีนอะซิติลโคเอคาร์บอกซิเลสในผักเสี้ยนผี
สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

- 5 เทคโนโลยีชีวภาพด้านพันธุศาสตร์โมเลกุล และอนุพันธุศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับชุดไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณยีนอะซิติลโคเอคาร์บอกซิเลสในผักเสี้ยนผี

ภูมิหลังของศิลปะหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

- ผักเสี้ยนผี (*Cleome viscosa* L.) เป็นพืชพืชมลลิมลูกอายุฤดูเดียว มีต่อมขนเหนียวปกคลุมหนาแน่นทั่วไป
10 ใบประกอบมี 3-5 ใบย่อย ช่อดอกออกที่ปลายกิ่งหรือตามซอกใบ กลีบดอกสีเหลือง 4 กลีบ ผลแบบแคปซูล
เป็นรีวชัดเจน เมล็ดจำนวนมาก เมื่อแก่มีสีน้ำตาลถึงดำ ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด ซึ่งพบได้ทั่วไปตามที่รกร้าง ป่าไม้
ทุ่งหญ้า นาข้าว และไร่ร้าง ทุกภาคของประเทศไทย ทั้งมีรายงานการใช้ประโยชน์ด้านพฤกษศาสตร์พื้นบ้าน โดยใช้
แก้ลม ปวดท้อง พิษฝี แก้ไข้ช่วยขับหนอง (วงศ์สถิต ฉั่วกุล และคณะ, 2539) แต่การใช้งานยังไม่แพร่หลายนัก
นอกจากนี้ยังพบว่าภายในเมล็ดของผักเสี้ยนผีมีปริมาณน้ำมันสะสมอยู่ (Kumari และคณะ, 2012)

- ในประเทศไทยนั้นมีการผลิตน้ำมันเชื้อเพลิงชีวภาพเพื่อใช้งาน ได้แก่ เอทานอล น้ำมันแก๊สโซฮอล์ น้ำมัน
15 ปาล์มบริสุทธิ์ และน้ำมันไบโอดีเซล แต่ยังคงไม่เพียงพอกับความต้องการใช้ที่ขยายตัวจากการเจริญเติบโตทาง
เศรษฐกิจ เนื่องจากวัตถุดิบในการผลิตน้ำมันชีวภาพส่วนใหญ่ยังต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งได้แก่ปาล์มและสบู่
ดำเป็นหลัก ทำให้ภาครัฐและภาคอุตสาหกรรมหันมาส่งเสริมการปลูกพืชปาล์มน้ำมัน และสบู่ดำในประเทศไทย
มากขึ้น แม้ว่าจะมีการสนับสนุนให้ปลูกมากขึ้น แต่ทว่าปาล์มน้ำมัน และสบู่ดำนั้นก็ยังคงประสบกับปัญหาในเรื่อง
ของการเป็นพืชยืนต้นอายุหลายปี ทำให้จำเป็นต้องใช้พื้นที่ในการปลูกค่อนข้างมาก ให้ผลผลิตที่ไม่พร้อมกัน และ
20 ปริมาณที่ได้ในแต่ละครั้งเมื่อเทียบกับพื้นที่ในการเพาะปลูกแล้วค่อนข้างน้อย จึงมีการเล็งเห็นจุดเด่นของผักเสี้ยนผี
โดยพบการรายงานว่าในส่วนของเมล็ดของผักเสี้ยนผีนั้นสามารถสะสมน้ำมันที่มีคุณสมบัติต่าง ๆ เหมือนกับใน
สบู่ดำ (Kumari และคณะ, 2012) อีกทั้งใช้พื้นที่ในการปลูกน้อย ต้นทุนค่อนข้างต่ำ การให้ปริมาณน้ำมันต่อพื้นที่
เพาะปลูกที่ค่อนข้างสูง และไม่มีการแข่งขันเพื่อนำไปผลิตอาหาร (Gubisová และคณะ, 2013) แต่อย่างไรก็ตาม
การศึกษาในผักเสี้ยนผีนั้นยังมีไม่มากพอ ในเรื่องของวิธีการปลูกและรวมไปถึงระยะเวลาในการเก็บผลผลิต

- 25 การศึกษาการแสดงออกของยีนที่ควบคุมเอนไซม์ในวิถีการสังเคราะห์กรดไขมันและกลีเซอรอลได้รับความ
ความสนใจเป็นอย่างมากในพืชที่มีการสะสมน้ำมัน โดยอะซิติลโคเอคาร์บอกซิเลส (Acetyl-CoA Carboxylase)
หรือ ACCase มักจะได้รับความสนใจเป็นลำดับต้น ๆ เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนอะซิติลโคเอ (Acetyl
CoA) เป็นมาโลนิลโคเอ (Malonyl CoA) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาขั้นแรกที่สำคัญในการสังเคราะห์กรดไขมัน หรืออนุพันธ์
ของกรดไขมันในลำดับต่อไป (Sasaki และคณะ, 2004) เอนไซม์ ACCase สามารถแบ่งกลุ่มตามลักษณะทาง
30 กายภาพได้เป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรก คือโปรตีนโฮโมเมอร์ิกในไซโตซอล (cytosolic homomeric) เกิดจากการ
ประกอบเป็นโปรตีนขนาดใหญ่ ซึ่งสามารถพบได้ในส่วนของไซโตซอล และในกลุ่มที่สองคือโปรตีนเฮเทอโรเมอร์ิกที่

อยู่ในพลาสติด (plastidic heteromeric) (Konishi และคณะ, 1994) ในกลุ่มนี้จะมีสมาชิกอยู่ 4 ชนิด โดยแต่ละชนิดจะถูกสร้างมาจากคนละยีนและมีการทำงานอย่างอิสระ ไม่ขึ้นต่อกัน ซึ่งเอนไซม์แต่ละตัวเหล่านี้จะถูกถอดรหัสและแปลรหัสในลำดับต่อมาจากยีน acc โดยที่หน่วยย่อยแอลฟาของเอนไซม์คาร์บอกซิลทรานสเฟอเรส (α -subunit of carboxyltransferase (α -CT)) ถูกสร้างจากยีน accA, โปรตีนไบโอตินคาร์บอกซิลแครีเออร์ (5 biotin carboxyl carrier protein (BCCP)) ถูกสร้างมาจากยีน accB, เอนไซม์ไบโอตินคาร์บอกซิเลส (biotin carboxylase (BC)) ถูกสร้างมาจากยีน accC และ หน่วยย่อยเบตาของเอนไซม์คาร์บอกซิลทรานสเฟอเรส (β -subunit of carboxyltransferase (β -CT)) ถูกสร้างมาจากยีน accD โดย accA, accB, accC เป็นยีนที่อยู่ใน

ภายในนิวเคลียส และในส่วนของ accD เป็นยีนที่อยู่ในคลอโรพลาสต์ โดยการค้นพบนั้นเริ่มแรกถูกพบในปี 1972 โดยการค้นพบเอนไซม์ชนิดนี้ว่าเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งของ *E. coli* (Kannangara และคณะ, 1972) ต่อมาในปี 1975 ได้ค้นพบเอนไซม์ ACCase ในกลุ่มของหน่วยย่อยที่เป็นเหมือนกัน (homomeric) ในหนู และยีสต์ (Tanabe และคณะ, 1975) และยังสามารถพบได้ในส่วนของพลาสติดในพืชชั้นสูง ทั้งในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว และพืชใบเลี้ยงคู่ ยกเว้นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวในวงศ์หญ้า (Graminae) (Konishi และคณะ, 1996) โดยพบในส่วนของใบ และ

เมล็ด เช่น ยีน accA พบได้ในพืชกลุ่มถั่วเหลือง ถั่วลิสง เต้า อาราบิโดปซิส (*Arabidopsis*) และข้าว ยีน accB พบได้ในถั่วเหลือง อาราบิโดปซิส และเมล็ดเรพชิต, ยีน accC พบได้ในถั่วเหลือง, ยาสูบ และอาราบิโดปซิส, และยีน accD พบได้ในกลุ่มของถั่วเหลือง, อาราบิโดปซิส, เมล็ดเรพชิต และถั่วลิสงเต้า จากข้างต้นจะเห็นว่าอาราบิโดปซิส จะมีการแสดงออกของยีน acc ในทุกกลุ่ม ดังนั้นหากมีการศึกษาการแสดงออกของยีนชนิดนี้จึงมักใช้อาราบิโดปซิส เป็นตัวเปรียบเทียบเพื่ออนุมานถึงการทำงานของเอนไซม์ ACCase โดยหากมีการแสดงออกของยีนในระดับที่สูงก็จะมีการทำงานของเอนไซม์ในปริมาณที่มากตามไปด้วย โดยกรดไขมันที่สังเคราะห์ขึ้นนั้นอาจถูกนำไปใช้ในหลาย ๆ ด้านเช่น เป็นองค์ประกอบในการสังเคราะห์เยื่อหุ้มเซลล์ การเจริญเติบโตของเซลล์ หรืออาจรวมไปถึงการสะสมน้ำมันของพืชบางชนิดอีกด้วย ซึ่งมีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการสะสมของน้ำมัน และการแสดงออกของยีน ACCase พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมากมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นกลุ่มพืชเรพชิต (Turnham and Northcote, 1983) และ ถั่วเหลือง (Charles และคณะ, 1986) นอกจากนี้ยังพบว่าในละอุนั้นมีการทำงานของ BC และ BCCP ที่มีความสัมพันธ์ต่อการสังเคราะห์น้ำมันด้วยเช่นกัน (Roesler และคณะ, 1996) อีกทั้งในส่วน

ของสบู่ดำซึ่งเป็นพืชที่ปัจจุบันได้รับความสนใจจากหลาย ๆ ทางในเรื่องของการนำมาเป็นแนวทางในการผลิตไบโอดีเซล ก็มีการศึกษาและรายงานว่าการแสดงออกของยีน ACCase นี้มีความสัมพันธ์ต่อการสร้างน้ำมัน (Gu และคณะ, 2011)

แต่อย่างไรก็ตามการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนมีความจำเป็นจะต้องออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อสิ่งมีชีวิตที่ต้องการตรวจสอบ เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอะซิติลโคเอคาร์บอกซิเลส ผักเสี้ยนผีไม่มีในฐานข้อมูล จึงจำเป็นต้องออกแบบไพรเมอร์โดยใช้บริเวณอนุรักษ์ของยีนในสิ่งมีชีวิตที่ใกล้เคียงที่สามารถใช้เพิ่มปริมาณยีนอะซิติลโคเอคาร์บอกซิเลสในผักเสี้ยนผี การประดิษฐ์นี้จึงสนใจการออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีนอะซิติลโคเอคาร์บอกซิเลสผักเสี้ยนผี เพื่อใช้ศึกษาการแสดงออกของยีนอะซิติลโคเอคาร์บอกซิเลสต่อไป



นางสาวทักษอร สมบูรณ์ทรัพย์

ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

การประดิษฐ์นี้มีวัตถุประสงค์เพื่อออกแบบชุดไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณยีนอะซิติลโคเอย์คาร์บอกซิเลสในผักเสี้ยนผี ประกอบด้วยไพรเมอร์จำนวน 4 คู่ ซึ่งจำเพาะต่อยีนเป้าหมาย 4 ตำแหน่ง และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

- 5 ไพรเมอร์คู่ที่ 1 ชื่อ accA ได้แก่
 - accA_F คือ 5' - GATGTGAGGAAGATGGCG -3'
 - accA_R คือ 5' - GAGTAGGCATMCCCCAAGTT -3'
- ไพรเมอร์คู่ที่ 2 ชื่อ accB ได้แก่
 - accB_F คือ 5' - TCTTAAGCTTGTGGATTCAAGA -3'
 - 10 - accB_R คือ 5' - GTGTCAACGCTGACTGGTT -3'
- ไพรเมอร์คู่ที่ 3 ชื่อ accC ได้แก่
 - accC_F คือ 5' - CATGAGATGGGGATTCTTGT -3'
 - accC_R คือ 5' - GACACGGATGCTATCAGGATT -3'
- ไพรเมอร์คู่ที่ 4 ชื่อ accD ได้แก่
 - 15 - accD_F คือ 5' - GGATCCGTAGTAGGCGAA -3'
 - accD_R คือ 5' - ATAACCTCACTCACACACCTTT -3'

- สำหรับการประดิษฐ์ครั้งนี้ ผู้ประดิษฐ์มีความสนใจระบุไพรเมอร์จำเพาะต่อยีนอะซิติลโคเอย์คาร์บอกซิเลสในผักเสี้ยนผี 4 ชนิด ได้แก่ ยีน accA สังเคราะห์หน่วยย่อยแอลฟาของเอนไซม์คาร์บอกซิลทรานสเฟอเรส (α -subunit of carboxyltransferase (α -CT)) ยีน accB สังเคราะห์โปรตีนไบโอตินคาร์บอกซิลแครีเออร์ (biotin carboxyl carrier protein (BCCP)) ยีน accC สังเคราะห์เอนไซม์ไบโอตินคาร์บอกซิเลส (biotin carboxylase (BC)) และยีน accD สังเคราะห์หน่วยย่อยเบต้าของเอนไซม์คาร์บอกซิเลส (β -subunit of carboxyltransferase (β -CT)) โดยการเลือกใช้บริเวณอนุรักษ์จากกลุ่มพืชสะสมน้ำมันเพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนดังกล่าว แล้วนำไปสู่การโคลนเพื่อส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละยีนของผักเสี้ยนผี

การเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

- 25 ขั้นตอนการประดิษฐ์ไพรเมอร์จำเพาะต่อยีนอะซิติลโคเอย์คาร์บอกซิเลส ในผักเสี้ยนผี 4 ชนิด ได้แก่ ยีน accA, accB, accC และ accD เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนดังกล่าว มีดังนี้

ก. การออกแบบไพรเมอร์จำเพาะสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโดยอาศัยบริเวณอนุรักษ์

- 30 สืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าวจากฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) จากพืชในกลุ่มที่มีการสะสมน้ำมัน (ตารางที่ 1) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาจัดเรียง

28702

และเปรียบเทียบเพื่อหาตำแหน่งอนุรักษ์ (conserve) ด้วยโปรแกรมคลัสทอลโอเมก้า (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) แล้วเลือกบริเวณสำหรับไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ด (Forward primer) และไพรเมอร์รีเวิร์ส (Reverse primer) ตรวจสอบความเหมาะสมของไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม OligoCalc: lignonucleotide Properties Calculator

5 ตารางที่ 1 แสดงชนิดของพืชที่นำมาออกแบบไพรเมอร์

ไพรเมอร์(Primer)	พืชต้นแบบ
accA	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	<i>Brassica napus</i>
	<i>Brassica rapa</i>
	<i>Camelina sativa</i>
	<i>Tarenaya hassleriana</i>
accB	<i>Arabidopsis lyrata subsp.</i>
	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	<i>Brassica napus</i>
	<i>Brassica oleracea</i>
	<i>Brassica rapa</i>
	<i>Camelina sativa</i>
accC	<i>Daucus carota subsp.</i>
	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	<i>Brassica napus</i>
	<i>Tarenaya hassleriana</i>
accD	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	<i>Brassica napus</i>
	<i>Tarenaya hassleriana</i>
	<i>Arabidopsis cebennensis</i>
	<i>Arabidopsis halleri subsp.</i>
	<i>Arabidopsis lyrata subsp.</i>
	<i>Arabidopsis petrogena</i>
	<i>Arabis hirsuta</i>
	<i>Barbarea verna</i>
	<i>Brassica juncea</i>
	<i>Brassica napus</i>

28702

	<i>Brassica nigra</i>
	<i>Brassica oleracea</i>
	<i>Brassica rapa</i>
	<i>Cakile arabica</i>
5	<i>Cardamine impatiens</i>
	<i>Cochlearia tridactylites</i>
	<i>Crucihimalaya wallichii</i>
	<i>Eutrema botschantzevii</i>
	<i>Eutrema heterophyllum</i>
10	<i>Eutrema yunnanense</i>
	<i>Isatis tinctoria</i>

ผลการทดลอง

จากการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนข้างต้นจากที่จัดแบบ และเลือกบริเวณอนุรักษ์เพื่อให้ได้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะดังแสดงในตารางที่ 2

15	ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของของไพรเมอร์จำเพาะ		
	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ 5' -->3'	ความยาวของดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนได้ (คู่นิวคลีโอไทด์)
	accA_F	GATGTGAGGAAGATGGCG	341
	accA_R	GAGTAGGCATMCCCAAAGTT	
20	accB_F	TCTTAAGCTTGTGGATTCAAGA	473
	accB_R	GTGTCAACGCTGACTGGTT	
	accC_F	CATGAGATGGGGATTCTTGT	277
	accC_R	GACACGGATGCTATCAGGATT	
	accD_F	GGATCCGTAGTAGGCGAA	422
25	accD_R	ATAACTCACTCACAACACCTTT	

28702

ข. การสกัดอาร์เอ็นเอ และสังเคราะห์คอมพลีเมนต์อาร์เอ็นเอ (complementary DNA : cDNA)

นำตัวอย่างผัสดักเลี้ยงผีเสื้อกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป

1. ชั่งเมล็ดผักเลี้ยงผี 0.05 กรัม และนำมาบดในโกร่งที่แช่ ณ -20 องศาเซลเซียส จนเย็น โดยใช้ไนโตรเจนเหลวเพื่อให้เซลล์แตกละเอียดและย้ายลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ PFL ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และบัฟเฟอร์ PFR ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
 2. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
 3. นำส่วนใสที่ได้ย้ายมาใส่ในหลอดที่มีแผ่นกรอง (Filter Column) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
 4. นำส่วนใสที่ได้มาใส่ลงในหลอดหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ เติมน้ำบัฟเฟอร์ PBL ปริมาตร 500 ไมโครลิตรตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ผสมให้เข้ากัน ทดส่วนใสในหลอดที่มีแผ่นกรอง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที
 5. ล้างหลอดด้วยบัฟเฟอร์ PFW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และล้างด้วยบัฟเฟอร์ PFW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ทำ 2 ขั้ว ย้ายคอลัมน์มาใส่หลอดใหม่
 6. เติมน้ำกลั่นที่ปราศจาก RNase ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เก็บสารละลายอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
- ตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอที่สกัดได้โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส ด้วยอะกาโรสเจล 1% และวัดปริมาณอาร์เอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตรโดยใช้เครื่องวัดสารพันธุกรรมชนิดละเอียด (Nanodrop) แล้วจึงนำอาร์เอ็นเอปริมาณ 0.1-5 ไมโครกรัม มาสังเคราะห์เป็นคอมพลีเมนต์อาร์เอ็นเอด้วยชุดสังเคราะห์ Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)
- ค. การเพิ่มปริมาณคอมพลีเมนต์อาร์เอ็นเอ
- เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอคู่สมจากคอมพลีเมนต์อาร์เอ็นเอสายแรก (first-strand cDNA) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) หรือพีซีอาร์ (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ โดยมีการเติมส่วนประกอบต่าง ๆ ดังนี้
- พีซีอาร์บัฟเฟอร์ (10X PCR buffer) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
 - สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ (MgCl₂) ความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร

- สารละลายนิวคลีโอไทด์ผสม (dNTP mixture) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร
- ไพรมอร์ฟอร์เวิร์ด ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร
- และไพรมอร์รีเวิร์ส ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร
- คอมพลีเมนต์เอ็นเอความเข้มข้น 50 นาโนกรัม ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
- 5 - น้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 6.2 ไมโครลิตร
- เอ็นไซม์แทคทีเอ็นเอโพลีเมอเรส (*Taq* DNA polymerase, 5U/u) ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร

หลังจากผสมสารต่าง ๆ ให้เข้ากันแล้ว นำหลอดบรรจุสารดังกล่าวใส่ลงในเครื่องที่ซีอาร์โดยมีการปรับอุณหภูมิของเครื่องในขั้นต่าง ๆ ดังนี้

- ขั้นที่ 1 ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที
- 10 ขั้นที่ 2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR amplification) 35 รอบ โดยประกอบด้วยขั้นตอน 3 ขั้นตอน คือ 95 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 52 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที
- ขั้นที่ 3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขั้นตอนสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที

ง. การโคลน และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนอะซิดิลโคเอคาร์บอกซิเลส

- นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรมอร์ข้างต้นมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอจาก
- 15 เจลสำเร็จรูป (E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit, Omega Bio-tek, USA) จากนั้นเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้ากับพาหะ pJET1.2/blunt Cloning Vector โดยชุดโคลนสำเร็จรูป (Clone JET PCR Cloning Kit, Thermo Scientific) และถ่ายโมเลกุลดีเอ็นเอลูกผสม (recombinant DNA molecule) เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5-alpha ด้วยการให้ความร้อน (heat shock) และคัดเลือกโคโลนีที่เจริญได้บนอาหารที่มีการเติม แอมพิซิลิน และสก็ดพลาสมิดจากเซลล์แบคทีเรียโดยใช้ชุดสก็ดพลาสมิดสำเร็จรูป (E.Z.N.A.® Plasmid DNA
- 20 Mini Kit I, Omega Bio-tek, USA) แล้วจึงนำพลาสมิดที่สกัดได้ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ บริษัทมาร์โคเจน (Macrogen) ประเทศเกาหลี แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้มา เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่มีการรายงานในฐานข้อมูลสากล ด้วยโปรแกรม BLAST จากเว็บไซต์ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

ผลการทดลองพบว่า

- 25 จากการเพิ่มปริมาณคอมพลีเมนต์เอ็นเอด้วยไพรมอร์จำเพาะที่ออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ทั้ง 4 ยีน นั้น สามารถเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาที่ซีอาร์ โดยตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส ใช้อะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ที่เติมเอทิดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) 0.1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าขนาดของ เป้าหมายที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรมอร์ข้างต้นนั้นใกล้เคียงกับขนาดที่คาดการณ์แสดงในรูปที่ 1 แล้วนำไปสู่การโคลนเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละยีน การหาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนทั้ง 4 ยีน
- 30 มาเทียบเคียงกับฐานข้อมูล จะมีคล้ายคลึงกับพืชที่ใกล้เคียงคือ *Tarenaya hassleriana* หรือผักเสี้ยนฝรั่ง โดยมี ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้



>accA – 341 bp
 GATGTGAGGAAGATGGCGGATGAAACtGGTcTGGACTTCACTGATCAGATTATCTCATTGGAGAATAAGTACAGACAGGCACT
 CAAAGATCTTTACACGCATCTTACTCCAATACAACGTGTGAACATTGCACGCCACCCCAACCGGCCACTTTCTTGATCATG
 5 TATTTAACATCACGGACAAGTTTGTGAGCTTCATGGAGACCGAGCAGGGTATGATGACCCCGCTATCGTGACGGGTATCGG
 CACAATAGATGGCAAAAGATACATGTTTATTGGCCACCAGAAGGGAAGAAATACAAAAGAAAATATCGAGCGTAACTTTGGG
 GATGCCTACTC
 >accB – 473 bp
 TCTTAAGGCTTGTGGATTCAAGGGACATAgTGCAGCTTGAACTGAAGCAACTGGACTGTGAGATAGTTATAAGGAAGAAGG
 10 AAGCCCCTACAGCAGCCCTGTAGCAGCGGCAGCTCCAGTCCAGTGTACTCAATGCCGCCTCAATGGCTATGCCTCCAGCT
 CAACCAGCCGCTCCACCAGCTGCTCAAGCTCTAGTCCCTCGGCTCTGCAGCTGCTCCTGCCGCCCGGGTAAGGCAAGCC
 CGTCCCTGTCTCATCTCCGCTCAAGTCTCCTATGGCTGGCACCTTTTACCGCTCTCCTGCACCTGGTGAACCTCCTTTTGT
 AAGGTTGGAGACAAGGTGCAGAAGGGTCAAGTTGTTGCATTATTGAGGCTATGAACTGATGAACGAAATTGAGGCTGATC
 AATCCGGAAGTGTGCTGAGAACGTACTGGCTGAAGATGGAAAACCAAGTCAGCGTTGACAC
 15 >accC – 277 bp
 GACACGGATGTATCAGGATTAGGTCCAATAAAGCTTGTGATCCCATGCTCTCTGCACATTTCAACAAAGAGAGCATTCTCCGA
 AAGGAAACCATATCCAGGATGAAGCATTGTACATCCACGGCTAATAGCAGCAGACAGAACATTTGGTATCAACAAGTACGATT
 GGCTGCTGGGAGCTTACCAATGCAACTGCTTCATCAGCCAATTTACATGAAGGGCATCCTGTCAATGGTCGAATAGACA
 GCGACACAAGGAATCCCCATCTCATA
 20 >accD– 694 bp
 GGATCCGTAGTAGGCGAAAAAATCACTCGTtGATCGAGTATGCTACCAATCAATTTTTACCTcTTATTTTAGTGTGTTcTTCC
 GGAGGAGCACGAATGCAAGAAGGAAGTTAAGTTTGATGCAAATGGCTAAAATTTcTTCGGTTTTGTGTGATTATCAATCACA
 TAAAAAGTTATTcTATGTATCAATTCTTACATCTCCTACTACCGGTGGGGTGACAGCTAGTTTTGGTATGTTGGGGGATATCAT
 TATTGCCGAACCTATGCCTATATTGCATTTGCGGGTAAAAGAGTAATTGAACAAACATTGAAAAAAGCCGTGCCTGAAGGTT
 25 CACAAGCGGCTGAATcTTTATTACGTAAGGGCTTATTGGATGCAATTGTAcCACGTAATCTTTGAAAAGGTGTTGTGAGTGA
 GTTAT

คำอธิบายรูปเขียนโดยย่อ

รูปที่ 1 แสดงแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ 1 accA 2 accB 3 accC และ 4 accD ตามลำดับโดย M
 คือดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส (Maker 100 bp DNA ladder)

30 วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

ดังที่กล่าวมาแล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

28702

ข้อถ้อยสัญญา

1.ชุดไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณยีนอะซีติลโคเอคาร์บอกซิเลสในผักเสี้ยนผี ประกอบด้วย ไพรเมอร์จำนวน 4 คู่ ซึ่งจำเพาะต่อยีนเป้าหมาย 4 ตำแหน่ง และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

ไพรเมอร์คู่ที่ 1 ชื่อ accA ได้แก่

- 5 - accA_F คือ 5'- GATGTGAGGAAGATGGCG -3'
 - accA_R คือ 5'- GAGTAGGCATMCCCAAAGTT -3'

ไพรเมอร์คู่ที่ 2 ชื่อ accB ได้แก่

- accB_F คือ 5'- TCTTAAGCTTGTGGATTCAAGA -3'
 - accB_R คือ 5'- GTGTCAACGCTGACTGGTT -3'

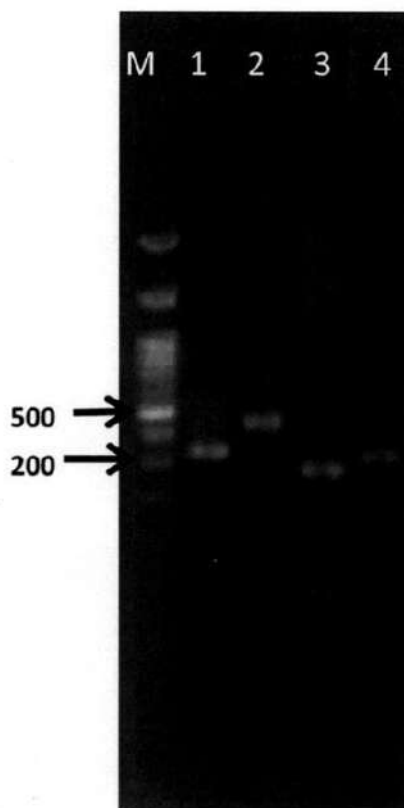
10 ไพรเมอร์คู่ที่ 3 ชื่อ accC ได้แก่

- accC_F คือ 5'- CATGAGATGGGGATTCTTGT -3'
 - accC_R คือ 5'- GACACGGATGCTATCAGGATT -3'

ไพรเมอร์คู่ที่ 4 ชื่อ accD ได้แก่

- accD_F คือ 5'- GGATCCGTAGTAGGCGAA -3'
15 - accD_R คือ 5'- ATAACCTCACTCACAACACCTTT -3'

28702



รูปที่ 1

28702

บทสรุปการประดิษฐ์

- ชุดไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณยีนอะซิติลโคเอคาร์บอกซิเลสในผักเสี้ยนผี เป็นการประดิษฐ์มุ่งเน้นผลิตไพรเมอร์จำเพาะที่ใช้เพิ่มปริมาณคอมพลีเมนต์ดีเอ็นเอต้นแบบของยีน ที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์อะซิติลโคเอคาร์บอกซิเลส 4 ชนิด ได้แก่ ยีน accA สังเคราะห์เอนไซม์แอลฟาคาร์บอกซิสทรานเฟอเรส (α -subunit of carboxyltransferase, α -CT) ยีน accB สังเคราะห์โปรตีนพาไบโอตินคาร์บอกซิล (biotin carboxyl carrier protein (BCCP)) ยีน accC สังเคราะห์เอนไซม์ไบโอตินคาร์บอกซิล (biotin carboxylase (BC)) และยีน accD สังเคราะห์เอนไซม์เบต้าคาร์บอกซิเลส (β -subunit of carboxyltransferase (β -CT)) เพื่อใช้ในการลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 4 ชนิดในผักเสี้ยนผี
- 5

28702