บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

พืชทดลอง

1. เมล็ดข้าว (*Oryza sativa* L.) พันธุ์เหลืองประทิว123 (LPT123)
2. เมล็ดข้าว (*Oryza sativa* L.) พันธุ์เหลืองประทิว123 สายพันธุ์ทนเค็ม (LPT123-TC171) ที่ได้จากการเกิด somaclonal variation ของข้าว LPT123 ในหลอดทดลอง (Vajrabhaya และ Vajrabhaya, 1991) โดยผ่านการผสมตัวเองและคัดเลือกภายใต้ภาวะเค็มมา 6 ชั่วรุ่น

สถานที่ปลูกพืชทดลอง

โรงเรือนปฏิบัติการวิจัยข้าว หน่วยปฏิบัติการวิจัยสิ่งแวดล้อมและสรีรวิทยาของพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุปกรณ์การศึกษา

1. **วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ปลูก**
   - กระบะพลาสติกขนาด 50x100 ตารางเซนติเมตร
   - ทราย
   - ขวดแก้วขนาด 100 มิลลิลิตร
   - ถาดพลาสติกขนาด 8x12 ตารางนิ้ว
   - เครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้า (digital electroconductivity meter)
   - บีกเกอร์

2. **วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างพืช**
   - อลูมินัมฟอยล์
   - กรรไกรตัดตัวอย่างพืช
   - เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่งของหน่วยกรัม
   - ภาชนะใส่ไนโตรเจนเหลว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. **วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัด** RNA
   - อลูมินัมฟอยล์
   - ภาชนะใส่ไนโตรเจนเหลว
   - โกร่งบด
   - อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath)
   - ไมโครปิเปต
   - หลอด microcentrifuge
   - เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (microcentrifuge)
   - เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refridgerated centrifuge)
   - เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer)
   - ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่าง (deep freezer) อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส
   - ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่าง อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
   - เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
   - microwave oven
   - เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
   - cuvette
   - ชุดแยกกรดนิวคลิอิกด้วยกระแสไฟฟ้าในแนวระนาบ (horizontal gel electrophoresis)
   - เครื่องกำเนิดแสง UV และถ่ายรูปเจล (Gel Doc™ 2000, Bio-Rad, California, USA)

4. **วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี differential display**
   - ไมโครปิเปต
   - หลอด microcentrifuge
   - เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (microcentrifuge)
   - เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refridgerated centrifuge)
   - อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath)
   - ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่าง (deep freezer) อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส
   - ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่าง อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
   - เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
   - เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- cuvette
- microwave oven
- เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA (programmable thermal controller รุ่น PTC-100™, MJ research, Inc., Massachusetts, USA)
- ชุดแยกกรดนิวคลิอิก /โปรตีน ด้วยกระแสไฟฟ้าในแนวดิ่ง (vertical gel electrophoresis รุ่น Protein II xi 2-D Cell, Bio-Rad, California, USA)
- บีกเกอร์
- กระบอกตวง
- ถาดพลาสติกขนาด 8x12 ตารางนิ้ว
- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (incubator)
- ชุดแยกกรดนิวคลิอิกด้วยกระแสไฟฟ้าในแนวระนาบ (horizontal gel electrophoresis)
- เครื่องกำเนิดแสง UV และถ่ายรูปเจล (Gel Doc™ 2000, Bio-Rad, California, USA)

5. **วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการโคลนชิ้นส่วน DNA**
   - ไมโครปิเปต
   - หลอด microcentrifuge
   - หลอด centrifuge ขนาด 50 มิลลิลิตร
   - ขวดรูปชมพู่ขนาด 25 มิลลิลิตร
   - เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (incubator)
   - เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (microcentrifuge)
   - เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refridgerated centrifuge)
   - อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath)
   - ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่าง (deep freezer) อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส
   - ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่าง อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
   - เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
   - microwave oven
   - เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
   - cuvette
   - pH meter

- เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA (programmable thermal controller รุ่น PTC-100™, MJ research, Inc., Massachusetts, USA)
- ชุดแยกกรดนิวคลิอิกด้วยกระแสไฟฟ้าในแนวระนาบ (horizontal gel electrophoresis)
- เครื่องกำเนิดแสง UV และถ่ายรูปเจล (Gel Doc™ 2000, Bio-Rad, California, USA)
- เครื่องกำเนิดแสง UV (UV transluminator)

6. **วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัด plasmid DNA**
   - ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่าง(deep freezer) อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส
   - ตู้เย็น
   - ไมโครปิเปต
   - หลอด microcentrifuge
   - ขวดรูปชมพู่ขนาด 25 มิลลิลิตร
   - หลอดทดลองขนาด 30 มิลลิลิตร
   - เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (incubator)
   - เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่งของหน่วยกรัม
   - เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (microcentrifuge)
   - pH meter
   - เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer)
   - อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath)
   - เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
   - cuvette
   - microwave oven
   - ชุดแยกกรดนิวคลิอิกด้วยกระแสไฟฟ้าในแนวระนาบ (horizontal gel electrophoresis)
   - เครื่องกำเนิดแสง UV และถ่ายรูปเจล (Gel Doc™ 2000, Bio-Rad, California, USA)
   - เครื่องกำเนิดแสง UV (UV transluminator)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. **วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี** Northern Blot Analysis

- ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่าง (deep freezer) อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส
- ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่าง อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath)
- ไมโครปิเปต
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (microcentrifuge)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refridgerated centrifuge)
- หลอด microcentrifuge
- microwave oven
- ชุดแยกกรดนิวคลิอิกด้วยกระแสไฟฟ้าในแนวระนาบ (horizontal gel electrophoresis)
- ไม้บรรทัด
- pH meter
- กระบอกตวง
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
- cuvette
- เครื่องกำเนิดแสง UV และถ่ายรูปเจล (Gel Doc™ 2000, Bio-Rad, California, USA)
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิสำหรับทำ Hybridization (hybridization oven)
- ตู้อบ (hot air oven)
- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (incubator)
- กล่องพลาสติกขนาด 15x30 ตารางเซนติเมตร
- กล่องพลาสติกขนาด 12x15 ตารางเซนติเมตร
- กระดาษหนังสือพิมพ์
- กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman Laboratory Division, England)
- แผ่นเมมเบรน (Hybond N^+, Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, Bucks, England)
- X-ray film (Eastman Kodak Company, New York, USA)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมี

1. **สารเคมีที่ใช้ในการปลูกข้าว**
   - สารเคมีสำหรับสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP no.2 (Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1991) (ภาคผนวก ก)
   - NaCl (Merck, Germany)

2. **สารเคมีที่ใช้ในการสกัด RNA**
   - RNA Extraction Buffer (ภาคผนวก ก)
   - Phenol:Chloroform (1:1) (V/V) (ภาคผนวก ก)
   - Ethyl alcohol
   - 10 M LiCl
   - TE Buffer (ภาคผนวก ก)
   - Agarose (USB, USA)
   - 5X TBE (Tris Borate EDTA) (ภาคผนวก ก)
   - RNA loading dye for agarose gel (ภาคผนวก ก)
   - 10 mg/ml Ethidium bromide

3. **สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี differential display**
   - RNase free DNase I (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)
   - Superscript^{TM} III Reverse Transcriptase (Invitrogen, California, USA)
   - *Taq* DNA polymerase (Qiagen, California, USA)
   - DNA marker (100 bp DNA Ladder, New England Biolabs, Beverly, USA)
   - DNA loading dye for denaturing polyacrylamide gel (ภาคผนวก ก)
   - Agarose (USB Corporation, Ohio, USA)
   - N,N'- Methylene- bis- acrylamide (Bio-Rad, Beverly, USA)
   - Acrylamide-PAGE (Plus one, Uppsala, Sweden)
   - Urea
   - Temed
   - Ammoniumpersulfate
   - 5X TBE (Tris Borate EDTA) (ภาคผนวก ก)

- Methanol
- Nitric acid
- Sodium carbonate anhydrous
- 37% formaldehyde
- Silver nitrate

4. สารเคมีที่ใช้ในการโคลนชิ้นส่วน DNA

- *Taq* DNA polymerase (Qiagen, California, USA)
- DNA marker (100 bp DNA Ladder, New England Biolabs, Beverly, USA)
- Agarose (USB Corperation, Ohio, USA)
- DNA loading dye for agarose gel (ภาคผนวก ก)
- 10 mg/ml Ethidium bromide
- Ultra Clean™ 15 DNA Purification Kit (MOBIO Laboratories, Inc., California, USA)
- Ammonium acetate
- Magnesium acetate
- SDS
- EDTA
- LB Medium (ภาคผนวก ก)
- LB Medium Agar (ภาคผนวก ก)
- Calcium chloride
- ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (General Drugs House, Thailand)
- X-gal (Fermentas, USA)
- IPTG (Fermentas, USA)
- SOC medium (ภาคผนวก ก)
- เอนไซม์ *Pst* I (New England Biolabs, Beverly, USA)
- เอนไซม์ *Eco*RV (New England Biolabs, Beverly, USA)
- เอนไซม์ *Hind*III (New England Biolabs, Beverly, USA)
- เอนไซม์ *Eco*RI (New England Biolabs, Beverly, USA)
- T4 ligase (New England Biolabs, Beverly, USA)
- pBluescript II KS+

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- pGEM® – T Vector System I (Promega, Madison, USA)

5. **สารเคมีที่ใช้ในการสกัด plasmid DNA**
   - LB Medium (ภาคผนวก ก)
   - LB Medium Agar (ภาคผนวก ก)
   - Ampicilin
   - Solution I (ภาคผนวก ก)
   - Solution II (ภาคผนวก ก)
   - Solution III (ภาคผนวก ก)
   - Ethyl alcohol
   - TE Buffer (ภาคผนวก ก)
   - RNase (Sigma, USA)
   - Phenol:Chloroform (1:1) (V/V)(ภาคผนวก ก)
   - Sodium acetate
   - Agarose (USB Corporation, Ohio, USA)
   - 5X TBE (Tris Borate EDTA) (ภาคผนวก ก)
   - DNA marker (1 kb DNA ladder, New England Biolabs, Beverly, USA)
   - DNA loading dye for agarose gel (ภาคผนวก ก)
   - 10 mg/ml Ethidium bromide
   - Ultra Clean™ 15 DNA Purification Kit (MOBIO Laboratories, Inc., California, USA)

6. **สารเคมีที่ใช้ในการทำ northern blot analysis**
   - Agarose (USB Corporation, Ohio, USA)
   - RNA marker (RNA Ladder, New England Biolabs, Beverly, USA)
   - 10x MOPS (ภาคผนวก ก)
   - 37% formaldehyde
   - RNA loading dye for formaldehyde gel (ภาคผนวก ก)
   - 10 mg/ml Ethidium bromide
   - 20x SSC (ภาคผนวก ก)
   - Maleic acid buffer (ภาคผนวก ก)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- Washing buffer (ภาคผนวก ก)
- Detection buffer (ภาคผนวก ก)
- Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche Diagnostic GmbH, Roche Applied Science, Germany)
- สารเคมีที่ใช้ในการล้างฟิล์ม(developer and fixer) (Kodak (Australia) PTY.LYD., Australia)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการทดลอง

1. **การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค** differential display

1.1 เตรียมเนื้อเยื่อใบข้าวเพื่อใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน

1.1.1 เพาะเมล็ดข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 โดยนำเมล็ดข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์แช่น้ำ 1 คืน ก่อนนำมาเพาะบนทราย เป็นเวลา 7 วัน เพื่อย้ายปลูกต่อไป

1.1.2 เมื่อต้นกล้าอายุ 7 วันนับจากวันเพาะ คัดเลือกต้นกล้าที่มีขนาดใกล้เคียงกัน ย้ายปลูกลงในขวดแก้วที่มีสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 (Vajrabhaya and Vajrabhaya, 1991) พันธุ์/สายพันธุ์ละ 50 ขวด ขวดละ 20 ต้น เป็นเวลา 7 วัน โดยวางในโรงเรือนทดลองที่มีแสงตามธรรมชาติตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง ควบคุมระดับของสารละลายธาตุอาหาร โดยเติมน้ำให้สารละลายอยู่ในระดับเดียวกันกับตอนเริ่มต้นการทดลองทุกวัน

1.1.3 แบ่งต้นกล้าข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ออกเป็น 2 ส่วน แล้วย้ายปลูกต่อในขวดแก้วด้วยสารละลายธาตุอาหาร ดังนี้

- LPT123 ปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2
- LPT123 ปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (W/V)
- LPT 123-TC171 ปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2
- LPT 123-TC171 ปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (W/V)

1.1.4 เมื่อต้นกล้าข้าวได้รับภาวะเค็มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อใบข้าว โดยตัดใบข้าวทั้ง 4 ชุดการทดลอง นำมาชั่งน้ำหนัก ใส่ในกระดาษฟอยด์ห่อละ 0.1 กรัม จากนั้นแช่ในไนโตรเจนเหลวก่อนนำไปเก็บที่ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่าง (deep freezer) อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

1.2 สกัด total RNA จากใบข้าว ด้วยวิธี hot phenol ซึ่งปรับปรุงจากวิธี hot phenol ของ ปารวี ธิกาศ (2546) (ภาคผนวก ข)

1.3 ตรวจสอบคุณภาพของ RNA ด้วย agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel (W/V) ในสารละลาย 1X TBE และใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร จากนั้นย้อมแถบ DNA ด้วย ethidium bromide เข้มข้น 0.5 μg/ml นาน 10 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่น 10 นาที แล้วจึงนำไปตรวจสอบด้วยแสง UV และบันทึกภาพ ด้วยเครื่องกำเนิดแสง UV และถ่ายรูปเจล

1.4 วัดความเข้มข้นของกรดนิวคลีอิกที่สกัดได้ โดยวิธี spectrophotometric method (Sambrook และคณะ, 1989)

1.5 กำจัด DNA ออกจาก Total RNA ด้วยการใช้เอนไซม์ดีออกซีไรโบนิวคลีเอส I (RNase free DNase I, Japan) ตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือ ตรวจสอบคุณภาพ และคำนวณปริมาณ RNA ดังข้อ 1.3 และ1.4

1.6 สร้าง cDNA สายแรก (the first strand cDNA, 1st cDNA) ด้วยการทำ reverse transcription (RT) ตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือของเอนไซม์ reverse transcriptase (Invitrogen, USA) โดยใช้ oligo dT primer จำนวน 8 primer ที่มีลำดับเบส ดังนี้

oligo dT1: 5'-TTT-TTT-TTT-TTA-T-3'
oligo dT2: 5'-TTT-TTT-TTT-TTC-G-3'
oligo dT3: 5'-TTT-TTT-TTT-TTG-C-3'
oligo dT4: 5'-TTT-TTT-TTT-TTC-A-3'
oligo dT5: 5'-TTT-TTT-TTT-TTA-C-3'
oligo dT6: 5'-TTT-TTT-TTT-TTT-A-3'
oligo dT7: 5'-TTT-TTT-TTT-TTC-C-3'
oligo dT8: 5'-TTT-TTT-TTT-TTG-G-3'

สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา RT ในปริมาตร 20 µl ประกอบด้วย

total RNA	0.2 µg
oligo dT primer	1 µM
dNTPs	20 µM
reversetranscription buffer	1 X
DTT	10 mM
reverse transcriptase	200 Units

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.7 นำ cDNA ที่ได้จากการทำ RT ในแต่ละปฏิกิริยามาเพิ่มปริมาณด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ primer 2 ชนิด คือ oligo dT ที่ใช้ในขั้นตอนการทำ RT และ primer สุ่ม (arbitary primer) ที่ออกแบบโดยบริษัท GENSET Oligos จำนวน 20 primers สำหรับสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ในปริมาตร 20 µl ประกอบด้วย

reversetranscription products (จากข้อ 1.6)	2 µl
oligo dT primer	1 µM
arbitary primer	0.2 µM
dNTPs	20 µM
reactionbBuffer	1 X
Taq DNA polymerase	1 Unit

เริ่มทำการแยกสาย DNA ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงทำ PCR โดยใช้จำนวนรอบ 40 รอบ ซึ่งแต่ละรอบประกอบด้วยอุณหภูมิ และเวลาดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที เมื่อครบจำนวนรอบแล้วคงอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส ต่ออีก 5 นาที

1.8 ทำการ denature RT-PCR products ที่ได้ โดยผสม RT-PCR products ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เข้ากับ DNA loading dye สำหรับ denaturing polyacrylamide gel 10 ไมโครลิตร และนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นวางบนน้ำแข็งทันที

1.9 นำ denature RT-PCR products จากข้อ 1.8 มาแยกด้วย 6% denaturing DNA polyacrylamide gel electrophoresis (Sambrook และคณะ, 1989) ซึ่งมี 1X TBE เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ก) โดยใช้ชุดแยกกรดนิวคลิอิก /โปรตีน ด้วยกระแสไฟฟ้าในแนวดิ่งรุ่น Protein II xi 2-D Cell (Bio-Rad, California, USA) และใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 120 โวลต์ จากนั้นย้อมแถบ DNA ด้วยวิธี Silver Staining ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ de Moreno et al (1985) (ภาคผนวก ข) บันทึกภาพด้วยเครื่องกำเนิดแสง UV และถ่ายรูปเจล โดยใช้แสงขาว (Gel Doc™ 2000, Bio-Rad, California, USA)

2. **การโคลนชิ้นส่วน DNA ที่แตกต่างกัน**

2.1 ทำการเทียบ cDNA ที่ได้จากตัวอย่างข้าวทั้ง 4 ชุดการทดลอง และเลือกชิ้น cDNA ที่มีการแสดงออกแตกต่างกัน นำไปทำให้ได้ DNA บริสุทธิ์ด้วยวิธี crush and soak method (Sambrook และคณะ, 1989)

2.2 ทำการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วย PCR อีกครั้งหนึ่ง โดยใช้คู่ primer เดิม ที่ใช้ในขั้นตอนการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค differential display และใช้ภาวะการทำปฏิกิริยา PCR เหมือนข้อ 1.7

2.3 นำ DNA ที่ได้จากการทำ PCR มาแยกตามขนาดโดย electrophoresis เช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 1.3

2.4 ทำการสกัด DNA fragments ที่ต้องการออกจาก agarose gel โดยใช้ Ultra Clean™ 15 DNA Purification Kit (MOBIO Laboratories, Inc. USA) ตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือ

2.5 โคลนชิ้นส่วน DNA (ภาคผนวก ข) เข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia Coli* โดยใช้ pBluescript II KS+ หรือ pGEM® – T Vector System I Cloning kit (Promega) ซึ่งมี pGEM-T เป็น DNA พาหะตามวิธีการที่ระบุไว้ในคู่มือ

2.6 นำโคลนที่ได้มาทำการสกัดแยก plasmid DNA ด้วยวิธี small-scale preparation of plasmid DNA lysis by alkali (Sambrook และคณะ, 1989) และทำการตัด plasmid DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

2.7 ตรวจสอบผลการโคลนด้วยการแยก plasmid DNA ในข้อ 2.6 ด้วย electrophoresis เช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 1.3 คัดเลือกพลาสมิดที่จะใช้เพื่อการศึกษาในขั้นต่อไป และกำหนดชื่อพลาสมิด

2.8 ทำ frozen stock (ภาคผนวก ข) เพื่อเก็บรักษาโคลนที่มีพลาสมิดที่ได้สำหรับใช้ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3. **การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน DNA**

3.1 นำพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของ DNA ที่ต้องการจากข้อ 2 มาสกัดแยก plasmid DNA ด้วยวิธี small-scale preparation of plasmid DNA lysis by alkali (Sambrook และคณะ, 1989) และนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Ultra Clean™ 15 DNA Purification Kit (MOBIO Laboratories, Inc. USA)

3.2 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน DNA ที่ได้ โดยการใช้บริการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA ของหน่วยบริการทางชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรม และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

3.3 นำข้อมูลลำดับเบสมา translate ให้เป็นลำดับกรดอะมิโนใน ExPASy homepage (Gasteiger และคณะ, 2003) แล้วจึงทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ได้กับฐานข้อมูลสากล EMBL Databases โดยใช้ Blast algorithm (Altschul และคณะ, 1997)

4. **การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่โคลนได้ด้วย** northern blot analysis

4.1 นำตัวอย่างเนื้อเยื่อใบข้าวทั้ง 4 ชุดการทดลอง จากข้อ 1.1 มาสกัด total RNA ดังข้อ 1.2 ตรวจสอบคุณภาพ และคำนวณปริมาณ RNA ดังข้อ 1.3 และ 1.4 ตามลำดับ

4.2 นำ total RNA ที่มีคุณภาพดี มาวิเคราะห์การแสดงออกของยีน ด้วยวิธี northern blot analysis ตามวิธีของ Sambrook และคณะ (1989) โดยทำการแยก total RNA ปริมาณ 40 μg/ตัวอย่าง ใน formaldehyde gel electrophoresis (ภาคผนวก ก) ที่ความต่างศักย์ 4 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 150 นาที

4.3 คัดเลือกพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของ DNA ที่ได้จากข้อ 2 ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ translate ได้ กับข้อมูลในฐานข้อมูลสากลแล้วมีความคล้ายคลึงกับโปรตีนในสิ่งมีชีวิตสูงสุด 9 อันดับแรก โดยเป็นยีนที่มีความคล้ายคลึงกับโปตีนในข้าว 8 ชนิด และมีความคล้ายคลึงกับโปรตีนในแบคทีเรียอีก 1 ชนิด เพื่อมาใช้เป็น probe ในการตรวจสอบด้วย northern blot analysis

4.4 สกัดพลาสมิดที่คัดเลือกในข้อ 4.3 ด้วยวิธีดังในข้อ 2.6 และทำพลาสมิดให้บริสุทธิ์โดยใช้ Ultra Clean™ 15 DNA Purification Kit (MOBIO Laboratories, Inc. USA)

4.5 ติดฉลาก probe และตรวจสอบการแสดงออกของยีนตามวิธีการในคู่มือ Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche Diagnostic GmbH, Roche Applied Science, Germany)

4.6 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วย northern blot analysis จะทำการศึกษาโดยใช้ตัวอย่างเนื้อเยื่อพืช 2 ชุด เพื่อยืนยันผลการแสดงออก