อุปกรณ์และวิธีการ

ทำการทดลองกับช่อดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มีสทีน (*Den.* 'Miss Teen') วิลลี่ (*Den.* 'Willie') วรรณา (*Den.* 'Wanna') ลีน่า (*Den.* 'Lina') เยลโลริเวอร์ (*Den.* 'Yellow River') ปอมปาดัวร์ (*Den.* 'Pompadour') และ โซเนีย (*Den.* 'Sonia') จากบริษัทบางกอกฟลาวเวอร์เซนเตอร์ จำกัดซึ่งเป็นบริษัทส่งออกดอกกล้วยไม้ โดยช่อดอกกล้วยไม้ที่นำมาไม่ได้รับสารละลายใด ๆ (pretreatment) จากบริษัท ช่อดอกกล้วยไม้ดังกล่าวถูกบรรจุแบบแห้งลงกล่องและขนส่งโดยรถห้องเย็นจากบริษัทที่กรุงเทพฯ มายังหน่วยวิจัยพืชผลหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ภายในเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นช่อดอกกล้วยไม้จะถูกตัดก้านให้มีความยาวก้าน 12 เซนติเมตร นับจากดอกบานดอกล่าง แล้วนำแต่ก้านดอกแต่ละก้านแช่น้ำกลั่นที่บรรจุอยู่ในหลอดแก้วขนาด 15 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25± 2 องศาเซลเซียส (°ซ) และความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ตลอดระยะเวลาการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 6 ซ้ำ ๆ ละ 2 ช่อ การทดลองแบ่งเป็น 3 การทดลองดังนี้

1. <u>ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของช่อดอกกล้วยไม้สกุลหวายภายหลังได้รับเอทิลีนจากภายนอก</u>

การทดลองที่ 1.1 การศึกษาอิทธิพลของเอทิลีนจากภายนอกที่มีต่อการร่วงของดอกในช่อดอกกล้วยไม้พันธุ์ มิสทีน วิลลี่ วรรณา ลีน่า เยลโลรีฟเวอร์ ปอมปาดัวร์ และ โซเนีย

ช่อดอกกล้วยไม้แต่ละช่อได้รับการเสียบก้านดอกในหลอดน้ำพลาสติกที่มีน้ำกลั่นอยู่ 6 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งช่อดอกกล้วยไม้ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรก นำช่อดอกไปไว้ในตู้พลาสติกใสที่มีระบบป้องกันอากาศผ่านเข้าออกขนาด 37.5x47.5x35.0 เซนติเมตร และให้เอทิลีนที่ระดับความเข้มข้น 0.4 μLL^{-1} เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และส่วนกลุ่มที่สองเป็นกลุ่มที่ช่อดอกไม่ได้รับเอทิลีน จากนั้นนำช่อดอกแต่ละช่อมาแช่ก้านในหลอดแก้วที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 12 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 80%

การบันทึกผลการทดลอง

1. การร่วงของดอกตูมและดอกบาน (%) คำนวณเปอร์เซ็นต์การร่วงดังสมการ

$$\text{ดอกร่วง (\%)} = \frac{\text{จำนวนดอกตูมหรือดอกบานที่ร่วงในแต่ละวัน x 100}}{\text{จำนวนดอกตูมหรือดอกบานทั้งหมด}}$$

2. ระยะเวลาที่ดอกร่วง (วัน) โดยทำการบันทึกการร่วงของดอกทุกวันเป็นระยะเวลา 15 วัน

การทดลองที่ 1.2 การศึกษาอิทธิพลของสาร 1-MCP จากภายนอกที่มีต่อการร่วงของดอกกล้วยไม้ภายในช่อ

ใช้ช่อดอกกล้วยไม้พันธุ์ที่มีการร่วงของดอกตูมมากที่สุด หรือน้อยสุดหลังการให้เอทิลีนจากการทดลองที่ 1.1 นำช่อดอกมาเสียบก้านช่อดอกในหลอดพลาสติกที่มีน้ำกลั่นแล้วนำไปวางไว้ในตู้พลาสติกเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.1 ให้สาร 1-MCP (EthylBloc®, Rohm and Haas Inc, USA) ที่ระดับความเข้มข้น 0 หรือ 500 nL L^{-1} เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง (นริสา, 2546) ที่ระดับอุณหภูมิ 25$\pm$2 $^{\circ}$ซ หลังจากนั้นนำช่อดอกกล้วยไม้ให้ได้รับเอทีลีนและไม่ให้ได้รับเอทิลีนที่ระดับความเข้มข้น 0.4 μL L^{-1} ในตู้พลาสติกเช่นเดียวกับการให้สาร 1-MCP เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยการทดลองประกอบด้วยทรีทเมนต์ดังนี้

ทรีทเมนต์ที่ 1 ช่อดอกกล้วยไม้ที่ไม่ผ่านการให้ 1-MCP และเอทิลีน

ทรีทเมนต์ที่ 2 ช่อดอกกล้วยไม้ที่ผ่านการให้ 1-MCP

ทรีทเมนต์ที่ 3 ช่อดอกกล้วยไม้ที่ผ่านการให้ 1-MCP และเอทิลีน

ทรีทเมนต์ที่ 4 ช่อดอกกล้วยไม้ที่ผ่านการให้เอทิลีน

การบันทึกผลการทดลอง

1. การร่วงของดอกตูมและดอกบาน (%) คำนวณเปอร์เซ็นต์การร่วงดังสมการ

$$\text{ดอกร่วง (\%)} = \frac{\text{จำนวนดอกตูมหรือดอกบานที่ร่วงในแต่ละวัน x 100}}{\text{จำนวนดอกตูมหรือดอกบานทั้งหมด}}$$

ภาพที่ 2 ช่อดอกกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์มิสทีน (A) วิลลี่ (B) เยลโลริเวอร์ (C) ปอมปาดัวร์ (D) โซเนีย (E) วรรณา (F) และ ลีน่า (G)

2. ระยะเวลาที่ดอกร่วง (วัน) โดยทำการบันทึกการร่วงของดอกทุกวันเป็นระยะเวลา 15 วัน

3. การเปลี่ยนแปลงอื่น ๆ ที่สังเกตได้ เช่น ดอกเหลือง ดอกฉ่ำน้ำ

4. กิจกรรมของ cell wall hydrolase ที่ตรวจด้วย Tissue Print assay

การทำ Tissue print โดยดัดแปลงจากวิธีของ รัมม์พัน (2545) Downie *et al.* (1998) และ Koslanund *et al*. (2005) ประกอบด้วยสารดังนี้

1. agarose gel (1%)

2. EDTA (1mM)

3. sodium acetate buffer (100 mM) pH 5

4. สารตั้งต้น (substrate) (0.1%)

- เอนไซม์ PG ใช้สารตั้งต้นคือ pectin from citrus fruit

- เอนไซม์ PME ใช้สารตั้งต้น 98% deesterified pectin

- เอนไซม์ β- 1,4 glucanase ใช้สารตั้งต้น carboxy methyl cellulose (CMC)

ผสมสารตั้งแต่ข้อ 1-4 ลงในขวดรูปชมพู่ โดยแยกเตรียมตามชนิดของสารตั้งต้น แล้วนำสารผสมดังกล่าวไปต้มด้วยเตาอบไมโครเวฟ ให้ความร้อนจนผงอะกาโรสละลายหมด แล้วเทสารละลายขณะอุ่น ๆ ประมาณ 20 มิลลิลิตรลงในจานเลี้ยงเชื้อ (petridish) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร รอให้เจลเย็นและจับตัวแข็งเป็นก้อนที่อุณหภูมิห้อง เจาะเจลให้เป็นหลุมด้วย cork borer เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร (จำนวนหลุมขึ้นกับจำนวนทรีทเมนต์ ภาพที่ 6) แล้ววางเนื้อเยื่อ AZ ของดอกตูมหรือดอกบานกล้วยไม้แต่ละพันธุ์ลงในหลุม ปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มในตู้บ่มที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ภายในตู้บ่มประมาณ 70±1% เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา 18 ชั่วโมง คีบเนื้อเยื่อ AZ ของดอกที่วางในหลุมออกทั้งหมด แล้วเทน้ำกลั่นล้างผิว

หน้าเจล 1-2 ครั้ง เทน้ำทิ้งให้หมด จากนั้นย้อมสีเจลด้วยสารละลายสีย้อมให้ท่วมผิวหน้าเจล (สีย้อม ruthenium red เข้มข้น 0.05% สำหรับการทดสอบเอนไซม์ PG และ PME หรือ สีย้อม congo red เข้มข้น 0.1% สำหรับทดสอบเอนไซม์ β- 1,4-glucanase) เป็นเวลาประมาณ 2-4 ชั่วโมง เจลที่ผ่านการย้อมสีด้วย ruthenium red จะเป็นสีชมพูแดง ส่วนเจลที่ผ่านการย้อมสีด้วย congo red จะเป็นสีน้ำตาลแดง จากนั้นเทสารละลายสีย้อมออกและล้างด้วยน้ำกลั่นสำหรับสำหรับเอนไซม์ PG และ PME พร้อมทั้งเทน้ำกลั่นปิดผิวหน้าเจลไว้ตลอดเวลาเพื่อป้องกันผิวหน้าเจลแห้ง ส่วนจานเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบเอนไซม์ β- 1,4-glucanase ให้ล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมล่าห์ (0.1 M NaCl) พร้อมทั้งเทสารละลายดังกล่าวปิดผิวหน้าเจลไว้ การตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์ PG และ β- 1,4-glucanase สังเกตจากวงสีขาวใส (clear zone) สำหรับกิจกรรมเอนไซม์ PME ตรวจวัดได้จากวงสีชมพู และเปรียบเทียบ (control) กับหลุมที่หยอดเฉพาะบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตทความเข้มข้น 100 mM pH 5 (100 mM sodium acetate buffer pH 5) ทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์เป็นระยะเวลา 6 วัน โดยเริ่มจากวันที่เริ่มทำการทดลองเป็นต้นไป

2. <u>ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์กลุ่ม cell wall hydrolase ที่เนื้อเยื่อ AZ ของดอกตูมและดอกบานของช่อดอกกล้วยไม้ที่มีการตอบสนองต่อเอทิลีนต่างกัน</u>

ใช้พันธุ์และจัดทรีทเมนต์ของช่อดอกกล้วยไม้เช่นเดียวกับการทดลองย่อยที่ 1.2 ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อบริเวณรอยต่อระหว่างก้านดอกย่อยและก้านช่อดอก (AZ) เป็นระยะ 6 วัน เริ่มจากวันแรกก่อนการให้ทรีทเมนต์ จนถึงวันที่ดอกร่วง โดยตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนาประมาณ 5 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปทำให้เย็นจัดด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วเก็บรักษาเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิ –80 °ซ ทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ได้แก่

2.1 กิจกรรมเอนไซม์ β- 1,4 glucanase โดยดัดแปลงวิธีการสกัดของ Awad and Young (1979) และวิธีวัดกิจกรรมของ Mandels and Sternberg (1976)

นำเนื้อเยื่อ AZ ปริมาณ 1 กรัม ใส่ลงในหลอดพลาสติก (falcon tube) เติมสารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 ที่เย็นจัด (40 mM sodium-acetate pH 5.5) ปริมาณ 8 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.2 M (0.2 M NaCl) ปริมาณ 2 มิลลิลิตร ปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่อง homogenizer (Polytron PT 2100, Kinematica AG, Switserland, 1.7 mm diamerter head) ขณะปั่นแช่หลอดตัวอย่างในน้ำแข็ง นำหลอดที่มีสารละลายไปวางไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ

นาน 15 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge; Jouan MR 23i) ที่อุณหภูมิ 4 °ซ ความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 20 นาที ส่วนใสที่ได้คือสารสกัดเอนไซม์ที่นำไปวัดกิจกรรม

นำสารสกัดเอนไซม์ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง (test tube) เติมสารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 4.8 (0.05 mM sodium-acetate pH 4.8) ที่เย็นจัดปริมาณ 1 มิลลิลิตร และใส่กระดาษ Whatman #1 ขนาด 0.5 x 3 เซนติเมตร (substrate) ผสมสารและทำให้กระดาษอยู่ก้นหลอดด้วยเครื่องเขย่า (vortex mixer) นำหลอดทดลองไปวางในอ่างน้ำ (water bath) ที่ปรับอุณหภูมิ 50 °ซ นาน 1 ชั่วโมง แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลายไดไนโตซาลิซิลิกความเข้มข้น 1% (1% DNS) จำนวน 3 มิลลิลิตร (1% DNS จำนวน 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วยสาร 3,5 dinitrosalicylic acid (DNS) 1 กรัม ฟีนอล (phenol) 0.2 กรัม โซเดียมซัลไฟล์ (sodium sulphide) 0.05 กรัม โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เตท (potassium sodium tartate) จำนวน 20 กรัม นำสารทั้งหมดละลายในโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 % จำนวน 50 มิลลิลิตร) ลงในหลอดที่มีสารละลายผสมอยู่ แล้วนำหลอดไปวางในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิที่มีอุณหภูมิของน้ำ 100 °ซ นาน 5 นาที นำหลอดขึ้นมาวางให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมน้ำกลั่น 16 มิลลิลิตรลงในหลอด แล้วเขย่าสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer นำสารละลายที่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร (nm) ด้วยเครื่อง spcetrophotometer (Genesys^{TM}) นำค่าที่ได้มาเทียบกับค่ามาตราฐานที่ได้จากการใช้กลูโคสเป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้น

2.2 กิจกรรมเอนไซม์ polygalacturonase (PG) โดยดัดแปลงวิธีการสกัดของ Abu-Goukh and Bashir (2003) และวิธีวัดกิจกรรมของ Yoshida *et al.* (1984)

นำเนื้อเยื่อ AZ ที่แช่แข็งปริมาณ 4 กรัม ใส่ลงในหลอดพลาสติก (falcon tube) เติมสารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6.6 (100 mM sodium-acetate pH 6.6) ที่เย็นจัดปริมาณ 10 มิลลิลิตร และ 1% PVP แล้วปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่อง homogenizer นาน 2 นาที ขณะปั่นตัวอย่างควรแช่หลอดตัวอย่างในน้ำแข็ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °ซ ความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนที่ได้ไปเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 6 % ในสารละลายโซเดียมอะซิเตทบัพเฟอร์ pH 6 (6% NaCl in 1 M sodium-acetate pH 6.0) ที่เย็นจัดจำนวน 10 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ของสารละลายให้ได้ pH 8.2 ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (2 N NaOH) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °ซ ความเร็วรอบ 12,000 rpm

นาน 20 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปผ่านการไดอะไลซิส (dialysis) ด้วยถุงไดอะไลซิส ในน้ำกลั่น นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °ซ ส่วนใสที่ได้นำไปวิเคราะห์กิจกรรม

นำส่วนใสที่สกัดได้จำนวน 125 ไมโครลิตร เติมในหลอดแก้วที่มีส่วนผสมของสารละลายกรดโพลีกาแลคทูโรนิก (polygalacturonic) ความเข้มข้น 0.5% ซึ่งเป็นสารตั้งต้น (0.5% polygalacturonic acid (substrate)) จำนวน 125 ไมโครลิตร สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.4 M (0.4 M NaCl) จำนวน 125 ไมโครลิตร และสารละลายโซเดียมอะซิเตท pH 4.5 ความเข้มข้น 0.4 M (0.4 M sodium-acetate pH 4.5) จำนวน 125 ไมโครลิตร เขย่าสารทุกชนิดให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer แล้วนำหลอดไปวางไว้ที่อ่างน้ำ (water bath) ที่อุณหภูมิ 35 °ซ นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายโพแทสเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 30% (30% K_2CO_3 ใน 5% $Na_2S_2O_3$) จำนวน 250 ไมโครลิตร และสารละลาย dinitrophtahlic acid monopyridium salt ความเข้มข้น 0.3% (0.3% 3,6, dinitrophtahlic acid monopyridium salt) จำนวน 250 ไมโครลิตร เขย่าสารทุกชนิดให้เข้ากันอีกครั้งด้วยเครื่อง vortex mixer นำหลอดสารละลายไปวางไว้ที่อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่มีอุณหภูมิของน้ำ 100 °ซ นาน 10 นาที นำหลอดสารละลายดังกล่าววางไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectophotometer เทียบกับ blank ซึ่งใช้สารละลายบัฟเฟอร์แทนสารละลายเอนไซม์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ PG โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐาน D-galacturonic acid ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0-250 นาโนโมล (ηmole) ซึ่งผ่านปฏิกิริยาเคมีด้วยวิธีเดียวกัน

2.3 กิจกรรมเอนไซม์ pectin methylesterase (PME) โดยดัดแปลงวิธีการสกัดของ Abu-Goukh and Bashir (2003) และวิธีวัดกิจกรรมของ Hagerman and Austin (1986)

นำเนื้อเยื่อบริเวณ AZ ที่แช่แข็งปริมาณ 4 กรัม ใส่ในหลอดพลาสติก เติมสารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6.6 (100 mM sodium-acetate pH 6.6) ที่เย็นจัดปริมาณ 10 มิลลิลิตร และ PVP 1% แล้วปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่อง homogenizer นาน 2 นาที ขณะปั่นควรแช่ตัวอย่างในน้ำแข็ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °ซ ความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 6 (6% NaCl ใน 1 M sodium-acetate pH 6.0) ที่เย็นจัดปริมาณ 10 มิลลิลิตรลงในตะกอน จากนั้นปรับ pH ให้ได้ 8.2 ด้วยสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ (2 N NaOH) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °ซ ความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 20 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปผ่านการไดอะไลซิส (dialysis) ด้วยถุง

ไดอะไลซิส ในน้ำกลั่น นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °ซ สารละลายที่ได้นำไปปรับ pH ให้ได้ pH 7.5 ด้วย 2 N NaOH แล้วจึงนำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรม

นำส่วนใสที่ผ่านการปรับ pH แล้ว จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด cuvette เติมสารละลายเพกทินความเข้มข้น 0.5% ซึ่งเป็นสารตั้งต้น (substrate) (0.5% pectin) จำนวน 2 มิลลิลิตร สารละลาย bromthymol blue ความเข้มข้น 0.01% (0.01% bromthymol blue) จำนวน 0.2 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น pH 7.5 จำนวน 0.7 มิลลิลิตร ผสมสารให้เข้ากันด้วยการเขย่ามือ จับเวลานาน 1 นาที นำสารผสมดังกล่าวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectophotometer เทียบกับ blank ซึ่งใช้น้ำกลั่นที่ pH 7.5 แทนเอนไซม์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ PME โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารตั้งต้น acetic acid ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0-0.8 ไมโครโมล (μmole) ซึ่งผ่านปฏิกิริยาเคมีด้วยวิธีเดียวกัน

2.4 ปริมาณโปรตีน (Protein content) ตามวิธีของ Bradford (1976)

ส่วนใสที่สกัดได้จากทุกเอนไซม์ นำมาวัดค่าปริมาณโปรตีน นำสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดเอนไซม์จำนวน 0.5 มิลลิลิตร แล้วเติมสาร Coomassie Brilliant Blue G-250 ความเข้มข้น 0.0125 % (ประกอบด้วยสาร Coomassie Brilliant Blue จำนวน 100 mg และสาร phosphoric acid 85% จำนวน 100 มิลลิลิตร ละลายสารทั้งสองในแอลกอฮอล์ 95% จำนวน 900 มิลลิลิตร) ปริมาณ 4 มิลลิลิตร เขย่าสารให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer วางทิ้งไว้นาน 15-60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าที่วัดได้มาคำนวณปริมาณโปรตีนเทียบกับกราฟมาตราฐานของสารตั้งต้น bovine serum albumin (BSA) ที่มีความเข้มข้น 0-1,000 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (mg/ml)

3. <u>ศึกษาการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการร่วง</u>

3.1 การเตรียมตัวอย่างโดย ใช้พันธุ์กล้วยไม้และการจัดทรีทเมนต์เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1.2 หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ AZ ของดอกไม้ตามทรีทเมนต์ต่าง ๆ ตั้งแต่วันก่อนเริ่มจัดทรีทเมนต์จนถึงวันที่ดอกร่วง

3.2 การสกัด RNA (total RNA extraction**)** โดยการดัดแปลงวิธีของ Chang *et al*. (1993)

นำเนื้อเยื่อ AZ ปริมาณ 1 กรัมบดในไนโตรเจนเหลว โดยใช้โกร่งบดจนตัวอย่างละเอียดเป็นผงแป้ง ขณะบดเติมไนโตรเจนเหลวตลอดเวลาเพื่อไม่ให้ตัวอย่างละลาย แล้วเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็ง (freezer) ที่อุณหภูมิ –20 °ซ จากนั้นนำหลอดพลาสติกใสขนาด 50 mL ชนิดปราศจาก RNA และ DNA (50 mL centrifuge tube Rnase-/Dnase free) ใส่สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดจำนวน 15 มิลลิลิตร (บัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดประกอบด้วย 2% CTAB (hexadecyltrimethyl-ammonium bromide) 2% PVP (polyvinylpyrrol-idone) 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) 25 mM EDTA (pH 8.0) 2.0 M NaCl) และสาร mercaptoethanol ความเข้มข้น 2% (2% mercaptoethanol) จำนวน 300 ไมโครลิตร และสาร spermidine ความเข้มข้น 0.5 กรัม/ลิตร (0.5 g/L spermidine) จำนวน 7.5 ไมโครลิตร เขย่าสารทั้งหมดให้เข้ากัน ปิดฝาหลอดนำไปวางใน water bath ที่อุณหภูมิ 65 °ซ เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำตัวอย่างที่บดละเอียดจากตู้แช่แข็งมาใส่ในหลอดที่มีบัฟเฟอร์อยู่ ผสมให้ตัวอย่างละลายด้วยเครื่อง vortex mixer เติมสารละลาย chloroform : isoamyl alcohol (24:1 v/v) จำนวน 15 มิลลิลิตร เขย่าสารผสมในหลอดอย่างแรงด้วยเครื่อง votex mixer นาน 10 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,500 rpm นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ ปิเปตส่วนใสทั้งหมดใส่หลอดพลาสติกใหม่ เติมสารละลาย chloroform : isoamyl alcohol (24:1 v/v) จำนวน 15 มิลลิลิตร เขย่าสารผสมในหลอดอย่างแรงด้วยเครื่อง votex mixer นาน 5 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,500 rpm นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ ปิเปตส่วนใสใส่หลอดใหม่เติมสารละลาย chloroform : isoamyl alcohol (24:1 v/v) จำนวน 15 มิลลิลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเท่าเดิมอีกครั้ง จากนั้นทำการตกตะกอน RNA โดยปิเปตส่วนใสใส่หลอดทดลอง (centrifuge tube) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วเติมสารลิเทียมคลอไรด์ความเข้มข้น 8 M (8 M LiCl) จำนวน 1/3 มิลลิลิตร ของส่วนใสที่ได้ แล้วนำไปวางไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เทส่วนใสทิ้ง คว่ำหลอดให้ตะกอนแห้ง แล้วเติมสาร SSTE ที่ผ่านการอุ่นในน้ำอุ่น 65 °ซ นาน 10 นาที จำนวน 0.5 มิลลิลิตร (สาร SSTE ประกอบด้วย 1.0 M NaCl 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 1 mM EDTA pH 8.0 และ 0.5% SDS ละลายสารทั้งหมดในน้ำ diethylpyrocarbonate (DEPC)) เพื่อละลายตะกอน นำสารละลายตะกอนที่ได้ใส่ในหลอด eppendrof ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมสารให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer แล้วเติมสารละลาย chloroform : isoamyl alcohol (24:1 v/v) จำนวน 0.5 มิลลิลิตร เขย่าสารผสมให้เข้ากันดี จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ปิเปตส่วนใสด้านบนลงหลอด eppendrof ใหม่ แล้วเติมสาร absolute ethanol ที่เย็นจัดจำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมสารให้เข้ากันโดยการคว่ำหลอดไปมา นำหลอดวางไว้ที่อุณหภูมิ –70 °ซ เป็นเวลา 30 นาที แล้วหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ ล้าง

ตะกอนอีกครั้งด้วย Ethanol ความเข้มข้น 70% จำนวน 0.5 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เทส่วนใสทิ้ง ทำตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนด้วยน้ำ DEPC จำนวน 50 ไมโครลิตร

3.3 การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณอาร์เอ็นเอ

3.3.1 หาความเข้มข้นสารละลายอาร์เอ็นเอโดยใช้ UV spectrophotometer

เจือจางสารละลาย RNA 50 เท่า โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายอัตราส่วนดังนี้ RNA จำนวน 2 ไมโครลิตร ต่อน้ำกลั่น 98 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 240 260 และ280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectophotometer โดยมีน้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ (blank) คำนวณหาความเข้มข้นของสารละลาย RNA จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ } (\mu g/\mu l) = \frac{A260 \times \text{dilution factor} \times 40}{1{,}000}$$

เมื่อ A260 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการวัด spectophotometer

Dilution factor = 50

40 μg/ml คือ ค่าคงที่ของปริมาณ RNA เมื่อวัด absorbance ของ RNA ที่ 260 nm ได้เท่ากับ 1

และความบริสุทธิ์ของ RNA พิจารณาจากสัดส่วนของค่า A260/A280 โดยสารละลาย RNA บริสุทธิ์จะมีค่าอัตราส่วนระหว่าง A260/A280 ประมาณ 1.8-2.0

3.3.2 การตรวจสอบคุณภาพของ RNA โดยวิธีอิเล็คโทรโฟริซิส (electrophoresis) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. หลอมวุ้น agarose (agarose gel) 0.8 กรัมในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5x TBE (0.045M Tris-borate 0.001M EDTA) จำนวน 100 มิลลิลิตร ในไมโครเวฟจนละลาย รอให้สารละลายวุ้นอุ่น แล้วจึงหล่อวุ้นในถาดเจล (แบบพิมพ์) ใส่หวี (comb) เพื่อทำช่องใส่ตัวอย่าง (well) ปล่อย

ให้แข็ง ยก comb ออกจากแผ่นเจล และยกแผ่นเจลพร้อมถาดใส่ในกล่องเจล ซึ่งอยู่ในเครื่องอิเลคโทรโฟริซิส เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5x TBE ให้ท่วมแผ่นเจล

2. เตรียมตัวอย่าง RNA สำหรับทำอิเลคโทรโฟริซิส โดยใช้ RNA 2 ไมโครลิตร ผสมกับ 2x loading dye (2x loading buffer, 0.25% bromphenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 40%w/v sucrose) จำนวน 2 ไมโครลิตร ใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้นลงเพื่อให้ RNA และสีผสมกันอย่างดี

3. ใช้ไมโครปิเปตดูดตัวอย่าง RNA จากข้อ 2 ทีละตัวอย่าง ค่อย ๆ หยอดลงในช่องใส่ตัวอย่างของแผ่นเจล โดยมีสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน 1kb marker เป็นตัวเปรียบเทียบ

4. ประกอบเครื่องอิเลคโทรโพริซิสเข้ากับกระแสไฟฟ้า ให้ตัวอย่างวิ่งจากขั้วลบไปบวก ใช้กระแส 100 โวลต์ นาน 25 นาที หรือดูจากสีที่ผสมใน RNA (loading dye) เคลื่อนที่ไปประมาณ 2 ใน 3 ของขนาดความยาวแผ่นเจล

5. เมื่อครบเวลา 25 นาที ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide; EtBr) เพื่อดูการเรืองแสงของ RNA โดยนำเจลไปแช่ในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นานประมาณ 5-15 นาที จากนั้นนำเจลแช่ในน้ำสะอาดเพื่อล้างเอธิเดียมโบรไมด์ส่วนเกินออก

6. ตรวจสอบการเรืองแสง RNA ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง uv transilluminator และถ่ายภาพเก็บไว้

คุณภาพของ RNA ที่ดี ควรจะปรากฏแถบสว่าง (band) 2 แถบ ซึ่งแถบบนจะมีขนาดใหญ่กว่าแถบล่าง และทั้งสองแถบนี้จะปรากฏอยู่ระดับระนาบเดียวกับชิ้น DNA มาตรฐาน (1 kb marker) ประมาณที่ 2,500 bp และ 1,500 bp เมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานตามลำดับ

3.4. RT-PCR β- 1,4 glucanase (*Cel*) และ PG (*PG*) gene ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

3.4.1 การสังเคราะห์ cDNA จาก RNA (cDNA synthesis)

การสังเคราะห์ cDNA สายแรก เริ่มต้นจาก การนำเนื้อเยื่อ AZ ของดอกตูมที่เริ่มแสดงอาการดอกเหลือง (3 วันหลังจากได้รับเอทิลีน) มาสกัด total RNA นำ total RNA ปริมาณ 1-5 ไมโครกรัม มาสังเคราะห์ cDNA โดยใช้สารละลายจากชุด kit ชื่อ RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas) cDNA ที่ได้นี้ใช้เป็นสายต้นแบบ (template) ในการสร้างยีนเป้าหมายโดยผ่านกระบวนการ PCR

3.4.2 การออกแบบไพร์เมอร์แบบไม่เฉพาะเจาะจง (degenerate primer) ประกอบด้วย

1. การออกแบบไพร์เมอร์ *PG* gene

ไพรเมอร์ของยีน PG ชนิดไม่จำเพาะ (degernerate primer) ถูกออกแบบให้ครอบคลุมส่วนบริเวณอนุรักษ์ของยีน PG ที่ได้รายงานไว้ใน GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการร่วงของพืชชนิดต่าง ๆ ได้แก่ มะเขือเทศ (*Lycopersion esculentum; TAPG1* accession number AF001000, *TAPG2* accession number U70480, และ AF001001, *TAPG3* accession number AF000999, *TAPG4* accession number U70481 และ AF001002, *TAPG5* accession number AF001003 accession number U23053), *Arabidopsis thaliana* (accession number AJ002532, AJ005584, X72292, X73222), *Brassica napus* (accession number AJ250918, AJ250919, L19879, Z49971), กีวีฟรุต (*Actinidia chinensis* accession number AF152758), ข้าวโพด (*Zea mays* accession number X62384, X66692), กล้วย (*Masa accuminata* accession number AY603339, AY603340) มีลำดับเบสเส้น upstream (forward) ดังนี้ 5'-GGACGMARAKGAAATGG AGG-3' และเส้น downstream (reverse) ดังนี้ 5'-GCTDATKCCRTGDCCNGGGC-3'

2 การออกแบบไพร์เมอร์ β- 1,4 glucanase (*Cel*) gene

ไพรเมอร์แบบไม่เฉพาะ (degernerate primer) ของยีน *Cel* ถูกออกแบบให้ครอบคลุมส่วนบริเวณอนุรักษ์ (conserve regioun) ของยีน *Cel* ที่ได้รายงานไว้ใน GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) ที่เกี่ยวข้องกับการร่วงของพืชชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ข้าว *Oryza sativa* (accession number XM_479767) สรตอเบอรี่ (*Fragaria ananassa* ;*Cel* 2 accession number AF054615), มะเขือเทศ (*Lycopersion esculentum; Cel* 5 accession number AF077339), ส้ม (*Citrus sinensis*; accession number AF000135), พริก (*Capsicum annuum*; accession number X97188) และ *Phaseolus vulgaris* (accession number M57400) โดยใช้โปรแกรม Multiple Sequence

Alignment-CLUSTALW มีลำดับเบสเส้น upstream (forward) ดังนี้ 5'-TAYTAYGAYGCNGGNG AYAA-3' และเส้น downstream (reverse) ดังนี้ 5'-AANCCNACCATRTANCWCAT-3' (กาญจนา, 2550)

3.4.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนเป้าหมาย ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

1. การทำพีซีอาร์ (PCR reaction)

ใช้ไพรเมอร์ชนิดไม่จำเพาะที่ออกแบบมาของแต่ละยีนจำนวน 1 คู่ ใส่ลงในหลอดพีซีอาร์ (PCR tube) ที่มีสารละลายที่ใช้ทำ PCR (Qiagen, Vanlencia, California) ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยสารละลายดังต่อไปนี้ 10x buffer 2.5 ไมโครลิตร 25 mM $MgCl_2$ 2.5 ไมโครลิตร 10 mMdNTPmix 0.5 ไมโครลิตร 10 μM primerForword 2.5 0.125 ไมโครลิตร cDNA (template) 1 ไมโครลิตร นำหลอดพีซีอาร์ (microcentrifuge tube) ที่มีสารผสมใส่เครื่อง PCR (DNAEngine® pelter thermal cycler (Bio-rad)) โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาสำหรับทำปฏิกิริยาของ β- 1,4 glucanase (*Cel*) gene ดังนี้

ช่วงที่ 1 ใช้อุณหภูมิ 94 °ซ นาน 3 นาที

ช่วงที่ 2 ใช้อุณหภูมิ 94 °ซ นาน 30 วินาที
อุณหภูมิ 55 °ซ นาน 1 นาที
อุณหภูมิ 72 °ซ นาน 1 นาที
ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ

ช่วงที่ 3 ใช้อุณหภูมิ 72 °ซ นาน 5 นาที

สำหรับ *PG* gene ตั้งอุณหภูมิและเวลาสำหรับทำปฏิกิริยาดังนี้

ช่วงที่ 1 ใช้อุณหภูมิ 94 °ซ นาน 3 นาที

ช่วงที่ 2 ใช้อุณหภูมิ 94°ซ นาน 30 วินาที

อุณหภูมิ 53°ซ นาน 45 วินาที
อุณหภูมิ 72°ซ นาน 45 วินาที
ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ

ช่วงที่ 3 ใช้อุณหภูมิ 72°ซ นาน 5 นาที

2. การตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากการทำพีซีอาร์ (PCR product)

นำผลผลิตที่ได้ไปตรวจสอบโดยวิธีอิเลคโทรโฟริซิสตามขั้นตอนการทดลองที่ 3.3.2 โดยชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จะถูกแยกขนาดในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8% ซึ่งชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ต้องมีขนาดจำนวนเบสใกล้เคียงกับที่ได้ทำการออกแบบไพร์เมอร์ไว้

3.4.4 การโคลนชิ้นส่วนของยีน (cloning) ดัดแปลงจากวิธีของ Sambrook *et al*., (1989) ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

1. การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับพลาสมิด (ligation reaction)

การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับพลาสมิด ใช้พลาสมิด pGEM®-T Easy Vector systems (Promega, USA) โดยนำผลผลิตยีนที่ได้จากข้อ 3.4.3 แต่ละยีนมาจำนวน 3 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด eppendrof ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีสาร 2x rapid ligation buffer จำนวน 5 ไมโครลิตร pGEM-T Easy Vector (50 นาโนกรัม)จำนวน 1 ไมโครลิตร และ T4 DNA ligase จำนวน 1 ไมโครลิตร นำหลอด eppendrof ที่มีสารผสมวางไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ นาน 18-24 ชั่วโมง

2 การนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ (competent cell) (Transformation)

นำสารละลายเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5∝ ระยะ log phase ที่เป็น competent cells (เซลล์ที่สามารถรับและนำดีเอ็นเอเข้าเซลล์ได้) ที่ผ่านการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 °ซ จำนวน 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด eppendrof ขนาด 1.5 มิลลิลิตร มาวางไว้ให้ละลายบนน้ำแข็งที่อุณหภูมิห้อง (25 °ซ) นาน 20 นาที แล้วเติมดีเอ็นเอสายผสมที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 (ligation) ทั้งหมด

ลงในหลอด วางหลอดดังกล่าวในน้ำแข็ง นาน 30 นาที ครบเวลานำหลอดสารผสมดังกล่าวไปจุ่มในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 42 °ซ นาน 1 นาที เมื่อครบตามเวลา นำหลอดดังกล่าววางบนน้ำแข็งทันที 5 นาที จากนั้นเติมอาหารเหลวสูตร SOC (ภาคผนวก) จำนวน 800 ไมโครลิตร นำไปเขย่าในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) ที่ความเร็วรอบ 100 rpm อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลานำหลอดสารผสมไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาที ปิเปตส่วนใสด้านบนออก 600 ไมโครลิตร แล้วละลายส่วนใสที่เหลือและตะกอนของเซลล์ให้เข้ากัน ปิเปตสารละลายตะกอนจำนวน 100 ไมโครลิตรนำไปเกลี่ย (spread) บนอาหารแข็งสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้น 0.5% ผสมอยู่ (0.5% of 500 mg ampicillin sodium; T.P. Drug Laboratories CO., LTD) (ภาคผนวก) และอาหารแข็งดังกล่าวผ่านการเคลือบผิวหน้าด้วยสาร IPTG และ X-Gal ความเข้มข้น 20 ng/ml นำจานอาหารวางไว้ที่ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ 37 °ซ นาน 18 ชั่วโมง

3. การคัดเลือกโคลนที่ได้รับชิ้น DNA

คัดเลือกโคโลนีสีขาวที่ได้จากขั้นตอน 3.4.4 ข้อที่ 2 โดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ (autoclave) จิ้มโคโลนีสีขาวไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (amplicillin) ความเข้มข้น 0.5% (ภาคผนวก) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรที่อยู่หลอดทดลอง eppendrof นำไปหลอดสารผสมวางในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) ที่ 37 °ซ นาน 18-24 ชั่วโมง นำหลอดอาหารเหลวที่มีเชื้อแบคทีเรียมาสกัดแยกพลาสมิดออกจากชิ้นดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสารละลาย QIA prep Miniprep kit (QIAGEN) โดยขั้นแรกนำหลอดไปปั่นเหวี่ยงในเครื่อง microcentrifuge ที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติมสาร P1 บัฟเฟอร์ จำนวน 25 ไมโครลิตร เขย่าจนตะกอนละลาย เติมสาร lysis buffer จำนวน จำนวน 25 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากัน เติมสาร neutral buffer จำนวน 25 ไมโครลิตร ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 นาน 10 นาที ดูดส่วนใสทั้งหมดประมาณ 75 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด eppendrof ใหม่ แล้วเติมสาร isopropanol ที่เย็นจัดปริมาตรเท่ากับส่วนใส (75 ไมโครลิตร) ผสมสารให้เข้ากัน ทำการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วยการเติม ethanol ความเข้มข้น 70% ที่เย็นจัด จำนวน 1 มิลลิลิตร ทำการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ตากตะกอนให้แห้ง แล้วเติมน้ำ DEPC (DEPC-treated water) จำนวน 20 ไมโครลิตร

4. การตรวจสอบขนาดชิ้น DNA

นำสารละลาย DNA ที่ได้จากขั้นตอน 3.4.4 ข้อ 3 จำนวน 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง eppendrof ที่มีชุดสารละลายเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI (Fermentas kit) ดังนี้ 10x buffer EcoRI with BSA จำนวน 2 ไมโครลิตร เอนไซม์ EcoRI จำนวน 1 ไมโครลิตร น้ำ DEPC จำนวน 12 ไมโครลิตร นำหลอดสารผสมดังกล่าววางไว้ที่ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (incubator) อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 3-24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบขนาดชิ้น DNA โดยวิธีอิเลคโทรโฟริซิส โดยใช้สารละลาย DNA จำนวน 5 ไมโครลิตรผสมกับ 2x loading dye จำนวน 5 ไมโครลิตร แล้วทำตามขั้นตอนการทดลองที่ 3.3.2 โดยชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จะถูกแยกขนาดในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8% ซึ่งจะปรากฏจำนวนชิ้น DNA 2 แถบ แถบบนสุดจะเป็นชิ้น DNA ของพาสมิด ส่วนแถบล่างจะเป็นชิ้น DNA เป้าหมายซึ่งต้องมีขนาด (จำนวนเบส) ใกล้เคียงกับที่ได้ทำการออกแบบไพร์เมอร์ไว้

5. การวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้น DNA เป้าหมาย (DNA sequencing)

ชิ้นส่วน DNA ที่ได้ถูกนำไปหาลำดับเบสของสาย DNA ด้วยเครื่อง Automated DNA sequencer (ABI PRIAM 377® DNA Sequencer) และลำดับเบสที่ได้ถูกนำมาเปรียบเทียบความเหมือนกับยีนเป้าหมายแต่ละตัวในเว็บไซด์ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ด้วยโปรแกรม Blast aligment (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

3.5 Semi-quantitative RT-PCR analysis ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

3.5.1 การสกัด RNA ทุกตัวอย่างตามขั้นตอน 3.2-3.3

3.5.2 การกำจัดดีเอ็นเอปนเปื้อนในตัวอย่าง RNA

นำสารละลาย RNAจำนวน 1-2 ไมโครกรัม ใส่ลงในหลอดทดลอง eppendrof ที่มีชุดสารละลาย Rnase-free Dnase I (Fermentas, USA) ดังนี้ 10x buffer with $MgCl_2$ for DNaseI จำนวน 1-2 ไมโครลิตร เอนไซม์ Deoxyribonuclease (Rnase-free 1 U/ul) จำนวน 1- 2 ไมโครลิตร น้ำ DEPC จำนวน 5 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร นำหลอดที่มีสารละลายผสม

วางไว้ที่อ่างน้ำ (water bath) ควบคุมอุณหภูมิ 37 °ซ นาน 30 นาที จากนั้นเติมสาร EDTA ที่ความเข้มข้น 25 mM จำนวน 1 ไมโครลิตร แล้วนำไปวางไว้ที่อ่างน้ำอุณหภูมิ 60 °ซ นาน 10 นาที

3.5.3 การสังเคราะห์ cDNA

นำสารละลาย RNA ที่ผ่านการกำจัด DNA ปนเปื้อนแล้วจากขั้นตอน 3.5.2 จำนวน 1-2 ไมโครกรัม ใส่ลงในหลอดทดลอง eppendrof แล้วเติม สาร OligodT ที่ความเข้มข้น 10 uM จำนวน 1 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวางในอ่างน้ำอุณหภูมิ 70 °ซ นาน 5 นาที ครบเวลานำหลอดวางในน้ำแข็ง จากนั้นเติมชุดสารละลาย M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) ดังนี้ สาร 5x MMLV buffer จำนวน 5 ไมโครลิตร สาร 10 mMdNTP จำนวน 1.25 ไมโครลิตร เอนไซม์ M-MLV-RT (200 U/ul) จำนวน 0.5 ไมโครลิตร น้ำ DEPC จำนวน 7 ไมโครลิตร และสาร Recombinant Rnasin® Ribonuclease inhibitor (40 U/ul) จำนวน 15 U ในปริมาตรสารละลายรวมทั้งหมด 15 มิลลิลิตร นำหลอดที่มีสารผสมวางไว้อ่างน้ำอุณหภูมิ 42 °ซ นาน 90 นาที ครบเวลานำหลอดดังกล่าวซึ่งมี cDNA ไว้ในตู้แช่แข็ง (-20 °ซ)

3.5.4 การออกแบบไพรเมอร์แบบจำเพาะ (specific primer)

1. การออกแบบไพรเมอร์แบบจำเพาะของยีนเป้าหมาย (*Cel* gene)

นำลำดับเบสของยีนβ- 1,4 glucanase ที่ได้จากขั้นตอน 3.4.4 ข้อ 5 มาออกแบบไพร์เมอร์แบบจำเพาะโดยใช้โปรแกรม Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) โดยยีน *Cel* gene มีลำดับเบสเส้น forward 5'-TTGGCTTTCTCCACGTCTCT-3' และเส้น reverse 5'-GCC CACCTGTGCATAAATCT-3' ซึ่งมีขนาดชิ้นยีน 174 bps

2. การออกแบบไพรเมอร์แบบจำเพาะของยีน actin (internal control gene)

นำลำดับเบสของยีน actin ซึ่งผ่านการโคลนยีนจากเนื้อเยื่อดอกกล้วยไม้พันธุ์มีสทีน มีลำดับเบสเส้น forward 5'-AAGCTGTTCTTTCCCTATATGCTAGTGG-3' และเส้น reverse 5'-CTTCTCCTTGATGTCCCTGACAATTT-3' ซึ่งมีขนาดชิ้นยีน 176 bps (Luangsuwailai, 2007)

3.5.5 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนเป้าหมายและยีนควบคุม ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

1. การทำพีซีอาร์ (PCR reaction) เพื่อหาจำนวนรอบที่เหมาะสมของยีนควบคุม เพื่อตรวจสอบคุณภาพของ cDNA และหาปริมาตร cDNA ที่ใช้ในแต่ละตัวอย่างเนื้อเยื่อ ใช้ไพรเมอร์ชนิดจำเพาะที่ออกแบบมาของยีน actin จำนวน 1 คู่ ใส่ลงในหลอดพีซีอาร์ (PCR tube) ที่มีสารละลายที่ใช้ทำปฏิกิริยา PCR (Qiagen) ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยสารละลายดังต่อไปนี้ 10x buffer จำนวน 2.5 ไมโครลิตร 25 mM$MgCl_2$ จำนวน 1 ไมโครลิตร 10 mM dNTPmix จำนวน 0.5 ไมโครลิตร 10 μM primer forword และ reverse จำนวนสารละ 0.3 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase จำนวน 0.125 ไมโครลิตร cDNA (template) จำนวน 1 ไมโครลิตร น้ำ DEPC จำนวน 17.775 ไมโครลิตร นำหลอดพีซีอาร์ที่มีสารผสมใส่เครื่อง PCR โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาสำหรับทำปฏิกิริยาของ actin gene ดังนี้

ช่วงที่ 1 ใช้อุณหภูมิ 94 °ซ นาน 3 นาที

ช่วงที่ 2 ใช้อุณหภูมิ 94 °ซ นาน 30 วินาที
อุณหภูมิ 55 °ซ นาน 30 วินาที
อุณหภูมิ 72 °ซ นาน 30 วินาที
ทำซ้ำจำนวน 23 25 27 29 31 33 35 รอบ

ช่วงที่ 3 ใช้อุณหภูมิ 72 °ซ นาน 5 นาที

หลังจากนั้นนำผลผลิตที่ได้จำนวน 5 ไมโครลิตรผสมกับ 2x loading dye จำนวน 5 ไมโครลิตร ไปตรวจสอบโดยวิธีอิเลคโทรโฟริซิสตามขั้นตอนการทดลองที่ 3.3.2 โดยชิ้น DNA ที่ได้จะถูกแยกขนาดในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.2% ซึ่งจำนวนรอบในการทำปฏิกิริยา PCR ที่เหมาะสมจะทำให้ได้ความสว่างของแถบ DNA ที่พอเหมาะ และคุณภาพของ cDNA ที่ดีจะต้องปรากฏแถบ DNA ตามจำนวนรอบที่กำหนด รวมทั้งความสว่างของแถบ DNA จากทุกตัวอย่างเนื้อเยื่อควรจะเท่ากัน ถ้าความสว่างของแถบDNA ที่ได้ไม่เท่ากันสามารถปรับปริมาณ cDNA ที่นำมาใช้ในแต่ละปฏิกิริยาให้มากขึ้นหรือลดลงจาก 1 ไมโครลิตร เมื่อความสว่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้เท่ากันหมายถึงปริมาณ cDNA เริ่มต้นที่ใช้ในแต่ละตัวอย่างเนื้อเยื่อเท่ากัน

2. การทำพีซีอาร์ (PCR reaction) ของยีนเป้าหมาย เพื่อทดสอบระดับการแสดงออกของยีน

ใช้ไพรเมอร์ชนิดจำเพาะที่ออกแบบมาของยีน *Cel* จำนวน 1 คู่ ใส่ลงในหลอดพีซีอาร์ (PCR tube) ที่มีสารละลายที่ใช้ทำปฏิกิริยา PCR (Qiagen) ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยสารละลายดังต่อไปนี้ 10x buffer จำนวน 2.5 ไมโครลิตร 25 mM $MgCl_2$ จำนวน 1 ไมโครลิตร 10 mM dNTPmix จำนวน 0.5 ไมโครลิตร 10 μMprimer forward และ reverse จำนวนตัวอย่างละ 0.5 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase จำนวน 0.125 ไมโครลิตร และ cDNA (template) ปริมาตรเดียวกับที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ของยีน actin น้ำ DEPC จำนวน 17.775 ไมโครลิตร นำหลอดพีซีอาร์ที่มีสารผสมใส่เครื่อง PCR โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาสำหรับทำปฏิกิริยาของ *Cel* gene ดังนี้

ช่วงที่ 1 ใช้อุณหภูมิ 94 °ซ นาน 3 นาที

ช่วงที่ 2 ใช้อุณหภูมิ 94 °ซ นาน 30 วินาที
อุณหภูมิ 51 °ซ นาน 30 วินาที
อุณหภูมิ 72 °ซ นาน 30 วินาที
ทำซ้ำจำนวน 36 รอบ

ช่วงที่ 3 ใช้อุณหภูมิ 72 °ซ นาน 5 นาที

หลังจากนั้นนำผลผลิตที่ได้จำนวน 5 ไมโครลิตรผสมกับ 2x loading dye จำนวน 5 ไมโครลิตร ไปตรวจสอบโดยวิธีอิเลคโทรโฟริซิสตามขั้นตอนการทดลองที่ 3.3.2 โดยชิ้น DNA ที่ได้จะถูกแยกขนาดในอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.2% ซึ่งแถบความสว่างของชิ้น DNA เป้าหมายจะแสดงความสว่างที่แตกต่างกันขึ้นกับปริมาณผลผลิตจากปฏิกิริยาPCR ของชิ้น DNA เริ่มต้นที่มีการแสดงออกของยีนตัวควบคุมที่เท่ากัน

4. <u>การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ</u>

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม Statistical Analysis System โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) จากนั้นทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) และ Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$)

5. <u>สถานที่ทำการทดลอง</u>

หน่วยวิจัยพืชผลหลังการเก็บเกี่ยว ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

6. <u>ระยะเวลาทำการทดลอง</u>

ตั้งแต่เดือน มิถุนายน 2545- เดือนพฤศจิกายน 2549