

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืช

พันธุ์สับปะรดที่ใช้ในวิทยานิพนธ์นี้เป็นสายพันธุ์ปัตตาเวีย (*Ananas comosus* (L.) Merr. cv. Smooth Cayenne) ซึ่งปลูกในแปลงปลูกของเกษตรกร ณ บ้านช้างแท่งกระเจา ต.บาสสามพระยา อ.เกาะช้าง จ.พิจิตร

2. สายพันธุ์ bacteria

Escherichia coli strain DH5 α (Invitrogen, USA)

วิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่างพืช

การเตรียมตัวอย่างพืชในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เริ่มตั้งแต่การเร่งดอก การเตรียมพืชเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ทดลองในแปลงใหญ่ และการเตรียมพืชเพื่อใช้ในการศึกษาผลของ ethephon ที่มีต่อสับปะรดในแต่ละระยะเวลาการเก็บเกี่ยวภายหลังการพ่นสาร ethephon

1.1 การเร่งดอก

ทำการเร่งดอกของสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียในแปลงปลูกเมื่อสับปะรดมีอายุ 9 เดือน โดยพ่น ethephon [พีทีฟอน, สารสำคัญ 2-chloroethylphosphonic acid เข้มข้น 48% (w/v), บริษัท พาร์เทคเคมีภัณฑ์การเกษตร จำกัด] เข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ละลายรวมกับยูเรียเข้มข้น 3% (w/v) ในปริมาตร 50 มิลลิลิตร ต่อต้น

1.2 การเตรียมพืชเพื่อศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ ethephon

ในการเลือกความเข้มข้นของ ethephon ที่จะนำไปใช้ในการศึกษาผลกระทบของ ethephon ในขั้นตอนต่อไปนั้นได้วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) และทำการพ่น ethephon เข้มข้น 0, 125, 250 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ในปริมาตร 50 มิลลิลิตร ต่อผล กับผลของสับปะรดอายุ 96, 110, 124 และ 138 วันหลังการเร่งดอก จำนวน 12 ผลต่อความเข้มข้น และเก็บสับปะรดที่อายุ 152 วันหลังการเร่งดอก มาศึกษาโดยศึกษาคุณภาพของผลทางด้านรสชาติ ซึ่งได้แก่ ปริมาณ TSS ปริมาณ TA และอัตราส่วนระหว่าง TSS:TA สำหรับอายุของสับปะรดที่เก็บมาเพื่อทำการศึกษานี้ในช่วงระยะเวลาเดียวกับที่เกษตรกรเก็บเกี่ยวผลสับปะรดส่งเข้าสู่โรงงานอุตสาหกรรมซึ่งผลสับปะรดจะมีขนาดโตเต็มที่และสีในส่วนฐานของผลเริ่มเปลี่ยนการทดลองในขั้นตอนนี้ใช้ผลสับปะรดในการศึกษาทั้งสิ้น 192 ผล

1.3 การเตรียมพืชเพื่อศึกษาผลของ ethephon และระยะเวลาการเก็บเกี่ยวภายหลังการพ่นสาร ethephon ที่อายุต่างๆ

การศึกษาในขั้นตอนนี้แบ่งแปลงสับปะรดภายหลังการกระตุ้นดอกแล้ว 80 วัน โดยแบ่งตามแผนการทดลองแบบ split plot in randomized complete block design (RCBD) ซึ่งประกอบด้วย main plot และ sub plot main plot คือความเข้มข้นของ ethephon ที่ใช้พ่นรอบผลสับปะรด โดยความเข้มข้นที่ใช้ได้จากการศึกษาในขั้นตอนที่ 1.2 ที่พบว่าความเข้มข้นของ ethephon ที่ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เหมาะสมที่สุด ดังนั้นความเข้มข้นที่ใช้ศึกษาในขั้นตอนนี้ได้แก่ 0 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยพ่นโดยรอบผลในปริมาตร 50 มิลลิลิตรต่อผล และพ่นเมื่อผลสับปะรดมีอายุต่างกัน 4 ช่วงอายุคือ 96, 110, 124 และ 138 วันหลังการเร่งดอก โดยการทดลองมี 3 ซ้ำ (แปลง) แปลงละ 8 ผล ส่วน sub plot คือระยะเวลาการเก็บเกี่ยวภายหลังการพ่นสาร ethephon แล้ว 1-2 สัปดาห์ ตามลำดับและวันสุดท้ายที่เก็บเกี่ยวในแต่ละอายุภายหลังการพ่นสารคือ 152 วันหลังการเร่งดอก ซึ่งอยู่ในช่วงเวลา 3-5 วันที่เกษตรกรเก็บเกี่ยวผลสับปะรดส่งเข้าสู่โรงงานอุตสาหกรรม เวลาดังกล่าวอยู่ในเดือนเมษายน พ.ศ. 2546 (สภาพภูมิอากาศและปริมาณน้ำฝนตั้งแต่เร่งดอกจนกระทั่งวันสุดท้ายของการเก็บเกี่ยวแสดงในภาพผนวกที่ 1) ทั้งนี้ในแต่ละช่วงอายุของผลสับปะรดที่ทำ การพ่นสาร ethephon ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาการเก็บเกี่ยวต่างๆสามารถสรุปได้ดังนี้คือ

พ่นสาร ethephon เข้มข้น 0 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ต่อ
ผล ขณะผลอายุ 96 วันหลังการเร่งดอก จะทำการเก็บเกี่ยวเมื่อผลอายุ 110, 124, 138, 145 และ 152
วันหลังการเร่งดอก โดยเก็บผลทั้งสิ้น 8 ผลต่อแปลงต่อความเข้มข้นของสารที่พ่น รวม 3 ซ้ำใช้
สับปะรดทั้งสิ้น 240 ผล

พ่นสาร ethephon เข้มข้น 0 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ต่อ
ผล ขณะผลอายุ 110 วันหลังการเร่งดอก จะทำการเก็บเกี่ยวเมื่อผลอายุ 124, 131, 138, 145 และ
152 วันหลังการเร่งดอก โดยเก็บผลทั้งสิ้น 8 ผลต่อแปลงต่อความเข้มข้นของสารที่พ่น รวม 3 ซ้ำ
ใช้สับปะรดทั้งสิ้น 240 ผล

พ่นสาร ethephon เข้มข้น 0 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ต่อ
ผล ขณะผลอายุ 124 วันหลังการเร่งดอก จะทำการเก็บเกี่ยวเมื่อผลอายุ 131, 138, 145 และ 152 วัน
หลังการเร่งดอก โดยเก็บผลทั้งสิ้น 8 ผลต่อแปลงต่อความเข้มข้นของสารที่พ่น รวม 3 ซ้ำใช้
สับปะรดทั้งสิ้น 192 ผล

พ่นสาร ethephon เข้มข้น 0 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ต่อ
ผล ขณะผลอายุ 138 วันหลังการเร่งดอก จะทำการเก็บเกี่ยวเมื่อผลอายุ 145 และ 152 วันหลังการ
เร่งดอก โดยเก็บผลทั้งสิ้น 8 ผลต่อแปลงต่อความเข้มข้นของสารที่พ่น รวม 3 ซ้ำใช้สับปะรดทั้งสิ้น
96 ผล

การทดลองในขั้นตอนนี้ใช้ผลสับปะรดในการศึกษาทั้งสิ้น 768 ผล ทั้งนี้แผน
ดำเนินงานภาคสนามแสดงไว้ในภาพที่ 3 ดังนี้



ภาพที่ 3 แผนการดำเนินการฉีดพ่นสาร ethephon และการเก็บเกี่ยวผลมาศึกษาในแต่ละช่วงอายุของสับปะรดนับตั้งแต่การเร่งดอก

2. การวิเคราะห์คุณภาพผลสับปะรด

การวิเคราะห์คุณภาพของผลสับปะรดทำภายหลังการเก็บเกี่ยวและขนส่งผลสับปะรดตามระยะเวลาที่กำหนดในแต่ละชุดการทดลองจากแปลงปลูกมาถึงห้องปฏิบัติการที่ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยแยกการวิเคราะห์คุณภาพออกเป็น 2 หัวข้อ คือ การวิเคราะห์ในชุดการทดลองที่ศึกษาความเหมาะสมของความเข้มข้นของ ethephon ที่จะนำไปใช้ต่อไปในขั้นตอนต่อไป ซึ่งวิเคราะห์คุณภาพทางด้านรสชาติเป็นหลักซึ่งได้แก่ ปริมาณ TSS และปริมาณ TA และหัวข้อที่สองคือการวิเคราะห์ในชุดการทดลองที่ศึกษาผลของ ethephon และระยะเวลาการเก็บเกี่ยวภายหลังการพ่นสาร ethephon ณ อายุต่างๆ ในเชิงคุณภาพของผลทั้งทางด้านกายภาพและรสชาติ ซึ่งเกณฑ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพในขั้นตอนนี้ได้แก่ น้ำหนักและขนาดของผลและลูกของสับปะรด เส้นผ่านศูนย์กลางแกนผล เปอร์เซ็นต์ความชื้นในเนื้อ pH ของน้ำคั้นจากเนื้อของสับปะรด ปริมาณ TSS และปริมาณ TA ซึ่งวิธีการวิเคราะห์คุณภาพมีรายละเอียดดังนี้

2.1 การหาน้ำหนักและขนาดของผลและลูก

การหาน้ำหนักทำโดยการชั่งผลและลูกด้วยเครื่องชั่ง การวัดขนาดของผลและลูกนั้นวัดทั้งความยาวและเส้นผ่านศูนย์กลางของผลและลูก โดยความยาวของผลวัดตั้งแต่โคนผลถึงปลาย

ผลไม่รวมจุก กรณีของความยาวจุกวัดตั้งแต่โคนจุกถึงปลายจุก สำหรับเส้นผ่านศูนย์กลางผลและจุกนั้นวัดจากส่วนที่กว้างที่สุดของผลและจุก

2.2 การหาเส้นผ่านศูนย์กลางแกนผล (fruit core)

วัดแกนผลหลังจากผ่าแบ่งครึ่งผลตามยาวออกเป็น 2 ส่วน โดยใช้ vernier caliper ทำการวัด 3 บริเวณคือ แกนกลางบริเวณส่วนปลายผล กลางผล และ โคนผล จากนั้นจึงนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางแกนผลในแต่ละผล

2.3 เพอร์เซ็นต์ความชื้นในเนื้อ (moisture content)

นำเนื้อสับประคบบริเวณส่วนกลางของผลไม่รวมแกนผลมา 1 ใน 4 ของเนื้อบริเวณดังกล่าวไปชั่งน้ำหนักสด จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70°C จนกระทั่งน้ำหนักแห้งคงที่ นำค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นในเนื้อ จากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้นในเนื้อ} = \frac{(\text{น้ำหนักสด} - \text{น้ำหนักแห้ง}) \times 100}{\text{น้ำหนักสด}}$$

2.4 การหา pH ของน้ำคั้น ปริมาณ TSS และปริมาณ TA

นำเนื้อสับประคบบริเวณส่วนกลางของผลไม่รวมแกนผลมา 2 ใน 4 หรือมากกว่านำมาคั้นน้ำ และนำไปวัดค่า pH โดยใช้ pH meter หลังจากนั้นจึงตรวจวัดปริมาณ TSS โดยใช้เครื่อง hand refractometer บันทึกค่าที่ได้เป็น °Brix สำหรับการหาปริมาณ TA นั้นปรับปรุงมาจากวิธีของประธาน (2544) โดยใช้ น้ำคั้น ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เติม 1% phenolphthalein ลงไป 2-3 หยด นำไปไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐาน 0.2 N NaOH จนกระทั่งถึง end point ซึ่งน้ำสับประคบเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อนนานประมาณ 30 วินาที นำปริมาตรสารละลาย NaOH ที่ใช้ในการไตเตรทมาคำนวณเปอร์เซ็นต์กรดเทียบกับกรดซิตริก โดยคำนวณจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์กรดซิตริก} = \frac{N \text{ NaOH} \times \text{ml Base} \times \text{meq.wt ของกรดซิตริก} \times 100}{\text{ปริมาณของน้ำคั้นสับประคบ}}$$

N = Normality ของสารละลายต่างมาตรฐานที่ใช้ (NaOH)

ml Base = ปริมาตรของสารละลายต่างมาตรฐานที่ใช้ในการไทเทรต หน่วยเป็นมิลลิลิตร

meq. wt ของกรดซิตริก = 0.06404

3. การเก็บรักษาตัวอย่างพืช

การทดลองในขั้นตอนต่อไป คือ การหาชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่มีอยู่ในเนื้อสับปะรด การสกัดแยกและการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ sucrose synthase (SuSy) และการหาปริมาณโปรตีน ซึ่งใช้เนื้อของสับปะรดในแต่ละชุดเป็นตัวอย่างในการศึกษา ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเก็บรักษาเนื้อเยื่อดังกล่าวนี้ไว้ โดยนำเนื้อจากบริเวณกลางผลในปริมาณที่เท่ากันจากทั้ง 8 ผลในแต่ละซัปดาห์มาตัดออกเป็นชิ้นบางๆ และทำให้เย็นอย่างรวดเร็วโดยใช้ไนโตรเจนเหลว เก็บรักษาไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ -80°C

4. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของน้ำตาลแต่ละชนิด

ในการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของน้ำตาลในเนื้อของสับปะรดที่ผ่านการพ่นสาร ethephon ที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตรต่อผล โดยเป็นเนื้อเยื่อชุดเดียวกับที่ใช้ศึกษาคุณภาพของผล นอกจากนี้ได้นำสับปะรดอายุ 110 วันหลังการเร่งดอกที่ไม่พ่นสาร ethephon มาแยกเปลือก แกนกลางและเนื้อจากบริเวณส่วนกลางของผล มาวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของน้ำตาล เพื่อศึกษาว่าขณะที่สับปะรดยังอ่อนอยู่นี้บริเวณใดมีน้ำตาลชนิดใดมากที่สุด เพื่อใช้ประกอบการหากิจกรรมของเอนไซม์ sucrose synthase

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของน้ำตาลในการศึกษานี้ใช้วิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) สกัดแยกน้ำตาลจากเนื้อสับปะรดโดยใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Chen and Paull (2000) โดยนำเนื้อเยื่อที่แช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -80°C มาบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว นำเนื้อที่ผ่านการบดละเอียด 2 กรัม มาทำให้ร้อนแบบเกลียวปล้นโดยใช้ไมโครเวฟจนถึงอุณหภูมิประมาณ 90°C เพื่อทำลายเอนไซม์ที่สามารถใช้หรือสลายน้ำตาลในเนื้อสับปะรด จากนั้นนำไปบดรวมกับเอธานอลเข้มข้น 90% (v/v) ปริมาตร 18 มิลลิลิตร เก็บสารผสมระหว่างเนื้อสับปะรดและเอธานอลไว้ที่อุณหภูมิ 1°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อสกัดน้ำตาลออกจากเนื้อสับปะรด หลังจากครบระยะเวลาที่กำหนดแล้วให้ดูดเฉพาะสารละลายใสส่วนบน

ขึ้นมา 5 มิลลิลิตร นำไปทำระเหยให้แห้งโดยใช้ก๊าซไนโตรเจน และละลายใหม่โดยใช้น้ำกลั่น (HPLC grade) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ก่อนนำไปกรองผ่านแผ่นกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมครอน นำสารละลายที่ผ่านการกรองแล้วปริมาตร 20 ไมโครลิตร ไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของน้ำตาล โดยฉีดเข้าสู่เครื่อง HPLC (Waters 2690 Separation Model) ซึ่งมีเครื่องตรวจจับสัญญาณ (detector) เป็นแบบ Differential Refractometer (RI) (Waters 410) แยกน้ำตาลชนิดต่างๆออกจากกันโดย Sugar-PAK I column (Column Part No. 85188, Waters Associates, Milford, USA) ซึ่งเป็น คอลัมน์ สเตนเลส ขาว 300 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 6.5 มิลลิเมตร และวัฏภาค เคลื่อนที่ (mobile phase) ที่ใช้คือ 0.1 mM calcium EDTA ความเร็ว (flow rate) และอุณหภูมิ oven (oven temperature) ที่ใช้ในการแยกน้ำตาลคือ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 90°C นำผลที่ได้ คือ retention time ของแต่ละยอดของสัญญาณ (peak) ที่ปรากฏไปเปรียบเทียบกับ retention time ของสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน ซูโครส กลูโคสและ ฟรุคโตส (Sigma Co., Ltd.) และนำพื้นที่ใต้ กราฟของน้ำตาลแต่ละชนิดไปเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานทั้ง 3 ชนิด เพื่อหาปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดภายในเนื้อสับปะรด

5. การสกัดแยกและตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ sucrose synthase

การศึกษาเอนไซม์ sucrose synthase (SuSy) ใช้เนื้อเยื่อหูดเคียวกับการศึกษาชนิดและ ปริมาณของน้ำตาลในเนื้อสับปะรด คือ หูดควบคุม (พ่นสาร ethephon เข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตรต่อผล) และหูดทดลอง (พ่นสาร ethephon เข้มข้น 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตรต่อผล) นอกจากนี้ยังได้นำเนื้อเยื่อทั้ง 3 บริเวณซึ่งได้แก่ เปลือก แกนกลาง และเนื้อจากบริเวณส่วนกลางของผลสับปะรดอายุ 110 วันหลังการเร่งดอกที่ไม่พ่นสาร ethephon มาศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ sucrose synthase เพื่อศึกษาว่าขณะที่สับปะรดยังอ่อนอยู่นี้บริเวณใด มีกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวมากที่สุด

5.1 การสกัดแยกเอนไซม์

การสกัดแยกเอนไซม์ sucrose synthase ออกจากเนื้อเยื่อสับปะรดใช้วิธีที่ปรับปรุงมา จากวิธีของ Chen and Paull (2000) โดยหลังจากการบดเนื้อเยื่อที่แช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -80°C ให้ ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลวแล้ว เติม extraction buffer [100 mM MOPS (pH 7.5 ปรับ pH โดยใช้ NaOH), 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 2.5 mM DTT, 0.05% (v/v) Triton X-100, 10 mM

ascorbic acid, 1 mM PMSF, 20 μ M E-64, 1 mg/ml BSA และ 10 mg/ml PVPP (insoluble)] ลงไป 4 เท่าของปริมาณเนื้อเยื่อที่ใช้และบดให้เข้ากับเนื้อเยื่อ กรองสารผสมดังกล่าวผ่านผ้าขาวบางหนา 8 ชั้นก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 20,000 X g เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C นำเฉพาะสารละลายใสส่วนบนไปกำจัดเกลือและสารที่ไม่ต้องการออกโดยใช้ HiTrap[®] desalting column (Amersham Biosciences) และใช้ desalting buffer (100 mM MOPS (pH 7.5), 5 mM MgCl₂ และ 2.5 mM DTT) เป็นตัวชะเอนไซม์ออกมา และนำไปตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์และหาปริมาณโปรตีนต่อไป

5.2 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์

การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ sucrose synthase ทำตามวิธีของ Chen and Paull (2000) ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Hubbard *et al.* (1989) การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์วิธีนี้เป็น การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ในทิศทาง การสังเคราะห์น้ำตาล โดยนำสารสกัดที่ผ่านการกำจัดเกลือและสารที่ไม่ต้องการแล้วปริมาตร 50 ไมโครลิตรไปเติม substrate buffer (100 mM MOPS (pH 7.5), 15 mM MgCl₂, 20 mM fructose และ 10 mM UDPG) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 35°C เพื่อให้เอนไซม์ sucrose synthase จากเนื้อตับกระต่ายทำปฏิกิริยาเปลี่ยนฟรุกโตส และ UDPG เป็นซูโครสและ UDP หยุดปฏิกิริยาเมื่อเวลา 0 และ 30 นาที โดยเติม 30% (w/v) KOH ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำลายน้ำตาลชนิดรีดิวซ์ (reducing sugar) ที่ไม่ได้ถูกนำไปใช้ในการทำปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ sucrose synthase เมื่อสารละลายเย็นลงหลังจากการต้ม นำสารทั้งหมดเติมลงในสารละลาย 2 มิลลิลิตร ของ 0.15% (w/v) anthrone ที่ละลายอยู่ใน 13.8 M H₂SO₄ นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 40°C เป็นเวลานาน 20 นาที และหาปริมาณผลผลิตที่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ sucrose synthase โดยนำสารละลายดังกล่าวไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณหา กิจกรรมของเอนไซม์โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานซูโครส ซึ่งทำปฏิกิริยากับ 0.15% (w/v) anthrone ในสถานะเดียวกัน

5.3 การตรวจสอบปริมาณโปรตีน

นำสารสกัดที่ผ่านการกำจัดเกลือและสารที่ไม่ต้องการแล้ว มาตรวจหาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry *et al.* (1951) โดยนำสารที่ได้ 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันกับ working

solution (ภาคผนวก) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติม 1 N Folin reagent ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 45 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณโปรตีนเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน BSA (Sigma, Co., Ltd.)

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้โปรแกรม IRRISTAT version 93-3 และตรวจสอบความแตกต่างของทรีตเมนต์ โดยการหาค่า Analysis of variance ตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์ โดยใช้ Duncant's multiple range tests (DMRT) ที่ระดับ .05 และ .01

7. การโคลนและศึกษาลำดับเบสบางส่วนของยีน sucrose synthase ในสับปะรด

7.1 การสกัดแยกอาร์เอ็นเอ

เนื่องจากเอนไซม์ sucrose synthase ในผลอ่อนของสับปะรดมีกิจกรรมที่สูงกว่าในขณะที่ยังผลแก่ ดังนั้นในการศึกษาลำดับเบสบางส่วนของยีน sucrose synthase จึงใช้อาร์เอ็นเอจากผลของสับปะรดที่ยังอ่อนอยู่ โดยใช้เนื้อของสับปะรดอายุ 103 วันหลังการเร่ดอกหนัก 100 มิลลิกรัม มาบดให้เป็นผงละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว เติมน้ำยา TRIzol[®] (Invitrogen) ลงไป 1 มิลลิลิตร และบดผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 15-30°C เป็นเวลา 5 นาที เติมหอโรฟอร์มลงไป 200 μ l เขย่าอย่างแรงให้สารเข้ากันเป็นเวลา 15 วินาที และตั้งทิ้งไว้ 2-3 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 X g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายใสส่วนบน 600 ไมโครลิตร ไปทำการตกตะกอนอาร์เอ็นเอ โดยเติมไอโซโพรพานอลลงไป 500 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 X g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายใสส่วนบนทิ้งจะเห็นตะกอนของอาร์เอ็นเอเป็นแผ่นเจลใสเกาะติดอยู่ที่ก้นหลอด ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอโดยเติมเอทานอล 75% ลงไป 1 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,500 X g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายใสทิ้ง ผึ่งตะกอนให้แห้งก่อนละลายอาร์เอ็นเอที่ได้ด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ (ultra pure water) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ตะกอนอาร์เอ็นเอละลาย

7.2 การหาความเข้มข้นและคุณภาพของอาร์เอ็นเอ

ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอทั้งหมดที่สกัดได้หาได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm โดยค่า OD ที่วัดได้ 1 หน่วย แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอเข้มข้นประมาณ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร (Sambrook and Russel, 2000) จากค่าดังกล่าวนี้ทำให้สามารถคำนวณความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างได้จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ (ไมโครกรัมต่อมิลลิตร)} = A_{260} \times \text{dilution factor} \times 40 \mu\text{g/ml}$$

สำหรับอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จะมีคุณภาพที่ดีมากน้อยเพียงใด ทราบได้จากการคำนวณอัตราส่วนระหว่าง A_{260}/A_{280} ถ้าค่าที่ได้อยู่ระหว่าง 1.8-2.0 แสดงว่าอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพที่ดี แต่ถ้าได้ค่าที่ต่ำกว่านี้แสดงว่าอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มีโปรตีนปนเปื้อนอยู่ นอกจากนี้ยังสามารถดูได้จากแถบของอาร์เอ็นเอที่ปรากฏเมื่อนำไปตรวจสอบโดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล และย้อมแถบอาร์เอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (EtBr)

7.3 การกำจัดดีเอ็นเอออกจากอาร์เอ็นเอ

เนื่องจากอาร์เอ็นเอที่สกัดออกมาได้อาจมีดีเอ็นเอปนเปื้อนอยู่ และการทดลองในขั้นต่อไปจะทำการสังเคราะห์ cDNA จาก mRNA ของยีน Sucrose Synthase ดังนั้นจึงต้องกำจัดดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนมากับสารสกัดอาร์เอ็นเอ โดยใช้ชุดน้ำยา RQ1 RNase-Free DNase (Promega) ดังนี้ นำสารละลายอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ซึ่งมีความเข้มข้นประมาณ 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร มา 5 ไมโครลิตร แล้วเติม 10 X Reaction Buffer [400 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM MgSO_4 และ 10 mM CaCl_2] ลงไป 2 ไมโครลิตร ตามด้วย RQ1 DNase เข้มข้น 1 unit [ละลายใน 10 mM HEPES (pH 7.5), 50% (v/v) glycerol, 10 mM CaCl_2 และ 10 mM MgCl_2] ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ก่อนปรับปริมาตรครั้งสุดท้ายให้เป็น 20 ไมโครลิตรโดยใช้น้ำกลั่นที่บริสุทธิ์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม DNase I Stop Solution [20 mM EGTA (pH 8.0)] ลงไป 2 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 5 นาที อาร์เอ็นเอที่ได้นี้สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C ในกรณีที่ต้องการเก็บอาร์เอ็นเอที่ได้ไว้เป็นเวลานานให้ตกตะกอนอาร์เอ็นเอและเติม absolute ethanol ก่อนนำไปเก็บที่ -70°C

7.4 การทำปฏิกิริยา Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

การทำปฏิกิริยา RT-PCR ในการศึกษาครั้งนี้ทำปฏิกิริยาแบบ one-step ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก มีความไวต่อปฏิกิริยา และสามารถวิเคราะห์อาร์เอ็นเอที่ต้องการได้ในขั้นตอนเดียว นั่นคือจะได้ cDNA เฉพาะของยีน Sucrose Synthase ที่มีขนาดตามที่คาดหมาย ในการศึกษาที่ใช้ชุดน้ำยา SuperScript™ One-Step RT-PCR ที่มี Platinum® *Taq* (Invitrogen) และใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากลำดับเบสของ sucrose synthase cDNA ในพืชชนิดต่างๆ ไพรเมอร์ดังกล่าวนี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.อัญชิรา สุขมาก ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยมีลำดับเบสดังต่อไปนี้

SuSy Sense Primer (forward primer) 5'>GGYATYGATGTYTTYGATCC<3'

SuSy Anti-Sense Primer (reverse primer) 5'>CCATAKACACCRGTSAGGGTC<3'

โดย Y = C+T K = G+T R = A+G S = G+C ในการทำปฏิกิริยา RT-PCR ปริมาตรสุทธิ 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2 X Reaction Mix (dNTP 4 ชนิดๆละ 0.4 mM และ 2.4 mM MgSO₄) ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร อาร์เอ็นเอต้นแบบ 3 ไมโครลิตร sucrose synthase Sense และ Anti-sense Primer อย่างละ 1 ไมโครลิตร RT/Platinum® *Taq* Mix 0.5 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นบริสุทธิ์ 7 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยา reverse transcription ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 30 นาที ต่อด้วยอุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาต่อไปอีก 40 รอบ เริ่มจาก denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 47°C เป็นเวลา 30 วินาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1 นาที เมื่อครบ 40 รอบแล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์ นำ cDNA ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา RT-PCR ไปตรวจสอบผลโดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลเข้มข้น 1% (w/v) และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (EtBr)

7.5 การแยก cDNA ออกจากอะกาโรสเจลและการเพิ่มปริมาณ cDNA โดยวิธี PCR

หลังจากการตรวจสอบแถบ cDNA ที่ปรากฏบนแผ่นอะกาโรสเจล ว่ามีขนาดใกล้เคียงกับขนาดที่คาดหวัง ใช้ใบมีดผ่าตัดที่สะอาดตัดแถบของชิ้น cDNA ที่ต้องการออกจากเจล และ

นำไปสกัดแยก cDNA โดยใช้ชุดน้ำยา QIA Quick[®] Gel Extraction Kit (QIAGEN) และทำตามขั้นตอนต่างๆที่ระบุอยู่ในชุดน้ำยาดังกล่าว

หลังจากได้ cDNA แล้วนำมาเพิ่มปริมาณ cDNA โดยการทำให้ PCR ซึ่งในปฏิกิริยาสุทธิ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย cDNA ต้นแบบ 2 ไมโครลิตร 10 X reaction buffer (ซึ่งมี 20 mM MgCl₂ ผสมอยู่) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร 2 mM dNTP 2 ไมโครลิตร SuSy Sense และ Anti-sense Primer อย่างละ 1 ไมโครลิตร YEA DNA polymerase 0.1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นบริสุทธิ์ 11.9 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยา 40 รอบ เริ่มจาก Denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 47°C เป็นเวลา 1 นาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1 นาที เมื่อครบ 40 รอบแล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์ ตรวจสอบผลโดยทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจลเข้มข้น 1% (w/v) และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย เอธิเดียมโบรไมด์ เปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้กับ 1 Kb Plus DNA Ladder

7.6 การโคลนบางส่วนของ sucrose synthase cDNA จากเนื้อตับประด

7.6.1 การเตรียม Competent *E. coli* cell

วิธีการเตรียม competent *E. coli* cell นี้ปรับปรุงมาจากวิธีของ Sambrook and Russell (2000) โดยเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5α จำนวน 1 โคโลนี ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร LB broth (ภาคผนวก) 50 มิลลิลิตร บ่มในอ่างน้ำควบคุม อุณหภูมิแบบเขย่าที่ 37°C ความเร็ว 150-250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารเลี้ยงแบคทีเรียไปวัดค่า OD ที่ 600 นาโนเมตร แล้วเจือจางในอาหาร LB ให้มีค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.05-0.1 ก่อนนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่ 37°C ความเร็ว 150-250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง หรือให้ได้ค่า OD₆₀₀ ประมาณ 0.5 เทอาหารเลี้ยงแบคทีเรียใส่ในหลอดเซนตริฟิวจขนาด 50 มิลลิลิตร ที่แช่ในน้ำแข็ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที หลังจากเทอาหารใส่ส่วนบนทิ้ง ให้เติมสารละลาย 50 mM CaCl₂ ที่เย็นจัดลงไป 20 มิลลิลิตร ทำการผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเบาๆ และแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทสารละลายใส่ส่วนบนทิ้ง ทำซ้ำในขั้นตอนของการเติม CaCl₂ และปั่นเหวี่ยงนี้อีกครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย CaCl₂ ที่มีกลีเซอรอลเข้มข้น 20% ที่เย็นจัดลงไป 2 มิลลิลิตร ค่อยๆผสมให้เป็นเนื้อเดียวโดยใช้ปิเปต จากนั้นแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที และทำ

การแบ่งสารละลาย competent *E. coli* DH5 α cell ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 100 ไมโครลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70°C ทั้งนี้ประสิทธิภาพในการ transformation ของ competent cell จะลดลงตามระยะเวลาในการเก็บรักษา

7.6.2 การ Transformation

ก่อนที่จะนำพลาสมิดเข้าสู่ competent cell ที่เตรียมไว้ให้นำชิ้นส่วนของ sucrose synthase cDNA ที่เพิ่มปริมาณขึ้นจากการทำ PCR มาเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pGEM[®]-T (Promega, ภาพผนวกที่ 6) โดยในปริมาตรสุทธิ 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย cDNA ของ sucrose synthase 1 ไมโครลิตร 2X Rapid ligation buffer 5 ไมโครลิตร pGEM[®]-T vector 0.5 ไมโครลิตร และ T4 DNA ligase 1 ไมโครลิตร ทำการบ่มข้ามคืนไว้ที่อุณหภูมิ 16°C เพื่อให้ชิ้นส่วนของ cDNA เชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pGEM[®]-T

นำพลาสมิดที่ได้ 5 ไมโครลิตร เติมนลงในหลอดที่บรรจุ competent cell *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α 100 ไมโครลิตร และนำไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ทำ heat shock โดยจุ่มหลอดลงในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 42°C เป็นเวลา 1 นาที (ห้ามเขย่า) แล้วย้ายมาแช่น้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติมอาหาร SOC (ภาคผนวก) ปริมาตร 900 μl ลงไปในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันและบ่มในอ่างน้ำแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนดูดสารละลายเซลล์ที่บ่มแล้วมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB (ภาคผนวก) ที่เคลือบผิวหน้าไว้ด้วยยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สาร X-gal 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสาร IPTG 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่มีพลาสมิดสายผสม โดยใช้การคัดเลือกจากสีของโคโลนี ทั้งนี้โคโลนีใดที่กล่าวว่ามีพลาสมิดสายผสมอยู่จะมีสีขาว สำหรับโคโลนีใดที่ไม่มีพลาสมิดสายผสมจะเป็นสีน้ำเงิน (blue/white screening)

7.6.3 การตรวจสอบยีน sucrose synthase ในพลาสมิด

เนื่องจากโคโลนีที่เห็นเป็นสีขาวอาจมีหรือไม่มีชิ้นส่วนของยีน sucrose synthase จึงต้องตรวจสอบเพื่อยืนยันว่าโคโลนีสีขาวที่เห็นมีชิ้นส่วนของยีน sucrose synthase โดยสุ่มเลือกโคโลนีสีขาวมากระจายเซลล์ในน้ำกลั่น 30 ไมโครลิตร และนำไปตรวจสอบโดยการทำ PCR ซึ่งในปริมาตรสุทธิ 10 ไมโครลิตร ที่ใช้ในการทำ PCR ประกอบไปด้วย สารละลายเซลล์ 2 ไมโครลิตร 10X reaction buffer (ที่มี 20 mM MgCl_2) 1 ไมโครลิตร 2 mM dNTP 1 ไมโครลิตร SuSy Sense และ Anti-sense Primer อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร และ YEA DNA polymerase 0.08 ไมโครลิตร เริ่มปฏิกิริยา PCR ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาต่อไปอีก 40 รอบ เริ่มจาก Denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 47°C

เป็นเวลา 1 นาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1 นาที เมื่อครบ 40 รอบแล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์ ตรวจสอบผลโดยทำอิเล็กโทร-โฟริซิสในอะกาโรสเจลเข้มข้น 1% (w/v) และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เปรียบเทียบขนาดของชิ้น ดีเอ็นเอ ที่ได้กับ 1 Kb Plus DNA Ladder

หลังจากทำอิเล็กโทรโฟริซิสแล้วพบว่าสารละลายเซลล์จากโคโลนีใดให้แถบ ดีเอ็นเอตามขนาดที่คาดไว้ ให้นำสารละลายเซลล์ของโคโลนีนั้นไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ซึ่งมียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินอยู่ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดังกล่าวจะสังเกตเห็นว่าสารละลายเซลล์จะ ชุ่น ซึ่งสามารถนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้ในการสกัดพลาสมิดต่อไป ในกรณีที่ต้องการ เก็บพลาสมิดไว้ให้นำสารละลายเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว LB ซึ่งมียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินอยู่ มาปรับปริมาตรให้เป็น 1 มิลลิลิตร โดยเติมอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไป จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง ซึ่ง สารละลายจะชุ่น หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงให้เซลล์แตกที่เรียดกตะกอน เทสารละลายใส่ทิ้ง และเติมอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไป 500 ไมโครลิตร และเติมกริเชอรอล 30% ลงไปอีก 500 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

7.7 การสกัดพลาสมิดและการหาลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนของยีน sucrose synthase

การสกัดพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของยีน sucrose synthase ออกจาก *E. coli* เซลล์นั้นใช้ชุด น้ำยา QIA prep[®] Spin Miniprep Kit (QIAGEN) และทำตามขั้นตอนต่างๆที่ระบุอยู่ในชุดน้ำยา ดังกล่าว เก็บพลาสมิดที่ได้ที่อุณหภูมิ -20°C ก่อนนำไปหาลำดับเบส โดยใช้เครื่อง ABI 3100 Genetic Analyzers และใช้ชุดน้ำยา BigDye[®] Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit จากนั้นนำ ลำดับเบสของยีนที่คาดว่าจะเป็ยีน sucrose synthase ที่ได้ไปค้นหว่าเหมือนกับลำดับเบสของยีนใดในฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BlastN ในเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> และใช้ โปรแกรม ClustalW จากเว็บไซต์ <http://www.ebi.ac.uk> ในการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสที่ได้จากการศึกษาและลำดับเบสที่ได้จากการใช้โปรแกรม BlastN ว่ามีความเหมือนกับยีนใด

นำลำดับเบสบางส่วนของยีน sucrose synthase ที่ได้จากการศึกษา ไปแปลเป็นกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรมในเว็บไซต์ <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/seq-util.html> และนำ ลำดับของกรดอะมิโนที่คาดว่าจะเป็โปรตีนของ sucrose synthase ที่ได้ไปค้นหว่าเหมือนกับ ลำดับของกรดอะมิโนของโปรตีนใดในฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BlastP ในเว็บไซต์

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> และใช้โปรแกรม ClustalW จากเว็บไซต์ <http://www.ebi.ac.uk> ในการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการศึกษาและลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการใช้โปรแกรม BlastP