

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 คัดเลือกยูคาลิปตัสโคลนทนเค็มและอ่อนแอต่อสภาวะเครียดจากโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

การศึกษานี้เป็นการทดลองเบื้องต้นเพื่อคัดเลือกยูคาลิปตัสโคลนทนเค็มและโคลนอ่อนแอ สำหรับใช้ในการทดลองที่ 2

1.1 การเพาะเลี้ยงพืช

ใช้กล้าไม้ยูคาลิปตัสอายุ 2 เดือน จากบริษัทสยามฟอเรสทรี จำกัด จำนวน 6 โคลน ดังนี้ โคลน C1 และ C2 เป็นสายพันธุ์การค้า โคลน C3 และ C4 เป็นสายพันธุ์อ่อนแอ โคลน C5 และ C6 คัดเลือกมาจากพื้นที่ดินเค็ม (อำเภอบรบือ จังหวัดมหาสารคาม) ปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตร Hoagland (Hoagland and Arnon, 1950) เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นให้โซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ ได้แก่ 0 (control), 100 และ 200 mM ไปพร้อมกับสารละลาย Hoagland เปลี่ยนสารละลาย Hoagland ตามตารางที่กำหนดทุกสัปดาห์

1.2 ศึกษาการเจริญเติบโต

เก็บข้อมูลการเจริญเติบโต และอัตราการอยู่รอดของยูคาลิปตัส โดยเก็บตัวอย่างที่ 14 และ 28 วัน หลังจากย้ายปลูก วัดมวลชีวภาพโดยแยกเป็นส่วนต่าง ๆ ได้แก่ ใบ ต้น และ ราก ซึ่งมวลสดแต่ละส่วนของพืช จากนั้นนำตัวอย่างพืชไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จนน้ำหนักแห้งคงที่แล้วจึงชั่งน้ำหนัก

1.3 การคัดเลือกยูคาลิปตัส

การคัดเลือกยูคาลิปตัสพิจารณาจากการเจริญเติบโต และอัตราการอยู่รอดของยูคาลิปตัสทั้ง 6 โคลน โดยคัดเลือกโคลนที่มีการเจริญเติบโตดีและมีอัตราการอยู่รอดสูงสุดสองลำดับแรกให้เป็นตัวแทนโคลนทนเค็ม และโคลนที่มีการเจริญเติบโตต่ำและมีอัตราการอยู่รอดต่ำสุดเป็นตัวแทนโคลนอ่อนแอ จำนวน 1 โคลน

การทดลองที่ 2 การศึกษาการแสดงออกของยีนและโปรตีนภายใต้สภาวะเครียดจากโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

2.1 การเพาะเลี้ยงพืช

เพาะเลี้ยงกล้าไม้ยูคาลิปตัสอายุ 2 เดือน ที่ได้รับการคัดเลือกจากการทดลองที่ 1 จำนวน 3 โคลน ในสภาพเดียวกับการทดลองที่ 1.1 โดยเก็บตัวอย่างที่ 7, 14 และ 21 วัน หลังจากย้ายปลูก เพื่อ

2.1.1 ศึกษาการเจริญเติบโตเช่นเดียวกับการทดลอง 1.2

2.1.2 ใช้ในการสกัด total RNA และโปรตีน โดยเก็บส่วนใบสด นำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะพร้อมสกัด

2.2 ศึกษาการแสดงออกของยีน Cu/Zn SOD และ APX

2.2.1 การสกัด total RNA

สกัด total RNA จากใบยูคาลิปตัส (ข้อ 2.1.2) เพื่อใช้ในการเพิ่มชิ้นส่วนของยีน Cu/Zn SOD และ APX และใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี northern blot analysis ในขั้นตอนการสกัด total RNA ทำการทดลอง ณ อุณหภูมิห้อง ยกเว้นบางขั้นตอนที่ได้กำหนดเป็นอุณหภูมิอื่น โดยดัดแปลงจากวิธีของ Salzman *et al.* (1990) มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1) บดใบยูคาลิปตัส 2 g ในไนโตรเจนเหลวให้เป็นผงละเอียด ถ่ายตัวอย่างที่บดแล้วลงใน centrifuge tube ขนาด 50 ml ที่มี RNA extraction buffer (4 M guanidine thiocyanate, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 25 mM sodium citrate pH 8.0, 0.5 % N-lauryl sarcosine) ปริมาตร 10 ml จากนั้นเติม polyvinylpyrrolidone (PVP) 0.1 g และ 2-mercaptoethanol 200 μ l ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปมา จากนั้นเติม chloroform:isoamyl alcohol (24:1) 10 ml ผสมให้เข้ากัน 5-10 นาที

2) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนใสชั้นบน ถ่ายลงสู่ centrifuge tube ใหม่ เติม absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่า และ 5 M NaCl 0.1 เท่าของ supernatant ที่ได้ และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

3) ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนใน DEPC-treated H_2O 10 ml และ เติม phenol:chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) ในปริมาณที่เท่ากัน และผสมให้เข้ากัน 5-10 นาที

4) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนใสชั้นบนโดยถ่ายลงสู่ centrifuge tube ใหม่ เติม absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่า และ 5 M NaCl 0.1 เท่าของ supernatant ที่ได้ และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

5) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ละลายตะกอนใน DEPC-treated H_2O 500 μ l จากนั้นนำสารละลายถ่ายลงสู่หลอด microtube ขนาด 1.5 ml ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ml และเติม 8 M LiCl 333 μ l หลังจากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

6) ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และล้างตะกอนด้วย 70 % ethanol 500 μ l จากนั้น ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งส่วน supernatant ตกตะกอนให้แห้ง และละลายตะกอน total RNA ด้วย DEPC-treated H_2O 100 μ l

7) ตรวจสอบความเข้มข้นของ total RNA โดยใช้ Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 nm (A_{260} และ A_{280}) แล้วคำนวณความเข้มข้นของสารละลาย total RNA จากสูตรต่อไปนี้

$$1.0 A_{260} = 40 \mu\text{g/ml}$$

ตรวจสอบคุณภาพของกรดนิวคลีอิก โดยการหาอัตราส่วนของ A_{260}/A_{280} ถ้ามากกว่า 2.0 แสดงว่า RNA ค่อนข้างบริสุทธิ์ และสามารถนำไปวิเคราะห์ขั้นต่อไป

2.2.2 การโคลนชิ้นส่วนของยีน Cu/Zn SOD และ APX (Cloning)

การโคลนชิ้นส่วนของยีนเป็นการเพิ่มปริมาณยีนที่สนใจโดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1) ออกแบบและสังเคราะห์ primer สำหรับยีน Cu/Zn SOD และ APX

การออกแบบ primer โดยนำลำดับเบสของยีน Cu/Zn SOD และ APX จากพืชชนิดต่าง ๆ ในฐานข้อมูลลำดับเบส GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) มาเทียบเรียง (alignment) เพื่อหาช่วงลำดับอนุรักษ์ (conserved region หรือ consensus) ของยีนทั้ง 2 ชนิด โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk>) จากนั้นจึงทำการออกแบบ primer ให้มีลำดับเบสที่เหมือนกับลำดับเบสของยีนในช่วงลำดับอนุรักษ์และให้มีองค์ประกอบต่าง ๆ ตรงกับ parameter ที่ต้องการเช่น ความยาว primer ความยาวของชิ้น PCR Tm ของ primer เบสที่ปลาย 3' ของ primer เป็นต้น primer ของยีน Cu/Zn SOD สังเคราะห์โดยหน่วยบริการชีวภาพศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) และ primer ที่ใช้การสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน APX สังเคราะห์โดย บริษัท Macro Gen ประเทศเกาหลี

การออกแบบและสังเคราะห์ primer เพื่อนำไปใช้ในการสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน Cu/Zn SOD และ APX

2) การสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน

การสังเคราะห์ชิ้นส่วนของยีน (cDNA) จาก RNA โดยใช้วิธี Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยใช้ Super Script III One Step RT-PCR (บริษัท Invitrogen) โดยเติม 2X Reaction mix 25 μ l, template RNA (0.01 pg-1 μ g) 1 μ l จากข้อ 2.2.1), primer (forward primer 1 μ l, reverse primer 1 μ l จากข้อ 2.2.2) , Super Scrip III RT/Platinum Taq 2 μ l และเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 20 μ l ปริมาตรรวม 50 μ l ปฏิบัติการแบ่งเป็น 4 ช่วง คือ ช่วงที่ 1 ใช้อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ช่วงที่ 2 อุณหภูมิ 94

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที ช่วงที่ 3 มี 30 รอบ แต่ละรอบประกอบด้วยการใช้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และช่วงที่ 4 ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

ตรวจสอบชิ้นส่วนของยีน Cu/Zn SOD และ APX ที่ได้จากการทำ RT-PCR ด้วยวิธี electrophoresis โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 1 % ใน TBE buffer (89 mM Tris-borate และ 2 mM EDTA) ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 40 นาที หลังจากนั้นย้อมด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5-1.0 µg/ml นาน 10 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น และในขั้นตอนสุดท้ายตรวจสอบ cDNA บน UV light และถ่ายรูป

3) การเชื่อมชิ้นส่วนของยีนกับพลาสมิด (Ligation reaction)

นำชิ้นส่วนของยีน (cDNA) ที่ได้จากการทำ RT-PCR มาแยกนิวคลีโอไทด์ขนาดเล็กที่ไม่ต้องการ โปรตีน และเกลือ ออกด้วย QIAquick PCR purification kit (บริษัท QIAGEN สหรัฐอเมริกา) โดยเติม PB buffer ปริมาตรเป็น 5 เท่าของ PCR products และผสมให้เข้ากันบรรจุลงในคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วย PE buffer 750 µl นำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที 2 ครั้ง เพื่อให้คอลัมน์แห้ง เติม TE 50 µl และปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ cDNA บริสุทธิ์ จากนั้นนำ cDNA มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM-T Easy Vector System โดยทำปฏิกิริยาดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงปฏิกิริยาการเชื่อมต่อ DNA กับพลาสมิด ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

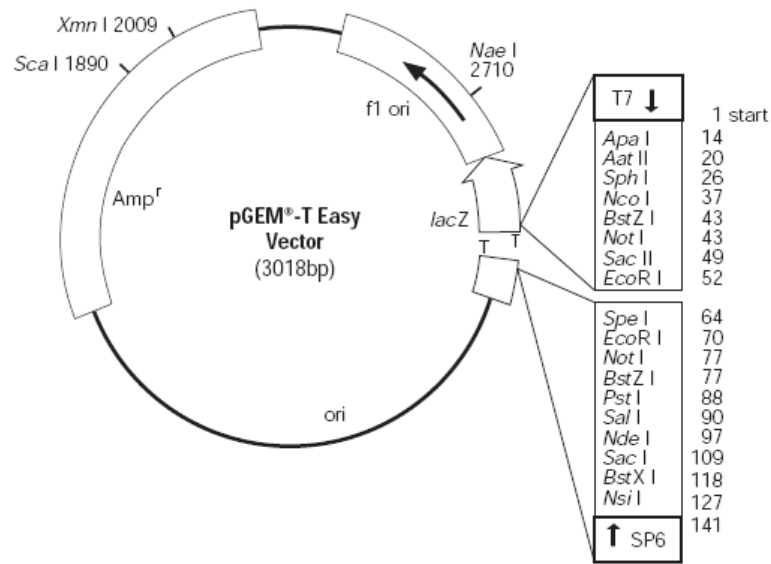
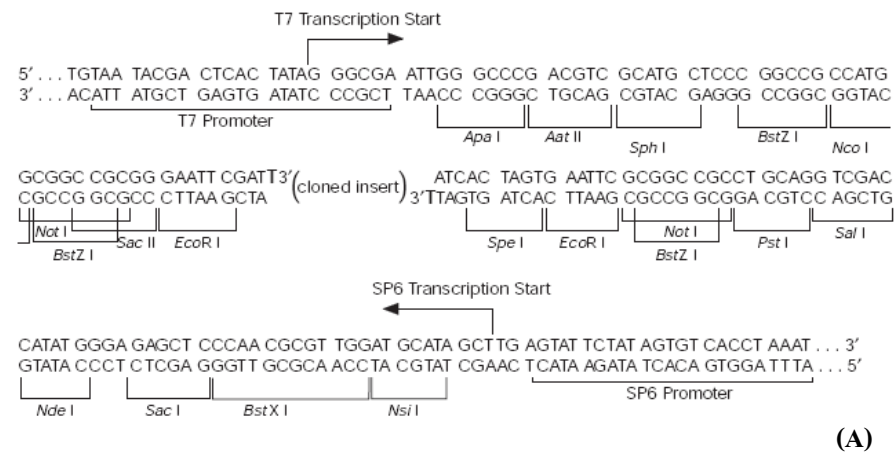
สารที่ใช้ในปฏิกิริยา	Standard reaction	Positive control
2X Rapid ligation buffer	5 µl	5 µl
pGEM®-T Easy Vector (50 ug)	1 µl	1 µl
PCR product	*	-
T4 DNA ligase (3 Weiss Units/ul)	1 µl	1 µl
Deionized water ปรับปริมาตรให้เป็น	10 µl	10 µl

ที่มา: Promega corporation (2000)

* PCR product

ปริมาณของ DNA ที่ใช้เชื่อมต่อกับพลาสมิดเท่ากับ 3:1 ซึ่งคำนวณได้จากสูตรต่อไปนี้

$$\text{DNA (ng)} = \frac{\text{พลาสมิด (ng)} \times \text{ขนาดของ DNA (kb)} \times \text{อัตราส่วนของ DNA กับ พลาสมิด}}{\text{ขนาดของพลาสมิด (kb)}}$$



ภาพที่ 2 แสดง Promoter และ Multiple cloning sequence ของ pGEM®-T Easy Vectors (A) และ pGEM®-T Easy Vector Circle Maps (B)

ที่มา: Promega technical manual for pGEM-T Easy Vector System

4) การนำพลาสมิดเข้าสู่ Competent cell (Transformation)

นำพลาสมิดที่เชื่อมต่อกับชิ้นส่วนของยีน 5 μ l ใส่ลงในหลอดที่มี competent cell 100 μ l (ตารางผนวกที่ 6) ผสมให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็ง 30 นาที และให้ความร้อนทันที (heat shock) โดยจุ่มลงในน้ำร้อนที่ควบคุมอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วจึงนำไปแช่ในน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติมอาหารสูตร SOC (ตารางผนวกที่ 7) 500 μ l และนำไปบ่มใน shaker incubator ที่ความเร็ว 150 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำสารละลายเซลล์แบคทีเรีย 200 μ l มา spread บนอาหาร สูตร LB ที่มี ampicilin 100 μ g/ml X-Gal 40 μ g/ml และ IPTG 4 μ g/ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือก colony สีขาวซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ได้รับการ transformation มาเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร LB (ตารางผนวกที่ 7) ปริมาตร 1 ml ที่มี ampicilin 100 μ g/ml บ่มในเครื่อง shaker incubator ที่ความเร็ว 150 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการสกัดพลาสมิด

5) การสกัดพลาสมิด

การสกัดพลาสมิด ดัดแปลงจากวิธีของ Sambrook *et al.* (1989) โดยนำสารละลายแบคทีเรียใส่ลงใน microtube ขนาด 1.5 ml เพื่อปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH8, 10 mM EDTA และ 2 mg/ml lysozyme) ที่เย็นจัด 100 μ l ลงในตะกอนที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงผสมแรง ๆ ให้เข้ากันจนตะกอนละลายหมด แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที เติม solution II (0.2 N NaOH และ 1% SDS) ที่เย็นจัด 200 μ l ผสมแรง ๆ ให้เข้ากันจนตะกอนละลายหมด แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที เติม solution III (3 M NaOAc pH 4.8) ที่เย็นจัด 150 μ l ผสมให้เข้ากันจนกระทั่งสารละลายเป็นสีขาว และแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสใส่หลอด microtube ใหม่ เติม absolute ethanol เป็นปริมาตร 2 เท่าของสารละลายที่ได้ เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 6,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ล้างตะกอนด้วย 70 % ethanol ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทิ้ง ตากตะกอนให้แห้ง และละลายตะกอนด้วย TE buffer 15 μ l

6) การวิเคราะห์สายลำดับเบส (DNA Sequencing)

วิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนของยีน Cu/Zn SOD และ APX ที่เชื่อมต่อกับพลาสมิด โดยบริษัท Macro Gen ประเทศเกาหลี และนำลำดับเบสทั้งสองที่ได้มาเปรียบเทียบกับยีนในฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม Blast X และ Blast N (NCBI) และใช้โปรแกรม ClustalW ในการเทียบเรียงลำดับเบส ชิ้นส่วนของยีน Cu/Zn SOD และ APX ของยูคาลิปตัสกับพืชชนิดอื่น จากนั้นก็จะใช้ primer และชิ้นส่วนของยีน Cu/Zn SOD และ APX ที่เชื่อมต่อกับพลาสมิดในการสังเคราะห์ probe

7) การเตรียม DNA probe

การเตรียม probe ของยีน Cu/Zn SOD และ APX โดยการทำปฏิกิริยา PCR กับพลาสมิดที่สกัดและใช้ primer ที่ออกแบบ โดยวิธี DIG incorporation duration PCR ใช้ Dioxigenin 11 dUTP เป็นตัวติดคลอโรเอมเอ ตามวิธีการของบริษัท Roche เพื่อใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน Cu/Zn SOD และ APX โดยใช้เทคนิค northern blot analysis

8) การตรวจสอบการแสดงออกของยีน Cu/Zn SOD และ APX

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน Cu/Zn SOD และ APX โดยใช้เทคนิค northern blot analysis ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้ เตรียม RNA บนไนลอนเมมเบรน โดยนำ total RNA จากยูคาลิปตัส 20 µg จากการทดลองที่ 2.2.1 มาแยกสาย RNA ด้วยวิธี electrophoresis /formaldehyde gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel 1 % ประกอบด้วย agarose 1 g ในน้ำ 74 ml, 10X MOPS 10 ml ที่เย็นจัด และ 16 ml ของ 37 % formaldehyde ใช้กระแสไฟฟ้า 50 Volt เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 30 นาที ล้างเจลด้วย 20X SSC 2 ครั้ง จากนั้น transfer RNA ลงในเมมเบรน (บริษัท Roche) ด้วยแรง capillary โดยใช้ 20X SSC ทั้งไว้ข้ามคืน ทำเครื่องหมายที่เมมเบรนแล้วค่อย ๆ ดึงเมมเบรนออกจากเจล หายเมมเบรนด้านที่มี RNA ขึ้น ล้างเมมเบรนด้วย 2X SSC และ อบเมมเบรนให้แห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ใส่เมมเบรนที่แห้งลงในถุงพลาสติกเติม pre-hybridization buffer และปิดผนึกถุงให้แน่น จากนั้นทำ pre-hybridization ใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ขณะรอ pre-hybridization ให้ต้ม probe 10 นาที และแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที เติม probe ลงในสารละลาย pre-hybridization ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ให้ท่วมเมมเบรน จากนั้นนำเมมเบรนออกจาก water bath ตัดมุมถุงที่มีเมมเบรน เทสารละลาย pre-hybridization buffer ออก และเติมสารละลาย pre-hybridization ที่มี probe ลงในถุงที่มีเมมเบรน ผนีกถุงปิดให้แน่นสนิท นำถุงไปเก็บที่ water bath แบบเขย่าที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ทิ้งให้เกิดการ pre-hybridization เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นล้างเมมเบรนด้วย 20X SCC ที่มี 0.1 % SDS 100 ml 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และล้างด้วย 0.5X SCC 100 ml 1 ครั้ง ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ทำการตรวจสอบโดยล้างเมมเบรนด้วย maleic buffer แล้ววางเมมเบรนลงใน 10 X blocking solution เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำเมมเบรนใส่ในถุงพลาสติก เติม antibody solution (anti-digoxigenin-AP เจือจางใน 1X blocking solution 1: 10,000) 10 ml และปิดผนึกให้แน่นสนิท บ่มไว้ 30 นาที ขั้นตอนต่อไปนำเมมเบรนถ่ายลงสู่กล่องพลาสติก และล้างเมมเบรนด้วย maleic buffer 100 ml 2 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที แล้วล้างเมมเบรนด้วย detection buffer อีก 1 นาที แล้วบ่มด้วย CDP-STAR solution (Chemiluminescent substrate CDP-Star™ (บริษัท Roche) เจือจางใน detection buffer 1:400) เป็นเวลา 15 นาที ชับเมมเบรนด้วยกระดาษกรอง แล้วจึงห่อเมมเบรนด้วยพลาสติก ไล่ฟองอากาศออกให้หมด และใช้เทปใสยึดติดกับ X-Ray cassette ขั้นตอนต่อไปนี้ทำในห้องมืด ประกบแผ่นฟิล์มเอ็กซ์เรย์ (บริษัท Kodak) เข้ากับเมมเบรนที่ยึดติดกับ X-Ray cassette ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที นำแผ่นฟิล์มเอ็กซ์เรย์แช่ใน developer solution (บริษัท Kodak) เป็นเวลา 5 นาที และแช่ใน fixer solution (บริษัท Kodak) เป็นเวลา 5 นาที นำไปล้างโดยให้น้ำไหลผ่านนานประมาณ 5 นาที ผึ่งแผ่นฟิล์มให้แห้ง แล้วตรวจดูแถบสีดำที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์มและวิเคราะห์ผล

2.3 ศึกษาโปรตีนที่มีการแสดงออกอย่างเด่นภายใต้สภาวะเครียดจากโซเดียมคลอไรด์

2.3.1 การสกัดโปรตีน

ดัดแปลงจากวิธีของ Cabral and Carvalho (2001) โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

- 1) บดใบยูคาลิปตัส 2 g (จากข้อ 2.1.2) ในไนโตรเจนเหลวให้เป็นผงละเอียดถ่ายตัวอย่างที่บดแล้วลงใน microtube ขนาด 1.5 ml ที่บรรจุ saline buffer (25 mM

NaH_2PO_4 pH7, 250 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM thiourea, 10 mM DTT, 1 mM PMSF และ 1.5 % PVP) 1 ml ผสมให้เข้ากัน โดยใช้เครื่อง shaker ที่ความเร็ว 150 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

2) ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ทำซ้ำ 2 รอบ โดยเก็บ supernatant ลงสู่ microtube ใหม่ จากนั้นเติม absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของสารละลายที่ได้

3) ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เติ supernatant ที่ละลายตะกอนด้วย suspension buffer (8 M urea, 2 M thiourea และ 2 % triton X 100) 100 ml

4) วิเคราะห์หาปริมาณของโปรตีนโดยวิธีของแบรดฟอร์ด (Robertson *et al.*, 1997) และใช้ bovine serum albumin เป็นโปรตีนมาตรฐาน

2.3.2 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

แยกโปรตีน 5 μg ของใบยูคาลิปตัส จากข้อ 2.3.1 โดยวิธี SDS-PAGE (10% separating gel และ 4% stacking gel) ตามวิธีการของ Laemmli การทำ electrophoresis โดยใช้กระแสไฟฟ้าเริ่มต้น 40 Volt เป็นเวลา 30 นาที และ 100 Volt จนกระทั่ง tracking dye เคลื่อนที่ไปยังปลายสุดของเจล หลังจากนั้นย้อมสีด้วย colloidal coomassie staining

2.3.3 หาลำดับกรดอะมิโนของโพลีเปปไทด์ที่มีการแสดงออกอย่างเด่นชัดใน ยูคาลิปตัสเมื่อได้รับไซโตไคนมคลอไรด์ และตรวจสอบลำดับกรดอะมิโนที่ได้กับฐานข้อมูล

เลือกแถบของโพลีเปปไทด์ จากข้อ 2.3.2 ที่เข้มข้นอย่างเห็นได้ชัดใน ยูคาลิปตัสโคลนทนต์เมื่อได้รับไซโตไคนมคลอไรด์ โดยเปรียบเทียบกับ control จากนั้นตัดแถบของ โพลีเปปไทด์จำนวน 2 แถบที่ต้องการจาก polyacrylamide gel เพื่อหาลำดับกรดอะมิโนของ โพลีเปปไทด์ทั้ง 2 ตำแหน่ง โดยใช้วิธี Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) (Finnigan LTQ linear ion trap mass spectrometer บริษัท Thermo electron) โดยหน่วยบริการ

ชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTECH) และตรวจสอบลำดับ
กรดอะมิโนที่ได้กับฐานข้อมูลโปรตีน nrFASTA

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการ Plant Physio-Molecular Biology ศูนย์ปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

ศูนย์วิจัยพืชผักเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

บริษัทสยามฟอเรสทรี จำกัด 99 หมู่ 6 ตำบลวังศาลา อำเภอนาทม จังหวัดกาญจนบุรี

ระยะเวลาในการทดลอง

การทดลองเริ่มเมื่อเดือนมีนาคม 2548 และสิ้นสุดเมื่อเดือนมีนาคม 2549