บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. วัสดุการทดลอง

1.1 เมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ

เมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ได้รับความอนุเคราะห์จากสถานีทดลองข้าว จ. ขอนแก่น

1.2 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการโคลนยีน ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Renkichi TAKATA

1.3 ดีเอ็นเอพาหะ

1.3.1 ดีเอ็นเอพาหะ pGEM®-T Easy vector, (Promega, USA)

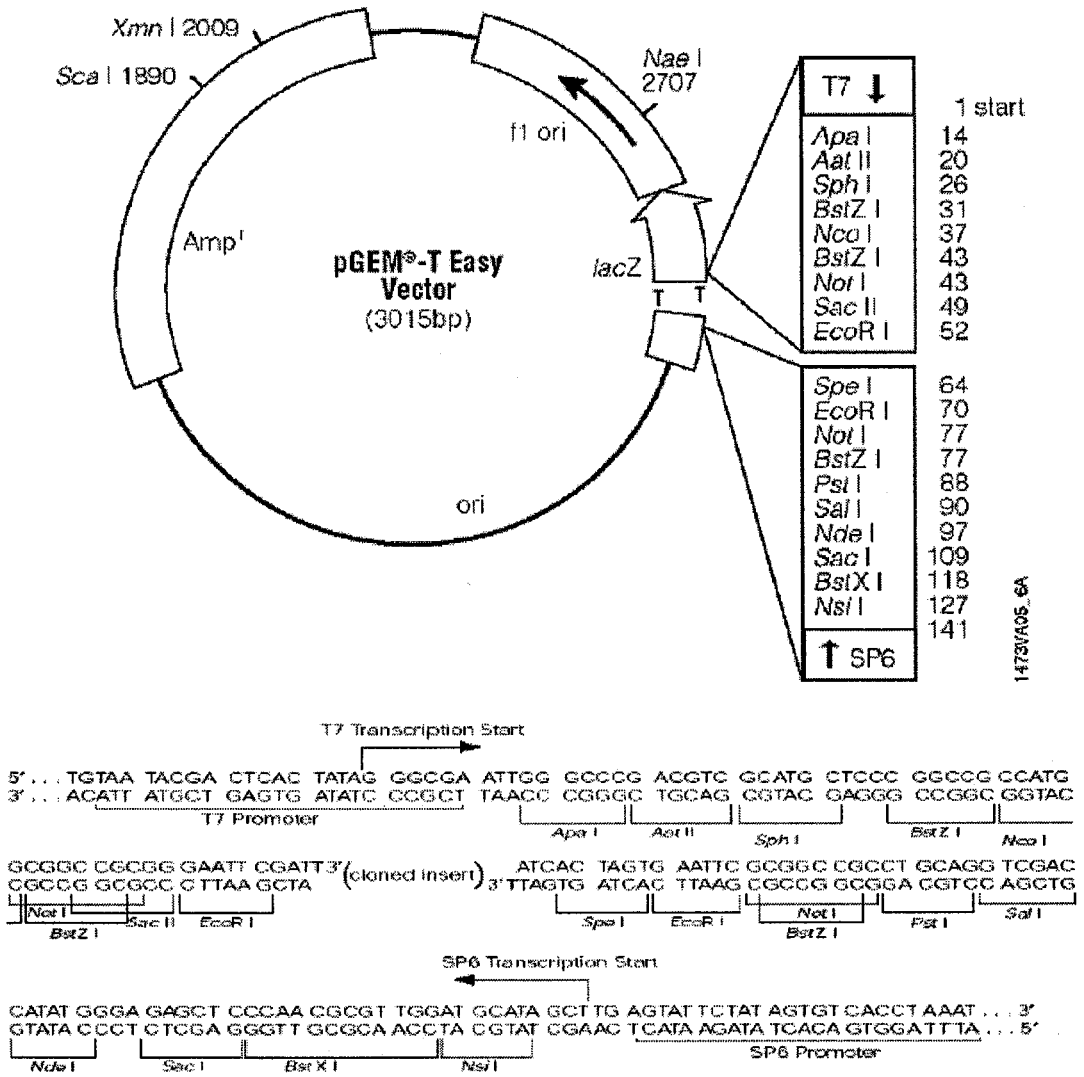
ดีเอ็นเอพาหะ pGEM®-T Easy vector อยู่ในรูปของเส้นตรง มี T-overhang ที่ปลาย 3' ซึ่งมีความจำเพาะต่อ A-overhang ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์โดยใช้เอนไซม์ Taq DNA polymerase แผนที่ยีนของดีเอ็นเอพาหะ pGEM®-T Easy vector แสดงดังภาพที่ 6

1.4 เอนไซม์

1.4.1 เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการทดลองและบริเวณตัดจำเพาะแสดงดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ชนิดของเอนไซม์และตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ

เอนไซม์ตัดจำเพาะ	บริเวณตัดจำเพาะ
*Bam*HI	G↓GATCC
*Eco*RI	G↓AATTC
*Hin*dIII	A↓AGCTT
*Pst*I	CTGCA↓G
*Xba*I	T↓CTAGA



ภาพที่ 6 แผนที่ยีนของดีเอ็นเอพาหะ pGEM®-T Easy vector (Promega, USA)

1.4.2 เอนไซม์ที่ใช้ในการแยกสกัดดีเอ็นเอและใช้สำหรับโคลนยีน

เอนไซม์ที่ใช้ในการแยกสกัดดีเอ็นเอและใช้สำหรับโคลนยีน ประกอบด้วย Calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP), T4 DNA ligase, Taq DNA polymerase, Proteinase K และ Ribonuclease A (RNase A) เอนไซม์ทั้งหมดใช้ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต

1.5 โปรตีนมาตรฐาน (Protein Marker) และช่วงของแถบโปรตีนมาตรฐาน

โปรตีนมาตรฐานที่ใช้ คือ P7707S ประกอบด้วยชิ้นส่วนโปรตีน 8 ชิ้น (หน่วย ดาลตัน; 175000, 83000, 62000, 47500, 32500, 25000, 16500 และ 6500)

1.6 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA Marker)

ดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้ คือ λ*Hin*dIII และ 100 bp DNA Ladder ดีเอ็นเอมาตรฐาน λ*Hin*dIII ประกอบด้วยชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้งหมด 8 ชิ้น (หน่วย base pairs; 23130, 9416, 4361, 2322, 2027, 564 และ 125) ส่วน 100 bp DNA Ladder ประกอบด้วยชิ้นส่วนดีเอ็นเอทั้งหมด 14 ชิ้น (หน่วย base pairs; 3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 และ 100)

1.7 ชุดสำเร็จรูป

ชุดสำเร็จรูปทั้งหมดที่ใช้ในการทดลอง แสดงดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 รายชื่อชุดสำเร็จรูปที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อชุดสำเร็จรูป	แหล่งที่มา/ผู้ผลิต
Taq PCR Core Kit	QIAGEN, Germany
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Germany
QIAGEN PCR Cloning Kit	QIAGEN, Germany
Rapid Ligation and Transformation Kit	QIAGEN, Germany
OneStep RT-PCR	QIAGEN, Germany
Gene Images AlkPhos Direct Labeling and Detection System	Amersham pharmacia biotech, England
Coomassie Plus™ Protein Assay Kit	PIERCE, USA

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 สภาวะในการเพาะเมล็ดข้าวและการให้เกลือ (ดัดแปลงวิธีการของ Powar and Mehta, 1995)

ทำการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดข้าวด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ 5% เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น แช่เมล็ดข้าวในน้ำกลั่นประมาณ 24 ชั่วโมง และเก็บเมล็ดข้าวไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งเมล็ดข้าวเริ่มงอก นำต้นข้าวที่มีอายุ 10 วัน ไปเพาะในสารละลายธาตุอาหารที่ใส่ในกระบะ (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 X 35 X 14 เซนติเมตร) และมีสารละลายธาตุอาหารประมาณ 12 ลิตร ที่ไม่มีการเติมเกลือ ทำการเปลี่ยนสารละลายธาตุอาหารใหม่ที่เตรียมโดยการเจือจาง stock ของสารละลายธาตุอาหารด้วยน้ำกลั่นที่อัตราส่วนของสารละลายธาตุอาหารที่แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 1:3, 1:2 และ 1:0 ปรับ pH ให้เท่ากับ 5.0 เพาะต้นกล้าข้าวให้เจริญอยู่ภายใต้สภาวะเรือนกระจก เป็นเวลานาน 9 วัน การเติมเกลือจะทำการเติมโซเดียมคลอไรด์และทำให้เป็นสารละลายธาตุอาหารมาตรฐานที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 25, 50, 75, 100, 150 และ 200 mM ภายหลังจากการเติมเกลือเป็นเวลานาน 5 วัน ทำการเก็บตัวอย่างต้นข้าวเพื่อนำไปวิเคราะห์โดยทำการชั่งน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของยอดและรากของต้นข้าว การวิเคราะห์หาน้ำหนักแห้งจะทำภายหลังจากการอบต้นข้าวเป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 ^{o}C

2.2 การแยกสกัดโปรตีนและการศึกษาแบบแผนของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

นำตัวอย่างต้นข้าวไปบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว เติมสารละลาย grinding ซึ่งประกอบด้วย 1M Tris-HCl pH 8.5, 2M sucrose และ 2-mercaptoethanol ดูดสารละลายที่ได้นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 rpm เป็นเวลานาน 10 นาที ทำการแยกเอาเฉพาะส่วนใสเก็บไว้ที่ -20 ^{o}C จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์ ส่วนใสที่ได้นำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford (1996) ด้วย Coomassie plus ^{TM} Protein Assay kit (PIERCE, USA) โดยใช้ Bovine serum (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน ตัวอย่างโปรตีนนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ด้วยวิธีการของ Laemmli (1970) การทำอิเล็กโตรโฟรีซีสจะใช้ Bio-Rad Mini PROTEIN II electrophoresis cell ในการวิเคราะห์ ทำการเตรียม Separating gel (ภาคผนวก จ) เทลงในชุดประกอบแผ่นเจล โดยเหลือช่องไว้สำหรับ stacking gel (ประมาณ 1 cm.) เทน้ำกลั่นลงไปทันทีบนส่วนเหนือสุดของสารละลายอะคริลาไมด์ ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลานาน 30 นาที เพื่อให้เจลแข็งตัว เทน้ำกลั่นออก และซับน้ำส่วนที่เหลือออกโดยใช้กระดาษกรอง Whatman 3 MM ทำการเตรียม Stacking gel (ภาคผนวก จ) ส่วนบนสุดของ separating gel เสียบหวีลงไปและทั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว ประมาณ 20-30 นาที เท 1xSDS running buffer ลงไปในหลุมเจล (ดูวิธีเตรียมภาคผนวก จ) ก่อนที่จะทำการโหลดสารละลายโปรตีน ตัวอย่างสารละลายโปรตีน (ปริมาณ 30 ไมโครกรัม) ทำการเตรียมโดยผสมกับ loading buffer และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 ^{o}C เป็นเวลา 5 นาที ทำการแยกโปรตีนใน 1XSDS running buffer ที่ 50 Volt จนกระทั่ง bromophenol blue อยู่ในส่วนของ separating gel หลังจากนั้นเพิ่มความต่างศักดิ์ไฟฟ้าเป็น 200 Volt นำแผ่นเจลที่ได้ไปทำการย้อมสีด้วย Coomassoie Brilliant Blue R250 (ภาคผนวก

จ) เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างสีออกโดยการบ่มด้วยสารละลายสำหรับล้างสี (destaining) (ภาคผนวก จ) จนกระทั่งเห็นแถบโปรตีนชัดเจนจึงนำแผ่นเจลไปตรึงในสารละลายเอทานอล 10%

2.3 การถ่ายแผ่นโปรตีนลงสู่แผ่นเมมเบรน

ในการหาลำดับของกรดอะมิโนที่ปลาย N (N-terminal) ภายหลังจากการแยกแถบโปรตีนโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE ทำโดยถ่ายแถบโปรตีนลงสู่แผ่น Immubilon Polyvinylidene Difluoride (PVDF) (Millipore, USA) แช่แผ่นกระดาษกรอง Whatman 3 MM ให้เปียกชุ่มในสารละลาย blotting buffer (ภาคผนวกนวก E) เป็นเวลา 5 นาที นำไปประกบกับแผ่น Immobilon Transfer membrane (Millipore) ที่จุ่มใน 100% ethanol โดยไม่ให้มีอากาศ แผ่นเจลจะต้องไม่ทำการย้อมสีหากจะนำมาทำการถ่ายแถบโปรตีน จากนั้นทำการถ่ายแถบโปรตีนจากแผ่นเจลลงสู่แผ่นเมมเบรนด้วยกระแสไฟฟ้า 50 mA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8 ชั่วโมง นำแผ่นเมมเบรนออกจากแผ่นเจล และนำไปย้อมสีด้วยสารละลาย Ponceau S เป็นเวลานาน 10 วินาที ล้างด้วย 100% methanol ตามด้วยน้ำกลั่นอีก 2-3 ครั้ง ทำการตัดแถบโปรตีนที่สนใจและนำไปศึกษาหาลำดับกรดอะมิโนที่ปลาย N โดยใช้เครื่องวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโน ณ หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ประเทศไทย

2.4 การแยกและศึกษาคุณลักษณะบางประการของโปรตีนตอบสนองต่อความเค็มในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KDML 105)

2.4.1 การแยกสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ

ดีเอ็นเอทั้งหมดจากใบข้าวทำการสกัดโดยดัดแปลงวิธีการของ Turgeon et al. (1987) ทำการปลูกข้าวในสารละลายธาตุอาหารที่ไม่มีการเติมเกลือ NaCl เก็บตัวอย่างพืชและนำมาแยกสกัดดีเอ็นเอโดยบดใบข้าวให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว เติมสาร extraction buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA pH 8.0, 500 mM NaCl และ 10 mM mercaptoethanol) จากนั้นเติม 20% SDS ลงไป นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 ^{o}C เป็นเวลานาน 15 นาที นำส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 20 ^{o}C มาเติมสารละลาย Proteinase K ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้มาเติม 5 M Potassium acetate ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 M นำไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลานาน 30 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C ทำการตกจะกอนกรดนิวคลีอิกด้วย isopropyl alcohol แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 20 ^{o}C ลายตะกอนด้วยสารละลาย TE (pH 8.0) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นกำจัดอาร์เอ็นเอด้วยการเติมสารละลาย RNaes A นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง กำจัดโปรตีนออกโดยใช้

phenol/chloroform การทดลองทั้งหมดทำตามวิธีมาตรฐานของ Sambrook and Russell (2001) โดยการเติม phenol อิ่มตัว (pH 8.0) ที่มีปริมาตรเท่ากับสารละลายดีเอ็นเอผสมสารให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่และเติมสารละลาย phenol/chloroform ในปริมาตรที่เท่ากันลงไป ภายหลังจากการปั่นเหวี่ยงนำสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่และเติมสารละลาย chloroform/isoamyl alcohol (24:1) ในปริมาตรที่เท่ากันลงไป ภายหลังจากการปั่นเหวี่ยงสารละลายดีเอ็นเอจะอยู่ในสารละลายส่วนบนจากนั้นเติมสารละลาย absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่า เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอและเติม 2 M ammonium acetate ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอทานอล 75% ทำให้ตะกอนแห้งและละลายตะกอนด้วย TE (pH8.0) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย 1.5 M sodium chloride ที่มี 13% PEG 6000 เก็บเกี่ยวตะกอนดีเอ็นเอโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 75% ทำให้ตะกอนแห้งและละลายด้วย TE (pH 8.0) ในปริมาตร 200 ไมโครลิตร

2.4.1.2 การตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

การตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอทำโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอปริมาตร 10 ไมโครลิตร เจือจางในน้ำกลั่น 990 มิลลิลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ช่วงความยาวคลื่น 260 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้น และความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอดังนี้

โดย 1 OD_{260} (unit) = 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอสายคู่ในสารละลาย (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

$=A_{260}$ x 50 x dilution factor

2.4.1.3 การแยกสกัดอาร์เอ็นเอจากใบข้าว

ฆ่าเชื้อเมล็ดข้าวด้วย 5% คลอร็อกซ์ เป็นเวลานาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น แช่เมล็ดข้าวในน้ำกลั่นประมาณ 24 ชั่วโมง และเก็บเมล็ดข้าวไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งเมล็ดข้าวเริ่มงอก นำต้นข้าวที่มีอายุ 10 วัน ไปเพาะในกระบะ (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 X 35 X 14 เซนติเมตร) ซึ่งมีสารละลายธาตุอาหารประมาณ 12 ลิตร เก็บตัวอย่างต้นพืชและนำไปสกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้ชุดสำเร็จรูป RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany) ตามวิธีการของผู้ผลิต

2.5 การเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอของยีนควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนตอบสนองความเค็มในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ (KMDL 105)

2.5.1 การออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะจากลำดับดีเอ็นเอในส่วนอนุรักษ์ (Conserved region) ของยีน *WRKY transcription factor* ทำการสังเคราะห์ไพรเมอร์โดยบริษัท QIAGEN Operon ประเทศเยอรมันนี ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์จำเพาะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนตอบสนองความเค็มในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ (KMDL 105) แสดงดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์จำเพาะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอของยีนโปรตีนตอบสนองต่อความเค็มในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105

ชื่อ	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	ขนาด (เบส)	Tm (^{o}C)
TRFOS1	CAGAATTCGGCCRTCSTGYSSARST	25	64
TRFOS2	ACAAGCTTTGGMWCTTSTYGCTGMT	25	59

โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ทางด้านปลาย 5' (ส่วนที่ขีดเส้นใต้) ของไพรเมอร์ทั้งสองเส้นเป็นตำแหน่งจดจำ (Recognition site) สำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI และ *Hin*dIII ในขณะที่ R = A/G, S = G/C, Y = C/T, M = A/C และ W = A/T

2.5.2 การเพิ่มชิ้นดีเอ็นเอของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนตอบสนองความเค็มโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์

นำไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบและสังเคราะห์ไว้ไปใช้ในการทำปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนตอบสนองความเค็ม ใช้ genomic DNA ที่แยกสกัดได้จากข้าวเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) โดยใช้ชุดสำเร็จรูป PCR Master Mix (Promega, USA) ส่วนผสมในการทำปฏิกิริยา (Reaction mixture) ในปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วย genomic DNA จากข้าว 50 นาโนกรัม, 2X PCR Master Mix, ไพรเมอร์ชนิดละ 1 ไมโครลิตร (ตารางที่ 10) ปรับปริมาตรให้เป็น 50 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน โดยตั้งโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิดังนี้

รอบที่ 1: 95 ^{o}C เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ

รอบที่ 2: จำนวน 35 รอบ ประกอบด้วยขั้นตอนย่อยดังนี้

Step 1: 94 ^{o}C เป็นเวลา 1 นาที

Step 2: 60 ^{o}C เป็นเวลา 5 นาที

Step 3: 72 ^{o}C เป็นเวลา 5 นาที

รอบที่ 3: 72 ^{o}C เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ

2.5.3 การแยกสกัดและทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้บริสุทธิ์

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปทำการแยกขนาดด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis ผ่าน 0.8% agarose gel ในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40-60 นาที บันทึกภาพแถบพีซีอาร์ที่ปรากฏในแผ่นเจลด้วยเครื่อง Image Analyzer (Phamacia, USA) จากนั้นนำแผ่นเจลไปส่องผ่านภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต (UV light) และใช้ใบมีดใหม่ที่ปลอดเชื้อตัดชิ้นเจลในตำแหน่งที่มีชิ้นดีเอ็นเป้าหมายหรือผลิตภัณฑ์ PCR อยู่ เก็บชิ้นดีเอ็นเอในหลอดปั่นเหวี่ยง (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และนำไปแยกสกัด DNA ด้วยชุดแยกสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (QIAquick Gel Extration Kit, QIAGEN, Germany) ทำการตกตะกอนชิ้นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ในสารละลายด้วยการเติมสารเอทานอลบริสุทธิ์ในปริมาตร 2 เท่า และเติม 3M sodium acetate ปริมาตร 1/10 เท่า เก็บสารละลายที่ได้ในตู้ -20 ^{o}C เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C เป็นเวลานาน 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอทานอล 75% ทำให้ตะกอนแห้งและละลายในสารละลาย TE (pH 8.0)

2.6 การโคลนชิ้นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์

2.6.1 การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายกับดีเอ็นเอพาหะ

ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จะนำไปเชื่อมต่อเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ pGEM®-T Easy vector (Promega, USA) โดยใช้ชุดสำเร็จรูป pGEM®-T Easy vector system (Promega, USA) ดีเอ็นเอพาหะ pGEM®-T Easy vector จะมีปลาย 3' เป็น T overhang ซึ่งจะมีความจำเพาะต่อ A overhang ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่สร้างขึ้นโดยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ถ่ายพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้เข้าสู่เชื้อ *E. coli* DH5α ซึ่งใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านโดยใช้ชุดสำเร็จรูป TransformAid™ Bacterial Transformation System (Fermentas, USA) อัตราส่วนระหว่างดีเอ็นเอพาหะกับชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายเท่ากับ 1:3 ภายหลังจากการบ่มของผสมที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C เป็นเวลาข้ามคืน นำเอาของผสมที่ได้ออกมา 5 ไมโครลิตรและทำการถ่ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

2.6.2 การนำพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

พลาสมิดลูกผสมจะถูกนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านโดยการใช้ชุดสำเร็จรูป TransformAid™ Bacterial Transformation System ตามวิธีการที่แนะนำของบริษัทผู้ผลิต (Fermemtas, ภาคผนวก ช) คัดเลือกเซลล์เจ้าบ้านที่มีดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้ลักษณะทางฟีโนไทป์ของเซลล์เจ้าบ้านที่เปลี่ยนไปภายหลังจากได้รับพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสม โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* ที่ผ่านการถ่ายดีเอ็นเอแล้วในจานอาหารวุ้น LB (ภาคผนวก ฉ) ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารละลาย X-gal ปริมาตร 40

ไมโครลิตร (จากสารละลาย stock ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และสารละลาย IPTG ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (จากสารละลาย stock ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง

2.6.3 การคัดเลือกเซลล์เจ้าบ้านที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย

คัดเลือกเซลล์เจ้าบ้านที่มีดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้การคัดเลือกแบบ blue-white selection นับจำนวนโคโลนีสีขาวและสีฟ้า และเลือกเฉพาะโคโลนีสีขาวไปเพาะเลี้ยงและแยกสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ ด้วยวิธี Rapid alkaline method (Sambrook, Russell, 2001) โดยเพาะเลี้ยง positive colony ในอาหาร LB broth ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลินเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 3 นาที เติมสารละลาย I ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ง) ลงไปในตะกอนเซลล์ ผสมให้เข้ากันอย่างดีและเติมสารละลาย II ลงในปริมาตร 200 ไมโครลิตร ซึ่งสารละลาย II นี้ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง กลับหลอดประมาณ 5 ครั้ง เพื่อผสมสารให้เข้ากัน บ่มในน้ำแข็งนาน 5 นาที ทำให้ของผสมที่ได้มีสภาพเป็นกลางโดยการเติมสารละลาย III ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอด 10 ครั้ง บ่มในอ่างน้ำแข็ง 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C นำเอาส่วนใสใส่หลอดใหม่ ทำการตกตะกอนพลาสมิดด้วยการเติมเอทานอลบริสุทธิ์ลงในปริมาตร 2 เท่า และเติม 3 M sodium acetate ปริมาตร 1/10 เท่า แช่ในตู้ -80 ^{o}C เป็นเวลานาน 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง ล้างตะกอนที่ได้ด้วยสารละลายเอทานอล 75% และละลายใน TE (pH 8.0) อาร์เอ็นเอในสารละลายจะถูกกำจัดออกโดยการเติม RNase A ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม ลงไปในสารละลาย บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลานาน 30 นาที พลาสมิดที่สกัดได้จะนำไปตรวจสอบขนาดและทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อหาโคลนที่ต้องการ คัดเลือกโคลนที่คาดว่าจะได้รับชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายเข้าไปในเซลล์และนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ยืนยันผลการทดลองที่ได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ภายหลังจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วจะนำชิ้นผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอนั้นมาใช้ในการเป็นดีเอ็นเอตรวจตามในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค southern hybridization หรือ colony hybridization ต่อไป

2.7 ดีเอ็นเอตรวจตาม (DNA probe)

2.7.1 การติดฉลากดีเอ็นเอตรวจตาม

ชิ้นดีเอ็นเอ (600-bp) ที่มีบางส่วนที่สามารถถอดรหัสได้เป็นยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนตอบสนองความเค็มของข้าวจะถูกนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอตรวจตาม ทำการติดฉลากดีเอ็นเอตรวจตามด้วย alkaline phosphatase เพื่อใช้การเชื่อมต่อกับ chemiluminescent detection กับ CDP-*star* ที่เตรียมโดยใช้ชุดสำเร็จรูป Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System (AlkPhos Direct^{TM}, Amersham) ตามวิธีการที่แนะนำของบริษัทผู้ผลิต

2.8 เทคนิคการทำ southern blotting

ตัด genomic DNA ของข้าวด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ ประกอบด้วย *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I และ *Xba*I ที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลาข้ามคืน (16-18 ชั่วโมง) แยกแถบดีเอ็นเอใน 0.7% agarose gel ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 volt เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง ย้อมแผ่นเจลด้วยสารเอทิเดียมโบรไมด์ บันทึกภาพเจลด้วยเครื่อง Gel Image Master (Pharmacia Biotech) ภายหลังจากการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสให้นำแผ่นเจลไปตัดส่วนที่ไม่ต้องการออกและวัดขนาดของแผ่นเจล จากนั้นนำแผ่นเจลไปแช่ในสารละลายไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.25 N เขย่าเบา ๆ จนกระทั่งสีของ front dye เปลี่ยนเป็นสีเหลือง ซึ่งใช้เวลาประมาณ 15 นาที (ขั้นตอนนี้ทำเพื่อกำจัดหมู่พิวรีนออก) จากนั้นย้ายแผ่นเจลไปแช่ในสารละลาย alkaline transfer buffer (สารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.4 N และสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.6 M) เขย่าเบา ๆ จนกระทั่งสีของ front dye เปลี่ยนจากสีเหลืองกลับเป็นสีน้ำเงิน ใช้เวลาประมาณ 30 นาที และขั้นตอนสุดท้าย ย้ายแผ่นเจลไปแช่ใน neutralization buffer (สารละลาย Tris-HCl pH 7.5 ความเข้มข้น 0.5M และสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 1.5 M) เขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 30-60 นาที เพื่อปรับสภาวะให้เป็นกลางเหมาะสำหรับการย้ายดีเอ็นเอจากแผ่นเจลไปสู่แผ่นไนลอนเมมเบรนในขั้นตอนต่อไป ซึ่งทุกขั้นตอนทำที่อุณหภูมิห้อง ทำการย้ายดีเอ็นเอจากแผ่นเจลลงสู่แผ่นไนลอนเมมเบรนด้วยวิธี Capillary transfer ตามวิธีมาตรฐานของ Sambrook และ Russell, 2001) นำแผ่นไนลอนเมมเบรนที่ได้จากข้อ (4) ไปแช่ใน Neutralization buffer (สารละลาย Tris-HCl pH 7.2 ความเข้มข้น 0.5 M ในสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 1 M) เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปทำ crosslink ภายใต้แสง UV เป็นเวลา 5 นาที

2.9 การไฮบริไดซ์กรดนิวคลีอิก (Nucleic acid hybridization)

แช่แผ่นไนลอนเมมเบรนในสารละลาย hybridization buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 55-60 ^{o}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในตู้ hybridization เติมสารละลายดีเอ็นเอตรวจลงไปบ่มต่อที่สภาวะเดิม เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นล้างแผ่นไนลอนเมมเบรนด้วยสารละลาย washing buffer ตามวิธีการที่ได้อธิบายไว้ในชุดติดฉลากสำเร็จรูป จากนั้นเติม CDP-*star* Detection Reagent (AlkPhos Direct^{TM}, Amersham) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 5 นาที ตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยาด้วยการประกบแผ่นไนลอนเมมเบรนกับแผ่นฟิล์ม (Autoradiography film; Hyperfilm^{TM} ECL บริษัท Amersham, UK) ในห้องมืดเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และทำการล้างแผ่นฟิล์มด้วยน้ำยาล้างฟิล์มและตรึงด้วยสารละลาย fixer (Kodak) ตามลำดับ

2.10 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ใช้วิธีการ dideoxy-mediated chain termination (Sanger et al., 1977) ทำการส่งตัวอย่างดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ ณ ภาควิชาชีวเคมี คณะ

แพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยใช้เครื่อง MegaBACE 1000 automated DNA sequencer (Pharmacia Biotech, Sweden) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ใช้ Blast system (Blastn และ Blastx) ในฐานข้อมูล GenBank

2.11 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนโดยการทำ Primer walking

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการทำ primer walking เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการตรวจหาโคลนที่มีดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งดีเอ็นเอต้องมีขนาดอยู่ระหว่าง 0.5-4.0 kb (Sambrook and Russell, 2001) ทำได้โดยการออกแบบและสังเคราะห์ไพรเมอร์ จากนั้นใช้เป็นไพรเมอร์ในปฏิกิริยาการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ครั้งที่สอง ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาครั้งที่สองจะคาบเกี่ยวกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายดีเอ็นเอและจะขยายออกไปทางด้านไพรเมอร์ที่ออกแบบจากส่วน downstream กระบวนการจะทำซ้ำจนได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ วิธีการนี้จะใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากโคลนที่คาดว่าจะรับดีเอ็นเอเป้าหมายเข้าไปจากการทำ genomic DNA library ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ primer walking สังเคราะห์โดยหน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ประเทศไทย

2.12 การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

ทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล European Bioinformatics Institute (EBI) และ NCBI GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

2.12.1 EBI (http:/www.ebi.ac.uk)

สถาบัน European Bioinformatics Institute (EBI) เป็นศูนย์วิจัยและให้บริการข้อมูลทางชีวสารสนเทศสาร ซึ่งทางสถาบันให้บริการทางด้านอณูชีววิทยา พันธุศาสตร์การแพทย์ และการเกษตร จากส่วนวิชาการ การเกษตรกรรม เทคโนโลยีชีวภาพ เคมี และอุตสาหกรรมทางยา สถาบัน EBI ได้จัดทำฐานข้อมูลและให้บริการข้อมูลทางด้านอณูชีววิทยาพร้อมกับทำการวิจัยทางด้านชีวสารสนเทศสารและ โปรแกรมคอมพิวเตอร์ทางด้านนี้อีกด้วย สถาบัน EBI ไม่ได้มีผลประโยชน์ในองค์กรทางด้านวิชาการที่มีรูปแบบบางส่วนมาจาก European Molecular Biology Laboratory (EMBL) สถาบันวิจัย EMBI เป็นโครงข่ายนานาชาติของกองทุนสถาบันวิจัยโดยความร่วมมือจาก 15 ประเทศ เพื่อให้ใช้ในการวิจัยทางด้านอณูชีววิทยาโดยเฉพาะ ชุดหลักของ EBI จะเป็นการเผยแพร่ข้อมูลในส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อใช้ในการค้นหาและเครื่องมือในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม FASTA, BLAST และ Clustal W

2.12.2 GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

GenBank DNA sequence database เป็นการรวบรวมลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่ทราบลำดับแล้ว GenBank เป็นสถาบันที่สนับสนุนโดย National Health Institute และเป็นแหล่งเก็บข้อมูลทางคอมพิวเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับลำดับของกรดนิวคลีอิก (Benson et al., 1996) ฐานข้อมูลจะดำเนินการโดย National Center for Biotechnology Information (NCBI) ซึ่งร่วมกับแหล่งเก็บฐานข้อมูลอื่นๆ โปรแกรมที่ใช้ คือ โปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

2.12.3 BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)

โปรแกรมนี้เป็นส่วนที่ออกแบบขึ้นมาเพื่อการวิเคราะห์ทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์หรือลำดับโปรตีนซึ่งจะเป็นเครื่องมือวิเคราะห์ทางอิเล็กทรอนิคใช้ในการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ การวิเคราะห์จะทำได้ภายหลังจากการแปลรหัสของลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็น 6 เฟรม และทำการเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีในฐานข้อมูล BLAST เป็นเครื่องมืออีกชนิดหนึ่งที่นิยมใช้กันมากในการหาข้อมูล โปรแกรม BLAST ออกแบบมาเพื่อให้สามารถค้นหาลำดับโปรตีนหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ คุณสมบัติของโปรแกรม BLAST ทั้ง 5 ชนิด มีดังนี้

Blastp: ใช้ในการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับโปรตีนที่มีอยู่ในฐานข้อมูล

Blastn: ใช้ในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล

Blastx: ใช้ในการเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับโปรตีนที่มี 6 เฟรม จากนั้นทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเกี่ยวกับโปรตีนในฐานข้อมูล NCBI

tBlastn: ใช้ในการหาลำดับโปรตีนและเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลนิวคลีโอไทด์ NCBI ซึ่งจะมีการแปลลำดับให้เป็น 6 เฟรม

tBlastx: ใช้ในการเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับโปรตีนที่มี 6 เฟรม จากนั้นทำการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเกี่ยวกับโปรตีนในฐานข้อมูล NCBI ซึ่งจะแปลเป็น 6 เฟรม

2.13 การศึกษาการแสดงออกของยีนควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนตอบสนองความเค็มในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ KDML 105 ภายใต้สภาวะความเครียดต่าง ๆ

2.13.1 การเพาะเมล็ดข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ KDML 105

ทำการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดข้าวด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ 5% เป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น แช่เมล็ดข้าวในน้ำกลั่นประมาณ 24 ชั่วโมง และเก็บเมล็ดข้าวไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งเมล็ดข้าวเริ่มงอก นำต้นข้าวที่มีอายุ 5 วัน แบ่งกลุ่มของต้นข้าวตามความยาวของรากและยอด นำไปวางในถาดพลาสติก (ขนาด 11 x 18 x 7 cm.) ที่มีสารละลายธาตุอาหารปริมาตร 1 มิลลิลิตร หลังจากการเพาะ 10 วัน ต้นข้าวจะถูกนำไปทดสอบที่สภาวะเครียดต่างๆ ในการทดสอบภายใต้สภาวะความเครียดของความเย็นและความร้อนจะนำต้นข้าว

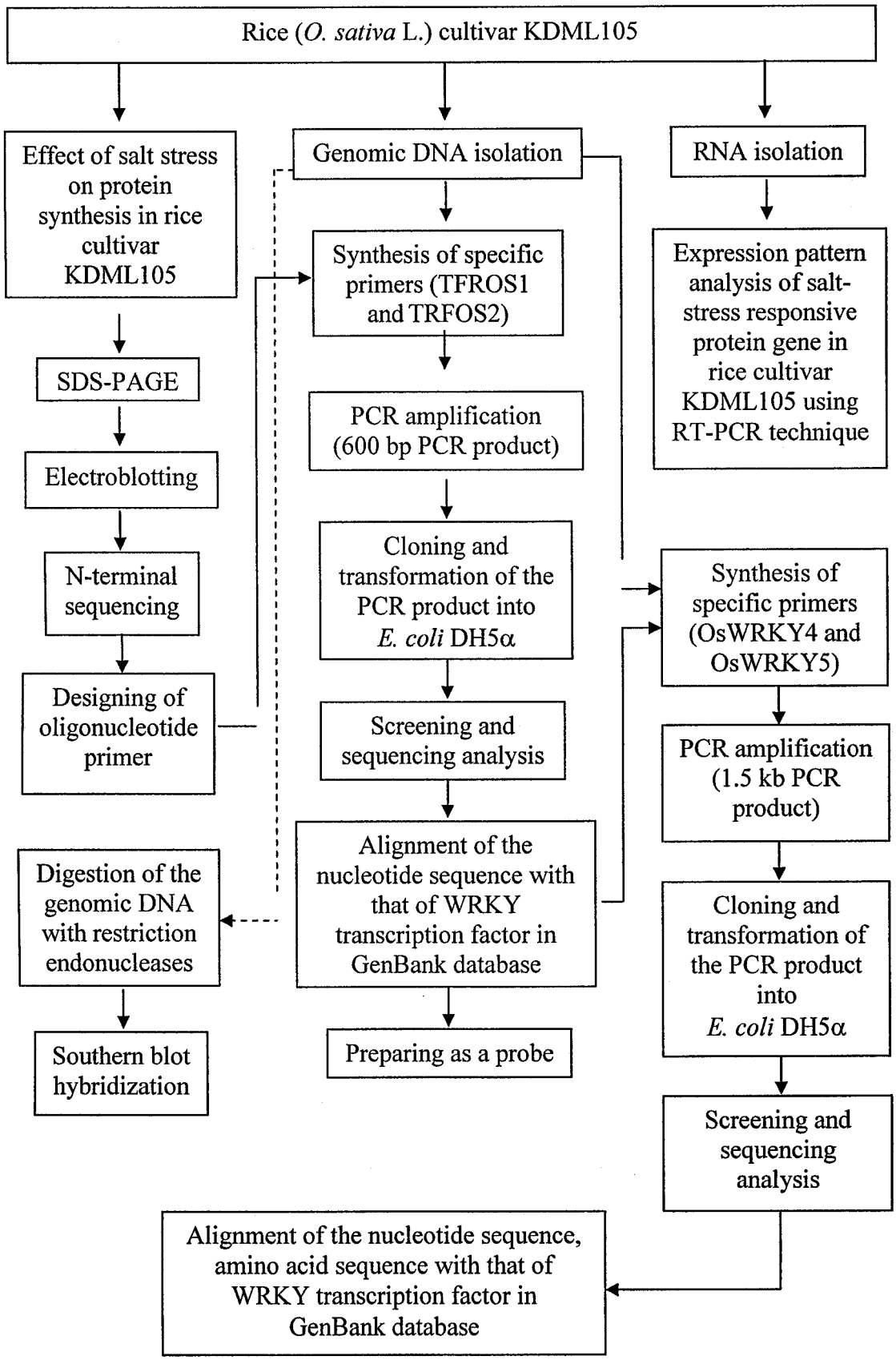
ไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลานาน 12 ชั่วโมง และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลานาน 12 ชั่วโมง ตามลำดับ การทดสอบภายใต้สภาวะขาดน้ำและความเครียดจากเกลือ NaCl โดยเติม 20% PEG 6000 และเกลือ NaCl ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 75 mM ลงไปในสารละลายธาตุอาหาร ตามลำดับ ภายหลังจากการทดสอบที่สภาวะความเครียดต่างๆ จะทำการเก็บตัวอย่างต้นข้าวไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C จนกว่าจะนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

2.13.2 การแยกสกัดอาร์เอ็นเอจากข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ KDML 105

ทำการบดใบข้าวให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลวและสกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany) ตัวอย่างสารสกัดอาร์เอ็นเอจะอยู่ในรูปของเหลวและทำการเก็บไว้ตู้ที่มีอุณหภูมิ -80 °C

2.13.3 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนตอบสนองความเค็มในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ KDML 105 ภายใต้สภาวะความเครียดต่างๆ โดยใช้เทคนิค RT-PCR

ทำการปรับความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่แยกสกัดได้ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis และเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอของยีนโปรตีนตอบสนองต่อความเค็มในข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ KDML 105 ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ชุดสำเร็จรูป QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN, Germany) โดยใช้อาร์เอ็นเอที่แยกสกัดจากสภาวะความเครียดต่างๆ สารละลายปฏิกิริยาสำหรับการทำ RT-PCR ประกอบไปด้วย 1x QIAGEN OneStep RT-PCR buffer, dNTP ชนิดละ 400 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์ชนิดละ 0.5 ไมโครโมลาร์ (TRFOS1 และ TRFOS2) QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix 3 ไมโครลิตร template RNA 1.5 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรรวมของสารละลายเป็น 75 ไมโครลิตร ด้วยน้ำปราศจาก RNase (RNase-free water) สำหรับอุณหภูมิและระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา RT-PCR ประกอบด้วยขั้นตอนการทำ Reverse transcription ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 30 นาที Initial PCR activation step ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนการทำ Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 1 นาที Annealing ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 2 นาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที ทำการเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ในรอบที่ 25, 28, 31, 34, 37 และ 40 ตามลำดับ และนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค electrophoresis ผ่าน 1% agarose gel ย้อมแผ่นเจลด้วยสารเอธิเดียมโบรไมด์เปรียบเทียบผลที่ได้จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค electrophoresis บันทึกภาพแผ่นเจลด้วยเครื่อง Gel Image Master (pharmacia Biotech) แถบของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จะพบในรอบที่ 31 เป็นต้นไป ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง ในการทดลองครั้งนี้ Reverse Transcriptase มีความจำเพาะต่อ mRNA เนื่องจากไม่มีแถบอื่นปรากฏเมื่อทำ Reverse Transcriptase



รูปที่ 7 แผงผังแสดงการทดลองทั้งหมด