

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 วัสดุและสารเคมี

วัสดุ น้ำยางพาราสายพันธุ์ RRIM600 ต้นกล้ายางพาราติดตาสายพันธุ์ RRIM600 และ ยางพาราสายพันธุ์ RRIC110

สารเคมีที่ใช้มีดังนี้ RNA Extraction Buffer (Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB), Tris-hydrochloride (Tris-HCl), Ethylenediaminetetra-Acetic Acid (EDTA), Sodium Chloride (NaCl), Polyethylene Glycol (PEG)), Chloroform,  $\beta$ -Mercaptoethanol, Diethyl Pyrocarbonate (DEPC), Isoamyl Alcohol, Lithium Chloride (LiCl), AMV Reverse Transcriptase, Oligo d(T) Primer, *Taq* DNA Polymerase, Dinucleotide Triphosphate (dNTP), Oligonucleotide Primer ดังตารางที่ 2, Magnesium Chloride ( $MgCl_2$ ), SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit, Agarose, Ethidium Bromide, DNA Maker, Gel Elute Extraction Kit, T4 DNA Ligase, Luria-Bertani medium (LB Medium), Transformation and Storage Solution (TSS), Glycerol, High-Speed Plasmid Mini Kit

ตารางที่ 3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ cDNA ด้านปลาย-5' และ ด้านปลาย-3'

ด้านปลาย	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
5'-RACE	GSP1	- 5' ACCCTCCCTTGAATTCTGGGCACTTGGG 3'
		- 5' CTTTTGGCATTTCGAAGCAATGGC 3'
		- 5' AGGAGGCCGTGACGTTGACGTTGATGAGCC 3'
		- 5' AGAAAGGCACTAGAGCTTGTGC 3'
		- 5' CACTCCTCCAAGCCTATTCA 3'
3'-RACE	GSP2	- 5' TGCTGCCTTTGCAAAGCGGAGCCAGAG 3'
		- 5' CTAATCTATCGGATTGGGGTTCC 3'

### 3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ มีดังนี้

ตารางที่ 3 แสดงเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

อุปกรณ์	รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
Microcentrifuge	Z 252MK	Chermle, USA
Microcentrifuge	UniCen 15D	Herolab
UV-VIS Spectrophotometer	PerkinElmer	
	Lambda 25/UV visible	PerkinElmer
PCR Instrument	iCycler iQ™	Biorad
Gel Documentation	Gel Doc 2000	Biorad
Gel Electrophoresis Apparatus	MINI-SUB CELL GT	Biorad

### 3.3 การเตรียม Total RNA

การเตรียม Total RNA จากน้ำยางและเนื้อเยื่อต่างๆ ของกล้วยพาราใช้วิธีการเดียวกันคือ ประยุกต์จากวิธีการของ ฟู, เด็ง, ซู, เซงและชิ (Fu, Deng, Su, Zeng and Shi, 2004 : 197a-197e) ถ้าเป็นเนื้อเยื่อต่างๆ จะบดเนื้อเยื่อน้ำหนัก 500 mg (น้ำหนักสด) ให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลวก่อนที่จะนำไปเตรียม Total RNA ถ้าเป็นน้ำยางนำไปเตรียม Total RNA ได้เลยตัวอย่างละประมาณ 500  $\mu$ l จากนั้นเติม RNA Extraction Buffer (2% CTAB (w/v), 100 mM Tris-HCl (pH8.5), 1% (v/v) PEG8000, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA) 500  $\mu$ l ที่มีส่วนผสมของ  $\beta$ -Mercapethanol 15% ตามด้วย Chloroform : Isoamylalcohol (24:1) ปริมาตร 500  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันอย่างดี ใช้ Micropipette ดูดสารละลายใส่หลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 ml จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Microcentrifuge ที่ความเร็ว 13,200 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายชั้นบนใส่หลอดใหม่และเติม Chloroform : Isoamylalcohol (24:1) ปริมาตร 750  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันอย่างดี นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Microcentrifuge ที่ความเร็ว 13,200 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายชั้นบนใส่หลอดใหม่และเติม Chloroform : Isoamylalcohol (24:1) ปริมาตร 750  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันอย่างดี นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Microcentrifuge ที่ความเร็ว 13,200 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายชั้นบนใส่หลอดใหม่และเติม 8M LiCl 1/3 ของปริมาตรสารละลายที่ได้ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ประมาณ 12-16 ชั่วโมง จากนั้น นำสารละลายดังกล่าวมา ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง

Microcentrifuge ที่ความเร็ว 13,200 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที คัดสารละลาย ที่ทิ้งและล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol 200  $\mu$ l และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Microcentrifuge ที่ความเร็ว 13,200 rpm 2 ครั้งๆละ 5 นาที คูดส่วนใสออก เปิดฝาหลอดไว้จนตะกอนแห้ง จึงละลาย ตะกอนด้วย DEPC-treated H<sub>2</sub>O เก็บ Total RNA ไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส ตรวจสอบ ปริมาณและคุณภาพของ Total RNA ต่อไป

### 3.4 ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของ Total RNA

#### 3.4.1. การคำนวณปริมาณและความบริสุทธิ์ของ Total RNA

ปริมาณและความบริสุทธิ์ของ Total RNA คำนวณได้จากการวัดค่าการดูดกลืน แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) เนื่องจาก RNA มีเบสพิวรีนและไพริมิดีนเป็นองค์ประกอบของ โครงสร้าง ทำให้สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ช่วงความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (OD<sub>260</sub>) โดย 1 OD<sub>260</sub> ของ RNA มีค่าเท่ากับ 40  $\mu$ g/ml

นำสารละลาย Total RNA ไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วนที่เหมาะสมไปวัดค่า การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (OD<sub>260</sub>) และ 280 นาโนเมตร (OD<sub>280</sub>) แล้วนำค่าที่ วัดได้มาคำนวณหาปริมาณและความบริสุทธิ์ของ Total RNA

$$\text{ปริมาณ Total RNA} = \frac{40 \times \text{OD}_{260} \times \text{จำนวนเท่าที่เจือจาง} (\mu\text{g}/\mu\text{l})}{1000}$$

ความบริสุทธิ์ของ Total RNA คำนวณจากค่าอัตราส่วนระหว่าง OD<sub>260</sub> และ OD<sub>280</sub> โดย RNA ที่บริสุทธิ์จะมีค่า OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> เท่ากับ 2.0  $\pm$  0.05

#### 3.4.2. ตรวจสอบสภาพ Integrity ของ Total RNA ด้วยเทคนิค Electrophoresis

นำสารละลาย Total RNA ตัวอย่างละ 2  $\mu$ g ไปทำ Electrophoresis ในเจลอะกาโรส เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมเจลด้วย Ethidium Bromide (EtBr) เข้มข้น 0.1 mg/ml

### 3.5 การโคลนยีน *HbKRI* ในยางพาราโดยเทคนิค RACE

การโคลนยีน *HbKRI* ในยางพาราด้วยเทคนิค RACE โดยใช้ SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit จากบริษัท Clontech ดังนี้

#### 3.5.1 การเตรียม poly A<sup>+</sup> RNA

เตรียม Poly A<sup>+</sup> RNA จาก Total RNA โดยใช้ Oligotex mRNA Spin Column ของบริษัท QIAGEN ดำเนินการตามคำแนะนำของผู้ผลิต ดังนี้

3.5.1.1 ปิเปิด Total RNA 50  $\mu$ l ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml ปรับปริมาตรให้ได้ 250  $\mu$ l ด้วย RNase-Free Water

3.5.1.2 เติม Buffer OBB (อุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 250  $\mu$ l และ Oligotex Suspension ปริมาตร 15  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันโดยการปิเปิดหรือเคาะเบาๆ

3.5.1.3 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

3.5.1.4 ตกตะกอน Oligotex mRNA Complex โดยหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 18000 xg เป็นเวลา 2 นาที แล้วดูดส่วนใสออกโดยการปิเปิด

3.5.1.5 ละลายตะกอนด้วย Buffer OW2 ปริมาตร 400  $\mu$ l จากนั้นจึงดูดสารละลายตะกอนที่ได้เติมลงใน Spin Column ขนาดเล็ก นำไปวางลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 18,000 xg เป็นเวลา 1 นาที

3.5.1.6 ย้าย Spin Column ไปยังหลอดทดลองขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ แล้วเติม Buffer OW2 ปริมาตร 400  $\mu$ l หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 18,000 x g เป็นเวลา 1 นาที นำส่วน Flow-Through ทิ้งไป

3.5.1.7 ย้าย Spin Column ไปยังหลอดทดลองขนาด 1.5 ml หลอดใหม่ แล้วเติม Buffer OW2 ปริมาตร 20  $\mu$ l ลงไปใน Column ปิเปิดขึ้นลง 3-4 รอบ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 18,000 x g ดูดสารละลาย mRNA ที่ได้ใส่หลอดใหม่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.5.2. สังเคราะห์ First-Strand cDNA

3.5.2.1 เตรียม Buffer Mix ต่อไปนี้สำหรับสังเคราะห์ 5' และ 3' RACE-Ready cDNA ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml ผสมให้เข้ากันและวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง

5X First-Strand Buffer	2.0	μl
DTT (20 mM)	1.0	μl
dNTP Mix (10 mM)	1.0	μl
<hr/> ปริมาตรรวมเท่ากับ	<hr/> 4.0	<hr/> μl

#### 3.5.2.2 คูณสารละลายต่อไปนี้

3' RACE-Ready cDNA :

- Total RNA	3.75	μl
- 3'-CDS Primer A	1.0	μl

5' RACE-Ready cDNA :

- Total RNA	2.75	μl
- 5'-CDS Primer A	1.0	μl

3.5.2.3 ผสมสารละลายข้างต้น ให้เข้ากันในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml โดยการเขย่าเบาๆ

3.5.2.4 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นบ่มต่อที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที นำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 g เป็นเวลา 10 วินาที

3.5.2.4 เติม SMARTer IIA Oligo 1.0 μl ในสารละลาย 5' RACE-Ready cDNA

3.5.2.5 เติม Buffer Mix ที่ได้เตรียมไว้ข้างต้น พร้อมกับสารละลาย ดังนี้

Buffer Mix from Step 1	4.0	μl
RNase Inhibitor (40 U/)	0.25	μl
SMARTScribe™ Reverse Transcriptase (100 U)	1.0	μl
<hr/> ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ	<hr/> 10.0	<hr/> μl

3.5.2.6 ผสมสารให้เข้ากันโดยใช้ Micropipette บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที ด้วยเครื่อง Thermal Cycler

3.5.2.7 จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที

3.5.2.8 เจือจางสารละลาย First-Strand cDNA ด้วย Tricine-EDTA Buffer 20  $\mu$ l นำตัวอย่างไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.5.3. การเพิ่มปริมาณ cDNA ของยีน *HbKRI* โดยเทคนิค RACE-PCR

การเพิ่มปริมาณ cDNA ของยีน *HbKRI* ทั้งด้านปลาย -5' และ ปลาย -3' โดยใช้ cDNA ของ TDFREP241 ที่ได้จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่มีการแสดงออกมากในน้ำยางพาราสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตสูงและมีการแสดงออกน้อยในสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตต่ำ โดยเทคนิค cDNA-AFLP ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ขนาด 242 คู่เบสและ Homology กับยีน *CaKRI* ในต้นพริก (Seong, et al. 2007a : 954) ที่รายงานไว้โดยเปลื้อง สุวรรณมณีและคณะ (Suwanmanee, et al. 2007 : 255) เป็นแม่แบบในการ ออกแบบ โพรเมอร์ที่มีความจำเพาะ (Gene Specific Primer, GSP) ด้านปลาย-5' (GSP1) และด้านปลาย-3' (GSP2) การเพิ่มปริมาณมีขั้นตอนดังนี้

3.5.3.1 เตรียม PCR Master Mix สำหรับการทำปฏิกิริยา PCR ทั้งปลายด้าน 5'-RACE และ 3'-RACE โดยใช้ 50  $\mu$ l ต่อหนึ่งปฏิกิริยา ซึ่งประกอบด้วย

PCR-Grade Water	34.5	$\mu$ l
10X Advantage 2 PCR Buffer	5.0	$\mu$ l
dNTP Mix (10 mM)	1.0	$\mu$ l
50X Advantage 2 Polymerase Mix	1.0	$\mu$ l
ปริมาตรรวมเท่ากับ	41.5	$\mu$ l

ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex Mixer นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง Microcentrifuge

3.5.3.2 เติมสารละลายต่อไปนี้ลงใน PCR Master Mix

#### 5'-RACE PCR

5' RACE-Ready cDNA	2.5	$\mu$ l
UPM (10X)	5.0	$\mu$ l
GSP1 (10 $\mu$ M)	1.0	$\mu$ l
PCR Master Mix	41.5	$\mu$ l
ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ	50.0	$\mu$ l

### 3'-RACE PCR

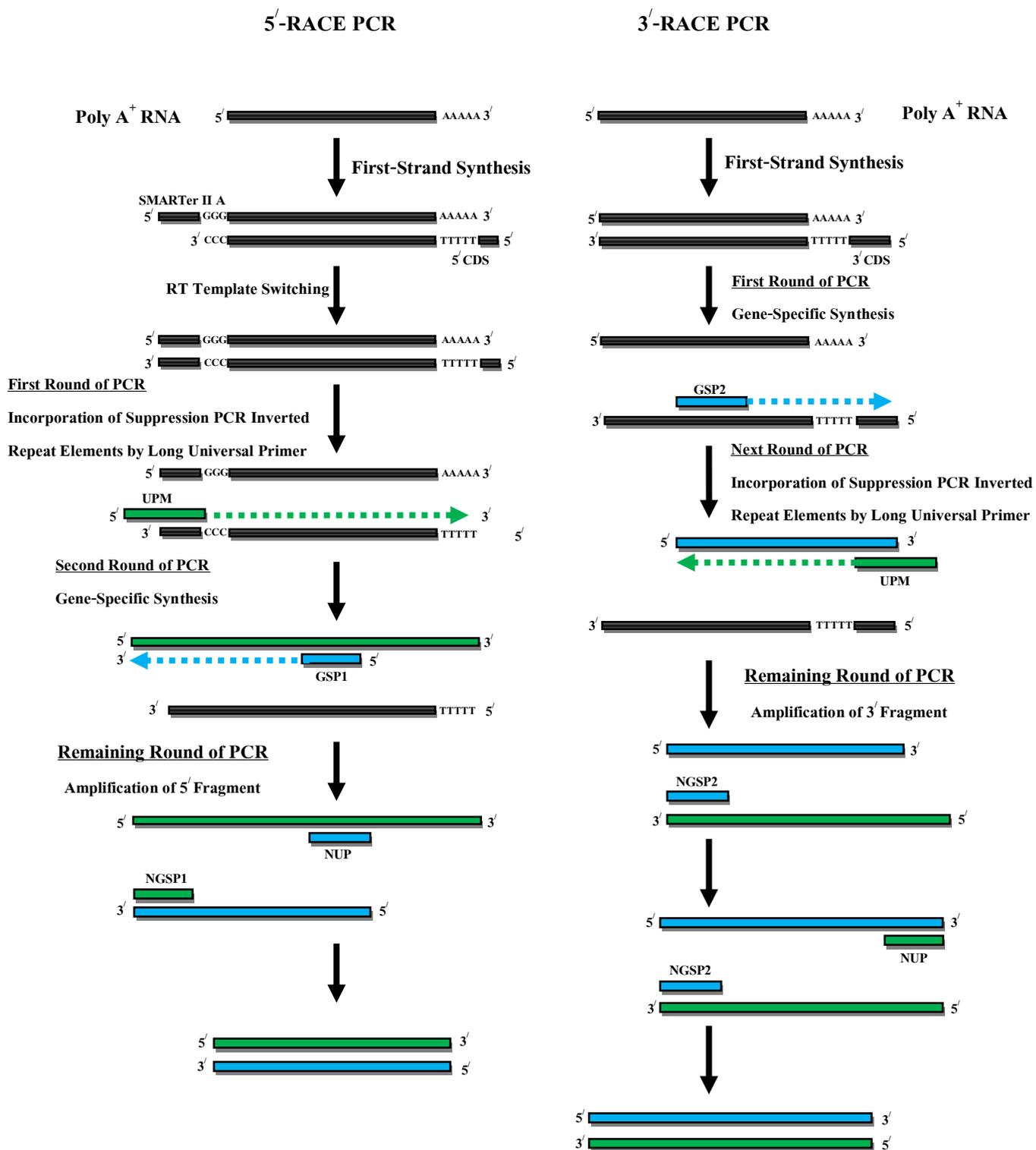
3' RACE-Ready cDNA	2.5	μl
UPM (10X)	5.0	μl
GSP2 (10 μM)	1.0	μl
PCR Master Mix	41.5	μl
<u>ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ</u>	<u>50.0</u>	<u>μl</u>

3.5.3.3 เริ่มต้นการทำ PCR โดยใช้เครื่อง Thermal Cycler ที่ปรับตั้งโปรแกรมการทำงาน โดยพิจารณาจากค่า  $T_m$  ของ GSP (Gene Specific Primer) ถ้าค่า  $T_m$  ของ GSP มากกว่า 70 องศาเซลเซียส ใช้โปรแกรม Touchdown PCR ปรับตั้งโปรแกรกดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที จำนวน 5 รอบ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาทีและอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที จำนวน 5 รอบ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาทีและอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที จำนวน 25 รอบ

3.5.3.4 หาก PCR Product ในขั้นตอน Primary PCR ไม่เป็น Single Band ให้นำ PCR Product ในตอนแรกมาทำ Secondary PCR โดยนำ Primary PCR Product ปริมาตร 5 μl มาเจือจางด้วย Tricine-EDTA Buffer 245 μl จากนั้นเตรียมสารละลายต่อไปนี้

- Primary PCR Product ที่ได้เจือจาง	5.0	μl
- NUP Primer	1.0	μl
- Nested GSPs	1.0	μl
- PCR-Grade Water	34.5	μl
- 10X Advantage 2 PCR Buffer	5.0	μl
- dNTP Mix (10 mM)	1.0	μl
- 50X Advantage 2 Polymerase Mix	1.0	μl
<u>ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ</u>	<u>50.0</u>	<u>μl</u>

ทำ PCR โดยใช้เครื่อง Thermal Cycler ที่ปรับตั้งโปรแกรมการทำงาน โดยพิจารณาจากค่า  $T_m$  ของ GSP ถ้าค่า  $T_m$  ของ GSP น้อยกว่า 70 องศาเซลเซียส ใช้โปรแกรม Nested PCR ปรับตั้งโปรแกรกดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาทีและอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 3 นาที จำนวน 25 รอบ (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ cDNA ของยีน *HbKR1* ด้านปลาย-5' และปลาย-3' (ดัดแปลงจาก : Clontech, 2007 : 28-29)

### 3.5.4. การตรวจสอบ PCR Product ด้วยเทคนิค Electrophoresis

นำ PCR Product ไปทำ Electrophoresis ในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ย้อมเจลด้วย EtBr (0.1 mg/ml) ตัดแถบ cDNA เป้าหมายใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml เพื่อนำไปทำการแยก cDNA ออกจากเจลอะกาโรสต่อไป

### 3.5.5. การแยก 5'-RACE และ 3'-RACE cDNA ออกจากเจลอะกาโรส

ใช้ GelElute Extraction Kit จากบริษัท Prima Science มีวิธีการดังนี้

3.5.5.1 ชั่งแถบ cDNA ที่ได้ แล้วเติม Buffer GX1 3 เท่าของน้ำหนักเจล จากนั้นจึงเติม GelElute ปริมาตร 10  $\mu$ l (Vortex ตั้งไว้เป็นเวลา 30 วินาที) ผสมให้เข้ากันเป็นอย่างดี

3.5.5.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที พร้อมทั้งเขย่าทุกๆ 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Microcentrifuge ที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ดูดสารละลายทิ้งให้หมด

3.5.5.3 ล้างตะกอนด้วย Buffer GX1 ปริมาตร 500  $\mu$ l แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Microcentrifuge ที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ดูดสารละลายทิ้ง

3.5.5.5 ล้างตะกอนด้วย Buffer GE ปริมาตร 500  $\mu$ l แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Microcentrifuge ที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 2 ครั้ง ดูดสารละลายออก แล้ววางไว้ให้ตะกอนแห้งประมาณ 15 นาที

3.5.5.6 ละลายตะกอนด้วย Deionized Water ปริมาตร 20  $\mu$ l วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Microcentrifuge ที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ดูดสารละลายชั้นบนใส่หลอดใหม่ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.6 การทำ TA Cloning

#### 3.6.1. การเชื่อมต่อชิ้นส่วน cDNA เข้ากับ Vector (Ligation)

นำ cDNA ที่ได้จากการแยกออกจากเจลมาต่อเข้ากับ Vector (pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector จากบริษัท Promega) ตามสารละลายต่อไปนี้

- PCR Product (cDNA)	3.0	μl
- 2X Rapid Ligation Buffer	5.0	μl
- pGEM <sup>®</sup> -T Easy Vector	1.0	μl
- T4 DNA Ligase	1.0	μl
ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ	10.0	μl

จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง แล้วจึงนำไป Transform เข้า *E.coli* (DH<sub>5</sub>α) ต่อไป

#### 3.6.2. การเตรียม Competent cell

นำเชื้อ *E.coli* (DH<sub>5</sub>α) จาก Glycerol Stock มา Streak บนอาหารแข็ง Luria-Bertani Medium (LB) นำไปวางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 280 rpm เป็นเวลา 16 ชั่วโมง คัดเลือก โคลนี ที่เป็นโคลนีเดี่ยว เพื่อนำมาเตรียม Starter โดยเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 1 ml ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง นำเซลล์ที่ได้ปริมาตร 20 μl เติมนลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 10 ml ในหลอด 1.5 ml บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าต่อเนื่องประมาณ 3-4 ชั่วโมง จนกระทั่ง เซลล์เจริญเติบโตอยู่ในระยะ Log Phase ซึ่งตรวจสอบโดยนำเชื้อไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD<sub>600</sub>) ซึ่งค่าที่วัดได้ เท่ากับ 0.3-0.6 จากนั้นนำเชื้อไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Microcentrifuge ที่ความเร็ว 2000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดอาหารเหลว LB ออกมาให้หมด ละลายเซลล์แบคทีเรียด้วย Ice-Cool TSS (Tryptone, Yeast Extract, NaCl, Glucose, PEG8000, MgCl<sub>2</sub>, DMSO) 2.5 ml นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Microcentrifuge ที่ความเร็ว 2000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายออก แล้วเติม Ice-Cool TSS 900 μl และ Glycerol ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ 100 μl ผสมให้เข้ากัน โดยใช้ Micropipette จากนั้นแบ่งสารละลายใส่หลอด 1.5 ml หลอดละ 50 μl และแช่ไว้ในน้ำแข็ง

### 3.6.3. การนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์

นำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์โดยวิธี Heat-Shock ซึ่งมีวิธีการดังนี้

3.6.3.1 นำ Ligation Vector ผสมลงใน Competent Cell 50 ml

3.6.3.2 วางไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที

3.6.3.3 เติมอาหารเหลว LB ลงไป 800  $\mu$ l จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 45 นาที

3.6.3.4 จากนั้นนำเชื้อมา Spread บนอาหารแข็ง LB ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ Ampicillin ความเข้มข้น 100 mg/ml และสาร IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside) ซึ่งเป็นสารที่ชักนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์  $\beta$ -Galactosidase พร้อมกับสาร X-gal (5-Bromo-4-chro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside) ซึ่งเป็นซับสเตรท (Substrate) ของเอนไซม์  $\beta$ -Galactosidase จำนวน 2 Plate โดยแต่ละ Plate ใช้เชื้อปริมาตร 200  $\mu$ l และ 100  $\mu$ l ตามลำดับ และมี Plate control จำนวน 1 plate

3.6.3.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

3.6.3.6 ตรวจสอบเซลล์แบคทีเรียที่ได้รับ Recombinant DNA โดยสังเกตจากลักษณะการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของ เซลล์แบคทีเรียและกิจกรรมของเอนไซม์  $\beta$ -Galactosidase โดยเซลล์ที่ได้รับพลาสมิดที่ไม่มีดีเอ็นเอสายผสมจะเจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ Ampicilin ได้และสามารถสร้างเอนไซม์  $\beta$ -Galactosidase ไปย่อยสาร X-gal เกิดเป็นสารสีฟ้า ทำให้โคโลนีดังกล่าวมีสีฟ้า ส่วนเซลล์ที่มีดีเอ็นเอสายผสมสามารถเจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ Ampicilin แต่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์  $\beta$ -Galactosidase จึงไม่มีกา รย่อยสาร X-gal โคโลนีที่ได้จึงไม่เกิดสี สำหรับเซลล์ที่ไม่ได้รับพลาสมิดจะไม่สามารถเจริญบนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ Ampicilin ได้

### 3.6.4. การเตรียมพลาสมิดจากแบคทีเรีย

เพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่มี Recombinant DNA โดยการเลือกโคโลนีที่เจริญในอาหารแข็ง LB ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ ซึ่งโคโลนีจะมีลักษณะเป็นสีขาว นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติมยาปฏิชีวนะ Ampicilin ความเข้มข้น 100 mg/ml นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง นำแบคทีเรียที่ได้มาเตรียมพลาสมิดโดยใช้ วิธี High-Speed Plasmid Mini Kit จากบริษัท QIAGEN ซึ่งขั้นตอนดังนี้

3.6.4.1 นำแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้ในอาหารเหลว LB ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Microcentrifuge ที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที

3.6.4.2 คูดสารละลายชั้นบนที่เติม Buffer P1 (RNase A added) ปริมาตร 250  $\mu$ l ผสมให้เข้ากัน

3.6.4.3 เติม Buffer P2 ปริมาตร 250  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันเบาๆ

3.6.4.4 เติม Buffer N3 ปริมาตร 350  $\mu$ l ผสมให้เข้ากันเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

3.6.4.5 คูดส่วนใสได้ QIAprep Spin Column ที่วางอยู่ใน Collection Tube นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที คูดส่วนใส ใน Collection Tube ที่ นำ QIAprep Spin Column มาวางไว้ใน Collection Tube

3.6.4.6 เติม Buffer PB ลงใน QIAprep Spin Column ปริมาตร 500  $\mu$ l แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที คูดส่วนใส ใน Collection Tube ที่ นำ QIAprep Spin Column กลับมาวางใน Collection Tube

3.6.4.7 เติม Buffer PE (Ethanol added) ใน QIAprep Spin Column ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที คูดส่วนใส ใน Collection Tube ที่ นำ QIAprep Spin Column กลับมาวางใน collection tube แล้วปั่นเหวี่ยงอีก 1 ครั้ง

3.6.4.8 นำ QIAprep Spin Column มาวางไว้ในหลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 ml เติม Buffer EB ปริมาตร 50  $\mu$ l วางไว้ในที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที

3.6.4.9 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3.6.4.10 การตรวจสอบ Integrity ของพลาสมิดด้วยการทำ Electrophoresis ในเจลอะกาโรส ความเข้มข้น 1% ย้อมเจลด้วย EtBr (0.1 mg/ml)

3.6.4.11 การวิเคราะห์ปริมาณและความบริสุทธิ์ของพลาสมิด นำพลาสมิดที่เตรียมได้มาวิเคราะห์ความบริสุทธิ์จากอัตราส่วนของค่าดูดกลืนแสงระหว่างความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ( $OD_{260}$ ) และ 280 นาโนเมตร ( $OD_{280}$ ) พลาสมิดที่บริสุทธิ์จะมีค่าประมาณ 2.0 คำนวณหาความเข้มข้นของพลาสมิดจากค่าดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (1 OD = 50  $\mu$ g/ml) เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต่อไป

3.6.4.12 ส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

### 3.7 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *HbKR1*

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *HbKR1* ในยารพาราโดยเปรียบเทียบลำดับ นิวคลีโอไทด์ กับ สิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ ในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ทำการ Alignment เพื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน *HbKR1* ของยารพารา กับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น โดยใช้โปรแกรม ClustalX 2.1 และคำนวณค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโน (Nucleotide and Amino Acid Identities) โดยใช้โปรแกรม LALIGN ([http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html))

### 3.8 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *HbKR1*

#### 3.8.1. ผลของความเค็มและการขาดน้ำต่อการแสดงออกของ ยีน *HbKR1* ในต้นกล้า

##### ยารพาราติดตาสายพันธุ์ RRIM600

#### 3.8.1.1 การเตรียมต้นกล้า การวางแผนการทดลองและการเก็บตัวอย่าง

เพาะเลี้ยงยารพาราติดตาสายพันธุ์ RRIM600 ในถุงพลาสติกที่มีส่วนผสมของดินร่วนประมาณ 3/4 ถุง อายุ 3 เดือน วางเลี้ยงในโรงเรือนเลี้ยงกล้าไม้ที่มีการควบคุมสภาวะที่เหมาะสม คือ แสง ความชื้นและอุณหภูมิ รดน้ำตอนเช้าวันละหนึ่งครั้ง จึงนำไปใช้ในการทดลอง โดยวางแผนการทดลอง แบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) การทดลองมีจำนวน 2 การทดลอง ดังนี้

การทดลองชุดที่ 1 มีทั้งหมด 7 ทริตเมนต์ ทริตเมนต์ละ 5 ซ้ำ แต่ละ

ทริตเมนต์รดน้ำที่มีส่วนผสมของโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 5 โมลาร์ และวางไว้เป็นระยะเวลาต่างๆ กัน แล้วจึงเก็บตัวอย่าง ไป ได้แก่ ใบและลำต้น นำไปเตรียม Total RNA ตามวิธีที่ได้กล่าวข้างต้น เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *HbKR1* ดังนี้ ทริตเมนต์ที่ 1 วางไว้เป็นเวลา 0.0 ชั่วโมง ทริตเมนต์ที่ 2 วางไว้เป็นเวลา 0.5 ชั่วโมง ทริตเมนต์ที่ 3 วางไว้เป็นเวลา 3.0 ชั่วโมง ทริตเมนต์ที่ 4 วางไว้เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ทริตเมนต์ที่ 5 วางไว้เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทริตเมนต์ที่ 6 วางไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทริตเมนต์ที่ 7 วางไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

การทดลองชุดที่ 2 มีทั้งหมด 7 ทริตเมนต์ ทริตเมนต์ละ 5 ซ้ำ แต่ละ

ทริตเมนต์รดน้ำเป็นเวลาต่างๆ กัน แล้วจึงเก็บตัวอย่าง ได้แก่ ใบและลำต้น นำไปเตรียม Total RNA ตามวิธีที่ได้กล่าวข้างต้น เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของ ยีน *HbKR1* ดังนี้ ทริตเมนต์ที่ 1 ให้น้ำตอนเช้าวันละ 1 ครั้งทุกวัน เป็นเวลา 10 วัน ทริตเมนต์ที่ 2 งดการให้น้ำเป็นเวลา 1 วัน ทริตเมนต์ที่ 3 งดการให้น้ำเป็นเวลา 2 วัน ทริตเมนต์ที่ 4 งดการให้น้ำเป็นเวลา 4 วัน ทริตเมนต์ที่ 5 งดการให้

น้ำเป็นเวลา 6 วัน ทรีตเมนต์ที่ 6 งดการให้น้ำเป็นเวลา 8 วัน และทรีตเมนต์ที่ 7 งดการให้น้ำเป็นเวลา 10 วัน

### 3.8.1.2 การวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีน *HbKRI* โดยเทคนิค sqRT-PCR

3.8.1.2.1 ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับลำดับเบสของ ยีน *HbKRI* และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค sqRT-PCR เช่น ความเข้มข้นของ  $MgCl_2$  จำนวนรอบของโปรแกรมการทำปฏิกิริยา PCR ความเข้มข้นของ Single Strand cDNA (sscDNA) เป็นต้น

#### 3.8.1.2.2 การสังเคราะห์ sscDNA ของตัวอย่างต่างๆ ดังนี้

นำ Total RNA ตัวอย่างละ 2  $\mu g$  ผสมกับ Oligo d(T) Primer 0.044 mM ปริมาตร 2  $\mu l$  และ 18S Down Primer 0.05 mM ปริมาตร 1  $\mu l$  ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมาวางไว้ในน้ำแข็ง 5 นาที จากนั้นจึงเติมสารต่างๆ ดังนี้

AMV Reverse Transcriptase 5x Reaction Buffer	5.0	$\mu l$
dNTP Mix	2.5	$\mu l$
AMV Reverse Transcriptase (4U)	0.5	$\mu l$
DEPC-treated $H_2O$	6.0	$\mu l$
<u>ปริมาตรรวม</u>	<u>25.0</u>	<u><math>\mu l</math></u>

ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายวางไว้ในน้ำแข็ง และเติม DEPC-treated  $H_2O$  ปริมาตร 55  $\mu l$  จะได้ปริมาตรรวม 80  $\mu l$

#### 3.8.1.2.3 การเพิ่มปริมาณ cDNA ของยีน *HbKRI* โดยปฏิกิริยา PCR

นำ sscDNA ของตัวอย่างต่างๆ ไปเพิ่มปริมาณ cDNA ของยีน *HbKRI* และ 18S rRNA โดยมีส่วนประกอบของสารต่างๆ ดังนี้

sscDNA	3.0	$\mu l$
1x <i>Tag</i> DNA Polymerase Buffer	5.0	$\mu l$
<i>HbKRI</i> /18S Upstream Primer	0.5	$\mu l$
<i>HbKRI</i> /18S Downstream Primer	0.5	$\mu l$
dNTP Mix	0.5	$\mu l$
<i>Tag</i> DNA Polymerase 1 Unit	0.13	$\mu l$
<u>ปริมาตรรวม</u>	<u>25.0</u>	<u><math>\mu l</math></u>

ปรับให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25  $\mu$ l ด้วย Deionized H<sub>2</sub>O นำไปเพิ่ม ปริมาณชิ้นส่วน cDNA ของยีน *HbKR1* ด้วยเครื่อง PCR ที่ปรับตั้งโปรแกรมดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาทีและอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที จำนวน 30 รอบ

3.8.1.2.4 ทำ Electrophoresis ในเจลอะกาโรสความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ย้อมเจลด้วย EtBr (0.1mg/ml) นำไปถ่ายรูป ด้วยเครื่อง Gel Documentation และวัดความเข้ม (Intensity) ของแถบ cDNA ของทุกตัวอย่าง สำหรับค่าการแสดงผลออกของ ยีน *HbKR1* ของแต่ละ ตัวอย่างคำนวณจากค่าอัตราส่วนระหว่าง Intensity ของแถบ cDNA ของยีน *HbKR1* และ Intensity ของแถบ cDNA ของ 18S rRNA

### 3.8.2. ผลของการกรีดต่อการแสดงออกของ ยีน *HbKR1* ในน้ำยางของต้นยางพาราสายพันธุ์ RRIC110

#### 3.8.2.1 การวางแผนการทดลอง

ศึกษาผลของการกรีดต่อการแสดงออกของ ยีน *HbKR1* ในน้ำยางของ ยางพาราสายพันธุ์ RRIC110 ที่มีอายุประมาณ 3 ปี ในแปลงปลูก ที่ตำบลพะวง อำเภอเมือง จังหวัด สงขลา ซึ่งเป็นยางที่ไม่มีการเปิดกรีดมาก่อน โดยวางแผนการทดลอง แบบสุ่มตลอด ซึ่งมีการ ทดลองครั้งนี้ ศึกษาผลของการกรีดต่อการแสดงออกของยีนมีทั้งหมด 2 ทรีตเมนต์ ทรีตเมนต์ละ 5 ซ้ำ คือ ทรีตเมนต์ที่ 1 กรีดทุกวันต่อเนื่องกันเป็นเวลา 10 วัน ทรีตเมนต์ที่ 2 กรีดวันเว้น 2 วัน เป็น ระยะเวลา 10 วัน

#### 3.8.2.2 การเก็บน้ำยางและการเตรียม Total RNA

กรีดยางเวลา 06.00 น. โดยปล่อยให้ให้น้ำยางไหลลงในหลอดขนาด 15 ml ที่ แห่อยู่ในน้ำแข็งตลอดเวลา รองรับน้ำยางจนกระทั่งน้ำยางหยุดไหล จึงรวบรวมน้ำยางไปวัด ปริมาตร และแบ่งส่วนหนึ่งไปเตรียม Total RNA ตามที่ได้กล่าวข้างต้น

#### 3.8.2.3 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *HbKR1* โดยเทคนิค sqRT-PCR

วิเคราะห์การแสดงออกของ *HbKR1* ตามวิธีการที่ได้กล่าวในข้อ 3.8.1.2

### 3.8 วิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีน *HbKR1* ทางสถิติ

วิเคราะห์ผล การ แสดงออกของยีน *HbKR1* ของตัวอย่างต่างๆ โดยทดสอบความแปรปรวน (ANOVA) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) และเปรียบเทียบผลของการกรีดถี่และกรีดปกติต่อการแสดงออกของ ยีน *HbKR1* โดย Paired Sample T-Test