

บทที่ 4

การศึกษามแบบแผนการแสดงออกของยีนในระหว่างพัฒนาการของอวัยวะและเนื้อเยื่อของข้าว

เรณูเป็นโครงสร้างที่สำคัญของพืช มีบทบาทในการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และการสร้างเมล็ดของพืช การศึกษาการแสดงออกของยีนในระหว่างพัฒนาการของอวัยวะและเนื้อเยื่อของข้าว เป็นข้อมูลพื้นฐานที่ช่วยให้เข้าใจชีววิทยาระดับโมเลกุลของขั้นตอนการพัฒนาของอวัยวะและเรณู และนำไปสู่การศึกษาเพื่อทำให้เข้าใจถึงกลไกการแสดงออกและการควบคุมการแสดงออกของยีนในระยะพัฒนาการของอวัยวะและเรณูด้วยเทคนิคระดับสูงในขั้นต่อไป

การศึกษามแบบแผนการแสดงออกของยีนทำได้หลายวิธี เช่น คอทบลอต ไฮบริไดเซชัน (Dot blot hybridization), โคลนไฮบริไดเซชัน (Colony hybridization), นอเทิร์น บลอต ไฮบริไดเซชัน (Northern blot hybridization), เซาเทิร์น บลอต ไฮบริไดเซชัน (Southern blot hybridization), อินซิทูไฮบริไดเซชัน (In situ hybridization) เป็นต้น

ไฮบริไดเซชัน (Hybridization)

เป็นวิธีการที่ใช้คุณสมบัติด้านการแยก-จับคู่ระหว่างดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอ หรือดีเอ็นเอกับอาร์เอ็นเอ ซึ่งจะเกิดการจับคู่เกิดขึ้นเมื่อมีลำดับเบสเป็นคู่สมกัน จากคุณสมบัติดังกล่าวถ้ามีดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอจำเพาะที่ต้องการอยู่ สามารถใช้ดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอจำเพาะมาเป็นตัวตรวจตาม (probe) หาคำแหน่งของกรดนิวคลีอิกทั้งดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอในเนื้อเยื่อได้ ซึ่งตัวตรวจตามอาจเป็นตัวตรวจตามสายสั้น (oligonucleotide probe) หรือ ตัวตรวจตามสายยาว (polynucleotide probe) ตัวตรวจตามสายยาวเตรียมจากดีเอ็นเอสายคู่ (double stranded DNA) หรือ ดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single stranded DNA) หรือ อาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single stranded RNA) การติดฉลากตัวตรวจตามส่วนใหญ่ถ้าเป็นตัวตรวจตามสายสั้นติดฉลากโดยวิธี 3' end labelling ถ้าเป็นตัวตรวจตามสาย

ยาวที่เป็นดีเอ็นเอสายคู่ติดฉลากโดยวิธี nick translation หรือ random priming extension หรือ วิธี *In vitro* transcription ตรวจสอบปฏิกิริยาการจับคู่ระหว่างดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอตัวตรวจตาม หรืออาร์เอ็นเอกับดีเอ็นเอตัวตรวจตามได้ โดยการติดฉลากตัวตรวจตามด้วยสารกัมมันตภาพรังสี เช่น ^3H , ^{35}S , ^{32}P และติดตามดูได้จากฟิล์มเอ็กซ์เรย์ (X-ray) ที่ฉายด้วยรังสีจะเห็นเป็นจุดดำหรือ ติดฉลากด้วยสารปลอดกัมมันตภาพรังสีเช่น ไบโอดีน (biotin), ฟลูออเรสซิน (fluorescein), ดิกอกซิจีนิน (digoxigenin; DIG) ที่เชื่อมต่อกับโปรตีนที่จับกับตัวแสดงผล (reporter binding protein; RBP) เช่น เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase; AP) และ เอนไซม์เพอร์ออกซิเดส (peroxidase; POD) หรือ แอนติบอดี หรือ วัสดุขนาดเล็กเชื่อมเข้ากับโปรตีนที่จับกับตัวแสดงผลและตรวจหาปฏิกิริยาการจับคู่ของตัวตรวจตามที่ติดฉลากด้วยอนุภาคของทองคำกับกรดนิวคลีอิกในเนื้อเยื่อ ด้วยการเพิ่มขยายสัญญาณจากอนุภาคของทองคำโดยการย้อมด้วยสารละลายเงิน เรียกวิธีการนี้ว่า อิมมูโนโกลด์ซิลเวอร์สแตนนิง (Immunogold silver-staining method; IGSS) ตรวจสอบปฏิกิริยาการจับคู่ของกรดนิวคลีอิกในเนื้อเยื่อกับตัวตรวจตามที่ติดฉลากได้ โดยการเติมสไลด์สเตรทของเอนไซม์ านกรณีที่ใช้เอนไซม์เชื่อมกับสารปลอดกัมมันตภาพรังสี แล้วนำศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บริเวณที่เกิดปฏิกิริยาการจับคู่จะเกิดผลผลิตที่เป็นสีม่วงจากการคะตะไลซ์สไลด์สเตรทของเอนไซม์ (สูนีย์ เกิดบัณฑิต, 2530a; ทรงศักดิ์ เพ็ชรมิตร, 2536; วีระพงศ์ ลุลิตานนท์, 2536)

อินซิทูไฮบริดเซชัน เป็นวิธีการหนึ่งที่สำคัญหลักการของการไฮบริดเซชันที่เข้ากันตรวจหาพร้อมชี้ตำแหน่งของกรดนิวคลีอิกทั้งดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ ในเนื้อเยื่อที่ผ่านกระบวนการต่างๆและตัดเป็นแผ่นบางด้วยเครื่องอัลตราไมโครทอม

ประโยชน์ของอินซิทูไฮบริดเซชัน

อินซิทูไฮบริดเซชันได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้งานหลายด้าน เช่น ระบุชี้ตำแหน่งที่มีการแสดงออกของจีโนมายานเซลล์ ใช้ศึกษาการกระจายของกระบวนการถอดรหัสของเซลล์ต่างๆในเนื้อเยื่อตัวอย่าง ใช้พิสูจน์ชนิดพร้อมทั้งระบุชี้ตำแหน่งของไวรัสที่เข้าปเพิ่มจำนวน

เซลล์และเนื้อเยื่อติดเชื้อ ใช้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอในไรโบซอมในเซลล์ใช้ศึกษาตำแหน่งของจีโนมบนเส้นโครโมโซม ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคต่างๆ เช่นการตรวจสภาพการผ่าเหล่าของจีโนมในคนไข้โรคพันธุกรรม (genetic disorder disease) ได้แก่ โรคธาลัสซีเมีย โรคฮีโมโกลบินผิดปกติ เป็นต้น หรือใช้ในการตรวจหาดีเอ็นเอ หรืออาร์เอ็นเอของเชื้อโรคต่างๆที่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคในเซลล์มนุษย์ เป็นต้น (ทรงศักดิ์ เพ็ชรมิตร, 2535)

ตัวอย่างของการนำอินทิเกรชันรีโพรตีนมาใช้ในการศึกษาการแสดงออกของจีโนมพืช เช่น

- 1) Raghavan (1989) ศึกษาการกระจายตัวของอาร์เอ็นเอในไรโบซอมที่มีการเปลี่ยนแปลงในแต่ละช่วงเวลาและแต่ละเนื้อเยื่อในระหว่างพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าวพันธุ์ IR-30 และ ใช้จีโนมจากโคลน rice histone ซึ่งติดฉลากด้วย [^3H]poly(U) เป็นตัวตรวจตามพบว่า จีโนมมีการแสดงออกเฉพาะในผนังอับเรณูชั้นแอนโดเทเลียม ซึ่งเป็นผนังอับเรณูระยะที่ไมโครสปอร์ไรฟมีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส
- 2) Robert และคณะ (1993) ศึกษาการแสดงออกของจีโนมจากโคลน Sta44-4 ในต้น *B. napus* สายพันธุ์ Westar พบว่า มีการแสดงออกของจีโนมในระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียสจนถึงระยะไมโครสปอร์มี 3 นิวเคลียส
- 3) Nacken และคณะ (1991) ศึกษาการแสดงออกของจีโนมจากโคลน Tap2 ในต้น *A. majus* พบว่า มีการแสดงออกของจีโนมชั้นทาลิพม์ซึ่งเป็นผนังอับเรณู
- 4) Evrard และคณะ (1991) ศึกษาการแสดงออกของจีโนมจากโคลน SF2 ในต้นทานตะวัน พบว่า มีการแสดงออกของจีโนมเฉพาะในผนังอับเรณูชั้นอีพิเคอร์มิส

การศึกษาในการทดลองบนนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการแสดงออกของจีดีเอ็นเอจากโคลน 4D2 และ โคลน A7 ในระหว่างพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าว โดยวิธีอินทิเกรชันรีโพรตีน (Cox และ Goldberg, 1988) คือ

- 1) ศึกษาการแสดงออกของจีดีเอ็นเอจากโคลน A7 ในอับเรณูจากดอกสดของข้าวพันธุ์ กข.23 ระยะไมโครสปอร์ไรฟ, ระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียสและระยะเรณูมี 3

นิวเคลียส

2) ศึกษาการแสดงออกของจีดีเอ็นเอจากโคลน A7 ในอับเรณูจากดอกสคของข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 เฉพาะระยะเรณูมี 3 นิวเคลียส

3) ศึกษาการแสดงออกของจีดีเอ็นเอจากโคลน 4D2 ในอับเรณูจากดอกสคของข้าวพันธุ์ Amaroo เฉพาะระยะเรณูมี 3 นิวเคลียส

ติดฉลากตัวตรวจตามที่ได้จากโคลน A7 ด้วยสารปลดกัมมันตภาพรังสี คือ biotin-14-dUTP ด้วยวิธี random priming extension และตรวจสอบปฏิกิริยาการจับคู่โดยใช้สเตรปตาวิดินอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสคอนจูเกต (Streptavidin alkaline phosphatase conjugate) และ ใช้ไนโตรบลูเตตระโซเลียม (nitro blue tetrazolium) และ 5-โบรม-4-คลอโร-3-อินโดลิล-ฟอสเฟส (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) เป็นซับสเตรทของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

ติดฉลากตัวตรวจตามที่ได้จากโคลน 4D2 ด้วยสารปลดกัมมันตภาพรังสี คือ biotin-16-rUTP ด้วยวิธี *In vitro* transcription ตรวจสอบปฏิกิริยาการจับคู่โดยใช้โกลด์แอนติไบโอตินโกลด์คอนจูเกต (goat anti-biotin gold conjugate) และเพิ่มขยายสัญญาณจากอนุภาคของทองโดยการย้อมด้วยสารละลายเงิน

พันธุ์ข้าวที่ใช้ในการศึกษา คือ

- ข้าวพันธุ์ กข.23 และ หอมมะลิ 105 จากประเทศไทย
- ข้าวพันธุ์ Amaroo จากประเทศออสเตรเลีย

สถานที่ทดลอง

- ภาควิชาพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
- ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

การปลูกข้าว ดำเนินการเหมือนการทดลองในบทที่ 1

วิธีการศึกษาวิจัย

1. เก็บและแยกอับเรณูออกเป็นกลุ่มตามระยะพัฒนาการของละอองเรณูของข้าว

เก็บอับเรณูระยะไมโครสปอร์ไรท์, ระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส และระยะเรณูมี 3 นิวเคลียสจากดอกสดของข้าวพันธุ์ กข.23 และเก็บอับเรณูระยะไมโครสปอร์ไรท์จากดอกสดของข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 และ Amaroo โดยนำผลที่ได้จากการศึกษานี้ในข้อ 3 จากการทดลองที่ 1 เป็นเกณฑ์การแยก และนำไปเตรียมเช็คชั้นถาวรของอับเรณูและเรณูของข้าวตามวิธีในข้อ 2.

2. การเตรียมเช็คชั้นถาวรของอับเรณูและเรณูของข้าว

2.1 การเตรียมเช็คชั้นถาวรของอับเรณูและเรณูของข้าวพันธุ์ กข.23 และ หอมมะลิ 105

1) การคงสภาพการทำงานของเนื้อเยื่อ

นำอับเรณูมาทำการคงสภาพด้วยสารละลายคานอฟสกี (Karnovsky's fixative) ซึ่งประกอบด้วย กลูตาโรลดีไฮด์ (glutaraldehyde) 4 % และพาราไกลูตาโรลดีไฮด์ (paraglutaraldehyde) 2 % ใน โซเดียมคลอไรด์บัฟเฟอร์ (Nacacodylatebuffer) 0.2 โมล พีเอช 7.2 เป็นเวลา 2 ชม. ล้างด้วยโซเดียมคลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.05 โมล พีเอช 7.0 จำนวน 3 ครั้งๆละ 20 นาที

2) การดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ

ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยเอทานอล 70, 80, 90 และ 100 % ความเข้มข้นละ 2 ครั้งๆละ 20 นาที

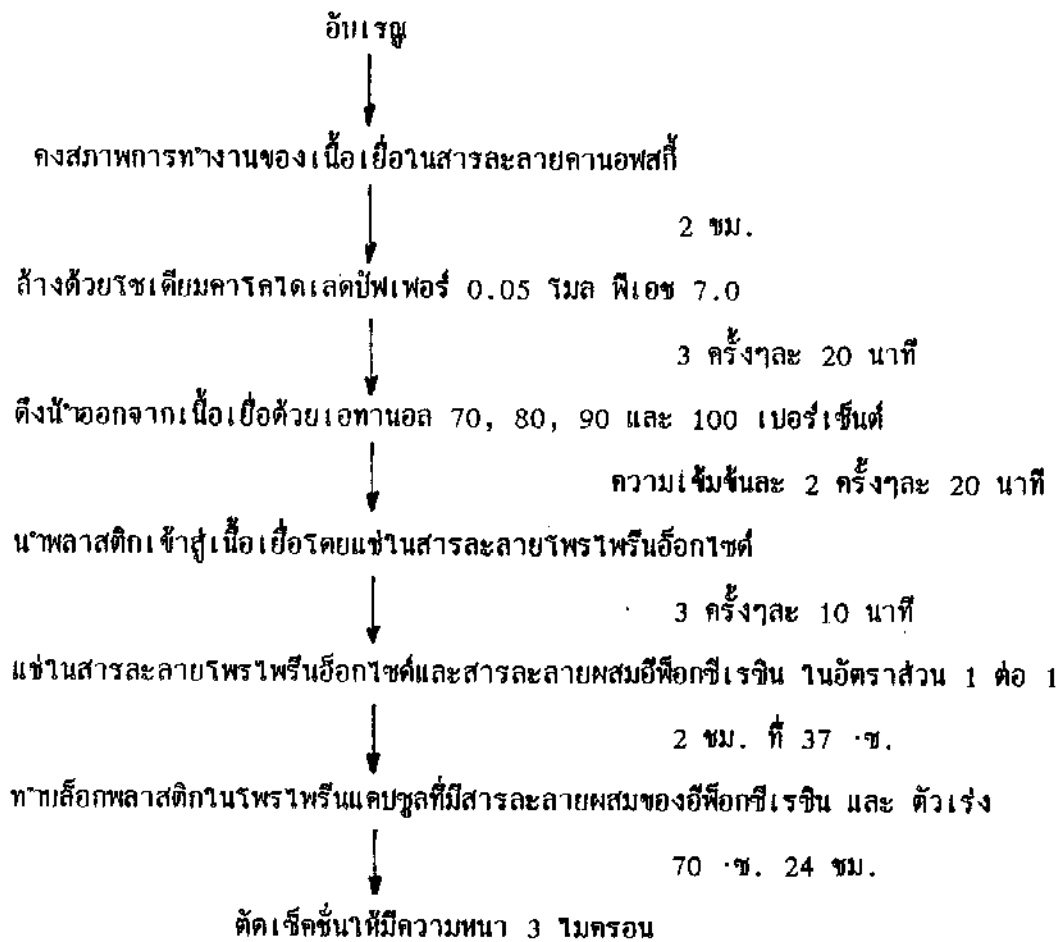
3) การนำพลาสติกเข้าสู่เนื้อเยื่อ

นำอับเรณูที่ดึงน้ำออกหมดแล้วไปแช่ในสารละลายโพรไพรีนออกไซด์ (propylene oxide) 3 ครั้งๆละ 10 นาที แล้วนำพลาสติกเข้าสู่เนื้อเยื่อโดยแช่ในสารละลายซึ่งประกอบด้วยโพรไพรีนออกไซด์และสารละลายพอลิเอพ็อกซีเรซิน (epoxy resin

mixture) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 เป็นเวลา 2 ชม. ที่ 37 ช. ทาบท็อกพลาสติกใน
 พรไพรีนแคปซูลที่มีสารละลายผสมของอีพ็อกซีเรซินและตัวเร่ง (DMP-30) ที่ 70 ช. 24 ชม.

4) การตัดเชิ๊คชั้น

ทาบท็อกพลาสติกมาตัดเชิ๊คชั้นด้วยเครื่องอุตสาหกรรมให้เชิ๊คชั้นมีความ
 หนา 3 ไมครอน ตัดเชิ๊คชั้นบนสไลด์ที่ผ่านการเคลือบด้วยสาร 3-อะมิโนพรพิลไตรเอทที่ออกซิ
 ไซเลน เพื่อให้ตัวอย่างสามารถติดแน่นกับแผ่นสไลด์ไม่หลุดออกจากสไลด์ในช่วงการทำอินซิ
 ทูเบรียดเซชั่นแล้วทาลงตัวอย่างแห้งติดบนสไลด์โดยวางไว้บนเครื่องอุ่นสไลด์ ที่อุณหภูมิ 40 ช.



ภาพที่ 38 โคอะแกรมแสดงการเตรียมเชิ๊คชั้นถาวรของเนื้อเยื่ออับเรณูและเรณูของข้าว

2.2 การเตรียมเช็คชั้นฉนวนของอับเรณูและเรณูของข้าวพันธุ์ Amaro

1) การคงสภาพการทำงานของเนื้อเยื่อ

นำอับเรณูมาทำการคงสภาพด้วยสารละลายไพเพอ์ (Pipes buffer) 50 mM พีเอช 7.3 เป็นเวลา 2 ชม.

2) การดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ

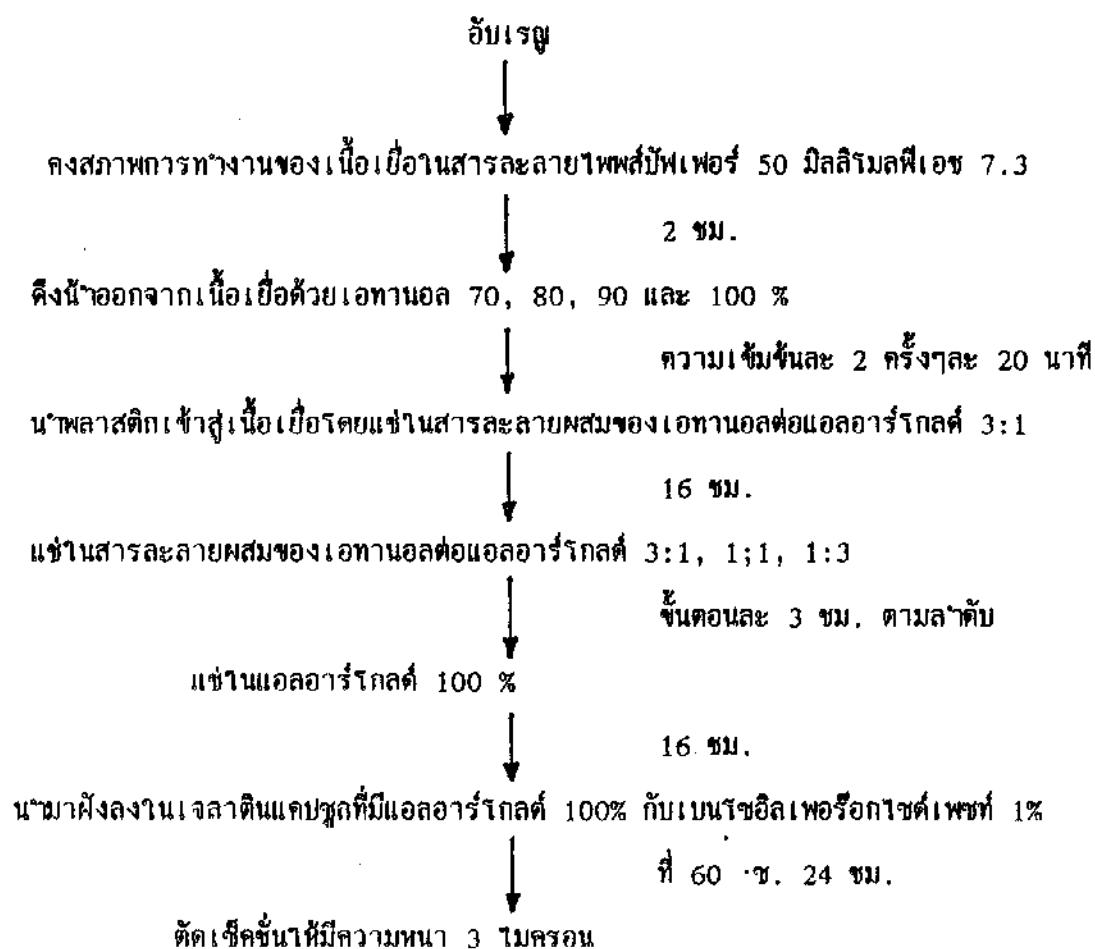
ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยเอทานอล 70, 80, 90 และ 100 % ความเข้มข้นละ 2 ครั้งๆละ 20 นาที

3) การนำพลาสติกเข้าสู่เนื้อเยื่อ

นำอับเรณูที่ดึงน้ำออกหมดแล้วไปแช่ในสารละลายผสมของเอทานอลต่อแอลอาร์โกลด์ (LR gold) 3 ต่อ 1 ที่อุณหภูมิห้อง 16 ชม. จากนั้นย้ายตัวอย่างมาแช่ต่อในสารละลายผสมของเอทานอลต่อแอลอาร์โกลด์ 3 ต่อ 1, 1 ต่อ 1, 1 ต่อ 3 ขึ้นตอนละ 3 ชม. ตามลำดับ ย้ายตัวอย่างมาแช่ในแอลอาร์โกลด์ 100 % ที่อุณหภูมิห้อง 16 ชม. และฝังอับเรณูลงในเจลาตินแคปซูลที่มีแอลอาร์โกลด์ 100 % ผสมกับ 1 % ของเบนโซอิลเพอร์ออกไซด์ (benzoyl peroxide) ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชม.

4) การตัดเช็คชั้น

นำบล็อกพลาสติกมาตัดเช็คชั้นด้วยเครื่องอัลตราไมโครทมิให้เช็คชั้นมีความหนา 3 ไมครอน ตัดเช็คชั้นบนสไลด์ที่ผ่านการเคลือบด้วยสาร 3-อะมิโนพรอพิลไตรเอท็อกซีซิลาน (3-Aminopropyl triethoxy silane) เพื่อให้ตัวอย่างสามารถติดแน่นกับแผ่นสไลด์ได้ดี ไม่หลุดออกจากสไลด์ในช่วงการทำอินซิทูไฮบริดเชชัน แล้วทำให้ตัวอย่างแห้งติดบนสไลด์โดยวางไว้บนเครื่องอุ่นสไลด์ ที่อุณหภูมิ 40 °C.



ภาพที่ 39 ไดอะแกรมแสดงการเตรียมเช็คน้ำของเนื้อเยื่ออับเรณูและเรณูของข้าว

3. การตรวจหาอาร์เอ็นเอ

เมื่อเตรียมเช็คน้ำแล้วนำมาตรวจเช็คว่าการสลายตัวของกรดนิวคลีอิกออกจากเซลล์หรือไม่ก่อนที่จะนำมาศึกษาต่อไป โดยนำเช็คน้ำมาผ่านการย่อยด้วย เอนไซม์อาร์เอ็นเอส (RNase) 1 มก. ที่ละลายในฟิอัมไพเพอไรด์ 1 มล. และไม่ผ่าน มาตรวจหาอาร์เอ็นเอ ด้วยการบ่มสไลด์ใน 0.2 มล. โกลซินัมไพเพอไรด์ ฟิเอช 2 เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาย้อมด้วย 0.5 มก. ของอะคริดีนออเรนจ์ (Acridine orange) ที่ละลายใน 1 มล. ของ 0.2 มล. โกลซินัมไพเพอไรด์ ฟิเอช 2 แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วย 0.2 มล. โกลซินัมไพเพอไรด์ ฟิเอช 2 จากนั้นนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ้ายังมีอาร์เอ็นเอในเนื้อเยื่อจะพบว่าไซโทพลาสซึมย้อมติดสีส้ม ส่วนของนิวเคลียสย้อมติดสีเหลือง

4. การเตรียมตัวตรวจตาม

4.1 การเตรียมตัวตรวจตาม จากแบคทีเรียโคลน A7

4.1.1 การเพิ่มจำนวนโคลน

นำแบคทีเรียโคลน A 7 ที่คัดเลือกมาจากห้องธนาคารซีดีเอ็นเอ (cDNA Library) ของเรณูที่เจริญเต็มที่ของข้าวที่ได้จาก ผศ.ดร.ปิยะดา ชีระกุลพิศุทธิ์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น มาทำการเพิ่มจำนวนในอาหารเหลว ซึ่งประกอบด้วยอาหารเหลวแอลบี 10 มล., มอลดิส 0.4 % และ 50 ug. แอมพิซิลลิน (ampicillin) บนเครื่องเขย่าที่ 37 ซ. เป็นเวลา 16-20 ชม.

4.1.2 การแยกพลาสมิดซีเอ็นเอออกจากเซลล์ตามวิธี Plasmid mini-prep (Serghini, 1989)

นำเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 4.1.1 จำนวน 1.5 มล. มาปั่นเหวี่ยง แล้วละลายตะกอนเชื้อด้วยทีเอชอีพีเอฟเออร์ 50 ul. จากนั้นเติมสารละลายผสมของฟีนอลต่อคลอโรฟอร์มต่อไอโซเอมิลต์อัลกอฮอล์ อัตราส่วน 25 ต่อ 24 ต่อ 1 จำนวน 50 ul. แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ 10,000 xg 3 นาที ตักเอาสารละลายชั้นบนจำนวน 50 ul. มาใส่หลอดไมโครทิวป์ แล้วตกตะกอนพลาสมิดซีเอ็นเอด้วย 10 โบลของแอมโมเนียมอะซิเตท 12.5 ul. และเติมเอทานอลบริสุทธิ์ 125 ul. นำไปแช่ในกระป๋องน้ำแข็ง 15 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงเอาตะกอนพลาสมิดซีเอ็นเอและล้างด้วยเอทานอล 70 % แล้วปั่นเหวี่ยงเอาตะกอนพลาสมิดซีเอ็นเอ ตั้งทิ้งไว้ให้เอทานอลระเหยไปจึงละลายตะกอนพลาสมิดซีเอ็นเอด้วยทีอีพีเอฟเออร์ 20 ul.

4.1.3 การแยกซีดีเอ็นเอออกจากพลาสมิดซีเอ็นเอ

นำพลาสมิดซีเอ็นเอ A7 ที่ได้จากข้อ 4.1.2 มาย่อยด้วยเอนไซม์ EcoRI และใช้การย้อมสีที่มีจุดหลอมเหลวต่ำ (Low melting agarose) 0.8 % ที่ละลายในทีอีพีเอฟเออร์ และมี 2 ul. ของ 10 มก. ต่อ มล. ของเอ็ดทีเดียมโบรมาйд (Ethidium bromide) เป็นตัวกลางในการแยกด้วยวิธีอิเล็กโตรเฟเรซิส แล้วนำซีดีเอ็นเอมาทำหีบรีสุทซ์ตามวิธีของ Maniatis และคณะ (1982)

4.1.4 การทำซีดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ตามวิธีของ Maniatis และคณะ (1982)

ตัดแถบของซีดีเอ็นเอจากอะการโรสเจลในข้อ 4.1.3 ใส่หลอดไมโครทิวป์เดิมที่อีปป์เพอร์ 100 μ l. นำไปอุ่นที่ 65 $^{\circ}$ C 10 นาที จนกระทั่งอะการโรสเจลละลายหมด แล้วสกัดอะการโรสเจลออกด้วยสารละลายผสมฟีนอลต่อคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ในปริมาณ 1 เท่าของปริมาณสารละลายที่มีในหลอดและปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้องโดยซ้ำแรงเหวี่ยง 10,000 $\times g$ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดส่วนน้ำที่ใสสกัดอะการโรสเจลออกอีกครั้งด้วยคลอโรฟอร์ม 1 เท่าของปริมาณสารละลายที่มีในหลอดและตกตะกอนพลาสมิดซีดีเอ็นเอด้วย 3 มิลลิลิตรของโซเดียมอะซิเตต 1/10 เท่าของปริมาณสารที่มีในหลอด และเติมเอทานอลบริสุทธิ์ 2 เท่าของปริมาณสารที่มีในหลอด เก็บที่ -70° C 20 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงโดยซ้ำแรงเหวี่ยง 13,000 $\times g$ เป็นเวลา 10 นาที เทของเหลวใสส่วนบนทิ้ง แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เอทานอลระเหยไป ละลายตะกอนซีดีเอ็นเอด้วยที่อีปป์เพอร์ 20 μ l.

4.1.5 การติดฉลากตัวตรวจตามจากโคลน A7 ด้วยสารปลดกัมมันตภาพรังสี คือ Biotin-14-dUTP โดยวิธี random priming extension โดยใช้ชุดคัมปายาของบริษัท Gibco BRL

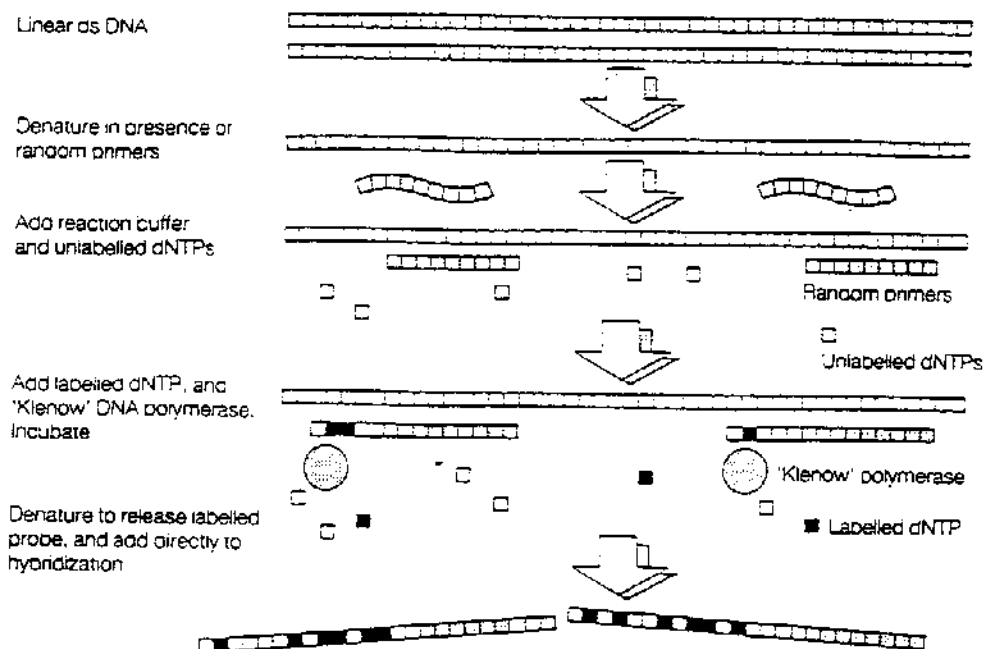
นำซีดีเอ็นเอจากโคลน A7 ประมาณ 100 ng. ที่ละลายในที่อีปป์เพอร์จากข้อ 4.1.4 มา 20 μ l. มาต้มในน้ำเดือด 5 นาที แล้วนำมาแช่ในน้ำแข็งทันที จากนั้นเติม 5 μ l. ของ dNTP ที่เข้มข้น 10 เท่า (ที่ละลายใน 10 mM ของทริสไฮโดรคลอริก พีเอช 7.5 และ 1 มิลลิโมลของโซเดียมอะซิเตต ซึ่งมี 1 mM ของ biotin-14-dCTP, 1 mM ของ dCTP, 2 mM ของ dATP, 2 mM ของ dTTP, 2 mM ของ dGTP) และเติม 20 μ l. ของสารละลาย Random primer ที่เข้มข้น 2.5 เท่า ผสมให้เข้ากันแล้วเติม 1 μ l. ของเอนไซม์ คีโนวแฟร็กเมนต์ (Klenow fragment) ที่เข้มข้น 100 mM (ที่ละลายใน 100 mM ของโบตัสเซียมฟอสเฟสพีเอช 7.0 และมี 10 mM ของ 2-เมอเคปโตรเอทานอล 50 % ผสมกับกลีเซอรอล 50 %) จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาณทั้งหมด 50 μ l. นำไปปั่นที่ 37 $^{\circ}$ C 60 นาที แล้วเติม 5 μ l. ของสต็อปบัฟเฟอร์ (stop buffer; 0.2 โมลของอะซิเตต พีเอช 7.5)

4.1.6 การดึงส่วนของนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ที่มาได้ถูกติดฉลากออกโดยผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟีที่มีเซฟาเดกซ์ ซี-50 บรรจุอยู่ในคอลัมน์

บรรจุเซฟาเดกซ์ ซี-50 ที่อิมมูโนสารละลายที่บีบีพีเฟอร์ ลงในคอลัมน์ขนาด 1 มล. ที่มีใยแก้วคอลลอยด์คอลัมน์ หยดซีเอ็นเอที่ได้รับการติดฉลากแล้วลงในคอลัมน์ แล้วเติมสารละลายที่บีบีพีเฟอร์ครั้งละ 100 μ l. และเก็บสารละลายที่ผ่านออกจากคอลัมน์ครั้งละ 2 หยดในหลอดไมโครทิวบ์ประมาณ 20 ลำดับส่วน นับแต่ละลำดับส่วนจำนวน 2 μ l. มาหยดลงบนแผ่นในลอนที่แบ่งออกเป็นช่องๆ 1 ถึง 20 ช่อง แล้วคั่งแผ่นในลอนที่ดำให้แห้งและนำไปอบที่ 80 $^{\circ}$ C. เป็นเวลา 1 ชม. จากนั้นทำการตรวจหาดีเอ็นเอที่ถูกติดฉลากในแต่ละลำดับส่วนที่ได้โดยใช้สารปลอดกัมมันตภาพรังสี และใช้ชุดน้ำยาของบริษัท Gibco BRL

4.1.7 การตรวจหาดีเอ็นเอที่ถูกติดฉลากบนแผ่นเมมเบรนโดยใช้สารปลอดกัมมันตภาพรังสีและใช้ชุดน้ำยาของบริษัท Gibco BRL

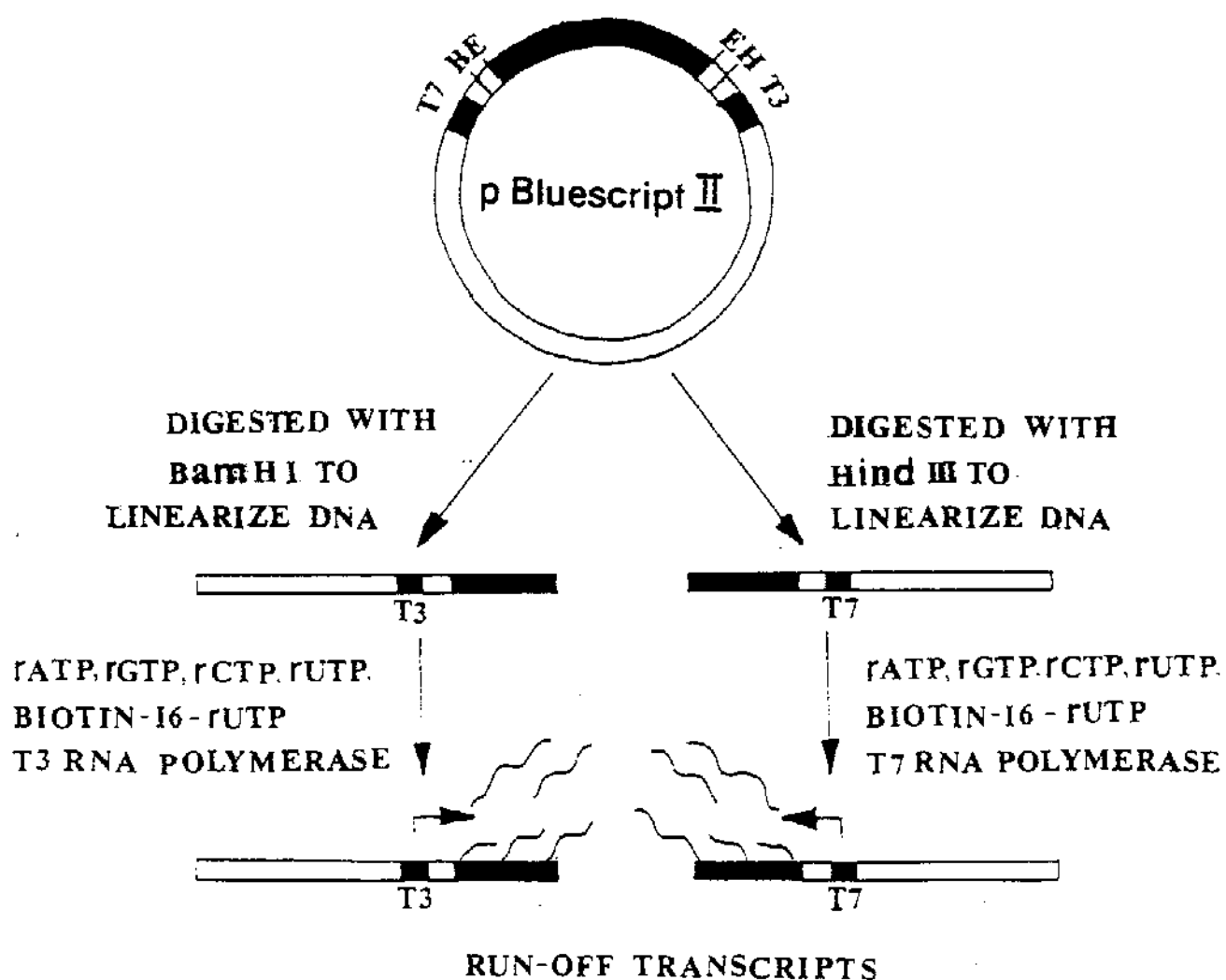
บดออกพื้นที่บนแผ่นในลอนจากข้อ 4.1.6 เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาการจับคู่ที่ไม่จำเพาะด้วยโซวายที่เข้มข้นบูมิน 3 % ที่ 65 $^{\circ}$ C. เป็นเวลา 1 ชม. แล้วบ่มาน 1 μ l. ของสเตรปตาวิดินอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสคอนจูเกต (ที่ละลายในสารละลายที่บีบีพีเฟอร์ 1 มล.) เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นล้างด้วยสารละลายที่บีบีพีเฟอร์ 2 ครั้งๆละ 15 นาที และบ่มานสารละลายที่บีบีพีเฟอร์ 10 นาที ตรวจสอบผลด้วยการนับที่ 37 $^{\circ}$ C. ใน 33 μ l. ของไนโตรบูเตดไตรโซเลียม 75 มก. ที่ละลายในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ 70 % (dimethylformamide) และ 25 μ l. ของ 5-โบรม-4-คลอโร-3-อินโดอีว-ฟอสเฟส 50 มก. ที่ละลายในไดเมทิลฟอร์มาไมด์ 70 % ซึ่งเป็นสับสเตรทของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส บริเวณที่มีดีเอ็นเอที่ถูกติดฉลากด้วยโบรดินจะเกิดผลผลิตสีน้ำเงิน จากการกะตะไลซ์ด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส



ภาพที่ 40 โดอะแกรมแสดงวิธีการเตรียมตัวตรวจตามจากแบคทีเรียโคลน A7

4.2 การเตรียมตัวตรวจตาม จากแบคทีเรียโคลน 4D2

ทำการเพิ่มจำนวนโคลนและแยกพลาสมิดดีเอ็นเอออกจากเซลล์ ตามวิธีในข้อ 4.1.1 และ 4.1.2 แล้วย่อยพลาสมิดดีเอ็นเอมาติดฉลากด้วยสารปลดปล่อยกับมันดภาพรังสี คือ Biotin-16-rUTP โดยวิธี *In vitro* transcription โดยใช้ชุดน้ำยาของบริษัท Promega โดยนํพลาสมิดดีเอ็นเอมาจำนวน 4 μ l. แบ่งใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดละ 2 μ g. แล้วย่อยด้วยเอนไซม์ BamH I และ Hind III จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ย่อยแล้วมาเป็นแม่แบบในการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอที่จะใช้เป็นตัวตรวจตาม โดยการเติมสารต่างๆ ดังนี้คือ 0.5 mM ของ rATP, rGTP, rCTP และ biotin-16-rUTP, 0.25 mM ของ rUTP, เติม 100 ยูนิต ของ RNasin ที่ละลายในบัฟเฟอร์ที่มีส่วนผสมของ 40 mM ของทริส พีเอช 7.5, 6 mM ของแมกนีเซียมคลอไรด์, 10 mM ของโซเดียมคลอไรด์, 2 mM ของสเปอร์มิดีนและ 10 mM ของไดโทเทอริทอลลงในแต่ละหลอด จากนั้นเติม 20 ยูนิตของ T3 อาร์เอ็นเอโพลิเมอเรส ลงในหลอดของพลาสมิดดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วย BamH I และเติม 20 ยูนิตของ T7 อาร์เอ็นเอโพลิเมอเรสลงในหลอดของพลาสมิดดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วย Hind III นำมาปั่นที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$ C. เป็นเวลา 2 ชม.



ภาพที่ 41 โคอะแกรมแสดงวิธีการเตรียมตัวตรวจตามจากแบคทีเรียโคลน 4D2

5. การไฮบริดเชลล์

5.1 การไฮบริดระหว่างอาร์เอ็นเอของไวรัสที่มันเนื้อเยื่อเกี่ยวกับตัวตรวจตามทีเตรียมจากโคลน A7

นำเชลล์ชั้นถาวรที่ผ่านการย่อยด้วยอาร์เอ็นเอสและไมผ่าน มาแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ เชลล์ชั้นถาวรที่ผ่านและไม่ผ่านการย่อยด้วยอาร์เอ็นเอส โดยไม่ต้องไฮบริดกับตัวตรวจตามไว้เป็นตัวควบคุมและอีกกลุ่มคือ เชลล์ชั้นถาวรที่ผ่านและไม่ผ่านการย่อยด้วยเอ็นไซม์อาร์เอ็นเอส มาไฮบริดกับตัวตรวจตาม การไฮบริดกับตัวตรวจตาม โดยหยดตัวตรวจตามทีผ่านดัม 5 นาที่ ลงบนสไลด์ 10 u1. บ่มสไลด์ในภาชนะที่ชื้นและปิดสนิทที่มีสารละลายฟอร์มามายด์ 50 % 16 ชม. จากนั้นนำเชลล์ชั้นถาวรทั้งสองกลุ่ม มาผ่านขั้นตอนการล้างสารส่วนที่ไม่เกิดปฏิกิริยาการจับคู่ออก ในสารละลายเอสเอสซีบีเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 6 เท่า 10 นาที่ ที่อุณหภูมิห้อง, ความเข้มข้น 2 เท่า ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที่ และ ความเข้มข้น 2 เท่า อีกครั้งที่ 37 ซ. 10 นาที่

5.2 การไฮบริดระหว่างอาร์เอ็นเอของไวรัสที่มันเนื้อเยื่อเกี่ยวกับตัวตรวจตามทีเตรียมจากโคลน 4D2

นำเชลล์ชั้นถาวรมาไฮบริดกับตัวตรวจตามที่ได้จากการย่อยด้วย Balm I และ นำเชลล์ชั้นถาวรอีกกลุ่มมาไฮบริดกับตัวตรวจตามที่ได้จากการย่อยด้วย HindIII โดยหยดตัวตรวจตามแต่ละชนิด 10u1. ลงบนเชลล์ชั้นถาวร แล้วนำไปบ่มที่ 37 ซ. ในภาชนะที่ชื้นและปิดสนิทที่มีสารละลายฟอร์มามายด์ 50 % 16 ชม. จากนั้นนำสไลด์ทั้งสองกลุ่มมาผ่านขั้นตอนการล้างสารส่วนที่ไม่เกิดปฏิกิริยาการจับคู่ออก (posthybridization washes) ในสารละลายเอสเอสซีบีที่มีความเข้มข้น 2 เท่า 15 นาที่ ที่อุณหภูมิห้อง และความเข้มข้น 1 เท่า ที่อุณหภูมิห้อง 45 นาที่

6. การตรวจสอบการไฮบริดเชลล์

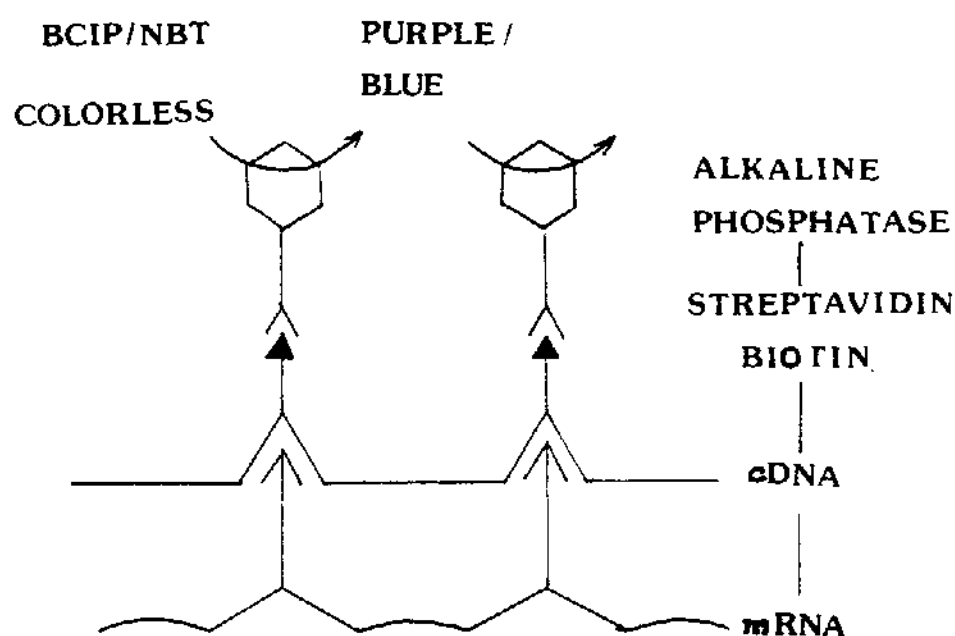
6.1 การตรวจสอบการไฮบริดระหว่างอาร์เอ็นเอของไวรัสที่มันเนื้อเยื่อเกี่ยวกับตัวตรวจตามทีเตรียมจากโคลน A7

นำเชลล์ชั้นถาวรทั้งสองกลุ่มจากข้อ 5.1 มาตรวจสอบปฏิกิริยาการจับคู่ของ ดีเอ็นเอจากโคลน A7 กับอาร์เอ็นเอที่มันเนื้อเยื่อ โดยนำเชลล์ชั้นถาวรมาบ่มสไลด์พื้นที่ที่ไม่เกิด

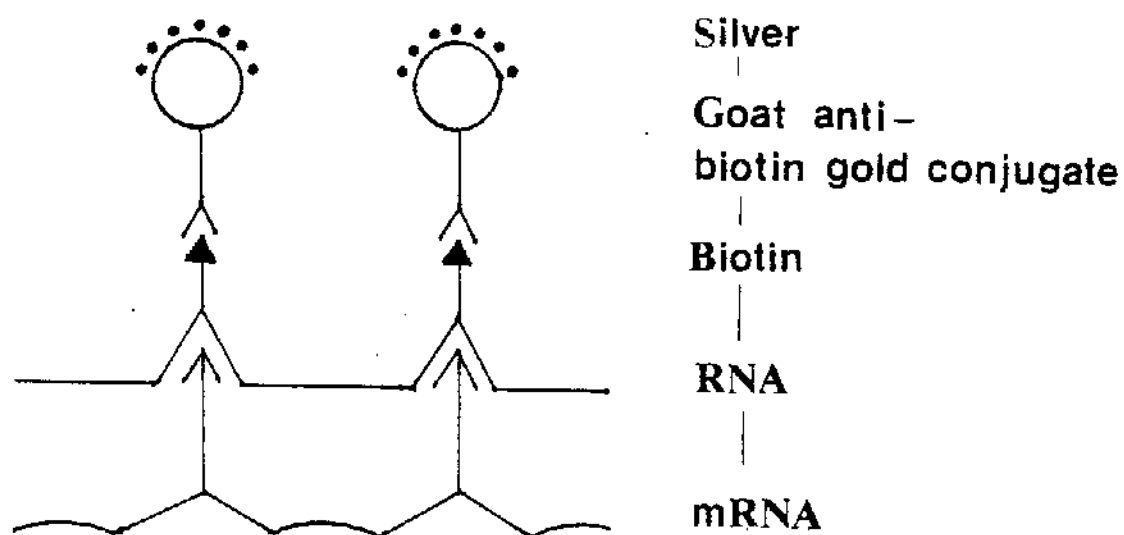
ปฏิบัติการการจับคู่เพื่อป้องกันการเกิดปฏิบัติการจับคู่ที่ไม่จำเพาะด้วยรอยาวจีซิมอัมบอุมิน 3% ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วยสารละลายทีพีเอสบัฟเฟอร์ ที่มีความเข้มข้น 2 เท่า เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมาปั่น 1 ul. ของสเตรปตาวิดินอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสคอนจูเกต (ที่ละลายในสารละลายทีพีเอสบัฟเฟอร์ 50 ul.) เป็นเวลา 1 ชม. จากนั้นล้างด้วยสารละลายทีพีเอสบัฟเฟอร์ 3 ครั้งๆละ 5 นาที และปั่นที่ 37 ช. ใน 33 ul. ของไนโตรเบลูเทตระโซเลียม 75 มก. ที่ละลายในไดเมทิลฟอร์มามاید 70 % และ 25 ul. ของ 5-โบรม-4-คลอโร-3-อินโดลิล-ฟอสเฟส 50 มก. ที่ละลายในไดเมทิลฟอร์มามاید 70 % ซึ่งเป็นซับสเตรทเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บริเวณที่เกิดปฏิบัติการการจับคู่ระหว่างอาร์เอ็นเอเอนเอื้อเยื่อกับดีเอ็นเอจากโคลนที่คัดลอกด้วยไบโรติน จะเกิดผลผลิตสีน้ำเงินจากปฏิบัติการที่คะตะไลซ์โดยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

6.2 การตรวจสอบการไฮบริดระหว่างอาร์เอ็นเอนาร์หัสที่มันเยื่อเยื่อกับตัวตรวจตามที่เตรียมจากโคลน 4D2

นำเชื้อชั้นถาวรทั้งสองกลุ่มจากข้อ 5.2 มาตรวจสอบปฏิบัติการการจับคู่ของอาร์เอ็นเอจากโคลน 4D2 กับอาร์เอ็นเอที่มันเยื่อเยื่อ โดยนำเชื้อชั้นถาวรมาปั่นในสารละลายที่มีโรดแอนตี้ไบโรตินโรดส์คอนจูเก้น ละลายในเจลาคีน 1 % ที่ละลายในสารละลายทีพีเอสบัฟเฟอร์ จากนั้นนำมาล้างด้วยสารละลายทีพีเอสบัฟเฟอร์ ที่มี 0.1 % ทวิน 20 (Tween 20) 3 ครั้งและในสารละลายทีพีเอสบัฟเฟอร์ 1 ครั้ง จากนั้นทิ้งสไลด์ไว้แห้ง แล้วนำมาเพิ่มขยายสัญญาณจากอนุภาคของทองและบิ่อมด้วยสารละลายเงิน ด้วยชุดนี้ยาของบริษัท Amersham ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บริเวณที่เกิดปฏิบัติการการจับคู่ระหว่างอาร์เอ็นเอนเอื้อเยื่อกับตัวตรวจตามที่เตรียมจากโคลนที่เป็นแอนติเซนส์อาร์เอ็นเอ (antisense RNA) และคัดลอกด้วยไบโรตินจะเกิดผลผลิตสีน้ำเงินและไม่เกิดปฏิบัติการการจับคู่ระหว่างอาร์เอ็นเอนเอื้อเยื่อกับตัวตรวจตามที่เตรียมจากโคลนที่เป็นเซนส์อาร์เอ็นเอ (sense RNA) และคัดลอกด้วยไบโรติน



ภาพที่ 42 โคอะแกรมแสดงวิธีอินซิทูไฮบริไดเซชัน (In situ hybridization) ที่ติดผลลากด้วยไบโอตินและตรวจสอบปฏิกิริยาการจับคู่ที่เกิดขึ้นด้วย สเตรปตาวิดิน-อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส คอนจูเกต (Streptavidin alkaline phosphatase conjugate), ไนโตรบลู เตตระโซเลียม (nitro blue tetrazolium) และ 5-โบรม-4-คลอโร-อินโดลิว-ฟอสเฟส (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate)



ภาพที่ 43 โคอะแกรมแสดงวิธีอินซิทูไฮบริไดเซชัน (*In situ hybridization*) ที่ติดฉลากด้วยไบโอติน และตรวจสอบปฏิกิริยาการจับคู่ที่เกิดขึ้นด้วยโกลด์แอนตี้ไบโอตินโกลด์คอนจูเกต (goat anti-biotin gold conjugate) และเพิ่มขยายสัญญาณจากอนุภาคของทองโดยการย้อมด้วยสารละลายเงิน

ผลการทดลอง

จากการศึกษาแบบแผนการส่งออกของเงินจากโคลน A7 และ 4D2 ในระหว่างพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าว โดยวิธีอินดิคาไฮบริดเจชันได้ผลดังนี้

ใช้ชั้นถาวรของอับเรณูและเรณูของข้าวที่ยังมีอาร์เอ็นเอในเนื้อเยื่อ เมื่อนำมาเชื่อมด้วยอะครีดินออเรนจ์ พบว่า ไซโทพลาสซึมล้อมติดสีส้มและส่วนของนิวเคลียสล้อมติดสีเหลือง (ภาพที่ 44)

การไฮบริดใช้ชั้นถาวรของอับเรณูและเรณูใน 3 ระยะพัฒนาการของข้าว กข.23 กับตัวตรวจตามที่เตรียมจากโคลน A7 และตรวจสอบปฏิกิริยาการจับคู่ด้วยสเตรปตาวิดิน อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสคอนจูเกต และใช้ในโรตารูเตตระยะโซเลียม และ 5-ไบรรม-4-คลอโร-3-อินโดอีว-ฟอสเฟส เป็นซับสเตรท แล้วนำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ภาพที่ 45) ได้ผลคือ

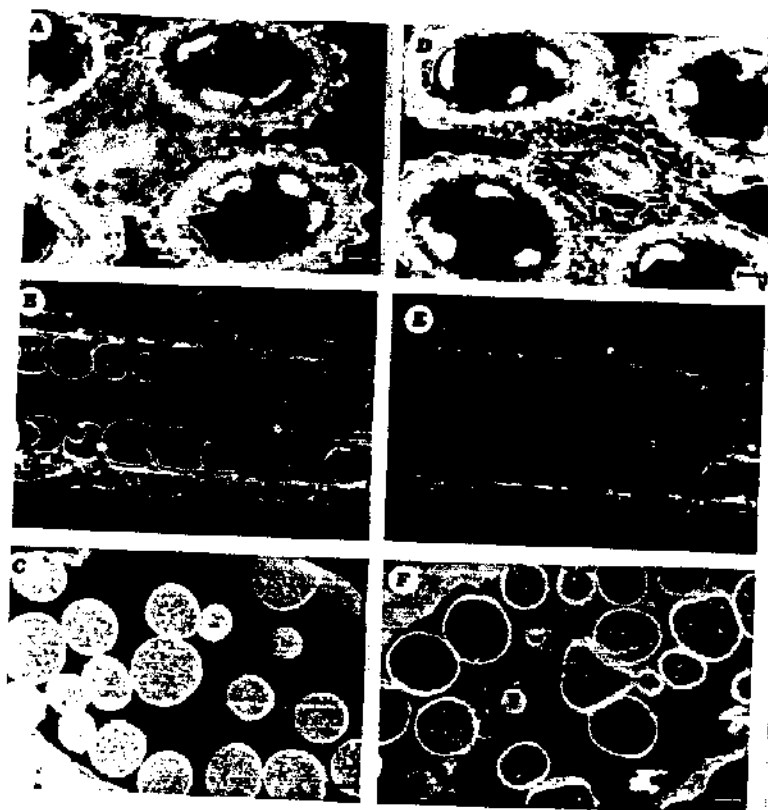
1) ใช้ชั้นถาวรของอับเรณูที่มีเรณูในระยะไมโครสปอร์ไรท์ และระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส ทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการย่อยด้วยอาร์เอ็นเอสและไม่ถูกไฮบริดซ์กับตัวตรวจตาม และที่ผ่านและไม่ผ่านการย่อยด้วยอาร์เอ็นเอสและถูกไฮบริดซ์กับตัวตรวจตาม พบว่าไม่มีปฏิกิริยาการจับคู่เกิดขึ้นทั้งในเรณูและผนังอับเรณู

2) ใช้ชั้นถาวรของอับเรณูระยะเรณูมี 3 นิวเคลียสที่ผ่านและไม่ผ่านการย่อยด้วยอาร์เอ็นเอส และไม่ถูกไฮบริดซ์กับตัวตรวจตาม และที่ผ่านการย่อยด้วยอาร์เอ็นเอสและถูกไฮบริดซ์กับตัวตรวจตาม พบว่า ไม่มีปฏิกิริยาการจับคู่เกิดขึ้นทั้งในเรณูและผนังอับเรณู แต่ใช้ชั้นถาวรที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยอาร์เอ็นเอสและถูกไฮบริดซ์กับตัวตรวจตาม พบบริเวณที่เกิดปฏิกิริยาการจับคู่ระหว่างอาร์เอ็นเอในเนื้อเยื่อกับดีเอ็นเอจากโคลนที่ติดฉลากด้วยไบรอติน เกิดผลผลิตสีน้ำเงิน ที่เกิดจากปฏิกิริยาที่อะตอมคาร์บอนของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส เฉพาะในเรณู ไม่พบบริเวณที่เกิดปฏิกิริยาการจับคู่ในผนังอับเรณู

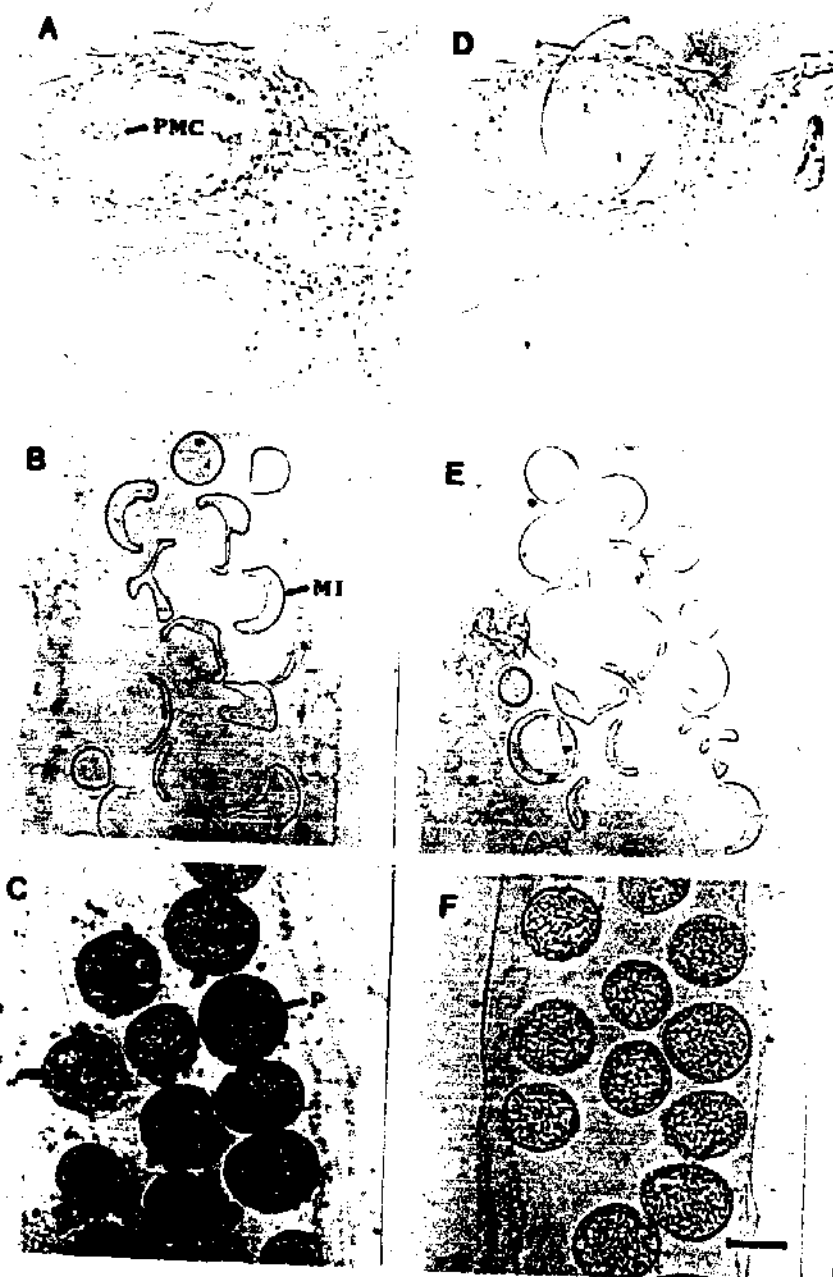
การไฮบริดใช้ชั้นถาวรของอับเรณูระยะเรณูมี 3 นิวเคลียสของข้าวหอมมะลิ 105

กับตัวตรวจตามที่เตรียมจากโคลน A7 และตรวจสอบปฏิกิริยาการจับคู่ด้วยสเตรปตาวิดินอัลคาไลน์ ฟอสฟาเตสคอนจูเกตและใช้ไนโตรบลูเตตระโซเลียม และ 5-โบรโม-4-คลอโร-3-อินโดอีว-ฟอสเฟส เป็นซับสเตรท แล้วศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ภาพที่ 46) พบว่า เชื้อชั้นถาวรที่ผ่านและไม่ผ่านการย่อยด้วยอาร์เอ็นเอสและไม่ถูกไฮบริดซ์กับตัวตรวจตาม และเชื้อชั้นถาวรที่ผ่านการย่อยด้วยอาร์เอ็นเอสและถูกไฮบริดซ์กับตัวตรวจตาม พบว่า ไม่มีปฏิกิริยาการจับคู่เกิดขึ้นทั้งในเรณูและผนังยับเรณู ส่วนเชื้อชั้นถาวรที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยอาร์เอ็นเอสและถูกไฮบริดซ์กับตัวตรวจตาม พบบริเวณที่เกิดปฏิกิริยาการจับคู่ระหว่างอาร์เอ็นเอในเนื้อเยื่อเยื่อกับดีเอ็นเอจากโคลนที่ติดฉลากด้วยไบโอดีน เกิดผลผลิตสีน้ำเงินจากปฏิกิริยาที่คะตะไลซ์ซับสเตรทของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเฉพาะในเรณู ไม่พบบริเวณที่เกิดปฏิกิริยาการจับคู่ในผนังยับเรณู

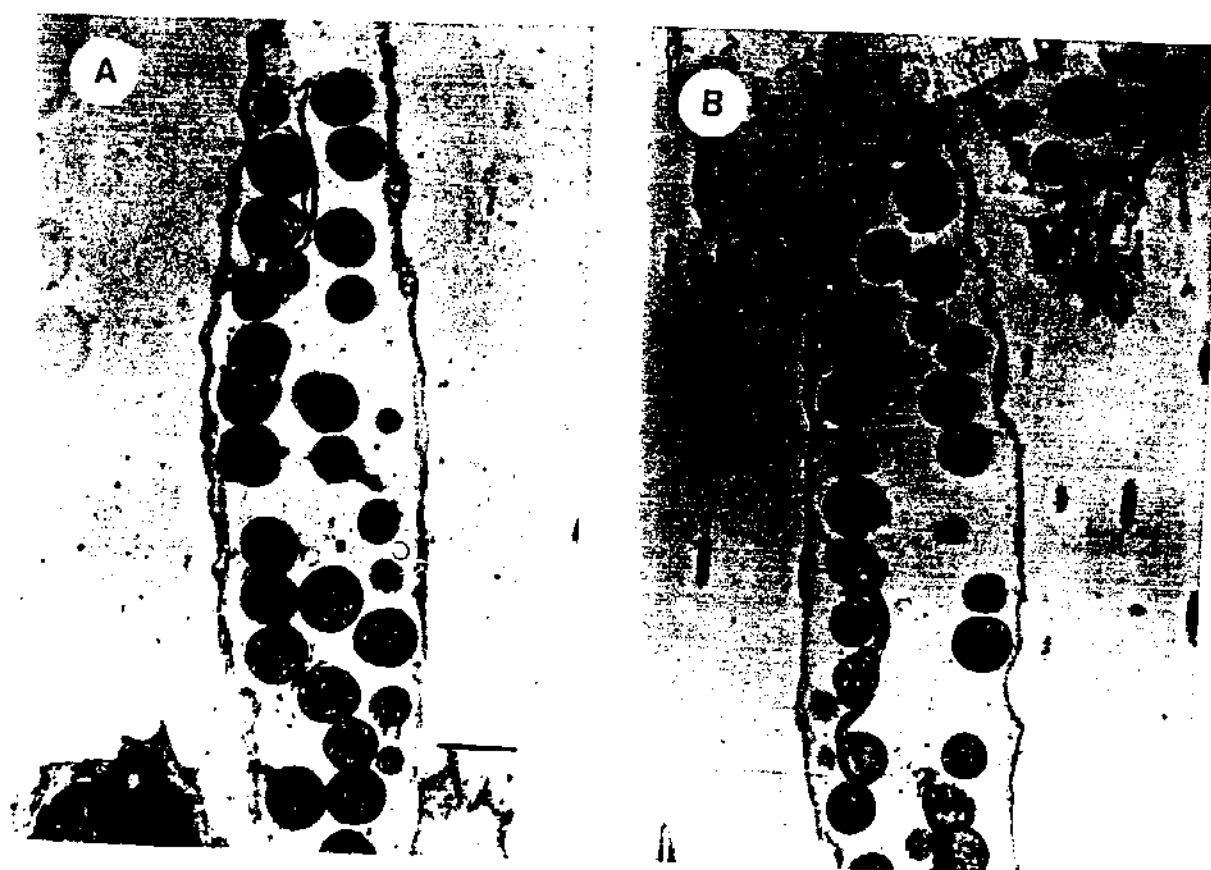
การไฮบริดซ์เชื้อชั้นถาวรของยับเรณูที่มีเรณูมี 3 นิวเคลียสของข้าว Amaro กับการตรวจตามที่เตรียมจากโคลน 4D2 และตรวจสอบปฏิกิริยาการจับคู่ด้วยสารละลายยอกแอนติไบโอดีนโรลต์คอนจูเกตและเพิ่มขยายสัญญาณจากอนุภาคของทองและย้อมด้วยสารละลายเงินศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ภาพที่ 47) พบว่า เชื้อชั้นถาวรที่ไฮบริดซ์กับตัวตรวจตามที่เตรียมจากโคลนที่เป็นแอนติเซนต่ออาร์เอ็นเอ พบบริเวณที่เกิดปฏิกิริยาการจับคู่ระหว่างอาร์เอ็นเอในเนื้อเยื่อกับตัวตรวจตาม เกิดผลผลิตสีน้ำเงินเฉพาะในเรณู ไม่พบบริเวณที่เกิดปฏิกิริยาการจับคู่ในผนังยับเรณู ส่วนเชื้อชั้นถาวรที่ไฮบริดซ์กับตัวตรวจตามที่เตรียมจากโคลนที่เป็นเซนต่ออาร์เอ็นเอ ไม่พบบริเวณที่เกิดปฏิกิริยาการจับคู่ทั้งในเรณูและผนังยับเรณู



ภาพที่ 44 แสดงเชิควัฒนาการของอับเรณูที่มีเรณูในระยะพัฒนาการต่างๆ ของข้าวพันธุ์ กข.23
 ที่ย้อมด้วยอะคริดีนออเรนจ์ (Acridine orange) (A,D) = 1 ไมโครสปอร์ไรฟ, (B,E) = 1 ไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส (C,F) = เรณูมี 3 นิวเคลียส
 (A-C) = เชิควัฒนาการที่ผ่านขั้นตอนการย่อยอาร์เอ็นเอในเนื้อเยื่อด้วยเอนไซม์
 อาร์เอ็นเอส
 (D-F) = เชิควัฒนาการที่ผ่านขั้นตอนการย่อยอาร์เอ็นเอในเนื้อเยื่อด้วยเอนไซม์
 อาร์เอ็นเอส

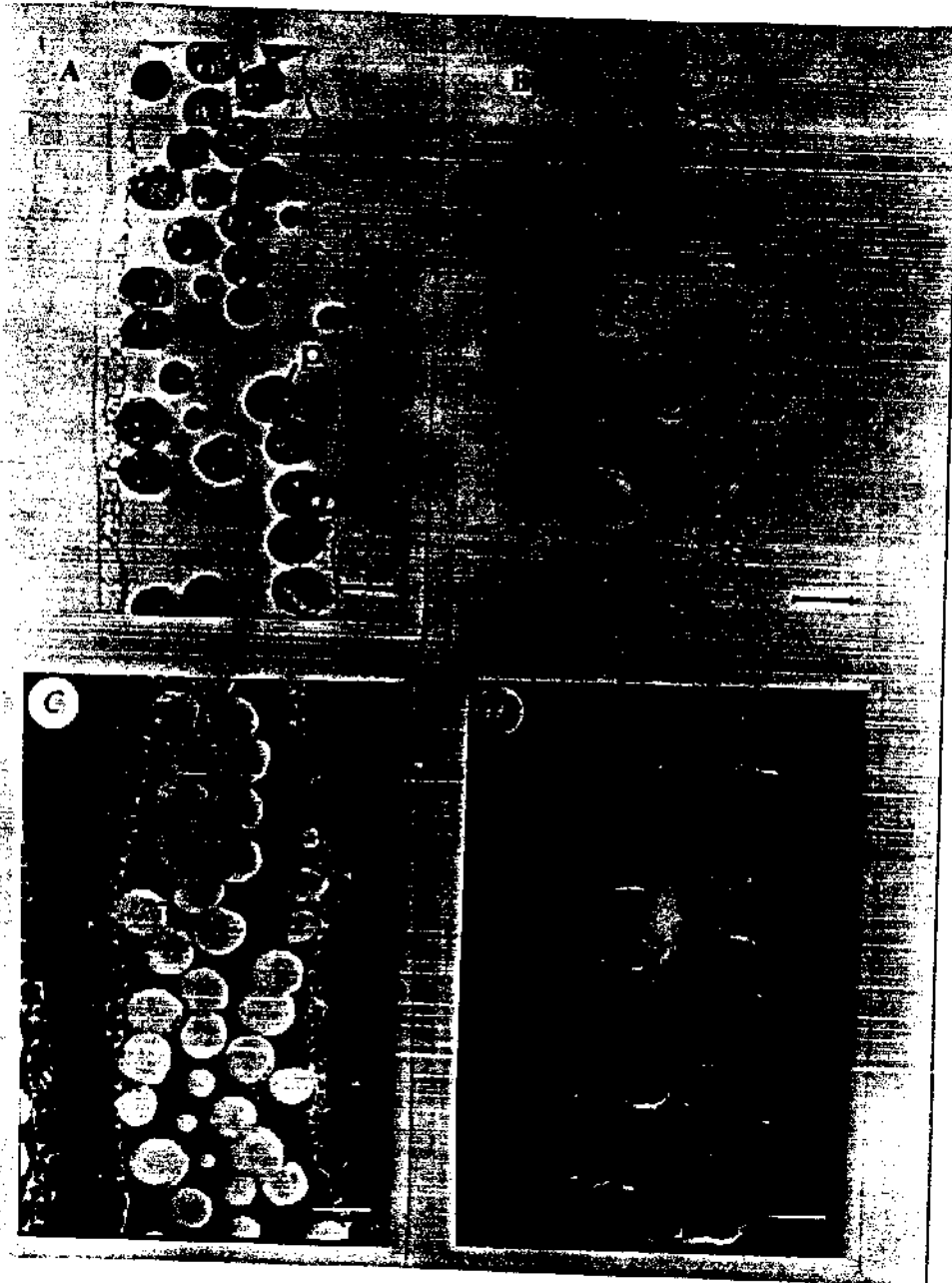


ภาพที่ 45 การแสดงออกของอาร์เอ็นเออาร์หัส (mRNA) ในอับเรณูที่มีเรณูในระยะพัฒนาการ
 ต่างๆของข้าวพันธุ์ กข.23 ที่ศึกษาด้วยวิธีอินซิทูไฮบริดเซชัน (In situ
 hybridization) โดยใช้ตัวตรวจตามจากโคลน A7 ที่คัดลอกด้วยไบรอติน
 และตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาการจับคู่ระหว่างอาร์เอ็นเออาร์หัสที่มีในเนื้อเยื่อเยื่อ
 ตีเอ็นเอจากโคลนด้วยสเตรปตาวิดิน-อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส คอนจูเกต
 (Streptavidin alkaline phosphatase conjugate), ในโตรบรูเตเตร
 โซเลียม (nitro blue tetrazolium) และ 5-โบรม-4-คลอโร-3-อินโดลิว-
 ฟอสเฟส (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) (บาร์ = 100 ไมครอน)
 (A,D) = ไมโครสปอร์ไรฟ, (B,E) = ไมโครสปอร์ระยะอ่อนมี 1 นิวเคลียส,
 (C,F) = ละอองเรณูมี 3 นิวเคลียส, (A-C) = เซลล์ชั้นถาวรที่ไม่ผ่านขั้นตอนการ
 ย่อยอาร์เอ็นเอในเนื้อเยื่อด้วยเอนไซม์อาร์เอ็นเอส (D-F) = เซลล์ชั้นถาวรที่ผ่าน
 ขั้นตอนการย่อยอาร์เอ็นเอในเนื้อเยื่อด้วยเอนไซม์อาร์เอ็นเอส



ภาพที่ 46 การแสดงออกของอาร์เอ็นเอ (mRNA) ในอับเรณูที่มีเรณู 3 นิวเคลียสของข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 ที่ศึกษาด้วยวิธีอินซิติวไฮบริดเซชัน (In situ hybridization) โดยให้ตัวตรวจตามจากโคลน A7 ที่คัดลอกด้วยไบโอดีน และตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาการจับคู่ระหว่างอาร์เอ็นเอที่มียานเนื้อเยื่อ กับ ดีเอ็นเอจากโคลนด้วยสเตรปตาวิดิน-อัลคาไลน์ ฟอสฟาเตส คอนจูเกต (Streptavidin alkaline phosphatase conjugate), ในโตรบลูเตเตตระโซเลียม (nitro blue tetrazolium) และ 5-โบรม-4-คลอโร-3-อินโดลิล-ฟอสเฟต (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) (บาร์ = 100 ไมครอน)

(A,D) = ไมโครสปอร์โรราท์, (B,E) = ไมโครสปอร์ระยะอ่อนมี 1 นิวเคลียส, (C,F) = ละอองเรณู 3 นิวเคลียส, (A-C) = เซ็กชันถาวรที่ผ่านขั้นตอนการย่อยอาร์เอ็นเอในเนื้อเยื่อด้วยเอนไซม์อาร์เอ็นเอส (D-F) = เซ็กชันถาวรที่ผ่านขั้นตอนการย่อยอาร์เอ็นเอในเนื้อเยื่อด้วยเอนไซม์อาร์เอ็นเอส



ภาพที่ 47 การแสดงออกของอาร์เอ็นเอเข้ารหัส (mRNA) ในอวัยวะที่มีรูป 3 นิวเคลียสของตัวหนอนไหม *Bombyx mori* ที่ศึกษาด้วยวิธีอินซิทูไฮบริไดเซชัน (*In situ hybridization*) โดยใช้ตัวตรวจตามที่ได้จากโคลน 4D₂ ที่คัดลอกด้วยไบโอดีเอ็นเอ และตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาการจับคู่ระหว่างอาร์เอ็นเอเข้ารหัสที่มีในเนื้อเยื่อของอวัยวะเข้ารหัสด้วยโกลด์คอนจูเกตไบโอดีเอ็นเอ (goat anti-biotin gold conjugate) และเพิ่มขยายสัญญาณจากอนุภาคของทองโดยการย้อมด้วยสารละลายเงิน (A,C) = เซ็คชันถาวรที่ผ่านขั้นตอนการย้อมอาร์เอ็นเอในเนื้อเยื่อด้วยแอนติบอดีอาร์เอ็นเอ (B,D) = เซ็คชันถาวรที่ผ่านขั้นตอนการย้อมอาร์เอ็นเอในเนื้อเยื่อด้วยแอนติบอดีอาร์เอ็นเอ (A-B) = ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์, (C-D) = ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์พื้นหลังดำ

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษานี้เป็นการรายงานผลครั้งแรกที่มีการศึกษาแบบแผนการแสดงออกของยีนจากโคลนในระหว่างพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าว ด้วยวิธีอินซูลินไฮบริดเชน โดยศึกษาจากแบคทีเรียโคลน A7 และ 4D2 ในข้าวพันธุ์ กข.23, หอมมะลิ 105 และ Amaroos สรุปได้ว่า ยีนทั้งสองโคลนมีการแสดงออกจำเพาะในเรณู 3 นิวเคลียส (pollen specific gene) ไม่มีการแสดงออกในผนังอับเรณู ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกับผลจากการศึกษาการแสดงออกของยีนจากโคลน A7 และ 4D2 ด้วยวิธี นอเทเชน บล็อก ซึ่งศึกษามาแล้วโดย ปิยะดา (2537) ว่า ยีนทั้งสองโคลนมีการแสดงออกจำเพาะในอับเรณู 3 นิวเคลียส ไม่มีการแสดงออกในอับเรณูระยะพัฒนาการอื่นๆ หรือในส่วนของลำต้นและใบ (ภาคผนวก ก ภาพที่ ค.1)

ยีนเอนเอโรลนที่แสดงออกจำเพาะในช่วงหลังของระยะพัฒนาการของอับเรณูและเรณูที่ได้มีการศึกษามาแล้วส่วนใหญ่ในพืชใบเลี้ยงคู่เช่น โคลน P2 ใน *Oenothera organnesis* (Brown และ Crouch, 1990 อ้างถึงโดย Robert และคณะ, 1993), โคลน Bp10 และ Bp19 ใน *B. napus* มีการแสดงออกในระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส, โคลน Sta 44-4 ใน *B. napus* มีการแสดงออกในระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียสและแสดงออกสะสมสูงสุดในระยะเรณู 3 นิวเคลียส (Robert, 1993b), โคลน LAT 52 ใน มะเขือเทศ (Twell และคณะ, 1989; Twell, Yamaguchi และ Mc Cormick, 1990), โคลน TUA1 ใน *Arabidopsis* (Carpenter และคณะ, 1992) มีการแสดงออกมากในเรณูที่เจริญเต็มที่

การศึกษากการแสดงออกของยีนในระหว่างพัฒนาการของอับเรณูและเรณูในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวยังมีค่อนข้างน้อย เช่น Hanson และคณะ (1989) ศึกษาการแยกยีนจากยีนเอนเอโรลน Zmc 13 จากข้าวโพด สำหรับข้าว เพิ่งมีการศึกษาโดย 1) Tsuchiya และคณะ (1992) ซึ่งได้แยกยีนเอนเอโรลน Osc4 และ Osc6 และนำมาศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยวิธี นอเทเชน บล็อก พบว่า ยีนเอนเอโรลน Osc4 มีการแสดงออกจำเพาะในอับเรณูระยะ

เรณูในระยะเทพรตจนถึงระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียสและไม่มีการแสดงออกในใบหรือราก และไม่มีการแสดงออกในอับเรณูที่เจริญเต็มที่ ส่วนซีดีเอ็นเอโคลน Osc6 มีการแสดงออกมากในอับเรณูระยะเรณู 2 นิวเคลียสและ 3 นิวเคลียส ซึ่งการแสดงออกจะลดลงในช่วงเรณูมี 3 นิวเคลียส 2) Raghavan (1989) ศึกษาการกระจายตัวของอาร์เอ็นเอในรहितานระหว่างพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าวพันธุ์ IR-30 และใช้เงินจากโคลน rice histone ซึ่งติดฉลากด้วย [^3H] poly(U) เป็นตัวตรวจตาม พบว่า เงินมีการแสดงออกจำเพาะในส่วนของผนังอับเรณูชั้นเอนโดทีเลียม ที่มีเรณูระยะไมโครสปอร์ไรโซที่มีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส 3) Zou และคณะ (1994) ได้ศึกษาเงินจากโคลน PS 1 ซึ่งเป็นเงินที่มีการแสดงออกจำเพาะในเรณูของข้าวเปรียบเทียบกับเงินจากโคลนที่มีการแสดงออกจำเพาะในเรณูของพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่คือ เงินจากโคลน Zmc 13 ของข้าวโพดและ LAT 52 ของมะเขือเทศ ตามลำดับ พบว่า ลำดับของกรดอะมิโนของเงินทั้งสามโคลนมีความใกล้เคียงกัน

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาพัฒนาการของอับเรณูและละอองเรณูของข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105, กข.23 และ กข.21 ที่ปลูกในแปลงทดลอง และ กข.23 ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 20 และ 40 mM โดยการศึกษาพัฒนาการได้แก่ การเพิ่มความยาวของช่อดอก, พัฒนาการของความยาวช่อดอก, ความยาวของดอกและความยาวของอับเรณู, ด้านเซลล์วิทยาโดยการย้อมนิวเคลียสด้วยอะซิโตนอิน หรือ 4',6-ไดอะมิดีน-2-ฟีโนลอินโดล, ย้อมแวคิวโลดด้วยฟลูออเรสซินโคอะซิเตท และย้อมแป้งด้วยสารละลายผสมระหว่างไอโอดีน 1 % และโปตัสเซียมไอโอดายด์ 3 % และศึกษาทางด้านกายวิภาคของเนื้อเยื่ออับเรณูที่ฝังในพาราฟินและพลาสติก พบว่า ในช่วงของความยาวระหว่างข้อต่อของใบจนถึงข้อต่อของใบที่อยู่ต่ำกว่าใบธงมีค่าไม่เกิน +3 ซม. จะพบดอกขนาด 1-3 มม. มากกว่าดอกขนาดอื่นๆ ซึ่งความยาวของดอกช่วงนี้เรณูส่วนใหญ่อยู่ในระยะไมโครสปอร์ไรซ์และถ้าความยาวระหว่างข้อต่อของใบจนถึงข้อต่อของใบที่อยู่ต่ำกว่าใบธงมีค่าเกิน +8 ซม. จะไม่ค่อยพบดอกขนาด 1-3 มม. ดอกที่พบส่วนใหญ่เป็นดอกที่มีขนาด 7-8 มม. เรณูส่วนใหญ่อยู่ในระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส และถ้าความยาวระหว่างข้อต่อของใบจนถึงข้อต่อของใบที่อยู่ต่ำกว่าใบธง มีค่าเกิน +18 ซม. ดอกที่พบส่วนใหญ่เป็นดอกที่มีขนาด 7-10 มม. ซึ่งเรณูส่วนใหญ่อยู่ในระยะมี 3 นิวเคลียส การศึกษาในหัวข้อนี้จะทำให้ทราบความสัมพันธ์ระหว่างพัฒนาการของอับเรณูและเรณูกับความยาวช่อดอก, ความยาวของดอกและความยาวของอับเรณู อันจะเป็นประโยชน์ในการเก็บและแยกอับเรณูออกเป็นกลุ่มตามระยะพัฒนาการของเรณู และทำให้สามารถเก็บเรณูตามระยะพัฒนาการที่ต้องการนำมาศึกษาได้มากและเก็บได้ทันก่อนที่จะเลยระยะพัฒนาการนั้นๆ ไป

นอกจากนี้ยังพบว่าเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 20 และ 40 mM ไม่มีผลต่อพัฒนาการของความยาวช่อดอก, ความยาวของดอกและความยาวของอับเรณูของข้าว กข.23 และจากการศึกษาพัฒนาการของอับเรณูและละอองเรณูของข้าว สามารถแบ่งได้ 7 ระยะคือ

ระยะที่ 1 ระยะไมโครสปอร์ไรท์ ไมโครสปอร์ไรท์เกิดจากการแบ่งตัวของ เซลล์สปอร์โรจีนัสแบบไมโอซิส เป็นระยะที่มีหนึ่งนิวเคลียสและยังไม่มีการสร้างแวคิวโอล ซึ่ง ระยะแรกไมโครสปอร์ไรท์มีรูปร่างค่อนข้างรีและมีผนังเซลล์อยู่ ผนังเซลล์ที่หนาที่ คิงดูคินันเพื่อรักษาความชื้นและ กรองสารหรือของเหลวต่างๆ ที่มาจากเนื้อเยื่อที่หุ้ม ต่อมา เมื่อมีการเพิ่มขนาดของเซลล์ รูปร่างของเซลล์เริ่มกลมขึ้น ระยะนี้ไมโครสปอร์ไรท์ถูกล้อม รอบด้วยผนังของอับเรณู นับจากชั้นนอกสุดเข้ามาตามลำดับได้แก่ ชั้นอีพิเดอร์มิส, เอนโดเดอร์มิส, มิติเคิลเลเยอร์และทากิทัม ซึ่งชั้นทากิทัมจะเป็นทางผ่านของสารอาหารที่ เข้าสู่กลุ่มเซลล์ไมโครสปอร์ไรท์ โดยติดต่อกันทางพลาสมาเดสมาต้า ระยะนี้เซลล์ทากิทัมจะมีกิจกรรมมากขนาดของเซลล์จะใหญ่กว่าเซลล์อื่นและมีไซโทพลาสซึมเข้มข้นมาก ประกอบด้วย นิวเคลียส 2 อัน โดยมากพบในช่วงที่ไมโครสปอร์ไรท์เริ่มแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส และมีรายงานว่า ชั้นทากิทัมยังทำหน้าที่ในการสร้างสารตั้งต้นอันเป็นองค์ประกอบของผนังอับเรณูชั้น เอ็กซอิน, สร้างยูบิซ บอดี ที่ทำหน้าที่ขนถ่ายสารที่จะกลายไปเป็นสปอร์โรเฟเลนิน ซึ่งเป็น สารที่สะสมอยู่บนชั้นเอ็กซอิน และสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งถูกนำมาใช้ในการสร้างสปอร์โรเฟเลนิน

ระยะที่ 2 ระยะไมโอซิส ไมโครสปอร์ไรท์มีการแบ่งตัวแบบไมโอซิส 2 ครั้งได้ ไมโครสปอร์ที่อยู่ติดกัน 2 และ 4 เซลล์ เรียก ไดแอต และ เทแทรต ตามลำดับ ระยะนี้ นิวเคลียสยังมีขนาดเล็กและมีหนึ่งอัน ระยะนี้ยังไม่มีการสร้างแวคิวโอล และมีผนังเซลล์อยู่ อยู่ระยะนี้เริ่มมีการสร้างชั้นโปรมเอ็กซอินซึ่งสารที่มาสะสมจะเป็นพวกเซลลูโลส จากนั้นมีการ สร้างชั้นโปรบาร์คิวลัม

ระยะที่ 3 ระยะไมโครสปอร์หลุดจากผนังเซลล์ โดยผนังเซลล์ที่ล้อมรอบกลุ่ม เซลล์ไมโครสปอร์ถูกย่อยโดยเอนไซม์ 1,3 เบต้ากลูคาเนส ไมโครสปอร์มีรูปร่างเป็นเส้นยาวหนึ่ง วนสี่ของทรงกลมมีนิวเคลียสหนึ่งอัน ระยะนี้ยังไม่มีการสร้างแวคิวโอล แต่เริ่มมีการสร้างผนัง ชั้นนอกของเรณูคือ ชั้นเอ็กซอิน โดยมีการพอกของสารสปอร์โรเฟเลนิน เมื่อระยะนี้ใกล้จะสิ้นสุดลง แวกิวโอลของเซลล์ทากิทัมเริ่มมีขนาดใหญ่มากและเซลล์ทากิทัมเริ่มแยกตัวออกจากกัน

ระยะที่ 4 ระยะไมโครสปอร์ระยะอ่อนมี 1 นิวเคลียสไมโครสปอร์เริ่มมีรูปร่างกลม แต่เซลล์ยังมีขนาดเล็กและมีนิวเคลียสขนาดเล็กอยู่กลางเซลล์ เริ่มมีการสร้างแวคิวโอล นอก จากนี้พบว่าพบไมโครสปอร์ 1 เซลล์มี 1 ไมโครพอร์

ระยะที่ 5 ระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียส ระยะนี้มีการเพิ่มขนาดของเซลล์, นิวเคลียสและแวคิวโอล เมื่อแวคิวโอลมีการเพิ่มขนาดใหญ่มากจนเกือบเต็มเซลล์ ทำให้ นิวเคลียสถูกดันไปติดขอบเซลล์ ในระยะนี้เซลล์ทาฟิทม์เริ่มมีการสลาย

ระยะที่ 6 ระยะเรณูมี 2 นิวเคลียส คือ นิวเคลียสของเวเกิทเดติฟเซลล์ กับ นิวเคลียสของเจเนเรติฟเซลล์ ซึ่งเป็นผลจากการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโทซิสของไมโครสปอร์ ในระยะแรกนิวเคลียสทั้งสองมีขนาดเท่ากัน จากนั้นพบว่า เวเกิทเดติฟเซลล์มีขนาดใหญ่กว่า เจเนเรติฟเซลล์ ขึ้นทาฟิทม์เริ่มมีการยุบสลายไปบางส่วนหรือเกือบหมด และแวคิวโอลมี ขนาดเล็กลง ระยะนี้เริ่มมีการสร้างผนังชั้นอินทิน และมีการสร้างและสะสมแป้งภายในเซลล์ ซึ่งระยะที่มีการสร้างแป้งนี้จะพบกิจกรรมไอโซไซม์พอสฟอกูโคสไอโซเมอเรส ที่ทำหน้าที่ เกี่ยวกับการเปลี่ยนฟรุคโตส-6-ฟอสเฟสให้เป็นกลูโคส-6-ฟอสเฟส ซึ่งเป็นปฏิกิริยาหนังาน วิธีของกระบวนการสังเคราะห์แป้งและกลูโคสเพิ่มมากขึ้น

ระยะที่ 7 ระยะเรณูมี 3 นิวเคลียสคือ สเปิร์มเซลล์ 2 เซลล์ และนิวเคลียสของ เวเกิทเดติฟเซลล์ 1 เซลล์ ระยะนี้ไม่พบแวคิวโอลและไซโทพลาสซึมเต็มไปด้วยเม็ดแป้ง และผนังเรณูประกอบด้วย 2 ชั้นคือ ชั้นเยื่อชั้นและชั้นอินทิน โดยชั้นเยื่อชั้นเป็นชั้นนอกสุด มีลักษณะแบบเพิกเตท ที่ประกอบด้วยส่วนที่มีลักษณะเป็นแท่งเรียกว่า บารูคูลัม และมีส่วน ปลายของแท่งยื่นออกคลุมส่วนฐานคล้ายหลังคาเรียกว่า เท็กตัม มีส่วนที่เป็นฐานของแท่ง เรียกว่า ฟุตเลเยอร์ มีสารพอลิเมอร์ไรโอเลนินเป็นองค์ประกอบ ซึ่งสารนี้มีคุณสมบัติต้าน การทำลายตัวเองได้ช้า ทำให้เรณูทนต่อสภาพแวดล้อมและการถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ และชั้นอินทินเป็นชั้นในที่มีลักษณะเรียบ ไม่เกี่ยวข้องกับการรูปแบบของผนังเรณู สารที่อยู่ภายในชั้นนี้ ถูกนำไปใช้ตามปฏิกิริยาการห้ามผสมข้ามพันธุ์ บริเวณที่เป็นรูเปิดของเรณูจะมีชั้นอินทินหนาเป็นพิเศษ และเป็นชั้นให้สารแก่ผนังหลอดเรณู

จากการศึกษาแบบแผนของโปรตีนของอับเรณูและเรณูของข้าวพันธุ์หอมมะลิ 105 และ กข.23 ด้วย SDS-PAGE ข้าวทั้งสองพันธุ์มีแบบแผนของโปรตีนส่วนใหญ่เหมือนกัน ครอบคลุมโปรตีน 3 ขนาดคือ 25, 15 และ 14 kD เฉพาะในบางระยะพัฒนาการของเรณู โปรตีนขนาด 25 kD พบตั้งแต่ระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียสถึงระยะเรณูมี 3 นิวเคลียส โปรตีนขนาด 15 และ 14 kD พบเฉพาะในระยะเรณูมี 3 นิวเคลียส นอกจากนี้ยังพบโปรตีนขนาดต่ำกว่า 14.4 kD เฉพาะในระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียสและระยะเรณูมี 3 นิวเคลียสในข้าว กข.23 แต่ไม่พบในข้าวหอมมะลิ 105 และพบว่า เกลือโซเดียมคลอไรด์มีผลต่อแบบแผนของโปรตีนของข้าว กข.23 คือที่ความเข้มข้น 20 mM มีผลทำให้โปรตีนขนาด 25 kD จางลงและที่ความเข้มข้น 40 mM ทำให้เกิดแถบโปรตีนขนาดต่ำกว่า 14.4 และ 25 kD ตั้งแต่ระยะไมโครสปอร์หลุดจากผนังแคลลัสถึงระยะเรณูมี 3 นิวเคลียส และโปรตีนทั้งสองขนาดที่พบในระยะต่างๆ ดังกล่าวมีความชัดเจนเท่ากัน ซึ่งปกติโปรตีนทั้งสองขนาดนี้ที่พบในข้าว กข.23 ที่ปลูกในแปลงทดลองและที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารที่ไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (0 mM) พบตั้งแต่ระยะไมโครสปอร์มี 2 นิวเคลียสถึงระยะเรณูมี 3 นิวเคลียสและโปรตีนขนาดต่ำกว่า 14.4 kD ที่มีความชัดเจนมากที่สุดในระยะเรณูมี 2 นิวเคลียส ซึ่งจากการศึกษาของ Vergne และคณะ (1988) ที่ศึกษารูปแบบของโปรตีนของข้าวสาลีในแต่ละระยะพัฒนาการของเรณู โดยใช้อัลลีอะคริลามิด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่ามีโปรตีนขนาด 18 kD ในทุกระยะพัฒนาการของเรณูและพบโปรตีนขนาด 32 kD ตั้งแต่ระยะไมโครสปอร์มี 1 นิวเคลียสขึ้นไป

จากการศึกษาไซโรแมแกรมของเอนไซม์ด้วยวิธี starch gel electrophoresis ในระหว่างพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าวหอมมะลิ 105 และ กข.23 ที่ปลูกในแปลงทดลอง พบความแตกต่างของไซโรแมแกรมของไอโซไซม์เอสเตอเรส, อาร์จีโนอะมิโนเปปติเดสและฟอสโฟกลูโคสไอโซเมอเรส แต่ไม่พบความแตกต่างของไซโรแมแกรมของไอโซไซม์ลิวซีนอะมิโนเปปติเดส, จีลิเมตดีไฮโดรจีเนส และ กลูตาเมตออกซาลอะซิเตส ทรานสอะมิเนสและพบความแตกต่างของไซโรแมแกรมของไอโซไซม์เอสเตอเรสและฟอสโฟกลูโคสไอโซเมอเรสของข้าว กข.23 ที่ปลูกในแปลงทดลองและในสารละลายธาตุอาหารที่ไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าวิธีการปลูกมีผลต่อการแสดงออกของจีน แต่เกลือโซเดียม

คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 20 และ 40 mM ไม่มีผลต่อไขมันแกรมของไรโซไซม์ชนิดต่างๆ ที่ศึกษานี้แล้ว กข.23

การศึกษานี้ครั้งนี้ เป็นการรายงานผลครั้งแรก ที่ศึกษาหาตำแหน่งของการแสดงออกของยีนในระหว่างพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าว ด้วยวิธีอินซิติวไรเซชัน โดยศึกษาตำแหน่งของการแสดงออกของยีนจากโคลน A7 ในอับเรณูที่มีเรณู 3 ระยะพัฒนาการของข้าว กข.23 และในอับเรณูระยะเรณูมี 3 นิวเคลียสของข้าวหอมมะลิ 105 และจากโคลน 4D2 ในอับเรณูระยะเรณูมี 3 นิวเคลียสของข้าวพันธุ์ Amaro โดยการศึกษาทั้งส้อมจิมทั้งส้อมจิมด้วยไบรอตินและตรวจสอบปฏิกิริยาการจับคู่ของอาร์เอ็นเอในเนื้อเยื่อเกี่ยวกับตัวตรวจตามที่ได้เตรียมจากโคลน A7 ด้วยสเตรปตาอิดินอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสคอนจูเกต และใช้ไนโตรบลูเตตระโซเลียมและ 5-บรอม-4-คลอโร-3-อินโดลิล-ฟอสเฟต และตรวจสอบปฏิกิริยาการจับคู่ของอาร์เอ็นเอในเนื้อเยื่อเกี่ยวกับตัวตรวจตามที่ได้เตรียมจากโคลน 4D2 ด้วยสารละลายยอกแอนตีไบรอตินโรลต์คอนจูเกตและเพิ่มขยายสัญญาณจากอนุภาคของทองและย้อมด้วยสารละลายเงินพบว่า มีการแสดงออกของยีนทั้งสองโคลนเฉพาะในเรณูระยะมี 3 นิวเคลียส ไม่มีการแสดงออกในอับเรณู ผลที่ได้จากการศึกษานี้พบว่า สอดคล้องกับผลจากการศึกษาการแสดงออกของยีนจากโคลน A7 และ 4D2 ด้วยวิธี นอเทรีน บล็อก ซึ่งศึกษามาแล้วโดยปิยะดา (2537) ว่า ยีนทั้งสองโคลนมีการแสดงออกเฉพาะในอับเรณูมี 3 นิวเคลียส ไม่มีการแสดงออกในอับเรณูระยะพัฒนาการอื่นๆ หรือลำต้นและใบ (ภาคผนวก ค ภาพที่ ค.1) นอกจากนี้ยีนทั้งสองที่ได้ศึกษานี้ ยังมียีนอื่นๆ ที่ได้ศึกษามาแล้วโดยนักวิจัยหลายท่านว่า มีการแสดงออกของยีนในช่วงพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าวด้วยวิธีอื่น เช่น 1) ยีนซีเอ็นเอโคลน Osc4 และ Osc6 ที่ศึกษาด้วยวิธี นอเทรีน บล็อก โดยซีเอ็นเอโคลน Osc4 มีการแสดงออกในอับเรณู ไม่มีการแสดงออกในส่วนของใบหรือรากที่เจริญเต็มที่และซีเอ็นเอโคลน Osc6 มีการแสดงออกมากในอับเรณูระยะเรณูมี 2 นิวเคลียสและ 3 นิวเคลียส ซึ่งการแสดงออกจะลดลงในช่วงเรณูมี 3 นิวเคลียส (Tsuchiya และคณะ, 1992) 2) ยีนจากโคลน rice histone มีการแสดงออกเฉพาะในอับเรณูชั้นแอนโดทีเลียมที่มีเรณูระยะไมโครสปอร์ไรซ์ที่มีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (Raghavan, 1989) 3) ยีนจากโคลน PS 1 มีการแสดงออกเฉพาะในเรณูของข้าว (Zou, 1994) เป็นต้น

ในการศึกษาการแสดงออกของยีนในระหว่างพัฒนาการของอับเรณูและเรณูของข้าว โดยวิธีอินซูลาไฮบริดเซชันนี้ มีปัจจัยสำคัญในการศึกษา คือ ระยะเวลาและความเข้มข้นของ สารเคมีที่เหมาะสมที่ใช้นานแต่ละขั้นตอนการศึกษา เช่น ขั้นตอนการคงสภาพเนื้อเยื่อของอับเรณู และเรณูซึ่งจะมีผลต่อสภาพของอาร์เอ็นเอที่อยู่ในเซลล์, การเตรียมตัวตรวจตาม, การติด ฉลากตัวตรวจตาม, การไฮบริดเซชันและการตรวจสอบการไฮบริดเซชัน ระยะเวลาและความเข้มข้นของสารเคมีที่ไม่เหมาะสมจะมีผลต่อการติดตามผลของเกิดปฏิกิริยาการจับคู่ ระหว่างอาร์เอ็นเอในเนื้อเยื่อกับตัวตรวจตามที่เตรียมจากโคลน ซึ่งอาจทำให้เกิดผลผลิตที่เป็นสิ่งจากปฏิกิริยาที่กระตือรือร้นโดยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสหรือการเข้าเกาะของอนุภาคได้ไม่ดีและใช้ระยะเวลานานก่อนเห็นผล

ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้ อาจเป็นแนวทางและข้อมูลพื้นฐานที่จะนำไปสู่การศึกษาต่อไปในด้านต่างๆ เช่น การแยกโปรตีนที่จำเพาะต่อระยะพัฒนาการของเรณู และนำมากระตุ้น การสร้างแอนติบอดีในสัตว์ทดลอง แล้วใช้แอนติบอดีที่ได้มาเป็นตัวตรวจตามหาโปรตีนที่เป็นผล ผลิตของยีนจาก cDNA expression library ได้หรือนำไปวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโน ของโปรตีนนั้น และนำไปสู่การสังเคราะห์ตัวตรวจตามจากลำดับกรดอะมิโนที่ได้เป็นขั้นๆต่อไป ตัวตรวจตามนี้สามารถนำมาใช้เป็นตัวตรวจเลือกยีนจาก cDNA library ได้ ซึ่งถ้ายีนที่ได้ เป็นยีนที่ควบคุมลักษณะที่ดีของสายพันธุ์ข้าว ก็สามารถถ่ายยีนนี้เข้าไปในข้าวสายพันธุ์ที่มี คุณสมบัติเด่นอื่นๆแล้ว ก็จะเป็นแนวทางหนึ่งในการผลิตข้าวสายพันธุ์ใหม่ที่มีคุณลักษณะที่ดีเพิ่ม ขึ้นได้ นอกจากนี้อาจนำไปสู่การดัดแปลงยีนที่มีการแสดงออกจำเพาะต่อระยะพัฒนาการของเรณู ระยะใดระยะหนึ่งด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม เพื่อสร้างสายพันธุ์ที่เป็นหมัน สำหรับนำมาใช้เป็นต้นแม่ในการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสม เป็นต้น