อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างพันธุ์อ้อยที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่

ตัวอย่างพันธุ์อ้อยที่ใช้ในการทดลอง จำนวน 6 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์กำแพงแสน 01-12 ที่ทนแล้งได้ดี, กำแพงแสน 94-13, สุพรรณบุรี 50, ลาวสะดุ้ง (เบอร์ 1), ขอนแก่น 3 (เบอร์ 9), ขอนแก่น 80 (เบอร์ 19), พันธุ์ K92 (เบอร์ 21)

วิธีการ

1. การศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอในจีโนมของอ้อย (Genomic DNA)

อ้อยเป็นพืชที่มีเส้นใยจำนวนมาก ในการวิจัยนี้จึงศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอในจีโนม โดยจะทดลองวิธีการสกัด 3 วิธี เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสกัด และการนำไปใช้ในการเพิ่มจำนวนของยีน *hsf*

1.1 การสกัดดีเอ็นเออ้อยด้วยวิธี mCTAB

1. นำใบอ้อยใส่ในโกร่ง แล้วเติมไนโตรเจนเหลว จากนั้นบดใบลำไยให้ละเอียด
2. เติมสารสะลาย mCTAB ซึ่งมี 1% (v/v) 2-mercaptoethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร หรือปรับปริมาตรตามความเหมาะสมของปริมาณใบที่บดได้ แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex
3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที โดยผสมให้เข้ากันทุก 10 และ 20 นาที
4. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
5. ย้ายเอาส่วนใสใส่ในหลอดใหม่ โดยห้ามเอาตะกอนออกมา จากนั้น เติมเอนไซม์ RNase A ความเข้มข้น 10 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อย่างน้อยเป็นเวลา 30 นาที
6. เติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 500 ไมโครลิตร หรือ 1 เท่าของปริมาตรสารละลาย mCTAB แล้วทำการ vortex เล็กน้อย
7. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

8. ย้ายชั้นน้ำด้านบนใส่ในหลอดใหม่ (ทำซ้ำในข้อที่ 6-7 จนกระทั่งชั้นของโปรตีนเหลือน้อยที่สุด) ซึ่งการทำซ้ำที่ 2 ถ้าย้ายชั้นน้ำมาปริมาตรเท่าไหร่ ให้เติมคลอโรฟอร์มในปริมาตรที่เท่ากัน

9. เติม 3 โมลาร์ Na-acetate, pH 5.2 ปริมาตร 1/10 เท่า แล้วเติมเอทานอลบริสุทธิ์เย็นปริมาตร 2 เท่าของสารละลาย (จะสังเกตเห็นตะกอนสีขาวขุ่น) แล้วผสมให้เข้ากัน

10. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

11. เทเอทานอลทิ้ง แล้วเติมเอทานอลเย็น ความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ เพื่อล้างตะกอน (ล้างตะกอน จำนวน 2 ครั้ง)

12. ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

13. ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง แล้วละลายดีเอ็นเอกลับด้วย 10 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl, pH 8.0 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร (ถ้ายังมีความหนืดของสารละลายมาก ให้เติมเพิ่ม)

1.2 การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป GF-1 (Vivantis)

1. นำใบอ้อยประมาณ 30 มิลลิกรัม มาบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว

2. เติมบัฟเฟอร์ PL ปริมาตร 280 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex ประมาณ 30 วินาที จากนั้นเติม Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดเบาๆ

3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดส่วนใสที่อยู่ด้านบนสุดใส่ในหลอดไมโครทิวขนาด 1.5 มิลลิลิตร

5. เติมเอนไซม์ RNase A ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

6. เติมบัฟเฟอร์ PB ปริมาตร 2 เท่า ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอด แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

7. โหลดลงคอลัมน์ปริมาตร 900 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง

8. เติม Wash buffer ลงในคอลัมน์ปริมาตร 750 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง เพราะเมมเบรนยังมีสีเข้ม

9. แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้เมมเบรนแห้ง

10. จากนั้นย้ายคอลัมน์ลงในหลอดไมโครทิวขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำ 2 รอบ เพื่อชะดีเอ็นเอ

1.3 การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป โดยใช้ชุด Genomic DNA Purification Kit (Thermo scientific) มีขั้นตอนดังนี้

1. ฉีกใบอ้อยให้มีขนาดประมาณ 1X5 cm^2 ใส่ในโกร่งเติม liquid nitrogen บดใบอ้อยจนละเอียดเป็นผงคล้ายแป้ง

2. เติม 400 ไมโครลิตร ของ lysis solution ผสมให้ละลาย แล้วเติม 300 ไมโครลิตร ของ 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 ดูดทั้งหมดใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3. บ่มในอ่างน้ำ (water bath) 65 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที พลิกหลอดทุกๆ 10 นาที

4. ครบเวลาเติม 600 ไมโครลิตร ของโคลโรฟอร์ม ผสมด้วยการ vortex 2-3 ครั้ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

5. ดูดส่วนใสด้านบนใส่ในหลอด ใหม่ เติม 800 ไมโครลิตร precipitation* ผสมด้วยการกลับหลอด (inversion) นาน 1-2 นาที แล้วปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

* โดยที่ precipitation เตรียมจาก sterile deionized water ปริมาตร 720 ไมโครลิตร ผสมกับ 10X concentrated precipitation solution ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ต่อ 1 ตัวอย่าง

6. เท supernatant ทิ้ง ละลายตะกอนกลับด้วย 100 ไมโครลิตร ของ 1.2 M NaCl จนตะกอนละลายหมด

7. เติม 1 มิลลิลิตร ice-cold absolute ethanol พลิกหลอด บ่มหลอดที่ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

8. นำหลอดมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เท absolute ethanol ทิ้ง

9. ล้างด้วย 1 มิลลิลิตร ice-cold 70% ethanol นำไปปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เท 70% ethanol ทิ้ง

10. ทำการล้างตะกอนซ้ำ (ข้อ 9) อีก 1 รอบ

11. ตากตะกอนจนแห้ง ละลายดีเอ็นเอด้วย 50 ไมโครลิตร ของ 10 mM Tris-HCl, pH 8.0

2. การออกแบบไพรเมอร์สำหรับยีน heat shock transcription factor (*hsf*)

การออกแบบไพรเมอร์จะสืบค้นลำดับดีเอ็นเอของยีน *hsf* ของอ้อยจากฐานข้อมูล transcription factors จากข้าว ข้าวฟ่าง ข้าวโพด และอ้อย (http://grassius.org/grasstfdb.html) และฐานข้อมูลของอ้อย (http://planttfdb.cbi.edu.cn/xiehe/web/index.php?sp=so) ลำดับดีเอ็นเอของยีน *hsf* เหล่านี้นำมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการแยกยีน *hsf* ต่อไป โดยการออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer 3 (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/)

3. การแยกยีนด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

การแยกยีน *hsf* ด้วยเทคนิค PCR ด้วยใช้ดีเอ็นเอในจีโนมของอ้อยที่สกัดได้ จากชุดสำเร็จรูป genomic DNA purification (Thermo Scientific) เป็นแม่พิมพ์ และใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับยีน *hsf* ต่างๆ ที่ออกแบบในตารางที่ 1 ซึ่งในปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X GeNei™ Red Dye PCR Master Mix (Merck) ดีเอ็นเอของจีโนมประมาณ 100-500 นาโนกรัม และไพรเมอร์ (forward และ reverse) อย่างละ 0.5 ไมโครโมลาร์ จากนั้นใช้สภาวะ PCR ดังนี้ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที (pre-denature) จากนั้นตามด้วย 40 รอบของ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 50 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส นาน 30 หรือ 60 หรือ 90 วินาที ตามขนาดของยีนที่ต้องการแยก โดยหากขนาดประมาณ 500 คู่เบส ใช้เวลา 30 วินาที ขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส ใช้เวลา 60 วินาที และหากมีขนาดมากกว่า 1,000 คู่เบส ใช้เวลา 90 วินาที จากนั้นตามด้วย 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที (post-extension) เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสิ้น เก็บที่ผลผลิตของการทำ PCR ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะวิเคราะห์ด้วยการทำ 1% agarose gel electrophoresis ที่ย้อมเจลด้วยสี SYBR Safe (Invitrogen) ที่เมื่อให้รังสี UV กับเจล แถบดีเอ็นเอจะเรืองแสง จากนั้นบันทึกภาพผลการวิเคราะห์

4. การแยกบริสุทธิ์ชิ้นดีเอ็นเอ

ยีน *hsf* ที่เพิ่มจำนวนได้จากเทคนิค PCR นำมาแยกบริสุทธิ์ด้วยชุด PureLink® Quick Gel Extraction kit (Invitrogen) ที่มีขั้นตอนดังนี้

1. นำผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR มาแยกขนาดด้วยการทำ 1% agarose gel electrophoresis โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที จากนั้นนำเจลไปดูแถบดีเอ็นเอด้วยแสง UV
2. ตัดเจลบริเวณที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการใส่ในหลอดทดลองสะอาด ชั่งน้ำหนัก เติม Gel Solubilization Buffer (L3) ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล
3. บ่มหลอดที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที กลับหลอดทุกๆ 3 นาที

4. นำสารละลายที่ได้ ในข้อ 3 ใส่ใน Quick Gel Extraction Column

5. นำ column ไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที 1 นาที เทน้ำที่อยู่ในส่วนล่างของ column ทิ้ง

6. เติม 500 ไมโครลิตร ของ Wash Buffer (W1) ลงใน Column

7. นำ column ไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทน้ำที่อยู่ในส่วนล่างของ column ทิ้ง

8. ปั่นเหวี่ยง column เปล่าอีกครั้งที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที

9. ย้าย column ด้านบนใส่ในหลอด microtube ใหม่ เติม 30 ไมโครลิตร ของ Elution Buffer (E5) ลงใน column บ่มไว้ 5 นาที

10. นำไปปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ได้เป็นชะครั้งที่ 1 (Elute 1) ทำการชะครั้งที่ 2 ได้เป็น ชะครั้งที่ 2 (Elute 2)

11. วิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากแยกบริสุทธิ์ (ชะครั้งที่ 1 และ 2) ด้วยการทำ 1% agarose gel electrophoresis

5. การเชื่อมยีน *hsf* กับดีเอ็นเอพาหะ

ยีน *hsf* ที่เพิ่มจำนวนจากเทคนิค PCR ที่ได้จากแยกบริสุทธิ์ จะนำมาโคลนเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ โดยใช้ชุดพลาสมิด pGEM-T easy (Promega) ดังภาพที่ 4 โดยเชื่อมต่อชิ้นยีน *hsf* ที่ได้จากการแยกบริสุทธิ์กับพลาสมิด ด้วยเอนไซม์ T4 DNA ligase (NEB BioLAB) บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้จากการเชื่อมต่อไปถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสมเข้าแบคทีเรีย *E. coli* DH5α ด้วยการทำ transformation จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยสีของโคโลนี (Blue/white colony selection)

6. การทำ Transformation

ดีเอ็นเอที่ได้จากการเชื่อมต่อนั้นจะต้องนำมาถ่ายฝากเข้าเซลล์เจ้าบ้าน คือ เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* DH5α เพื่อให้เพิ่มจำนวนภายในเซลล์ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. นำดีเอ็นเอสายผสมที่ได้จากการเชื่อม 10 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดที่มี competent cell ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มไว้บนน้ำแข็ง 20 นาที

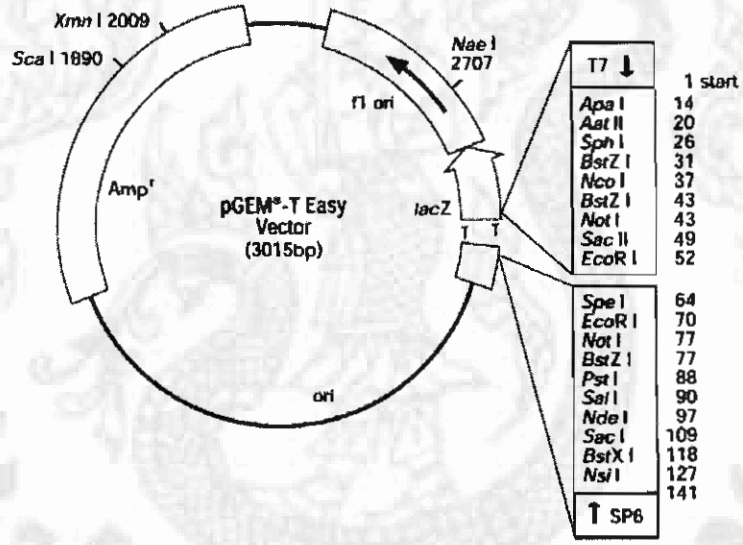
2. เอาอาหารแข็ง LB agar ที่มีแอมพิซิลิน 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร รอให้แห้ง จากนั้นทาสาร X-gal และ IPTG อย่างละ 40 ไมโครลิตร บนอาหารเกลี่ยให้ทั่ว จนแห้ง

3. นำหลอดจากข้อ 1 บ่มใน water bath อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

4. เมื่อครบเวลา นำไปบ่มในน้ำแข็งทันที แล้วเติมอาหารเหลว (LB Broth ธรรมดา) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร บ่ม และเขย่าหลอดที่ 37องศาเซลเซียส นาน 40-90 นาที

5. ปั่นเชื้อ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง ให้เหลือประมาณ 200 ไมโครลิตร ปิเปตขึ้นลงเพื่อให้ตะกอนละลาย จากนั้นนำไปเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB ที่เตรียมในข้อ 2 รอ ให้แห้ง

6. นำจานเพาะเลี้ยง ไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน สังเกตสีของโคโลนี ซึ่งโคโลนีสีขาวจะเป็นโคโลนีที่มีดีเอ็นเอสายผสม ส่วนโคโลนีสีฟ้าจะเป็นโคโลนีที่มีพลาสมิด pGEM-T easy



ภาพที่ 4 แผนที่ของพลาสมิด pGEM-T easy (Promega)

7. การคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมจากขนาด (Rapid size screening)

เมื่อได้โคโลนีแล้ว จะนำโคโลนีสีขาวมาคัดเลือกด้วยขนาด โดยหากเป็นดีเอ็นเอสายผสมจะต้องเคลื่อนที่ในเจลได้ช้ากว่าดีเอ็นเอที่ได้จากโคโลนีสีฟ้า ซึ่งการคัดเลือกจะมีขั้นตอน ดังนี้

1. เตรียมอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

2. นำปากคีบไปเผา แล้วคีบไม้จิ้มฟันไปจิ้ม โคโลนีสีขาว แล้วนำไม้จิ้มฟันไปใส่ในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ที่เตรียมไว้

3. นำไปเขย่า 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

4. ดูดเชื้อมา 100 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ทิ้งส่วนน้ำ

5. เติม 50 ไมโครลิตร Lysis buffer (5 mM EDTA,10%w/v sucrose, 0.25%w/v SDS, 100 mM NaOH, 60 mM KCl, 0.05%w/v bromophenol blue) ผสมด้วยการ Vortex

6. บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

7. ครบเวลาบ่มน้ำแข็ง 5 นาที ปั่น 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที

8. ดูดของเหลว 20 ไมโครลิตร ไปวิเคราะห์ด้วยการทำ 1% agarose gel electrophoresis ด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 60 นาที

8. การสกัดดีเอ็นเอสายผสมด้วยวิธีการ CTAB Mini Plasmid Preparation

1. ดูดเชื้อที่เลี้ยงไว้ที่ผ่านการทำ Rapid size screening ว่าน่าจะเป็นดีเอ็นเอสายผสมปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใส ทำซ้ำเช่นนี้ 3 ครั้ง

2. เติม STET Buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติม lysozyme ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร แล้วนำไป vortex เพื่อผสมตะกอนเซลล์

3. บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที และบ่มที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นย้ายส่วนใสไปไว้ในหลอดใหม่ (ทิ้งหลอดเก่า)

5. เติม 5% CTAB ปริมาตร 20 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาเพื่อผสม แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

6. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งส่วนน้ำ

7. เติม 1.2 M NaCl ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติม RNase ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

8. เติมโคลโรฟอร์ม 1 ปริมาตร (510 ไมโครลิตร) ผสม แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนบนไว้หลอดใหม่ (400 ไมโครลิตร) ทิ้งหลอดเก่า

9. เติม 3 M โซเดียมอะซิเตด pH 5.6 0.1 ปริมาตร (40 ไมโครลิตร) และเติม 95% เอทานอล 2 ปริมาตร (880 ไมโครลิตร)

10. บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

11. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งส่วนน้ำ ระวังอย่าให้ตะกอนดีเอ็นเอหลุด

12. เติม 70% เอทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนน้ำ ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ

13. ตั้งทิ้งไว้ให้ตะกอนแห้ง และละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วย 10 mM Tris-HCl pH 8.0 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร

9. การวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ

ยีน *hsf* ที่เพิ่มจำนวนได้ นำไปแยกบริสุทธิ์และโคลน แล้วนำไปหาลำดับดีเอ็นเอที่บริษัท 1st Base (Malaysia) หากยีนมีขนาดมากกว่า 0.5 กิโลเบส จะหาลำดับดีเอ็นเอ 2 ทิศทาง แล้วนำผลการหาลำดับดีเอ็นเอ จะนำมาสร้างสาย contiguous sequence และแปลเป็นลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม BioEdit จากนั้นนำลำดับดีเอ็นเอและลำดับกรดอะมิโนที่ได้มาเปรียบเทียบกันด้วยโปรแกรม ClustalX และ GeneDoc การเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) นอกจากนี้ลำดับกรดอะมิโนนำไปวิเคราะห์บริเวณ motif ของโปรตีนด้วยการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน Pfam (http://pfam.sanger.ac.uk/search) (Marco *et al.*, 2012)

10. การศึกษาการแสดงออกของยีนจากใบอ้อยด้วยเทคนิค RT-PCR

การแสดงออกของยีน ScHSF6 และ ScHSF10 โดยการขุดหน่อของอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50 นำมาเลี้ยงในน้ำที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส แล้วตัดใบเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อในการศึกษาการแสดงออก จากนั้นนำหน่อเดียวกันมาเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37, 42, 45 และ 48 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ในตู้ที่ให้แสง ในการทดลองนี้จะใช้หน่ออ้อยเดียวกัน ในแต่ละอุณหภูมิจะเพาะเลี้ยงอ้อยให้กลับมาในสภาพปกติก่อนจะนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิอื่นๆ เช่น เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ตัดใบ เพาะเลี้ยงหน่ออ้อยที่อุณหภูมิห้อง 4-5 วัน เพื่อให้อ้อยกลับสู่สภาวะปกติ จากนั้นจึงเลี้ยงที่ 45 องศาเซลเซียส เมื่อครบกำหนดเวลาจะตัดใบอ้อย ล้างด้วยน้ำให้สะอาดแล้ว เก็บใบอ้อยที่ -20 องศาเซลเซียส ทันที เพื่อในการศึกษาการแสดงออก จากนั้นนำใบอ้อยที่เตรียมไว้มาสกัด total RNA ด้วยน้ำยา TriZol reagent (Invitrogen) แล้วนำ total RNA มากำจัดดีเอ็นเอในจีโนม (genomic DNA) ด้วยชุดสำเร็จรูป Thermo Scientific RapidOut DNA Removal Kit (Thermo Scientific) นำ total RNA ที่เตรียมได้ มาใช้ในการทำ reverse transcription ด้วยชุดสำเร็จรูป RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) แล้วนำใช้ทำ PCR ซึ่งในปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X GeNei™ Red Dye PCR Master Mix (Merck) ดีเอ็นเอของจีโนมประมาณ 100-500 นาโนกรัม และไพรเมอร์ (forward และ reverse) อย่างละ 0.5 ไมโครโมลาร์ และไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองนี้ แสดงในตารางที่ 1 โดยสภาวะที่ใช้ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 50 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที จำนวน 28 รอบ ต่อไป จากนั้นวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนด้วยการทำ 1% agarose gel

electrophoresis แล้วนำปริมาณของยีนที่เพิ่มมาเปรียบเทียบการแสดงออกเทียบกับการแสดงของยีน *actin* ที่ออกแบบจากยีน *actin* ของข้าว โดยการแสดงอกของยีน *actin* เป็นตัวควบคุมภายในเนื่องจากเป็นยีนที่มีการแสดงคงที่ และแสดงออกในเนื้อเยื่อทุกชนิด ที่เตรียมวิธีการเดียวกัน

ตารางที่ 1 ลำดับดีเอ็นเอของไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค RT-PCR

ยีน	ลำดับดีเอ็นเอของไพรเมอร์ (5′ ไป 3′)	ขนาดของผลผลิต (bp)
ScHSF5	Forward; CCACATCGCGGCCACTTGTT	517
	Reverse; AGCGCGGCAGTGAAGGGATT	
ScHSF6	Forward1; CCAGCTCGTCCCACACATC	471
	Reverse; CCGCCAAAGGATCCCAGTG	
actin (ABO47313)	Forward; TGATGCGCCCAGGGCTGTCT	276
	Reverse; CGATTGGCCTTGGGGTTGAG	