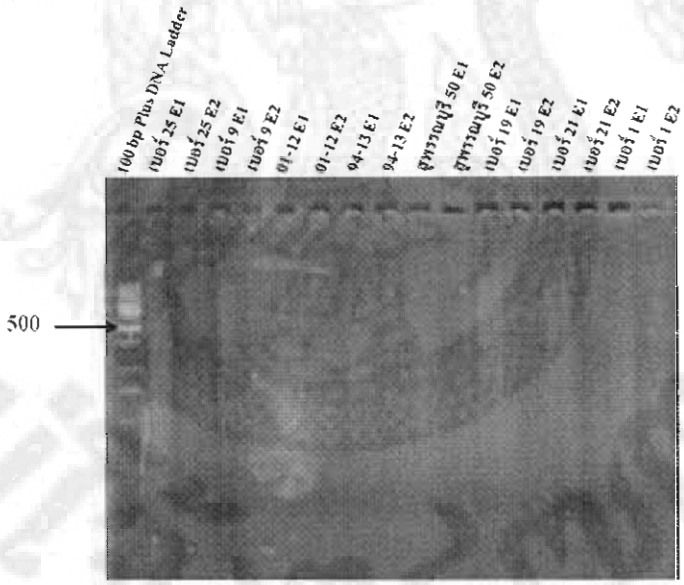
ผลการวิจัย

1. การศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอในจีโนมของอ้อย (Genomic DNA)

การสกัดดีเอ็นเอในจีโนมจากใบอ้อยจะเปรียบเทียบวิธีการสกัด 3 วิธี คือ วิธีการ mCTAB ชุดสำเร็จรูป GF-1 (Vivantis) และ ชุดสำเร็จรูป Genomic DNA Purification Kit (Thermo scientific) จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ด้วยกระแส 100 โวลต์ นาน 60 นาที จากนั้นนำไปใช้เป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR เพื่อวิเคราะห์คุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดว่าสามารถใช้ในการทำ PCR

การสกัดดีเอ็นเอในจีโนมของอ้อยด้วยชุดสกัด สำเร็จรูป GF-1 (Vivantis) เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวิเคราะห์ด้วย 1% agarose gel electrophoresis พบว่าได้ดีเอ็นเอปริมาณน้อย ดังภาพที่ 5

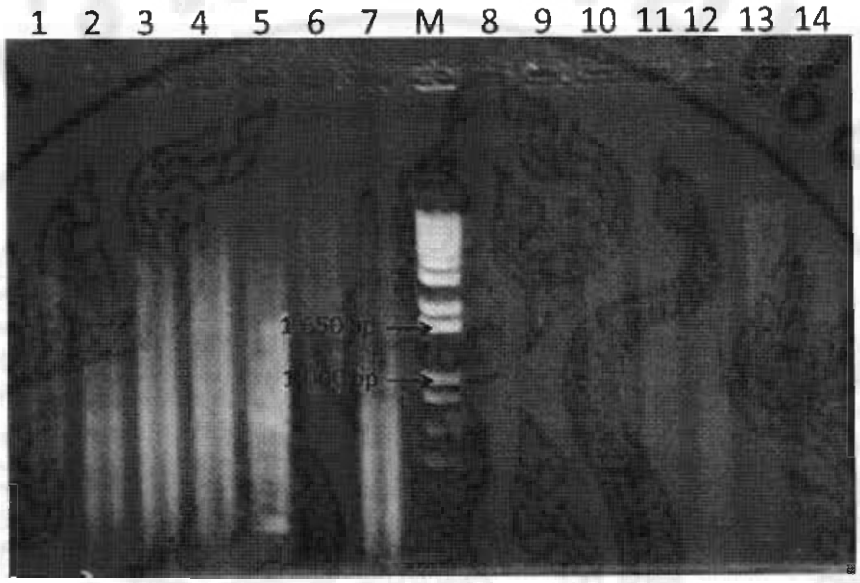


ภาพที่ 5 ผลการทำ 1% agarose gel electrophoresis ของดีเอ็นเอในจีโนมที่ได้จากการสกัดด้วยชุดสกัด GF-1 (vivantis)

จากนั้นนำดีเอ็นเอของอ้อยที่สกัดได้ด้วยชุดสกัด GF-1 (vivantis) มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ PTSo00732, PTSo00733 และ PTSo00734 หลังจากได้ผล PCR แล้วจึงนำผลที่ได้ไปตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทั้ง 3 ไพรเมอร์ (ไม่แสดงข้อมูล)

เมื่อทำการเปรียบเทียบวิธีการสกัดระหว่างการใช้ชุด Genomic DNA Purification Kit (Thermo scientific) กับใช้วิธี mCTAB นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวิเคราะห์ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ผลของการเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอในจีโนม (genomic DNA) ของอ้อย

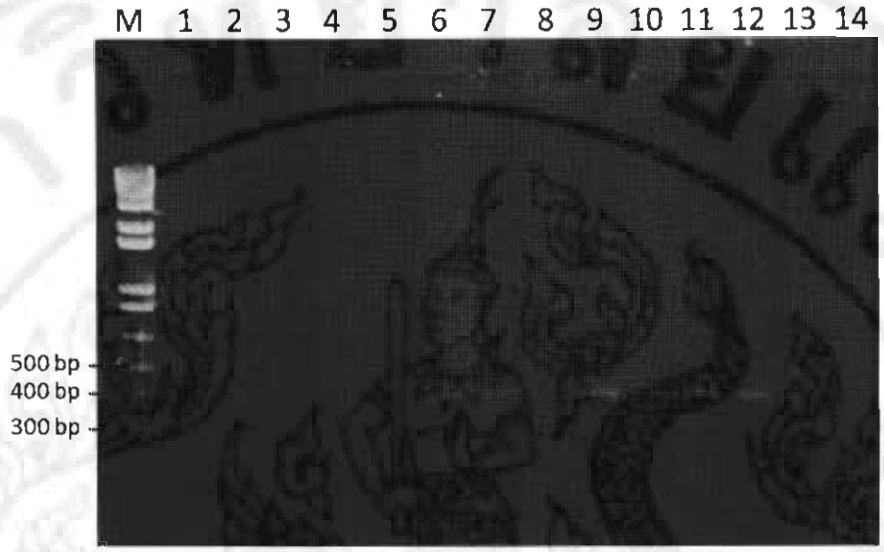
ได้ผลการทดลอง ดังภาพที่ 6 พบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทั้งสองวิธีมีการแตกหักของดีเอ็นเอ สังเกตจากแถบสว่างที่ได้จะมีการไล่ยาวลงมาด้านล่างเป็นปื้น แต่หากพิจารณาจากปริมาณ จะเห็นได้ว่าการสกัดโดยใช้ชุดสำเร็จรูป จะได้ดีเอ็นเอปริมาณมากกว่าการใช้วิธีการ mCTAB



ภาพที่ 6 ผลการทำ agarosegel electrophoresis ที่ได้จากการเปรียบเทียบระหว่างการสกัดโดยใช้ชุด Genomic DNA Purification Kit กับวิธี mCTAB ของดีเอ็นเอในจีโนมจากอ้อยพันธุ์ต่างๆ เลนที่ M คือ 1Kb Plus DNA Ladder จำนวน 3 ไมโครลิตร และผสมดีเอ็นเอตัวอย่างที่ได้จากการสกัด ปริมาตร 2 ไมโครลิตร กับ 6X loadind dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร การสกัดโดยใช้ชุด Genomic DNA Purification Kit เลนที่ 1 คือ ลาวสะดุ้ง เลนที่ 2 คือ ขอนแก่น 3 เลนที่ 3 คือ ขอนแก่น 80 เลนที่ 4 คือ K92 เลนที่ 5 คือ สุพรรณบุรี 50 เลนที่ 6 คือ กำแพงแสน 01-12 เลนที่ 7 คือ กำแพงแสน 49-13 การสกัดโดยใช้ mCTAB เลนที่ 8 คือ ลาวสะดุ้ง เลนที่ 9 คือ ขอนแก่น 3 เลนที่ 10 คือ ขอนแก่น 80 เลนที่ 11 คือ K92 เลนที่ 12 คือ สุพรรณบุรี 50 เลนที่ 13 คือ กำแพงแสน 01-12 เลนที่ 14 คือ กำแพงแสน 49-13

จากนั้นวิเคราะห์คุณภาพของดีเอ็นเอในจีโนมที่สกัดได้ โดยเลือกตัวอย่างดีเอ็นเอในจีโนมที่ได้จากการสกัดทั้ง 2 วิธี ด้วยชุด Genomic DNA Purification Kit (Thermo scientific) ทั้งหมด 5 พันธุ์ คือ สุพรรณบุรี 50, กำแพงแสน 01-12, กำแพงแสน 94-13, ลาวสะดุ้ง และ ขอนแก่น 80 และวิธี mCTAB ทั้งหมด 7 พันธุ์ คือ สุพรรณบุรี 50, กำแพงแสน 01-12, กำแพงแสน94-13, ลาวสะดุ้ง, ขอนแก่น 3, ขอนแก่น 80, และพันธุ์ K92 มาทำ PCR ด้วยไพรเมอร์ 2 คู่ คือ ScHSF5 และ ScHSF6 เมื่อนำผลการทำ PCR มาวิเคราะห์ด้วยการทำ 1% agarose gel electrophoresis ใช้กระแส 100 โวลต์

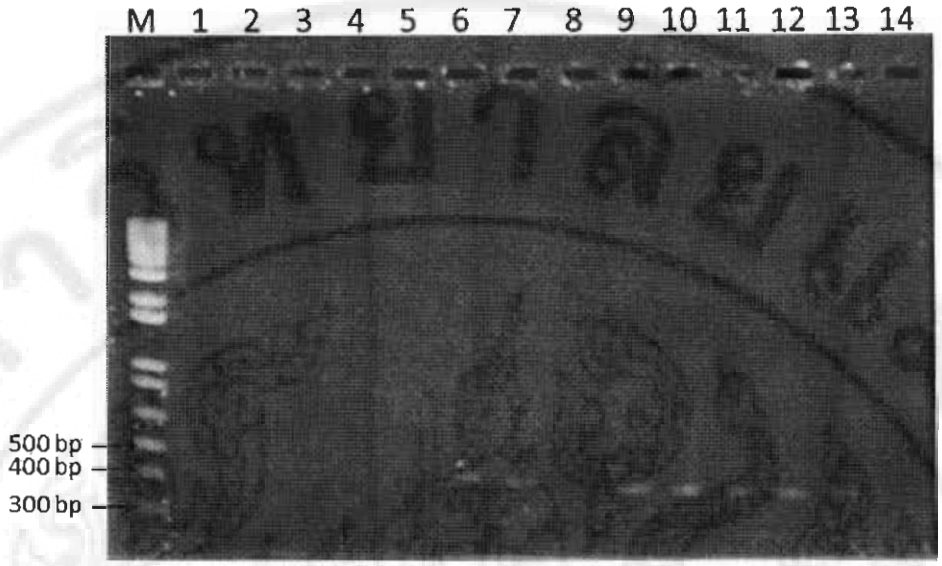
นาน 30 นาที พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ได้จากไพรเมอร์ จำนวน 2 คู่ ได้แก่ ScHSF5, ScHSF6 ดังภาพที่ 7 และ 8



ภาพที่ 7 ผลการทำ 1% agarose gel electrophoresis ของผลผลิต PCR ของยีน ScHSF5 จากดีเอ็นเอในจีโนมจากอ้อยพันธุ์ต่างๆ เปรียบเทียบระหว่างการสกัดโดยวิธี mCTAB (เลน 1-8) กับ ชุด Genomic DNA Purification Kit (เลน 9-14) เลนที่ M คือ 1Kb Plus DNA Ladder เลนที่ 1 คือ ลาวสะดุ้ง เลนที่ 2 คือ ขอนแก่น 3 เลนที่ 3 คือ ขอนแก่น 80 เลนที่ 4 คือ K92 เลนที่ 5 คือ สุพรรณบุรี 50 เลนที่ 6 คือ กำแพงแสน 01-12 เลนที่ 7 คือ กำแพงแสน 49-13 เลนที่ 8 คือ น้ำ (ตัวควบคุม) เลนที่ 9 คือ ลาวสะดุ้ง เลนที่ 10 คือ ขอนแก่น 80 เลนที่ 11 คือ กำแพงแสน 01-12 เลนที่ 12 คือ กำแพงแสน 94-13 เลนที่ 13 คือ สุพรรณบุรี 50 เลนที่ 14 คือ น้ำ (ตัวควบคุม)

จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ พบว่าดีเอ็นเอในจีโนมที่สกัดได้จากชุดสำเร็จรูป Genomic DNA Purification Kit (Thermo scientific) จะสามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ดีกว่าการสกัดด้วยวิธีการ mCTAB ในขณะที่ดีเอ็นเอที่สกัดด้วยชุดสกัด GF-1 (Vivantis) นั้นนอกจากจะได้ดีเอ็นเอปริมาณน้อยแล้ว ยังไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ได้

ดังนั้นจากผลการวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอในจีโนมที่ได้จากวิธีการสกัด ทั้ง 3 วิธี สามารถสรุปได้ว่าการสกัดด้วยชุดสำเร็จรูป Genomic DNA Purification Kit (Thermo scientific) นั้นให้ปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอในจีโนมดีกว่าวิธีการสกัดอื่น ทำให้ในการทดลองส่วนต่อไปจะใช้ดีเอ็นเอในจีโนมที่ได้จากการสกัดด้วยชุดสำเร็จรูป Genomic DNA Purification Kit (Thermo scientific)



ภาพที่ 8 ผลการทำ 1% agarose gel electrophoresis ของผลผลิต PCR ของยีน ScHSF6 จากดีเอ็นเอในจีโนมของอ้อยพันธุ์ต่างๆ เปรียบเทียบระหว่างการสกัดโดยวิธี mCTAB (เลน 1-8) กับ ชุด Genomic DNA Purification Kit (เลน 9-14) เลนที่ M คือ 1 Kb Plus DNA Ladder เลนที่ 1 คือ ลาวสะตุ้ง เลนที่ 2 คือ ขอนแก่น 3 เลนที่ 3 คือ ขอนแก่น 80 เลนที่ 4 คือ K92 เลนที่ 5 คือ สุพรรณบุรี 50 เลนที่ 6 คือ กำแพงแสน 01-12 เลนที่ 7 คือ กำแพงแสน 94-13 เลนที่ 8 คือ น้ำ (ตัวควบคุม) เลนที่ 9 คือ ลาวสะตุ้ง เลนที่ 10 คือ ขอนแก่น 80 เลนที่ 11 คือ กำแพงแสน 01-12 เลนที่ 12 คือ กำแพงแสน 49-13 เลนที่ 13 คือ สุพรรณบุรี 50 เลนที่ 14 คือ น้ำ (ตัวควบคุม)

2. การออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการแยกยีน *hsf*

ยีน *hsf* ของอ้อยได้จากฐานข้อมูล transcription factors จากข้าว ข้าวฟ่าง ข้าวโพด และอ้อย ที่รายงานจำนวน 12 ยีน ได้แก่ ScHSF1, ScHSF2, ScHSF5, ScHSF6, ScHSF7, ScHSF10, ScHSF11, ScHSF12, ScHSF13, ScHSF15, ScHSF16, ScHSF18 และฐานข้อมูลของอ้อย จำนวน 4 ยีน ได้แก่ PTSo00731, PTSo00732, PTSo00733 และ PTSo00734 ลำดับดีเอ็นเอของยีน *hsf* เหล่านี้นำมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์สำหรับการแยกยีน *hsf* ด้วยการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR โดยลำดับดีเอ็นเของไพรเมอร์และขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่คาดว่าจะได้ แสดงในตารางที่ 2

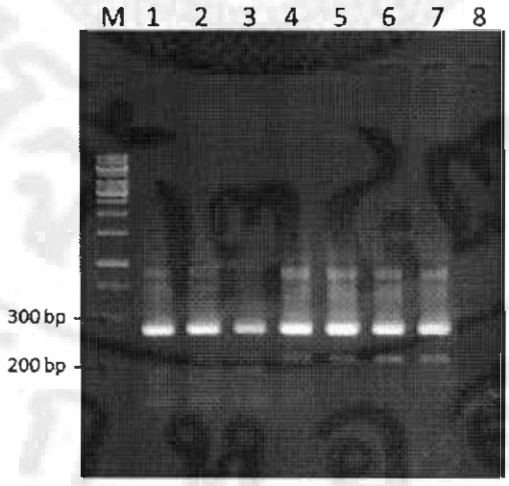
ตารางที่ 2 ลำดับดีเอ็นเอและขนาดของผลผลิตที่ได้จาก PCR ของไพรเมอร์สำหรับยีน *hsf* ต่างๆ

ยีน	ลำดับดีเอ็นเอของไพรเมอร์ (5′ ไป 3′)	ขนาดของผลผลิต (bp)
ScHSF1	Forward; TGCGACGATTTCCTCCGGTG	538
	Reverse; TCCGAGGCTCCGATTCTCC	
ScHSF2	Forward; GCCCACCTCCATTGCCACAA	1,023
	Reverse; TTCGGGAGGGAGGGGCAACTAT	
ScHSF5	Forward; CCACATCGCGGCCACTTGTT	517
	Reverse; AGCGCGGCAGTGAAGGGATT	
ScHSF6	Forward; AGAGCCAGAGGTGGCGTTATAGTTG	835
	Reverse; CCGCCAAAGGATCCCAGTG	
ScHSF7	Forward; CAGCTCCAGGTGCGGAAGAA	1,774
	Reverse; CATGCAGAAGGTCCTCCCAG	
ScHSF710	Forward; GTTGTTGTGCTTAAAGAGGC	435
	Reverse; AAATATCCTAGATCGCCGAC	
ScHSF11	Forward; CTGGAAGCTACGGTTTCGCC	565
	Reverse; ACCTTCCGGCGGTGTATGTC	
ScHSF12	Forward; CTCATCGCAGGCCTCGCAGC	367
	Reverse; TGCCGGAGGAAGGTGGAGAA	
ScHSF13	Forward; GTAGTCGCCGTTGCTCTCGT	1,010
	Reverse; TCTATCTCTTCCCGCGCCGA	
ScHSF15	Forward; GCATCACCCGTCATGGAGGT	502
	Reverse; CCCCTGACTGCTGCTGATGA	
ScHSF16	Forward; GCCTCCGGCTTTTCGATCGA	1,369
	Reverse; CTGCTGCCAAAAGCCATCGT	
ScHSF718	Forward; GAGAGGTAGGTAGCCGGAGCTA	912
	Reverse; GTTCTCGCTGGTCAGCTGGT	
PTSo00731	Forward; ATGGATGTGCTCCATGACG	942
	Reverse; CTACATCTTCATATCATCGTGACC	

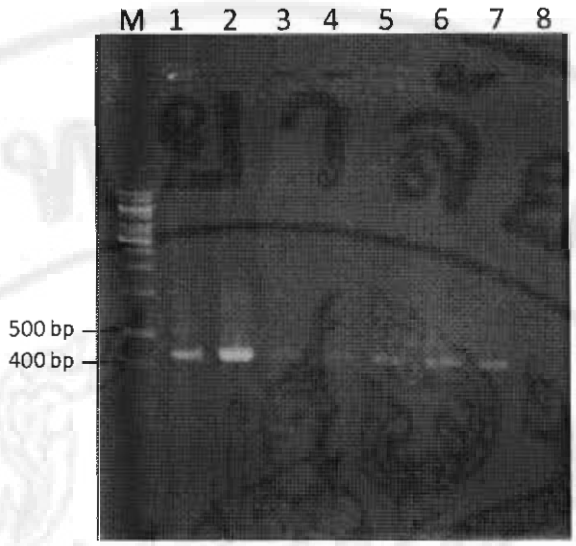
ยีน	ลำดับดีเอ็นเอของไพรเมอร์ (5′ ไป 3′)	ขนาดของผลผลิต (bp)
PTSo00732	Forward; ATGGAAGCACAGCCAAGAAAAT	652
	Reverse; CTACTCATAGTGCTCCACAAACTGC	
PTSo00733	Forward; ATGGAGGCGGGCGG	517
	Reverse; TCACCGATCCTCCAAAAAGAT	
PTSo00734	Forward; CGGGAACAGCTTCGTGGTGT	746
	Reverse; AATACTTCTCACCAGTGCATAGCTG	

3. การแยกยีนด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

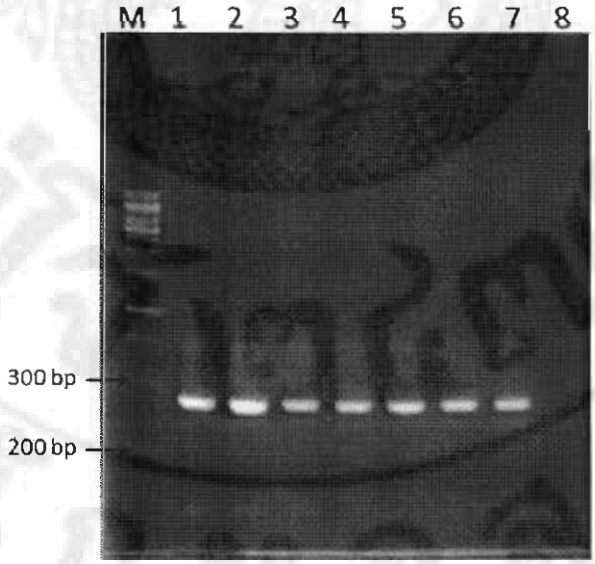
นำตัวอย่างดีเอ็นเอในจีโนมมาเพิ่มจำนวนด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับยีน *hsf* ต่างๆ นั้น เมื่อเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค PCR แล้ว นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 1% agarose gel electrophoresis พบว่าไพรเมอร์สำหรับยีน ScHSF1, ScHSF2, ScHSF7, ScHSF11, ScHSF12, ScHSF13, ScHSF15, ScHSF16, ScHSF18 ไม่พบการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอ (ไม่แสดงข้อมูล) ส่วนไพรเมอร์สำหรับยีน ScHSF5, ScHSF6 และ ScHSF10 สามารถเพิ่มจำนวนได้ ดังภาพที่ 9, 10 และ 11



ภาพที่ 9 ผลการทำ 1% agarose gel electrophoresis ของผลผลิต PCR ของยีน ScHSF5 จากดีเอ็นเอในจีโนม ของ อ้อยพันธุ์ต่างๆ เลนที่ M คือ GeneRuler 1Kb Plus DNA Ladder เลนที่ 1 คือ กำแพงแสน 01-12 เลนที่ 2 คือ กำแพงแสน 49-13 เลนที่ 3 คือ สุพรรณบุรี 50 เลนที่ 4 คือ ลาวสะดุ้ง เลนที่ 5 คือ ขอนแก่น 3 เลนที่ 6 คือ ขอนแก่น 80 เลนที่ 7 คือ K92 เลนที่ 8 คือ น้ำ (ตัวควบคุม)



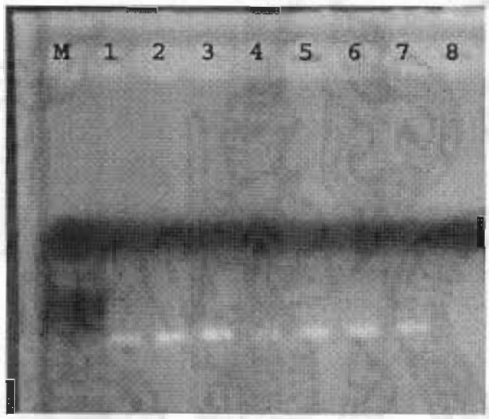
ภาพที่ 10 ผลการทำ 1%agarose gel electrophoresis ของผลผลิต PCR ของยีน ScHSF6 จากดีเอ็นเอในจีโนมของอ้อยพันธุ์ต่างๆ เลนที่ M คือ GeneRuler 1Kb Plus DNA Ladder เลนที่ 1 คือ กำแพงแสน 01-12 เลนที่ 2 คือ กำแพงแสน 49-13 เลนที่ 3 คือ สุพรรณบุรี 50 เลนที่ 4 คือ ลาวสะตุ้ง เลนที่ 5 คือ ขอนแก่น 3 เลนที่ 6 คือ ขอนแก่น 80 เลนที่ 7 คือ K92 เลนที่ 8 คือ น้ำ (ตัวควบคุม)



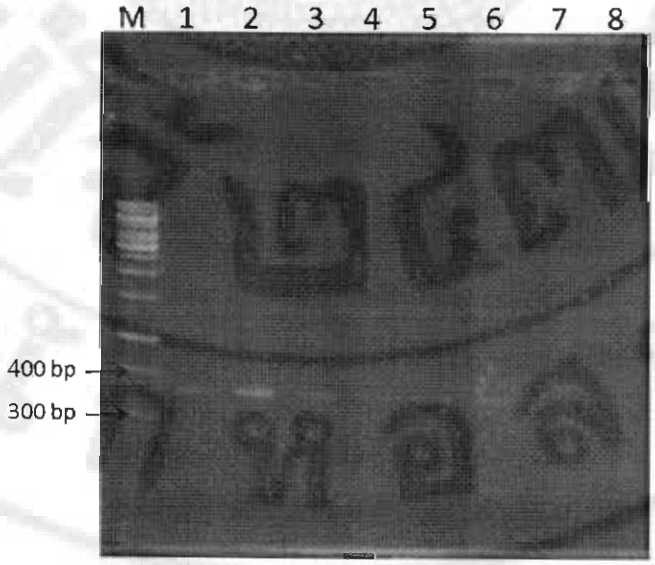
ภาพที่ 11 ผลการทำ 1% agarose gel electrophoresis ของผลผลิต PCR ของยีน ScHSF10 จากดีเอ็นเอในจีโนมของอ้อยพันธุ์ต่างๆ เลนที่ M คือ GeneRuler 1Kb Plus DNA Ladder เลนที่ 1 คือ กำแพงแสน 01-12 เลนที่ 2 คือ กำแพงแสน 49-13 เลนที่ 3 คือ สุพรรณบุรี 50 เลนที่ 4 คือ ลาวสะตุ้ง เลนที่ 5 คือ ขอนแก่น 3 เลนที่ 6 คือ ขอนแก่น 80 เลนที่ 7 คือ K92 เลนที่ 8 คือ น้ำ (ตัวควบคุม)

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้

สำหรับสำหรับยีน PTSo00731 - PTSo00734 จึงได้ออกแบบไพร์เมอร์สำหรับยีนทั้ง 4 จากนั้นใช้ในการเพิ่มจำนวนยีนจากดีเอ็นเอในจีโนมของอ้อย จำนวน 7 สายพันธุ์ด้วยเทคนิค PCR พบว่าอ้อยทุกพันธุ์ มียีน PTSo00731 และยีน PTSo00732 ดังภาพที่ 12 และ 13 แต่พบยีน PTSo00733 ในอ้อยบางสายพันธุ์ และไม่พบยีน PTSo00734 ดังภาพที่ 14



ภาพที่ 12 ผลการทำ 1% agarose gel electrophoresis ของไพรเมอร์ PTSo00731 จากอ้อยพันธุ์ต่างๆ โดยช่อง M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน เลนที่ 1 คือ กำแพงแสน 01-12 เลนที่ 2 กำแพงแสน 94-13 เลนที่ 3 คือ ขอนแก่น 3 เลนที่ 4 คือ ขอนแก่น 80 เลนที่ 5 คือ K92 เลนที่ 6 คือ ลาวสะดุ้ง เลนที่ คือ สุพรรณบุรี 50 และ เลนที่ 8 คือ น้ำ (ตัวควบคุม)



ภาพที่ 13 ผลการทำ 1% agarose gel electrophoresis ของไพรเมอร์ PTSo00732 จากอ้อยพันธุ์ต่างๆ เลนที่ M คือ GeneRuler 1Kb Plus DNA Ladder เลนที่ 1 คือ กำแพงแสน 01-12 เลนที่ 2 คือ กำแพงแสน 49-13 เลนที่ 3 คือ สุพรรณบุรี 50 เลนที่ 4 คือ ลาวสะดุ้ง เลนที่ 5 คือ ขอนแก่น 3 เลนที่ 6 คือ ขอนแก่น 80 เลนที่ 7 คือ K92 เลนที่ 8 คือ น้ำ (ตัวควบคุม)

ภาพที่ 14 ผลการทำ 1% agarose gel electrophoresis ของไพรเมอร์ PTSo00733 (เลนที่ 1-8) และ 07334 (เลนที่ 9-16) โดยช่อง M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน เลนที่ 1 และ 9 คือกแพงแสน 01-12 เลนที่ 2 และ 10 คือกำแพงแสน 94-13 เลนที่ 3 และ 11 คือขอนแก่น 3 เลนที่ 4 และ 12 คือ ขอนแก่น 80 เลนที่ 5 และ 13 คือ K92 เลนที่ 6และ 14 คือ ลาวสะดุ้ง เลนที่ 7 และ 15 คือ สุพรรณบุรี 50 และ เลนที่ 8 และ 16 คือ น้ำ (ตัวควบคุม)

จากการแยกยีน *hsf* ของอ้อยด้วยเทคนิค PCR พบว่าเพิ่มจำนวนได้ชิ้นดีเอ็นเอได้จากไพรเมอร์ ของยีน 4 ยีน ได้แก่ ยีน ScHSF5, ScHSF6 ScHSF10, PTSo00731, PTSo00732 และ PTSo00733 ซึ่งชิ้นดีเอ็นเอเหล่านี้จะนำมาแยกบริสุทธิ์แล้วส่งไปอ่านลำดับดีเอ็นเอต่อไปเพื่อวิเคราะห์ว่าเป็นยีน *hsf* ต่อไป

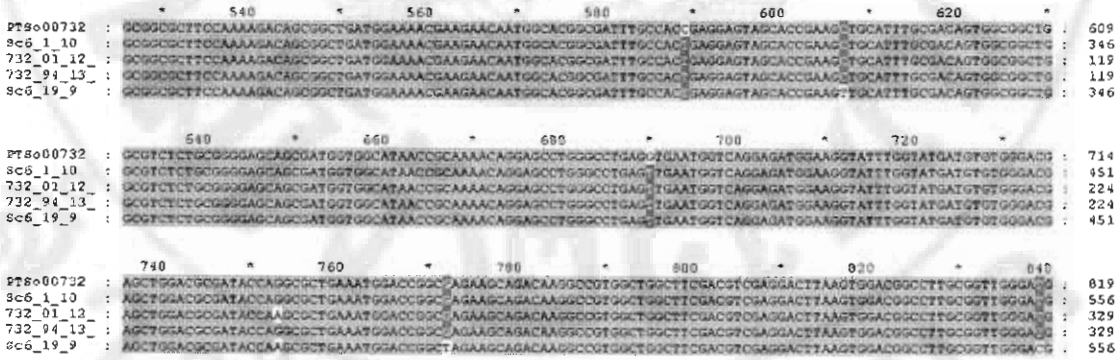
4. การวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR

ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ทั้ง 6 ยีน (ScHSF5, ScHSF6 ScHSF10, PTSo00731, PTSo00732 และ PTSo00733) เพื่อแยกบริสุทธิ์ เมื่อนำไปหาลำดับดีเอ็นเอ พบว่าไม่สามารถหาลำดับได้จากชิ้นดีเอ็นเอของไพรเมอร์ PTSo00731 และไพรเมอร์ PTSo00733 (ไม่แสดงข้อมูล) สามารถหาลำดับดีเอ็นเอของชิ้นดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ ScHSF5 จากอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 ที่มีความยาว 388 คู่เบส และชิ้นดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ ScHSF5 จากอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50 นั้นหาได้เพียง 330 คู่เบส เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank ด้วยการทำ BLAST พบว่าเหมือนกับ retrotransposon ของจีโนมอ้อย (Saccharum hybrid cultivar

R570 isolate RLG_scDEL_5.1 retrotransposon, accession number JN800047.1) แต่ไม่เหมือนยีน *hsf*

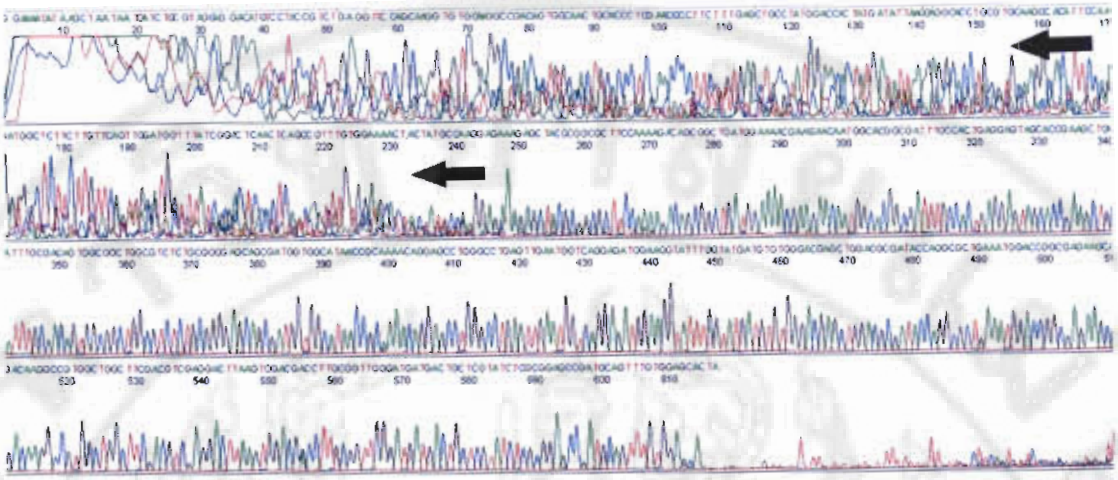
ลำดับดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ ScHSF6 จากอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 ความยาว 719 คู่เบส ผลการ BLAST พบว่าเหมือนกับยีน *hsf* ของข้าวโพด (*Zea mays* clone UT1392 HSF transcription factor mRNA, accession number HQ858724) และลำดับดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ ScHSF10 จากอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50 ความยาว 437 คู่เบส ผลการ BLAST พบว่าเหมือนกับยีนพบว่าเหมือนกับยีน *hsf* ของข้าวโพด (*Zea mays* heat shock factor protein HSF30, accession number NM_001153656) เหมือนกับยีน *hsf*

ลำดับดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ PTSo00732 นั้นสามารถหาได้จากอ้อย 4 พันธุ์ ได้แก่ กำแพงแสน 01-12, กำแพงแสน 94-13, พันธุ์ K92 เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล พบว่าเหมือนกับ ยีน *hsf* ของข้าวโพด (*Zea mays* clone UT1392 HSF transcription factor mRNA, accession number HQ858724) และจากการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ PTSo00732 และ ScHSF6 พบว่ามีลำดับดีเอ็นเอเหมือนกัน ดังภาพที่ 15 แสดงว่าดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ ScHSF6 นั้นเหมือนกับดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ PTSo00732 ดังนั้นจึงเลือกศึกษาเฉพาะยีน ScHSF6 ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 15 ผลการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ PTSo00732 (732) และ ScHSF6 (Sc6)

นอกจากนี้ผลการหาลำดับดีเอ็นเอของยีน ScHF6 จากอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50 พบว่าส่วนแรกมีลำดับดีเอ็นเอแตกต่างกัน เป็นบริเวณที่ชี้ด้วยลูกศรในภาพที่ 16 และส่วนหลังมีลำดับดีเอ็นเอแบบเดียว แสดงให้เห็นว่ายีน *hsf* นี้จะมีจำนวนมากกว่า 1 ลำดับในจีโนมของอ้อยพันธุ์นี้ และเนื่องจากอ้อยเป็นพืชที่มีโครโมโซมหลายชุด (polyploidy) ซึ่งแต่ละชุดน่าจะมียีน ScHSF6 ที่แตกต่างกันด้านหนึ่งของยีน นอกจากนี้ผลลำดับดีเอ็นเอของยีน ScHSF6 และScHSF10 ของอ้อยพันธุ์อื่นๆ แสดงผลเช่นเดียวกัน



ภาพที่ 16 ภาพ chromatogram ของผลการหาลำดับดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ ScHSF6 จากอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50

การวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอพบว่าสามารถแยกยีน *hsf* ของอ้อย จำนวน 2 ยีน ได้แก่ ScHSF6 และ ScHSF10 ซึ่งชิ้นยีนทั้งสองนี้จะนำมาโคลนเข้าดีเอ็นเอพาหะ เพื่อแยกลำดับดีเอ็นเอที่ผสมกันออก เพื่อแสดงให้เห็นว่ายีนทั้งสองนี้มีมากกว่า 1 ลำดับ นั้นเนื่องมาจากอ้อยเป็นพืชที่มีโครโมโซมหลายชุด (polyploidy)

5. การโคลนยีน ScHSF6 และ ScHSF10

เนื่องจากอ้อยเป็นพืชที่มีโครโมโซมหลายชุด (polyploidy) จึงคาดว่ายีน ScHSF6 และ ScHSF10 น่าจะมีจำนวนมากกว่า 1 แบบในอ้อยแต่ละสายพันธุ์ ทำให้เมื่อโคลนชิ้นดีเอ็นเอ ได้โคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมของยีน ScHSF6 จำนวน 23 โคลน ยีน ScHSF10 จำนวน 10 โคลน ซึ่งนำไปคัดเลือกดีเอ็นเอสายผสมที่แตกต่างกันด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*cII, *Pvu*II และ *Kpn*I เพื่อส่งไปหาลำดับดีเอ็นเอ

โดยพบว่าจากโคลน ScHSF6 จำนวน 23 โคลน เป็นโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมของยีน ScHSF6 ที่แตกต่างกัน 11 โคลน ซึ่งได้มาจากอ้อย จำนวน 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ลาวสะคุ้ง จำนวน 4 โคลน พันธุ์ขอนแก่น 3 จำนวน 4 โคลน และพันธุ์ขอนแก่น 80 จำนวน 3 โคลน

ส่วนโคลน ScHSF10 จำนวน 7 โคลน พบว่าเป็นโคลนที่มีดีเอ็นเอสายผสมของยีน ScHSF10 ที่แตกต่างกัน 5 โคลน จากอ้อย จำนวน 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ลาวสะคุ้ง จำนวน 3 โคลน พันธุ์ขอนแก่น 3 จำนวน 1 โคลน และกำแพงแสน 01-12 จำนวน 1 โคลน ซึ่งจากลำดับดีเอ็นเอและจำนวนโคลนแสดงให้เห็นว่ายีน ScHSF6 นั้นจะมีจำนวนแบบมากกว่ายีน ScHSF10

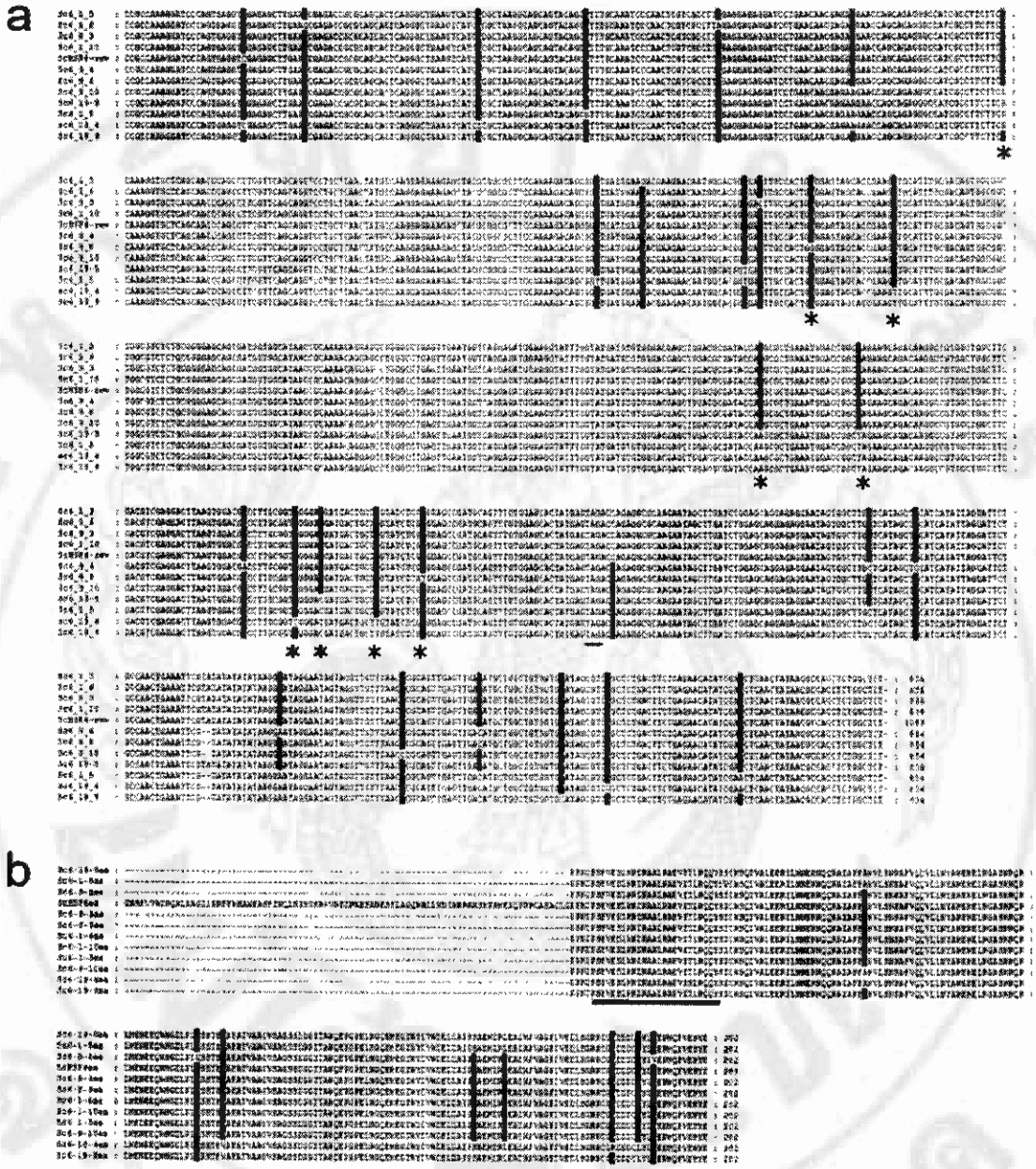
6. การวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอของยีน ScHSF6 และ ScHSF10 ที่ได้จากการโคลน

นำลำดับดีเอ็นเอของยีนที่โคลนได้มาเปรียบเทียบกัน ซึ่งผลการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของยีน ScHSF6 ที่แยกได้ (ภาพที่ 17a) จากอ้อยพันธุ์เดียวกันมีลำดับ ดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน และมีความเหมือนกันกับยีนเดียวกันจากอ้อยพันธุ์อื่น โดยยีน ScHSF6 ที่แยกได้จากอ้อย 3 พันธุ์ จำนวน 11 โคลน มีความเหมือนกัน 97-99 เปอร์เซ็นต์ พบลำดับดีเอ็นเอที่แตกต่าง 29 ตำแหน่ง ซึ่งอยู่ในส่วนของยีน 20 ตำแหน่ง โดย มีเพียง 9 ตำแหน่งเท่านั้นที่มีผลเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน และในส่วนของการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน (ภาพที่ 17b) พบความเหมือนของโปรตีนเป็น 95-100 เปอร์เซ็นต์

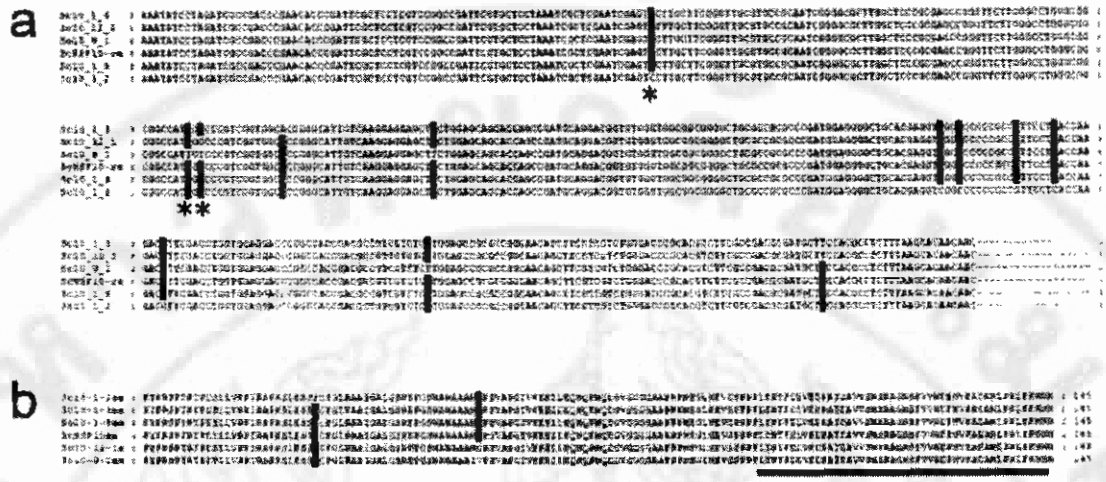
ส่วนผลการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของยีน ScHSF10 ที่แยกได้ (ภาพที่ 18a) จากอ้อยพันธุ์เดียวกันมีลำดับดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน และมีความเหมือนกันกับยีนเดียวกันจากอ้อยพันธุ์อื่น โดยยีน ScHSF10 ที่แยกได้จากอ้อย 3 พันธุ์ จำนวน 5 โคลน มีความเหมือนกัน 97-99 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีลำดับดีเอ็นเอแตกต่างกัน 12 ตำแหน่ง และมีเพียง 3 ตำแหน่งที่มีผลเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน และในส่วนของการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิ-โน (ภาพที่ 18b) พบความเหมือนของโปรตีนเป็น 97-100 เปอร์เซ็นต์

จากผลการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอแสดงให้เห็นว่ายีน ScHSF6 และ ScHSF10 จากอ้อยพันธุ์เดียวกันมีลำดับดีเอ็นเอแตกต่างกัน และยีนทั้งสองมีความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนที่สูง คาดว่ายีน ScHSF6 และ ScHSF10 จากอ้อยพันธุ์อื่น ก็น่าจะมีลักษณะเดียวกันนี้

ผลการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม blastx พบว่ายีน ScHSF6 และ ScHSF10 มีความเหมือนกับยีน *hsf* ของข้าวกลุ่ม A6a และ A2c ตามลำดับ ส่วนผลการวิเคราะห์บริเวณ motif ของโปรตีนด้วยการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรดีน Pfam ลำดับกรดอะมิโนของยีน ScHSF6 ของอ้อยพันธุ์ลาวสะตุ้ง (เบอร์ 1) โคลนที่ 3 พบว่าเป็นบริเวณ leucine zipper ที่เป็นคุณลักษณะสำคัญของโปรตีน transcription factor ส่วนลำดับกรดอะมิโนของยีน ScHSF10 ของอ้อยกำแพงแสน 01-12 พบว่าเป็นบริเวณจับดีเอ็นเอของโปรตีน (DNA binding domain) กลุ่ม heat shock transcription factor (HSF) ดังแสดงในตารางที่ 3 และการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่พบในยีนทั้งสอง ไม่มีผลกระทบต่อบริเวณ motif ของทั้งสองโปรตีน (ภาพที่ 17b และ 18b) แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงในยีน ScHSF6 และ ScHSF10 ที่แยกได้จากอ้อยในงานวิจัยนี้ ไม่น่าจะส่งผลกระทบต่อการทำงานของโปรตีน HSF ซึ่งจะต้องแยกยีนทั้งสองให้ได้ยีนที่สมบูรณ์ ซึ่งอาจจะพบความแตกต่างที่มีผลกระทบต่อการทำงานของโปรตีน



ภาพที่ 17 ผลการเปรียบเทียบขีน ScHSF6 จากอ้อย 3 พันธุ์ จำนวน 11 โคลน (a) ลำดับนิวคลีโอไทด์ (b) ลำดับกรดอะมิโน โดยบริเวณแรเงา คือ บริเวณที่ลำดับนิวคลีโอไทด์หรือลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน * แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน ส่วนแถบแสดงบริเวณที่เป็น leucine zipper motif



ภาพที่ 18 ผลการเปรียบเทียบยีน ScHSF10 จากอ้อย 3 พันธุ์ จำนวน 5 โคลน (a) ลำดับนิวคลีโอไทด์ (b) ลำดับกรดอะมิโน โดยบริเวณแรเงา คือ บริเวณที่ลำดับนิวคลีโอไทด์หรือลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน * แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน ส่วนแถบแสดงบริเวณที่เป็น HSF DNA binding motif

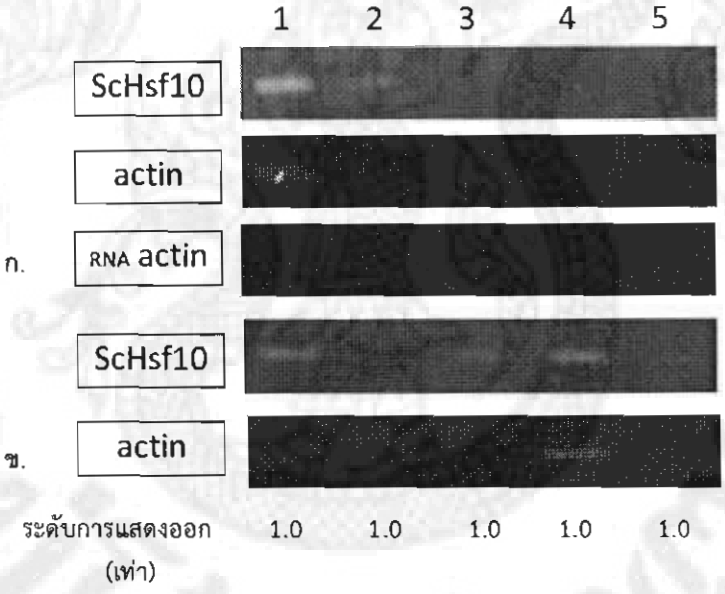
ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ motif ของโปรตีนด้วยการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสยีน ScHSF6 และ ScHSF10 ที่แยกได้กับฐานข้อมูลโปรตีน Pfam

Genes	Family	Description	Alignment		Bit score	E-value
			start	End		
ScHSF6-B1-3	HALZ	Homeobox associated leucine zipper	6	29	13	0.061
#HMM	AENDSLQKEKEKLRAEVLSLKEKL					
#MATCH	+e +sL+++ ++Lraev +L+ ++					
#SEQ	SEVESLKRDRAALRAEVITLRQQY					
ScHSF10-01-12	HSF-DNA-binding	HSF-DNA-binding	98	145	46.1	4.1e-12
HMM	FLKKLYEILEDEELKELISWSENGNSFVVLDEEEFAKKVLPKYFKHSN					
#MATCH	Fl+k+++++ed++++ ++sws+ gnsfvv+d++ fa+ +Lp+ Fkh+n					
#SEQ	FLTKTFDLVEDPATDAVVSWSRAGNSFVVWDPHVFADAMLPRLFKHNN					

7. ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน ScHSF6 และ ยีน ScHSF10

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน ScHSF6 และ ยีน ScHSF10 จากใบอ้อยที่เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28, 37, 42, 45, และ 48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค RT-PCR

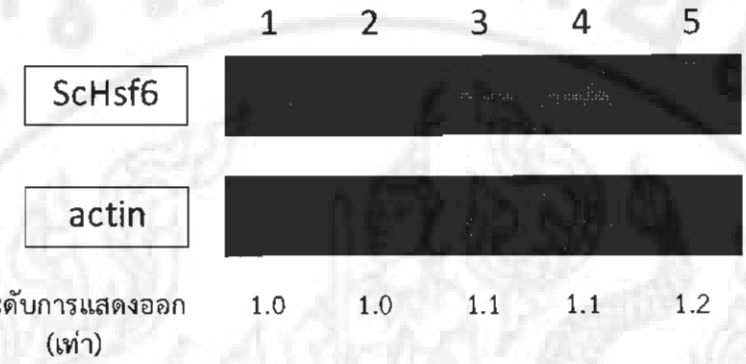
ในการทดลอง RT-PCR หากมีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอในจีโนม จะเกิดการเพิ่มจำนวนให้ผลเช่นเดียวกับ RT-PCR จึงทำ PCR ด้วย total RNA ที่สกัด ที่ไม่ผ่านการเปลี่ยนเป็น cDNA หากมีการปนเปื้อนจะให้แถบดีเอ็นเอ ผลการการทำ PCR ของ total RNA ของยีน *actin* (RNA actin) ดังภาพที่ 19 ไม่พบแถบดีเอ็นเอ แสดงถึงการไม่ปนเปื้อนจากดีเอ็นเอในจีโนม



ภาพที่ 19 ผลการทำ 1% agarose gel electrophoresis ของผลผลิต RT-PCR ของยีน ScHSF10 และ *actin* จาก cDNA อ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆ (ก) การทดลองครั้งที่ 1 (ข) การทดลองครั้งที่ 2 โดย เลนที่ 1 คือ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เลนที่ 2 คือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เลนที่ 3 คือ อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เลนที่ 4 คือ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เลนที่ 5 คือ อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส

จากผลการทำ RT-PCR ทั้งสองครั้ง จะพบแถบดีเอ็นเอของยีน ScHSF10 พร้อมกับแถบของยีน *actin* โดยพบแถบยีน ScHSF10 แสดงออกที่ทุกอุณหภูมิ คือ พบแถบดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 28 และ 37 องศาเซลเซียส ในการทดลองที่ 1 (ภาพที่ 19 ก) และพบแถบดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 42, 45 และ 48 องศาเซลเซียส ในการทดลองที่ 2 (ภาพที่ 18 ข) นอกจากนี้ความเข้มของแถบยีน ScHSF10 และยีน *actin* ที่พบจะมีความเข้มที่เท่ากัน นำไปวิเคราะห์ปริมาณของการแสดงออกของยีน ScHSF10 ต่อการแสดงออกของยีน *actin* ที่อุณหภูมิเดียวกัน ได้เป็นค่าการแสดงออกของยีน จากนั้นเปรียบเทียบ

ค่าการแสดงออกที่อุณหภูมินั้นกับค่าการแสดงออกที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ได้เป็นระดับการแสดงออก ที่พบว่ามีค่าเป็น 1.0 ในทุกอุณหภูมิ ผล RT-PCR ของยีน ScHSF10 ของอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50 แสดงออกที่ทุกอุณหภูมิ และแสดงออกเท่ากันในทุกอุณหภูมิ



ภาพที่ 20 ผลการทำ 1% agarose gel electrophoresis ของผลผลิต RT-PCR ของยีน ScHSF6 และ *actin* จาก cDNA อ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆ เลนที่ 1 คือ อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เลนที่ 2 คือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เลนที่ 3 คือ อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เลนที่ 4 คือ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เลนที่ 5 คือ อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส

ส่วนผล RT-PCR ของยีน ScHSF6 นั้น พบว่าแถบยีน ScHSF6 ที่ทุกอุณหภูมิ แต่จะเข้มมากที่อุณหภูมิ 42, 45 และ 48 องศาเซลเซียส แถบยีน *actin* มีความเข้มใกล้เคียงกันในทุกอุณหภูมิ ยกเว้นที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 20) นำไปวิเคราะห์ปริมาณของการแสดงออกของยีน ScHSF6 ต่อการแสดงออกของยีน *actin* ที่อุณหภูมิเดียวกัน ได้เป็นค่าการแสดงออกของยีน จากนั้นเปรียบเทียบค่าการแสดงออกที่อุณหภูมินั้นกับค่าการแสดงออกที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ได้เป็นระดับการแสดงออก ซึ่งพบว่ามีค่า 1 ที่อุณหภูมิ 28 และ 37 องศาเซลเซียส ค่า 1.1 ที่อุณหภูมิ 42 และ 45 องศาเซลเซียส และค่า 1.2 ที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 20) แสดงให้เห็นว่ายีน ScHSF6 ของอ้อยพันธุ์สุพรรณบุรี 50 นั้นจะมีการแสดงออกที่ทุกอุณหภูมิ และจะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น