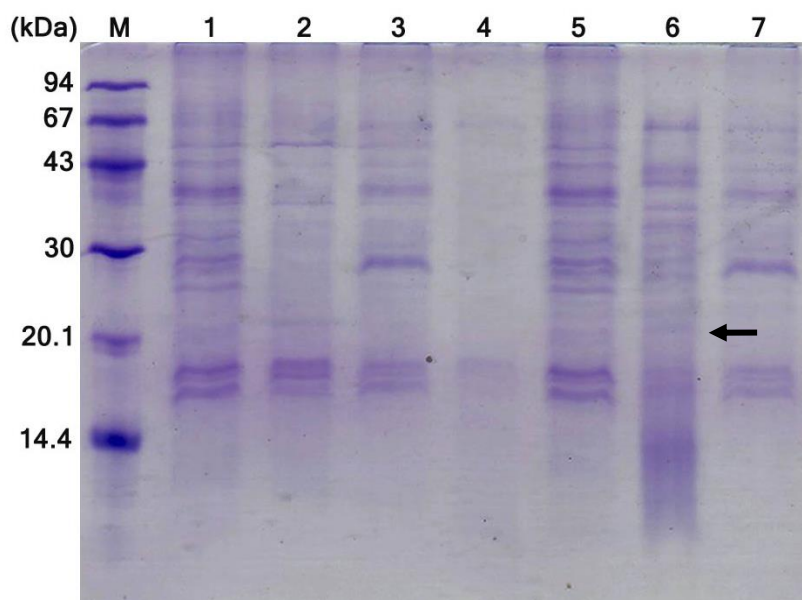


4. ผลการวิจัย

จากการที่ได้รายงานไว้แล้วว่าโปรตีนเลกติน2 (lectin2) ที่ตาข้างของหัวแก่นตะวันลดปริมาณลงเมื่อตาข้างเกิดการกระตุ้นการงอก (พรพิมล เจริญชัยปริเปรม และคณะ 2552) เพื่อให้ได้ข้อมูลเพิ่มเติมเกี่ยวกับเลกติน2 ที่อาจช่วยอธิบายหน้าที่ตามธรรมชาติของเลกติน2 นี้ จึงศึกษาว่าเลกติน2 อยู่ส่วนใดของเซลล์ ใช้ตาข้างระยะที่ 1 เพราะเป็นระยะที่เลกติน2 ยังไม่ลดปริมาณ จากการสกัดโปรตีนแบบแยกส่วนเซลล์ในตาข้างระยะที่ 1 ของหัวแก่นตะวัน พบแถบของโปรตีนตรงบริเวณเดียวกันกับโปรตีนเลกติน2 ที่ตาข้างระยะที่ 1 อยู่ในสารสกัดจากผนังเซลล์ (ภาพที่ 1) แสดงว่าโปรตีนเลกติน2 อยู่ที่ผนังเซลล์ ไม่อยู่ในไซโตพลาสซึมหรือที่เยื่อ ยืนยันแถบของโปรตีนเลกติน2 ด้วยการไม่พบแถบโปรตีนนี้ในสารสกัดโปรตีนรวมจากตาข้างระยะที่ 3 ซึ่งเป็นตาข้างระยะที่ไม่มีโปรตีนเลกติน2



ภาพที่ 1 แบบแผนโปรตีนของสารสกัดโปรตีนแบบแยกส่วนเซลล์จากตาข้างหัวแก่นตะวัน เปรียบเทียบกับสารสกัดโปรตีนรวมจากตาข้างระยะที่ 1

M: low molecular weight marker

1: โปรตีนรวมจากตาข้างระยะที่ 1

2: โปรตีนจากส่วนไซโตพลาสซึม

3: โปรตีนรวมจากตาข้างระยะที่ 3

4: โปรตีนจากส่วนเซลล์เมมเบรน

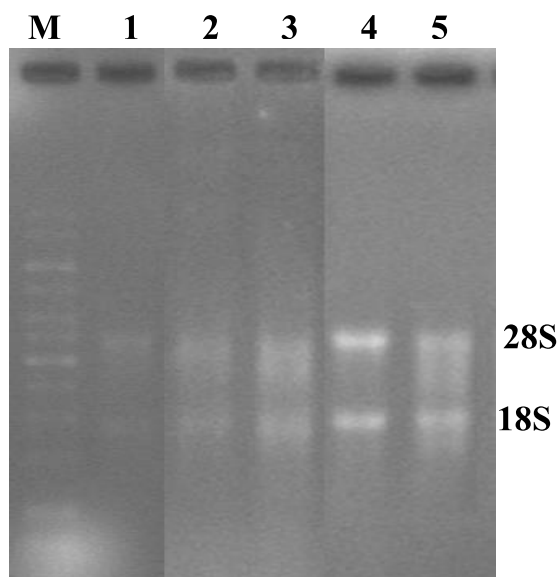
5: โปรตีนรวมจากตาข้างระยะที่ 1

6: โปรตีนจากส่วนผนังเซลล์

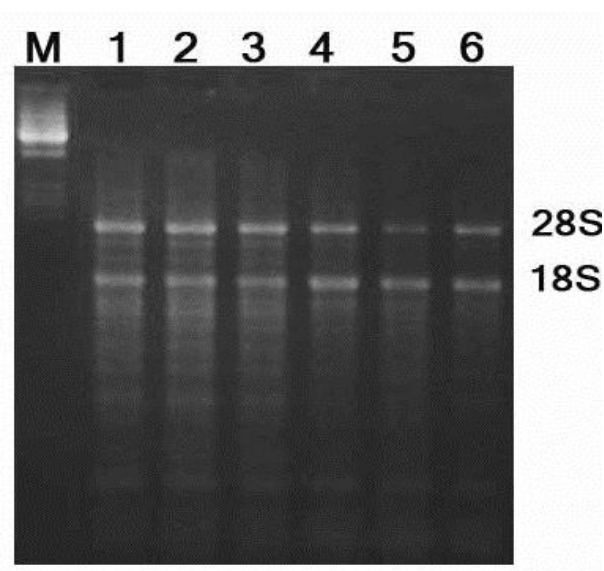
7: โปรตีนรวมจากตาข้างระยะที่ 3

ในการสกัด RNA ใช้ 2 วิธี คือ ใช้ RNeasy Plant mini kit (Qiagen) และใช้ TRIzol kit ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 2 ปรากฏว่า ทั้งสองวิธีสามารถสกัด RNA ได้ แต่ในการวิจัยต่อไปนี้จะใช้วิธีของ TRIzol kit เพราะสามารถสกัด RNA ปริมาณมากได้

ก.



ข.



ภาพที่ 2 ผลการสกัด RNA ด้วย Qiagen kit (ก.) วิเคราะห์ด้วย FA gel และการสกัดด้วย TRIzol kit (ข.)
วิเคราะห์ด้วย TBE gel (ตัวเลขในภาพหมายถึงระยะตาข่ายที่ใช้สกัด RNA)

ในการศึกษาการแสดงออกที่ระดับยีนด้วยเทคนิค RT-PCR จำเป็นจะต้องมีตัวควบคุม เรียกว่าเป็น internal control เพื่อบ่งบอกปริมาณการแสดงออกของยีนที่สนใจจะศึกษา การเลือกยีนเพื่อใช้ mRNA ของยีนนั้นเป็น internal control จะใช้ยีนที่มีการแสดงออกตลอดเวลาภายในเซลล์ (constitutive expression) และมีระดับการแสดงออกคงที่หรือมีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุดในสภาวะที่ต้องการจะศึกษา ในขณะที่ยีนที่สนใจจะศึกษาอาจมีการเปลี่ยนแปลงได้ในภาวะเดียวกันนั้น งานวิจัยต่างๆมีการเลือกใช้ internal control แตกต่างกันไปหลายชนิดขึ้นกับวัตถุประสงค์ของงานวิจัย เช่น β -tubulin actin 18S rRNA เป็นต้น

ในการวิจัยนี้ทดลองทำ RT-PCR ของ 18S rRNA ออกแบบไพรเมอร์โดยใช้ลำดับเบส consensus sequence เป็นหลัก โดยเริ่มจากการหาลำดับของ 18S rRNA ในฐานข้อมูลของ NCBI พบลำดับของ *Arabidopsis thaliana* 18S rRNA (accession No. X16077.1) เมื่อเปรียบเทียบกับ 18S rRNA ของพืชหลายชนิดตามการรายงานของ Nolan et al. (2002) พบช่วงลำดับที่เป็น high homology แก่ลำดับเบสของ *A. thaliana* 18S rRNA (No. X16077.1) ตรงบริเวณที่ไม่อนุรักษ์ให้สอดคล้องกับ consensus sequence ได้ช่วงลำดับเบสตามภาพที่ 3 นำลำดับเบสไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Nucleotide blast และโปรแกรม primer blast เพื่อหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมต่อไป

GAGCAGGCGCGCAAATTACCCATCCTGACACGGGGAGGAGTGACAATAAATAACAATACCGGGCTCAAAC
GAGTCTGGTAATTGGAATGAGTACAATCTAAATCCCTTAACGAGGATCCATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC
AGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAACC
TTGGGATGGGTGCGGGCCGGTCCGCCCTTGGTGTGCACCGGTGCGACTCGTCCCTTCGGTCGGCGATACGCTCC
TGGTCTTAATTGGCCGGGTCGTGCCTCCGGCGCTGTTACTTTGAAGAAATTAGAGTGCTCAAAGCAAGCCTA
CGCTCTGGATACATTAGCATGGGATAACATCATAGGATTTGATCCTATTGTGTGCCCC

ภาพที่ 3 ช่วงลำดับเบสของ 18S rRNA ที่แก้ไขเปลี่ยนแปลงเพื่อออกแบบไพรเมอร์ ลำดับขีดเส้นใต้เป็นลำดับที่เปลี่ยนแปลง

หลังจากการใช้โปรแกรม Primer blast ได้ไพรเมอร์ออกมาหลายคู่ จากนั้นก็นำลำดับของไพรเมอร์มาเปรียบเทียบกับผลการ alignment จาก Nucleotide Blast เมื่อตรวจดูความเหมาะสมจากเกณฑ์ 4 ข้อ

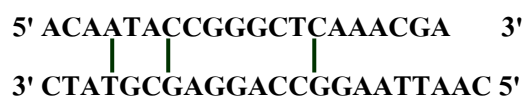
คือ (1) ไม่สั้นกว่า 20 bp (2) %GC ไม่น้อยกว่า 50% (3) มีโอกาสต่ำในการเกิดการจับคู่ระหว่างเส้นไพรเมอร์ เพื่อลดการเกิด primer dimmer และ (5) ไม่เกิดพันธะไฮโดรเจนจับกันเองระหว่างคู่เบสภายในเส้นเลือกคู่ไพรเมอร์ได้ 1 คู่ ดังแสดงในตารางด้านล่างนี้

Sequence (5'-> 3')	Length (bp)	Starting sequence	Ending sequence	%GC	Product Length (bp)
F: ACAATACCGGGCTCAAACGA	20	53	72	50	244
R: CAATTAAGGCCAGGAGCGTA	22	296	277	50	

ในการทดลองนี้ได้ทำการดัดแปลงลำดับของไพรเมอร์เพิ่มเติม เพื่อให้ไพรเมอร์จับลำดับเป้าหมายได้ดีขึ้น โดยเพิ่มเบสอีก 2 ตัว (*TC*) ที่ปลาย 3' ของ reverse primer (R) ผลออกมาดังตาราง ขนาดของ RT-PCR product ที่คาดว่าจะได้ คือ 244 bp

Sequence (5'-> 3')	Length (bp)	Starting sequence	Ending sequence	%GC	Product Length (bp)
F: ACAATACCGGGCTCAAACGA	20	53	72	50	244
R: CAATTAAGGCCAGGAGCGTA <u>TC</u>	22	296	277	50	

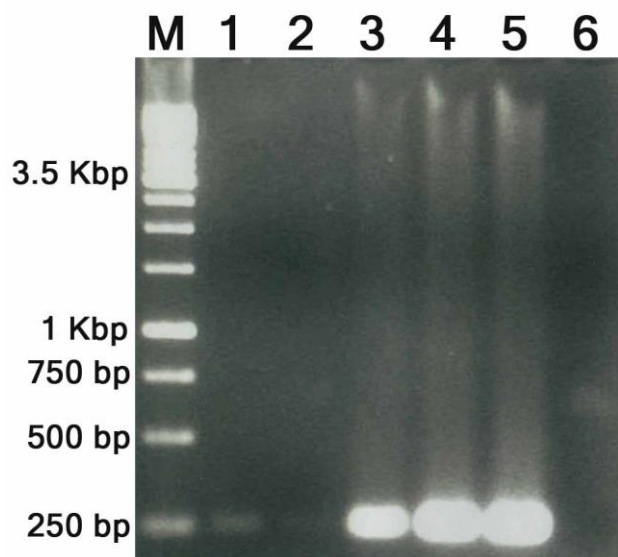
หลังจากการดัดแปลงลำดับเบสแล้ว นำไปตรวจสอบด้วยโปรแกรม Primer Blast ในขั้นสุดท้ายพบว่าคู่ primer มีความจำเพาะต่อเป้าหมายและจะไม่จับกับบริเวณอื่นที่อยู่ภายในลำดับของเป้าหมาย เมื่อตรวจสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบมาพบว่า ไม่มีโอกาสเกิดการจับคู่เบสภายในเส้นไพรเมอร์แต่มีโอกาสเกิด primer dimer จากคู่ไพรเมอร์ที่เลือกใช้ในการทดลอง แสดงให้เห็นดังนี้



จากลำดับของคู่ไพรเมอร์ที่เลือกใช้นี้หากเกิด primer dimer ขึ้นจะมีขนาดประมาณ 24 bp อย่างไรก็ตามโอกาสเกิด primer dimer ไม่สูงนัก และอาจมี mismatch ของคู่เบสที่ปลายด้านหนึ่งที่เป็นการจับคู่ A-C

ซึ่งแม้ว่าจะเกิดพันธะจับกันได้ แต่ไม่คงตัวเนื่องจากเกิดขึ้นได้เฉพาะเมื่อ A และ C อยู่ในสภาพ tautomeric structure

ผลการทำ RT-PCR ของ 18S rRNA จากตาข้างที่หิวแก่นตะวันทั้ง 6 ระยะ ด้วยคู่ไพรเมอร์ PCR ดังกล่าว คือ forward primer (ACAATACCGGGCTCAAACGA) และ reverse primer (CAATTAAGGCCA GGAGCGTATC) ที่ annealing temperature 58 องศาเซลเซียส เมื่อตรวจสอบด้วยผลิตภัณฑ์ PCR พบแถบเดี่ยวที่ขนาดประมาณ 244 bp ของ 18S rRNA ตามที่คาดคะเนไว้ (ภาพที่ 4) เมื่อนำไปยืนยันด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบส และทำ Nucleotide blast พบว่าเป็นลำดับของ 18S rRNA (ภาพที่ 5) อย่างไรก็ตามผลการทดลองภาพที่ 4 แสดงว่า ขณะที่ตาข้างเกิดการงอก ระดับ 18S rRNA เพิ่มขึ้น



รูปที่ 4 ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของ 18S rRNA (cDNA 200 นาโนกรัม , PCR 25 รอบ)

M: 100 bp DNA ladder marker

1: ตาข้างระยะที่ 1

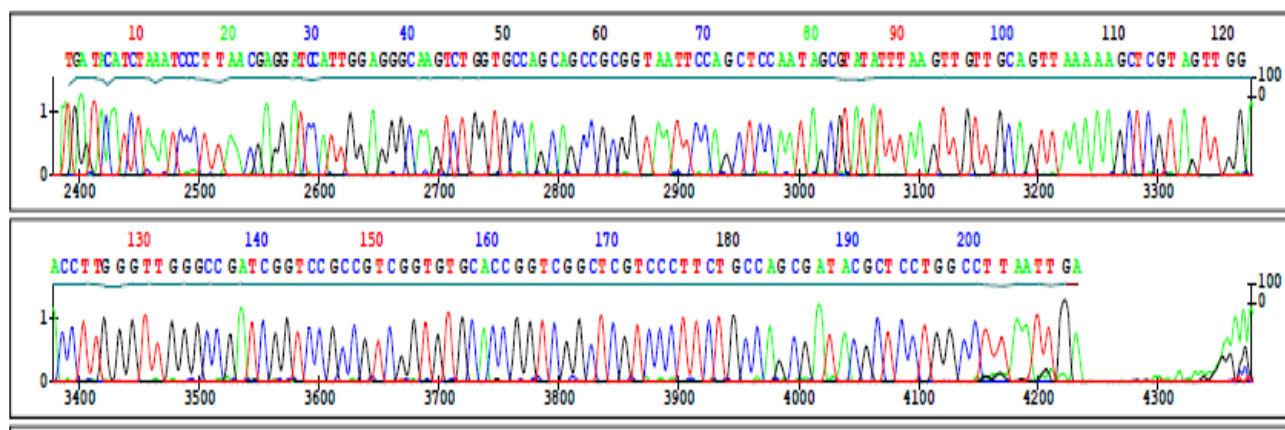
2: ตาข้างระยะที่ 2

3: ตาข้างระยะที่ 3

4: ตาข้างระยะที่ 4

5: ตาข้างระยะที่ 5

6: negative control



>lcl|29145 Arabidopsis thaliana
Length=1902

Score = 302 bits (334), Expect = 3e-86
Identities = 194/209 (93%), Gaps = 2/209 (1%)
Strand=Plus/Plus

```

Query_6      GAGTACA-TC TAAATCCCTTAAAGGATCCATTGGAGGGCAAGTC TGGTGCAGCAGCC 64
          |||||
Sbjct_603    GAGTACAATC TAAATCCCTTAAAGGATCCATTGGAGGGCAAGTC TGGTGCAGCAGCC 662

Query_65     GCGGTAAATTC CAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTT 124
          |||||
Sbjct_663    GCGGTAAATTC CAGCTCCAATAGCGTATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTT 722

Query_125    GGACTTTGGGTTGGGTGCGCCGGTCCGCCCATCAGGTGTGCACCGGTTTACTCGTCCCTTC 184
          |||||
Sbjct_723    GAACCTTGGGATGGGTGCGCCGGTCCGCC-TTTGGTGTGCATTGGTTCGGCTTGTCCTTC 781

Query_185    TGTGCGCGATACGCTCCTGGCCTTAATTG 213
          |||||
Sbjct_782    GGTGCGCGATACGCTCCTGGTCTTAATTG 810

```

Query หมายถึง ลำดับที่ต้องการวิเคราะห์ ในที่นี้หมายถึงลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของ 18S rRNA ที่ได้จากการทดลอง

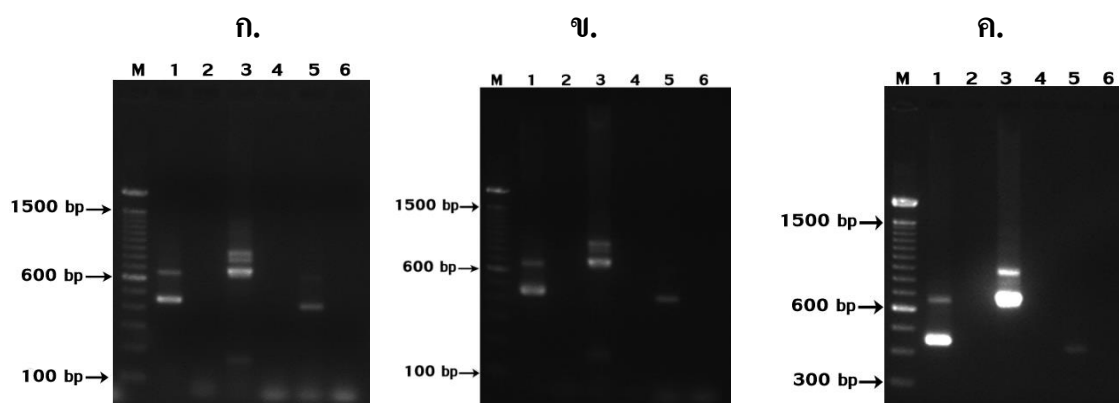
Sbjct หมายถึง ลำดับอ้างอิง ในที่นี้คือ ลำดับเบสของ 18S rRNA ของ *Arabidopsis thaliana*

รูปที่ 5 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของ 18S rRNA และการวิเคราะห์ด้วย
และการวิเคราะห์ด้วย Nucleotide Blast

ในการศึกษาการแสดงออกด้วยวิธี RT-PCR ของยีน *lectin2* คู่ไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษามี 3 คู่ ดังที่รายงานไว้แล้ว (สุพร นุชดำรงค์และคณะ 2553) ได้แก่ คู่ของ Nakagawa et al. (2000) ซึ่งกำหนดเป็น F-R1 และคู่ที่ได้จากการออกแบบ reverse primer ใหม่เพื่อใช้กับ forward primer (F) ของ Nakagawa et al. (2000) ซึ่งกำหนดเป็น F-R2 และ F-R3 ตามลำดับ คู่ F-R1 มีเป้าหมายที่ช่วงลำดับที่ 82-525 bp ของ *lectin2* cDNA (ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ขนาด 444 bp) คู่ F-R3 มีเป้าหมายที่ช่วงลำดับที่ 82-493 bp ของ *lectin2* cDNA (ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ขนาด 412 bp) คู่ F-R2 มีเป้าหมายที่ช่วงลำดับที่ 82-758 bp ของ *lectin2* cDNA (ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ขนาด 677 bp) ลำดับ R2 (CCTTTTGC GGAGAACAG) อยู่บริเวณทางด้านปลาย 3' ใกล้กับบริเวณของ poly A tail ของ *lectin2* cDNA แต่ที่รายงานไว้คู่ไพรเมอร์ทุกคู่ยังไม่ให้ผลการทดลองที่เกิดแถบจำเพาะของเป้าหมายเมื่อทดสอบโดยแปรความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ในปฏิกิริยา PCR ในรายงานนี้จะได้ทดลองเพิ่มความจำเพาะด้วยวิธีการต่างๆ ได้แก่ เพิ่มอุณหภูมิใน annealing step ทำ Hotstart PCR ทำ Touchdown PCR ให้สาร formamide ตามความเหมาะสม โดยทดสอบกับ RNA สกัดจากตาข้าง ระยะที่ 1

ผลจากการตรวจสอบการใช้งานของคู่ไพรเมอร์ F-R1 อุณหภูมิ annealing ตามปกติ คือ 48 องศาเซลเซียส เพื่อลดแถบผลิตภัณฑ์ PCR ไม่จำเพาะขนาด 670 bp ที่เกิดขึ้นคู่กับแถบขนาดจำเพาะ 444 bp จึงเพิ่มอุณหภูมิ annealing เป็น 50, 52 และ 54 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (ภาพที่ 6 ก., ข. และ ค., ภาพที่ 7 ก.) การใช้อุณหภูมิ annealing 54 องศาเซลเซียสร่วมกับปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ (1, 1.5, 2, 2.5 มิลลิโมลาร์) (ภาพที่ 7 ข.) ยังไม่สามารถกำจัดแถบขนาด 670 bp ได้ ในขณะที่การทำ Hotstart PCR และ Touchdown PCR (อุณหภูมิ annealing 58 องศาเซลเซียส ทำ 8 รอบ และอุณหภูมิ annealing 50 องศาเซลเซียส ทำ 25 รอบ) ก็ยังคงไม่มีการเปลี่ยนแปลงและยังไปเพิ่มผลิตภัณฑ์นอกเป้าหมาย (non-specific PCR) ขนาดใหญ่อีกด้วย (ภาพที่ 7 ค.)

เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ขนาดที่คาดว่าเป็นเป้าหมายจำเพาะ คือ จีน DNA ขนาดประมาณ 444 bp พบว่ามีความเหมือน (identity) ถึง 99% (ภาพที่ 8) กับ cDNA ของ *lectin2* แต่เนื่องจากบริเวณดังกล่าวเป็นช่วงลำดับรหัส (coding sequences) ซ้ำซ้อนกับเลกตินชนิดอื่นๆด้วย จึงเหมาะกับการศึกษาการแสดงออกโดยรวมของยีนเลกตินทุกชนิดในตาข้างหัวแก่่นตะวัน แต่ไม่เหมาะสำหรับการอธิบายการออกของ *lectin2*



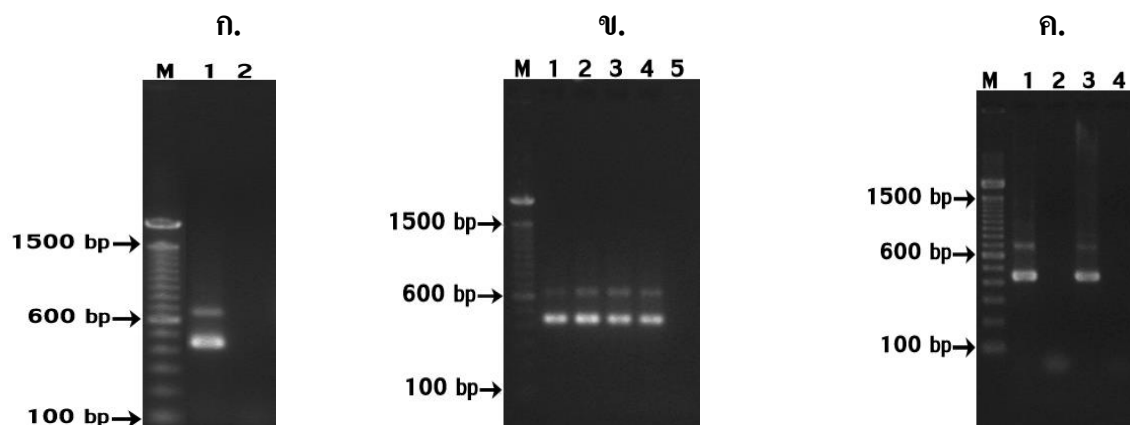
รูปที่ 6 ผลการเพิ่มอุณหภูมิ annealing ที่ 48°C (ก.), 50°C (ข.), 52°C (ค.) ด้วยคู่ไพรเมอร์ F-R1, F-R2 และ F-R3 ในตาข่ายระยะที่ 1 (cDNA 100 นาโนกรัม, PCR 30 cycles)

M: 100 bp DNA ladder marker

1: F-R1 2: negative F-R1

3: F-R2 4: negative F-R2

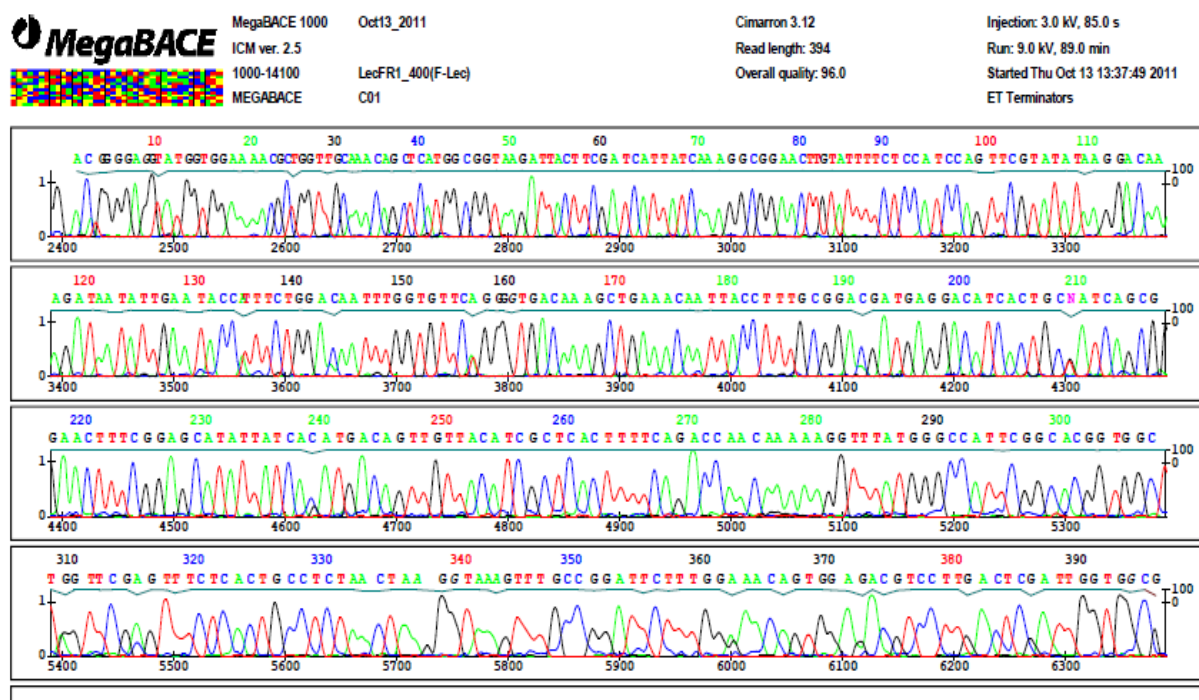
5: F-R3 6: negative F-R3



รูปที่ 7 ผลการเพิ่มอุณหภูมิ annealing ที่ 54 องศาเซลเซียส (ก.) , ผลของความเข้มข้นแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ที่ annealing ที่ 54 องศาเซลเซียส (ข.) และการทำ Hotstart PCR กับ Touchdown PCR (ค.) ด้วยคู่ไพรเมอร์ F-R1 ในตาข่ายระยะที่ 1 (cDNA 100 นาโนกรัม, PCR 30 cycles)

M: 100 bp DNA ladder marker

ก.	ข.	ค.
1: 54 องศาเซลเซียส	1: 1 mM $MgCl_2$	1: Hotstart PCR
2: negative control	2: 1.5 mM $MgCl_2$	2: negative Hotstart PCR
ของ 1.	3: 2 mM $MgCl_2$	3: Touchdown PCR
	4: 2.5 mM $MgCl_2$	4: Touchdown PCR
	5: negative control	
	ของ 1-4	



Query หมายถึง ลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ RT-PCR (670 bp) โดยคู่ไพรเมอร์ F-R2ที่ได้จากการทดลอง

Sbjct หมายถึง ลำดับอ้างอิง ในที่นี้คือ ลำดับเบสของ lectin2 cDNA ของ *Helianthus tuberosus* (แก่ต้น)

➤ AF064030.1 *Helianthus tuberosus* lectin2 mRNA

Score = 702 bits (380), Expect = 0.0

Identities = 389/393 (99%), Gaps = 1/393 (0%)

Strand=Plus/Plus

```

Query 3      GGGGAGGT-ATGGTGGAAAACGCTGGTTGCAACAGCTCATGGCGGTAAGATTACTTCGA 61
            |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 119     GGGGAGGTAATGGTGGAAAACGCTGGTTGCAACAGCTCATGGCGGTAAGATTACTTCGA 178

Query 62     TCATTATCAAAGGCGGAACCTTGATTTTCTCCATCCAGTTCGTATATAAAGACAAAGATA 121
            |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 179     TCATTATCAAAGGCGGAACCTTGATTTTCTCCATCCAGTTCGTATATAAAGACAAAGATA 238

Query 122    ATATTGAATACCTTTCTGGACAATTTGGTGTTCAGGGTGACAAAGCTGAAACAATTACCT 181
            |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 239     ATATTGAATACCTTTCTGGACAATTTGGTGTTCAGGGTGACAAAGCTGAAACAATTACCT 298

Query 182    TTGCGGACGATGAGGACATCACTGCGATCAGCGGAACCTTCGGAGCATATTATCACATGA 241
            |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 299     TTGCGGACGATGAGGACATCACTGCGATCAGCGGAACCTTCGGAGCATATTATCAGATGA 358

Query 242    CAGTTGTTACATCGCTCACTTTTCAGACCAACAAAAAGGTTTATGGGCCATTTCGGCACGG 301
            |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 359     CAGTTGTTACATCGCTCACTTTTCAGACCAACAAAAAGGTTTATGGGCCATTTCGGCACGG 418

Query 302    TGGCTGGTTTCGAGTTTCTCACTGCCTCTAACTAAGGGTAAGTTTGCCGGATTCTTTGGAA 361
            |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 419     TGGCTGGTTTCGCGTTTCTCACTGCCTCTAACTAAGGGTAAGTTTGCCGGATTCTTTGGGA 478

Query 362    ACAGTGGAGACGTCCTTGACTCGATTGGTGGCG 394
            |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||  |||||
Sbjct 479     ACAGTGGAGACGTCCTTGACTCGATTGGTGGCG 511

```

ภาพที่ 8 ผลการหาลำดับเบสและการวิเคราะห์ด้วย Nucleotide Blast ของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ขนาด 440 bp ของคู่ไพรเมอร์ F-R1

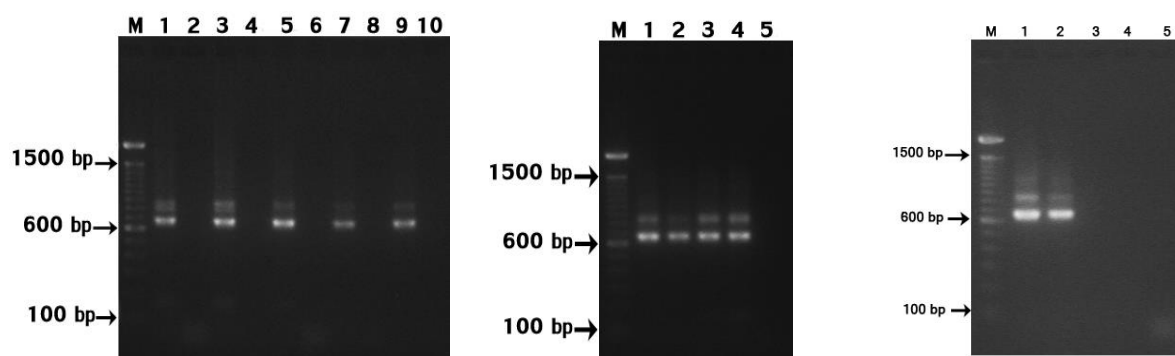
คู่ไพรเมอร์ของ F-R2 ปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR หลักที่ขนาดประมาณ 670 bp (ใกล้เคียงกับขนาดที่คาดคะเนได้ทางทฤษฎีที่ 677 bp) และแถบผลิตภัณฑ์นอกเป้าหมาย (non-specific band) ขนาดใหญ่กว่า 800 bp ซึ่งเป็นขนาดที่ใหญ่กว่า cDNA ของ *lectin2* จึงเป็นผลิตภัณฑ์ของยีนอื่น การทำ PCR ที่อุณหภูมิ annealing 48 องศาเซลเซียสจนถึง 58 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 6 และ 9 ก.) ไม่สามารถกำจัด non-specific band ดังกล่าวได้ เมื่อปรับเปลี่ยนความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ (ภาพที่ 9 ข.) และการเพิ่มผลของการมีฟอร์มามิด (formamide) ในปฏิกิริยา PCR เพื่อรบกวนการจับของไพรเมอร์ (ภาพที่ 9 ค.) พบว่ายังไม่สามารถยับยั้งการเกิดแถบที่ไม่ต้องการดังกล่าวได้ เมื่อนำแถบ PCR ที่ขนาด 670 bp ไปวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่ามีความเหมือน (identity) เป็น 99% กับ cDNA ของ *lectin2* (ภาพที่ 10) ตามที่คาดไว้ อย่างไรก็ตามการที่คู่ไพรเมอร์ดังกล่าวไม่มีความเหมาะสมในการศึกษาการแสดงออกระดับยีนของเลกติน 2

ผลของการใช้คู่ไพรเมอร์ F-R3 ปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR หลัก (major band) ที่ขนาดประมาณ 410 bp ใกล้เคียงกับขนาดที่คาดคะเนไว้ในทางทฤษฎีของเลกติน 2 คือ 412 bp และผลิตภัณฑ์นอกเป้าหมาย (non-specific band) จำนวนหนึ่ง เมื่อเพิ่ม อุณหภูมิ annealing สูงถึง 52 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 6 ค.) สามารถยับยั้งไม่ให้เกิดผลิตภัณฑ์นอกเป้าหมายนั้นได้อย่างสมบูรณ์ เหลือเพียงผลิตภัณฑ์หลักที่ 410 bp ดังกล่าว นำไปยืนยันด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสพบว่า เป็น เลกติน 2 ด้วยความเหมือน (identity) 99% และบริเวณลำดับเบสที่มีความแตกต่างกับเลกตินอีก 3 ชนิด ยังมีลำดับเบสตรงกับเลกติน 2 อีกด้วย (บริเวณที่แสดงสัญลักษณ์ *) แสดงดังภาพที่ 11 ซึ่งไพรเมอร์คู่นี้จะถูกนำไปใช้ในการศึกษาการแสดงออกระดับยีนของเลกติน 2 ที่ตาข้างหัวแก่่นะวัน ทั้ง 6 ระยะ

ก.

ข.

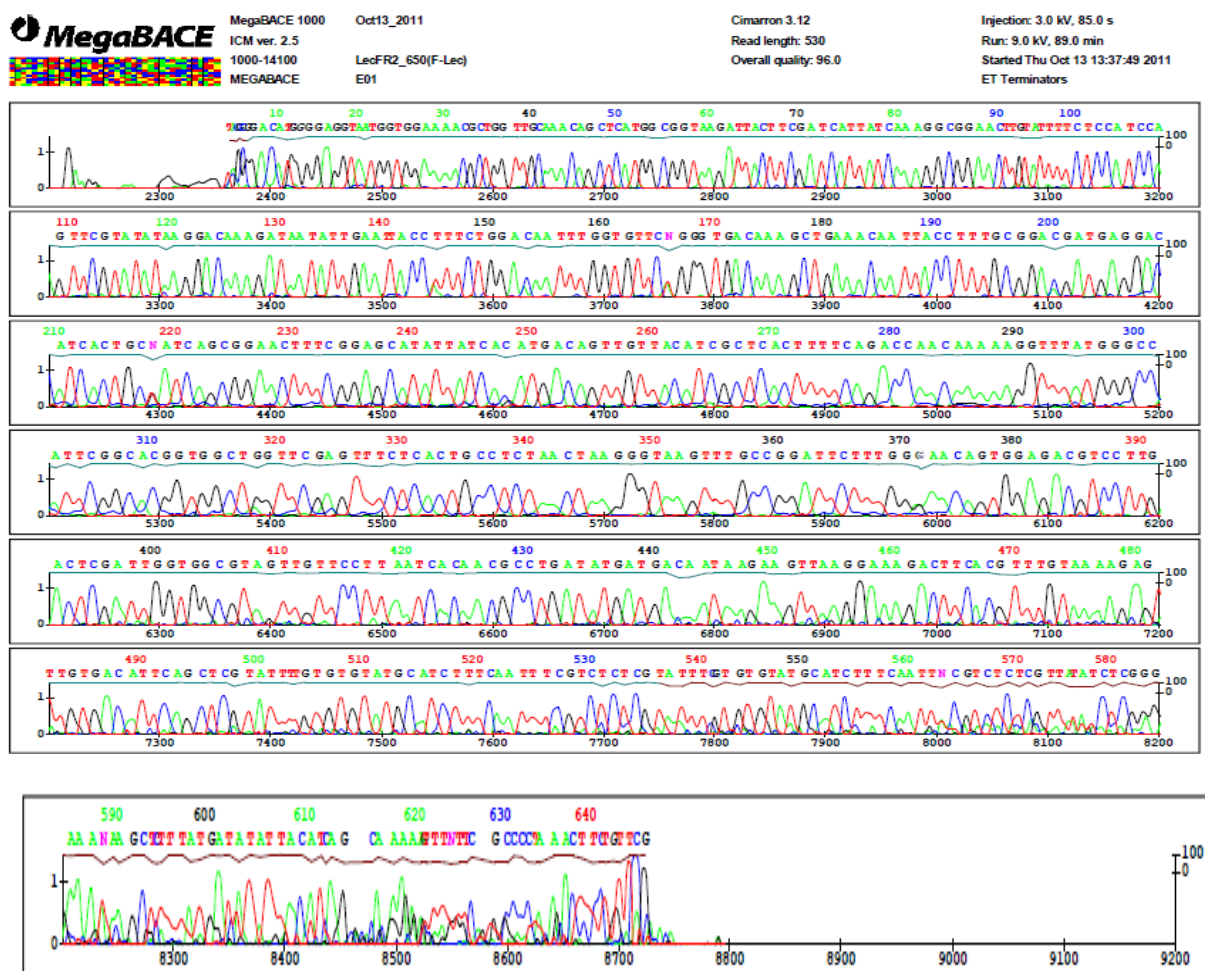
ค.



ภาพที่ 9 ผลการเพิ่มอุณหภูมิ annealing จาก 48-58 องศาเซลเซียส (ก.) , ผลของความเข้มข้นของ แมกนีเซียมคลอไรด์ (ข.) และผลของฟอร์มาไมด์ (ค.) ในปฏิกิริยา PCR ของคู่ไพรเมอร์ F-R2 ในตา ข้างระยะที่ 1 (cDNA 100 นาโนกรัม PCR 30 cycles)

M: 100 bp DNA ladder marker

- ก. 1, 2 (negative control): 48 องศาเซลเซียส 3, 4 (negative control): 50 องศาเซลเซียส
 5, 6 (negative control): 52 องศาเซลเซียส 7, 8 (negative control): 56 องศาเซลเซียส
 9, 10 (negative control): 58 องศาเซลเซียส
- ข. 1-4: แมกนีเซียมคลอไรด์ 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 มิลลิโมลาร์ตามลำดับ
 5: negative control
- ค. 1-4: ฟอร์มาไมด์ 1.0, 1.25, 2.5, 5.0% ตามลำดับ
 5: negative control



ภาพที่ 10 ผลการหาลำดับเบสและการวิเคราะห์ด้วย Nucleotide Blast ของผลิตภัณฑ์ RT-PCR

ขนาด

670 bp ของคู่ไพรเมอร์ F-R2

ภาพที่ 10 (ต่อ)

Query หมายถึง ลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ RT-PCR (670 bp) โดยคู่ไพรเมอร์ F-R2ที่ได้จากการทดลอง

Sbjct หมายถึง ลำดับอ้างอิง ในที่นี้คือ ลำดับเบสของ lectin2 cDNA ของ *Helianthus tuberosus* (แก่นตะวัน)

Score = 1075 bits (582), Expect = 0.0
Identities = 596/602 (99%), Gaps = 3/602 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query   5      CGGA-CATGGGGAGGT-ATGGTGAAAAACGCTGGTTGCAAACAGCTCATGGCGGTAAGAT   62
      |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct  111    CGGACCATGGGGAGGTAATGGTGAAAAACGCTGGTTGCAAACAGCTCATGGCGGTAAGAT   170

Query   63      TACTTCGATCATTATCAAAGGCGGAACTTGTATTTTCTCCATCCAGTTCGTATATAAGGA   122
      |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct  171    TACTTCGATCATTATCAAAGGCGGAACTTGTATTTTCTCCATCCAGTTCGTATATAAGGA   230

Query   123     CAAAGATAATATTGAATACCTTTCTGGACAATTTGGTGTTTCAGGGTGACAAAGCTGAAAC   182
      |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct  231    CAAAGATAATATTGAATACCTTTCTGGACAATTTGGTGTTTCAGGGTGACAAAGCTGAAAC   290

Query   183     AATTACCTTTGCGGACGATGAGGACATCACTGCGATCAGCGGAACCTTCGGAGCATATTA   242
      |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct  291    AATTACCTTTGCGGACGATGAGGACATCACTGCGATCAGCGGAACCTTCGGAGCATATTA   350

Query   243     TCACATGACAGTTGTTACATCGCTCACTTTTCAGACCAACAAAAAGGTTTATGGGCCATT   302
      |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct  351    TCAGATGACAGTTGTTACATCGCTCACTTTTCAGACCAACAAAAAGGTTTATGGGCCATT   410

Query   303     CGGCACGGTGGCTGGTTCGAGTTTCTCACTGCCTCTAACTAAGGGTAAGTTTGCCGGATT   362
      |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct  411    CGGCACGGTGGCTGGTTCGCGTTTCTCACTGCCTCTAACTAAGGGTAAGTTTGCCGGATT   470

Query   363     CTTTGGGAACAGTGGAGACGTCCTTGACTCGATTGGTGGCGTAGTTGTTTCCTTAATCACA   422
      |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct  471    CTTTGGGAACAGTGGAGACGTCCTTGACTCGATTGGTGGCGTAGTTGTTTCCTTAATCACA   530

Query   423     ACGCCTGATATGATGAAAATAAGAAGTTAAGGAAAGACTTCACGTTTGTAAAAGAGTTGT   482
      |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct  531    ACGCCTGATATGATGAAAATAAGAAGTTAAGGAAAGACTTCACGTTTGTAAAAGAGTTGT   590

Query   483     GACATTCAGCTCGTATTTGTGTGTATGCATCTTTCAATTTTCGTCTCTCGTATTTGTGTGT   542
      |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct  591    GACATTCAGCTCGTATTTGTGTGTATGCATCTTTCAATTTTCGTCTCTCGTATTTGTGTGT   650

Query   543     ATGCATCTTTCAATTTTCGTCTCTCGTTTATCTCGGAAATAAGCTTTTATGATATATTA   602
      |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct  651    ATGCCTCTTTCAATTTTCGTCTCTCGTTT-TCTCGGAAATAAGCTTTTATGATATATTA   709

Query   603     CA      604
      ||
Sbjct  710     CA      711

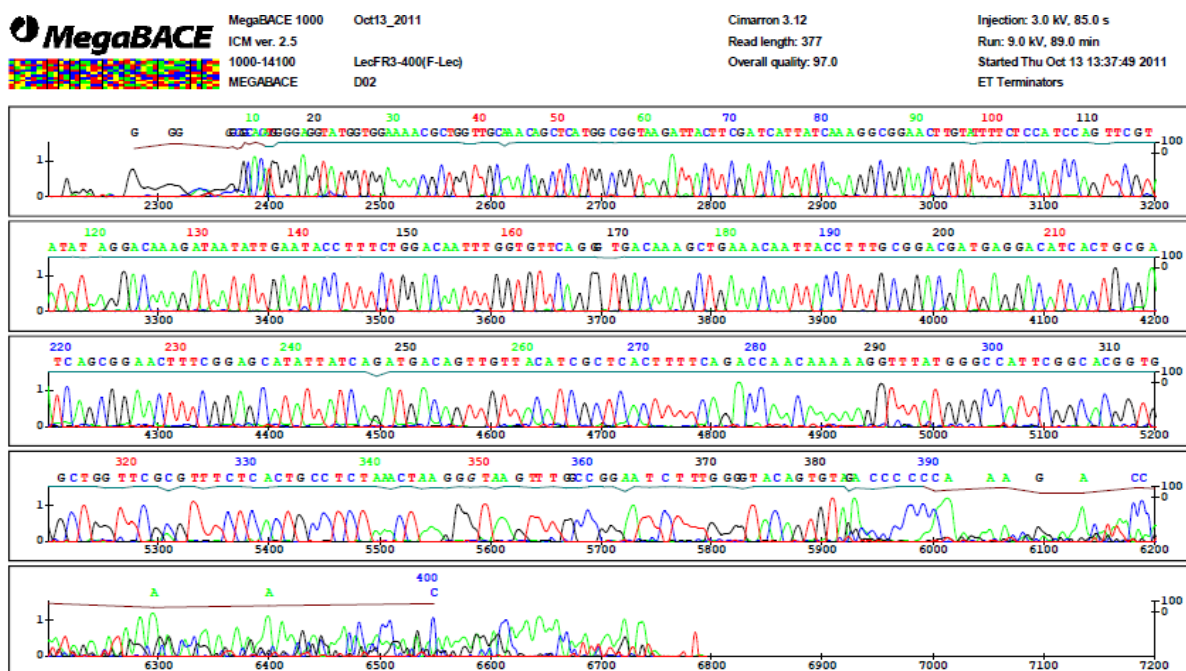
```

Score = 76.8 bits (41), Expect = 2e-10
Identities = 44/45 (98%), Gaps = 1/45 (2%)
Strand=Plus/Plus

```

Query   528     CTCGTATTTGTGTGTATGCATCTTTCAATTTTCGTCTCTCGT-TTT   571
      |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct  600     CTCGTATTTGTGTGTATGCATCTTTCAATTTTCGTCTCTCGTATTT   644

```



Query หมายถึง ลำดับเบสของผลิตภัณฑ์ RT-PCR (410 bp) โดยคู่ไพรเมอร์ F-R3 ที่ได้จากการทดลอง

Sbjct หมายถึง ลำดับอ้างอิง ในที่นี้คือ ลำดับเบสของ lectin2 cDNA ของ *Helianthus tuberosus* (แก่ต้นตะวัน)

Score = 673 bits (364), Expect = 0.0

Identities = 371/374 (99%), Gaps = 1/374 (0%)

Strand=Plus/Plus

```

Query 11 CATGGGGAGGT-ATGGTGGAAAACGCTGGTTCGAAACAGCTCATGGCGGTAAGATTACTT 69
      |||
Sbjct 116 CATGGGGAGGTAATGGTGGAAAACGCTGGTTCGAAACAGCTCATGGCGGTAAGATTACTT 175

Query 70 CGATCATTATCAAAGCGGAACTTGTATTTTCTCCATCCAGTTCGTATATAAGGACAAAG 129
      |||
Sbjct 176 CGATCATTATCAAAGCGGAACTTGTATTTTCTCCATCCAGTTCGTATATAAGGACAAAG 235

Query 130 ATAATATTGAATACCTTTCTGGACAATTTGGTGTTTCAGGGTGACAAAGCTGAAACAATTA 189
      |||
Sbjct 236 ATAATATTGAATACCTTTCTGGACAATTTGGTGTTTCAGGGTGACAAAGCTGAAACAATTA 295

Query 190 CTTTTCGCGACGATGAGGACATCACTGCGATCAGCGGAACTTTCGGAGCATATTATCAGA 249
      |||
Sbjct 296 CTTTTCGCGACGATGAGGACATCACTGCGATCAGCGGAACTTTCGGAGCATATTATCAGA 355

Query 250 TGACAGTTGTTACATCGCTCACTTTTCAGACCAACAAAAGGTTTATGGGCCATTTCGGCA 309
      |||
Sbjct 356 TGACAGTTGTTACATCGCTCACTTTTCAGACCAACAAAAGGTTTATGGGCCATTTCGGCA 415

Query 310 CGGTGGCTGGTTCGCGTTTCTCACTGCCTCTAACTAAGGGTAAGTTTGCCGGATTCTTTG 369
      |||
Sbjct 416 CGGTGGCTGGTTCGCGTTTCTCACTGCCTCTAACTAAGGGTAAGTTTGCCGGATTCTTTG 475

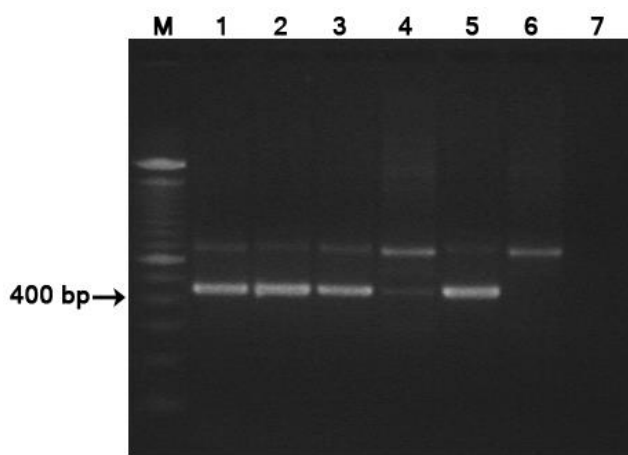
Query 370 GGTACAGTGTAGAC 383
      |||
Sbjct 476 GGAACAGTGGAGAC 489

```

* ตำแหน่งเบสที่มีความจำเพาะต่อ lectin2 sequence (อยู่ในลำดับไพรเมอร์ R3)

ภาพที่ 11 ผลการหาลำดับเบสและการวิเคราะห์ด้วย Nucleotide Blast ของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ขนาด 410 bp ของคู่ไพรเมอร์ F-R3

ผลจากการทำ RT-PCR เพื่อการแสดงผลของเลกตินรวมที่ตาข้างหัวแก่้นตะวันทั้ง 6 ระยะปรากฏแถบผลิตภัณฑ์ที่ขนาด 440 bp และ 700 bp (ภาพที่ 12) โดยยีนเลกตินจะมีการแสดงออกในทุกช่วงระยะของการเจริญสังเกตจากการปรากฏของแถบขนาด 440 bp ปริมาณของแถบขนาด 440 bp ลดลงที่ระยะที่ 4 ยังไม่ทราบว่าที่ขนาด 700 bp เป็นของยีนใด เพราะมีการเปลี่ยนแปลงแบบไม่คงที่ นอกจากนี้ยังปรากฏแถบบางที่ขนาด 500 bp เพิ่มขึ้น เห็นได้ชัดในระยะที่ 4



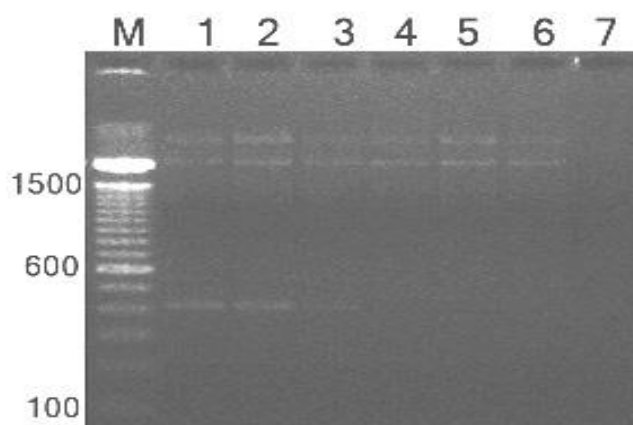
ภาพที่ 12 ผลการทำ RT-PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ F-R1 กับ RNA สกัดจากตาข้างที่หัวแก่้นตะวัน 6 ระยะ

(cDNA 200 นาโนกรัม PCR 25 cycles)

1-6 แทนระยะการเจริญของตาข้าง 6 ระยะตามลำดับ

7 เป็น negative control

ผลจากการทำ RT-PCR เพื่อการแสดงผลของ *lectin2* ที่ตาข้างหัวแก่้นตะวัน ด้วย F-R3 (ภาพที่ 13) ปรากฏว่าผลิตภัณฑ์เป้าหมาย (410 bp) มีปริมาณสูงในตาข้างที่ยังไม่ถูกกระตุ้นการเจริญในระยะที่ 1 ปริมาณผลิตภัณฑ์ลดลงตามลำดับเมื่อตาข้างเริ่มเกิดการเจริญในระยะที่ 2 และ 3 จนกระทั่งตรวจหาไม่ได้ในตา ระยะที่ 4-6 ผลการทดลองดังกล่าวนี้ ตรงข้ามกับผลการทำ RT-PCR ของ 18S rRNA (ภาพที่ 4) ในการทำ RT-PCR ด้วย F-R3 เกิดผลที่คลาดเคลื่อนไปจากดังที่แดงไว้ในภาพที่ 6 กล่าวคือเกิดผลิตภัณฑ์นอกเป้าหมายที่ขนาดใหญ่มากกว่า 1500 bp โดยที่มีปริมาณค่อนข้างคงที่ตลอดทุกระยะของตา จึงไม่น่าจะมีผลรบกวนการเกิดปฏิกิริยา PCR ของคู่ไพรเมอร์กับบริเวณเป้าหมาย ผลิตภัณฑ์นี้ไม่ใช่เป็นผลจากการมี DNA ปนเปื้อน เนื่องจากไพรเมอร์ทุกคู่ถูกทดสอบแล้วว่าไม่เกิดปฏิกิริยา PCR กับ DNA



ภาพที่ 13 ผลการทำ RT-PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ F-R3 กับ RNA สกัดจากตาข้างที่หัวแก่จนวัน 6 ระยะ (cDNA 200 นาโนกรัม PCR 25 cycles)

M: 100 bp DNA ladder marker

1-6 แทนระยะการเจริญของตาข้างทั้ง 6 ระยะตามลำดับ

7 เป็น negative control

ในการวิเคราะห์การแสดงออกของ Cu,Zn-SOD ในตาข้างที่หัวเหวCHAเล็มอาร์ดิโซกทั้ง 6 ระยะ ด้วยวิธี RT-PCR เริ่มต้นโดยออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณลำดับอนุรักษ์ (conserved sequences) ของยีน *Cu, Zn-SOD* ในพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ Maize (*Zea mays*) Rice (*Oryza sativa*) Chickpea (*Cicer arietinum*) Chinese cabbage (*Brassica rapa ssp.*) Thale cress (*Arabidopsis thaliana*) และ Tomato (*Lycopersicon esculentum*) จากฐานข้อมูล GenBank ผลจากการทำ RT-PCR ของ Cu,Zn-SOD จากตาข้างที่หัวเหวCHAเล็มอาร์ดิโซกทั้ง 6 ระยะ ด้วยคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ โดยใช้อุณหภูมิ annealing ที่ 60 องศาเซลเซียสตามค่า Tm ได้ผลิตภัณฑ์ RT-PCR แถบเดียวที่คาดว่าจะเป็ขนาดของ Cu, Zn-SOD ตามที่คาดคะเนไว้ที่ 233 bp (ภาพที่ 14) เมื่อนำไปยืนยันด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่าเป็นลำดับส่วนหนึ่งของ *Cu, Zn-SOD* cDNA (ภาพที่ 15)

