บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

สำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พืชทดลอง

กล้วยไม้สกุลหวาย 'เอียสกุล' (*Dendrobium* 'EISKUL') ที่ได้จากการทำ mericlone แล้วนำมาปลูกในเรือนเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 ปี

ปลูกพืชทดลองด้วยลูกอัดกาบมะพร้าว บรรจุในภาชนะกระถางดินเผาที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 นิ้ว วางพืชทดลอง 6 ต้น ในตะกร้าพลาสติก และทำการเพาะเลี้ยงภายในโรงเรือนกระจก ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้รับการพรางแสงด้วยตาข่ายไนลอนสีเขียวพรางแสง ซึ่งมีการพรางแสงลดลง 40-60 เปอร์เซ็นต์ ทำให้พืชได้รับแสงโดยเฉลี่ยประมาณ 65.3 ไมโครโมลต่อวินาที (μmol/sec) และอุณหภูมิที่พืชได้รับโดยเฉลี่ยประมาณ 30.5 องศาเซลเซียส นอกจากนี้พืชทดลองทั้งหมดได้รับน้ำในตอนเย็นอย่างน้อย 5 วันต่อสัปดาห์ และได้รับปุ๋ยสูตร 30-10-10 (บริษัท เคโมฟายล์ จำกัด ประเทศไทย) ปริมาณ 5 กรัมต่อ น้ำ 2 ลิตร ทุก 7 วัน ตลอดการทำวิจัยในครั้งนี้

กล้วยไม้สกุลหวาย 'เอียสกุล' ที่ใช้ในการทดลอง จัดเป็น 2 ชุดการทดลอง

- ชุดการทดลอง 1 กล้วยไม้สกุลหวายที่ไม่ได้ฉีดพ่นไคโตซาน (ชุดควบคุม)
- ชุดการทดลอง 2 กล้วยไม้สกุลหวายที่ฉีดพ่นไคโตซาน ที่อยู่ในรูปโอลิโกเมอร์ ซึ่งมี degree of deacetylation เป็น 80% (O80 chitosan) (Limpanavech และคณะ, 2003) ที่ความเข้มข้น 10 ppm ทั่วทั้งต้น

สถานที่ปลูกพืชทดลอง

โรงเรือนกระจก ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุปกรณ์การศึกษา

1. **วัสดุที่ใช้ในการปลูกกล้วยไม้**
   - กระถางดินเผา
   - ลูกอัดกาบมะพร้าว
   - ตะกร้าพลาสติก
   - เครื่องฉีดฟนปุ๋ย ขนาด 4 ลิตร

2. **วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ฉีดพ่นสารไคโตซาน**
   - กระบอกฉีดน้ำ ขนาด 500 มิลลิลิตร

3. **วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างพืช**
   - อลูมินัมฟอยล์
   - กรรไกรตัดตัวอย่างพืช
   - เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่งของหน่วยกรัม
   - ภาชนะใส่ไนโตรเจนเหลว
   - คีมคีบ (forcep)
   - ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen)
   - ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่าง (deep freezer) อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

4. **วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัด** RNA
   - ตัวอย่างที่เก็บรักษาในตู้แช่แข็ง (deep freezer) อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส
   - ภาชนะใส่ไนโตรเจนเหลว
   - ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen)
   - โกร่งบดยา
   - หลอดเซนตริฟิวส์ ขนาด 15 มิลลิลิตร (15 ml centrifuge tubes)
   - หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (1.5 ml microcentrifuge tubes)
   - ถุงมือยางผ่าตัด
   - ปิเปตทิป (pipette tip)
   - ไมโครปิเปต (micropipette)
   - อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
   - เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer)

- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated microcentrifuge)
- ชุดแยกกรดนิวคลีอิก ด้วยกระแสไฟฟ้าในแนวระนาบ (horizontal gel electrophoresis) (Bio-Rad, CA, USA)
- microwave oven
- เครื่องกำเนิดแสง UV และถ่ายรูปเจล (Gel Doc™ 2000, Bio-Rad, CA, USA)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (UV / visible / NIR spectrophotometer, UK)
- cuvette
- ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่าง (deep freezer) อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส
- ตู้แช่แข็งสำหรับ RNA (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

5. **วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน โดยวิธี** differential display
   - ถุงมือยางผ่าตัด
   - บีกเกอร์
   - กระบอกตวง
   - หลอดฉีดยา
   - ถาดพลาสติกขนาด 8×12 ตารางนิ้ว
   - ปิเปตทิป (pipette tip)
   - ไมโครปิเปต (micropipette)
   - หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ ขนาด 0.2 มิลลิลิตร (0.2 ml microcentrifuge tubes)
   - หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (1.5 ml microcentrifuge tubes)
   - เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA (programmable thermal controller รุ่น PTC-100™, MJ research, Inc., MC, USA)
   - ชุดแยกกรดนิวคลีอิก ด้วยกระแสไฟฟ้าในแนวดิ่ง (vertical slab gel electrophoresis units รุ่น Hoefer SE400 series, Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA)
   - เครื่องกำเนิดแสง และถ่ายรูปเจล (Gel Doc™ 2000, Bio-Rad, CA, USA)
   - ตู้แช่แข็ง (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

6. **วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการโคลนชิ้นส่วน** cDNA

- ปิเปตทิป (pipette tip)
- ไมโครปิเปต (micropipette)
- **หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ ขนาด** 0.2 **มิลลิลิตร** (0.2 ml microcentrifuge tubes)
- **หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ ขนาด** 1.5 **มิลลิลิตร** (1.5 ml microcentrifuge tubes)
- **หลอดเซนตริฟิวส์ ขนาด** 50 **มิลลิลิตร** (50 ml centrifuge tube)
- **ขวดรูปชมพู่ขนาด** 25 **มิลลิลิตร**
- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (incubator)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (microcentrifuge)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated microcentrifuge)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer)
- เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA (programmable thermal controller รุ่น PTC-100™ ,MJ research, Inc., MC, USA)
- ชุดแยกกรดนิวคลีอิก ด้วยกระแสไฟฟ้าในแนวระนาบ (horizontal gel electrophoresis) (Bio-Rad, CA, USA)
- เครื่องกำเนิดแสง UV และถ่ายรูปเจล (Gel Doc™ 2000, Bio-Rad, CA, USA)
- เครื่องกำเนิดแสง UV (UV transluminator)

7. **วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัด** DNA plasmid

- ปิเปตทิป (pipette tip)
- ไมโครปิเปต (micropipette)
- **หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ ขนาด** 1.5 **มิลลิลิตร** (1.5 ml microcentrifuge tubes)
- **หลอดเซนตริฟิวส์ ขนาด** 15 **มิลลิลิตร** (15 ml centrifuge tubes)
- **ขวดรูปชมพู่ขนาด** 25 **มิลลิลิตร**
- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (incubator)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน (microcentrifuge)
- microwave oven
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (UV / visible / NIR spectrophotometer, UK)

- cuvette
- ชุดแยกกรดนิวคลีอิก ด้วยกระแสไฟฟ้าในแนวระนาบ (horizontal gel electrophoresis) (Bio-Rad, CA, USA)
- เครื่องกำเนิดแสง UV และถ่ายรูปเจล (Gel Doc™ 2000, Bio-Rad, CA, USA)
- เครื่องกำเนิดแสง UV (UV transluminator)
- ตู้เย็น
- ตู้แช่แข็ง (deep freezer) อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

8. **วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน โดยวิธี** RT-PCR analysis
   - ปิเปตทิป (pipette tip)
   - ไมโครปิเปต (micropipette)
   - หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ ขนาด 0.2 มิลลิลิตร (0.2 ml microcentrifuge tubes)
   - หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (1.5 ml microcentrifuge tubes)
   - เครื่องเพิ่มปริมาณ DNA (programmable thermal controller รุ่น PTC-100™, MJ research, Inc., MC, USA)
   - microwave oven
   - ชุดแยกกรดนิวคลีอิก ด้วยกระแสไฟฟ้าในแนวระนาบ (horizontal gel electrophoresis) (Bio-Rad, CA, USA)
   - เครื่องกำเนิดแสง UV และถ่ายรูปเจล (Gel Doc™ 2000, Bio-Rad, CA, USA)
   - ตู้แช่แข็ง (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
   - ตู้แช่แข็ง (deep freezer) อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

<u>สารเคมี</u>

1. **สารเคมีที่ใช้ในการฉีดพ่นไคโตซาน**
   - ไคโตซานที่อยู่ในรูปโอลิโกเมอร์ ซึ่งมี degree of deacetylation เป็น 80% (O80 chitosan) (Limpanavech และคณะ, 2003) ที่ความเข้มข้น 10 ppm

2. **สารเคมีที่ใช้ในการสกัด** RNA
   - Extraction buffer (ภาคผนวก ก)
   - Phenol : Chloroform (1:1) (v/v)
   - Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1, v/v)

- Absolute ethanol
- 70% ethanol
- 80% ethanol
- 10 M LiCl
- TE buffer pH 8.0 (ภาคผนวก ก)
- Agarose (USB, USA)
- 5X TBE (Tris Borate EDTA) (ภาคผนวก ก)
- RNA loading dye (ภาคผนวก ก)
- 10 mg/ml ethidium bromide
- DEPC (diethyl pyrrocarbonate)
- DEPC-treated water (ภาคผนวก ก)

3. **สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน โดยวิธี** differential display

- DNase I (RNase-free) (TAKARA BIO INC, Shiga, Japan)
- เอนไซม์ SuperScript II RT (200 units) (Invitrogen, CA, USA)
- DyNAzyme II DNA Polymerase (FINZYMESE, Espoo, Finland)
- DNA marker (1Kb DNA ladder, New England Biolabs, MA, USA)
- DNA loading dye (ภาคผนวก ก)
- 30% acrylamide (ภาคผนวก ก)
- *N,N'* – methylenebisacrylamide
- TEMED (*N,N,N',N'* –tetramethylethylenediamine)
- Ammonium persulfate
- 5X TBE
- Methanol
- Nitric acid
- Sodium carbonate anhydrous
- 37% formaldehyde
- Silver nitrate
- Citric acid
- Elution buffer (ภาคผนวก ก)

4. **สารเคมีที่ใช้ในการโคลนชิ้นส่วน** cDNA

- DyNAzyme II DNA Polymerase (FINZYMESE, Espoo, Finland)
- DNA marker (1Kb DNA ladder, New England Biolabs, MA, USA)
- DNA loading dye
- 10 mg/ml ethidium bromide
- Ultra Clean™ 15 DNA Purification Kit (MO BIO Laboratories, Inc., CA, USA)
- Ammonium acetate
- Magnesium acetate
- SDS (sodium dodecyl sulfate)
- EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)
- อาหารเลี้ยงแบคทีเรียสูตร LB (ภาคผนวก ก)
- Magnesium chloride
- DMSO (dimethyl sulfoxide)
- อาหารเลี้ยงแบคทีเรียสูตร SOB (ภาคผนวก ก)
- อาหารเลี้ยงแบคทีเรียสูตร SOC (ภาคผนวก ก)
- ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (General Drugs House, Bangkok, Thailand)
- X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-D-galactoside) (Fermentas Inc., MD, USA)
- IPTG (isopropylthio-ß-D-galactoside) (Fermentas Inc., MD, USA)
- เอนไซม์ *Pst*I (New England Biolabs, MA, USA)
- เอนไซม์ *Eco*RV (New England Biolabs, MA, USA)
- เอนไซม์ *Hin*dIII (New England Biolabs, MA, USA)
- เอนไซม์ *E*coRI (New England Biolabs, MA, USA)
- pGEM-T cloning kit (Promega, MD, USA)

5. **สารเคมีที่ใช้ในการสกัด** DNA plasmid

- อาหารเลี้ยงแบคทีเรียสูตร LB
- ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (General Drugs House, Bangkok, Thailand)
- Solution I (ภาคผนวก ก)
- Solution II (ภาคผนวก ก)

- Solution III (ภาคผนวก ก)
- 70% ethanol
- TE buffer pH 8.0
- RNase (Sigma, USA)
- Phenol : Chloroform (1:1) (v/v)
- 3 M sodium acetate pH 5.2
- Agarose (USB Corporation, OH, USA)
- 5X TBE
- DNA marker (1Kb DNA ladder, New England Biolabs, MA, USA)
- DNA loading dye
- 10 mg/ml ethidium bromide
- Ultra Clean™ 15 DNA Purification Kit (MO BIO Laboratories, Inc., CA, USA)

6. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน โดยวิธี reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis

- เอนไซม์ SuperScript III RT (200 units) (Invitrogen, CA, USA)
- DyNAzyme II DNA Polymerase (FINZYMESE, Espoo, Finland)
- DNA marker (1Kb DNA ladder, New England Biolabs, MA, USA)
- DNA loading dye
- 10 mg/ml ethidium bromide
- 5X TBE
- Agarose (USB Corporation, OH, USA)

หอสมุดกลาง สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการทดลอง

1. **ศึกษาวิธีการสกัด total RNA ที่เหมาะสมสำหรับกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอียสกุล'**

1.1 เปรียบเทียบปริมาณ และคุณภาพของ total RNA ที่สกัดจากใบอ่อนของกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอียสกุล' ที่ได้จากวิธีการสกัด total RNA 3 วิธี ได้แก่

- วิธีของ Thikart และคณะ (2005) (ภาคผนวก ก)
- วิธีดัดแปลงจากวิธีของ Yu และ Goh (2000) โดยการลดขั้นตอนการบ่มเนื้อเยื่อพืชที่บดละเอียด ใน extraction buffer ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส (วิธีดัดแปลง Yu และ Goh (2000) แบบที่ 1) (ภาคผนวก ก)
- วิธีดัดแปลงจากวิธีของ Yu และ Goh (2000) โดยการลดขั้นตอนการบ่มเนื้อเยื่อพืชที่บดละเอียด ใน extraction buffer ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของ extraction buffer โดยการใช้ polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) แทนการใช้ polyvinylpyrrolidone (PVP) (วิธีดัดแปลง Yu และ Goh (2000) แบบที่ 2) (ภาคผนวก ก)

1.1.1 สกัด total RNA จากเนื้อเยื่อใบอ่อนของกล้วยไม้ 0.4 กรัม ตามวิธีทั้ง 3 ที่ระบุข้างต้น โดยทำทั้งสิ้นวิธีละ 4 ซ้ำ

1.1.2 เปรียบเทียบคุณภาพของ total RNA ที่สกัดได้ โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ในตัวกลาง คือ 0.8% agarose gel ใน 1X TBE บัฟเฟอร์ และบันทึกภาพ

1.1.3 เปรียบเทียบคุณภาพ และปริมาณของ total RNA ที่สกัดได้ โดยวิธี spectrophotometric measurement (Sambrook และคณะ, 1989) ซึ่งวัดค่าดูดกลืนแสงของ total RNA ที่ค่าความยาวคลื่น 230 260 และ 280 นาโนเมตร

1.2 ศึกษาปริมาณเนื้อเยื่อที่เหมาะสมต่อการสกัด total RNA ของกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอียสกุล'

1.2.1 เลือกวิธีการสกัดที่ดีที่สุดจากข้อ 1.1 เพื่อสกัด total RNA จากกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอียสกุล' โดยใช้เนื้อเยื่อ 0.1 0.2 0.3 และ 0.4 กรัมต่อ extraction buffer 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง

1.2.2 เปรียบเทียบคุณภาพ total RNA ที่สกัดได้ โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าดังระบุในข้อ 1.1.2

1.2.3 เปรียบเทียบคุณภาพ และปริมาณของ total RNA ที่สกัดได้ โดยวิธี spectrophotometric measurement ดังระบุในข้อ 1.1.3

2. **ศึกษาการแสดงออกของยีน โดยวิธี** differential display

2.1 เตรียมต้นกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอียสกุล'

ปลูกเลี้ยงกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอียสกุล' ซึ่งเป็น mericlone อายุ 2 ปี หลังจากออกจากขวด

2.1.1 การปลูกเลี้ยงทำในโรงเรือนกระจก ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งพรางแสงโดยตาข่ายไนลอนสีเขียวพรางแสง 40-60 เปอร์เซ็นต์ ให้น้ำในตอนเย็นอย่างน้อย 5 วันต่อสัปดาห์ และให้ปุ๋ยสูตร 30-10-10 ปริมาณ 5 กรัมต่อน้ำกรอง 2 ลิตร ทุก 7 วัน

เมื่อจะทำการทดลอง แบ่งกล้วยไม้เป็น 2 กลุ่ม โดยการติดฉลากกลุ่มชุดการทดลองที่ 1 ไม่ฉีดพ่นไคโตซาน (ชุดควบคุม) และกลุ่มชุดการทดลองที่ 2 ฉีดพ่นไคโตซาน

2.1.2 การฉีดพ่นไคโตซาน

- ชุดการทดลองที่ 1 ฉีดพ่นต้นกล้วยไม้ 6 ต้น ด้วยน้ำกรองที่ไม่มีไคโตซาน ปริมาตร 500 มิลลิลิตร จนชุ่มทั่วทั้งต้น

- ชุดการทดลองที่ 2 ฉีดพ่นต้นกล้วยไม้ 6 ต้น ด้วยน้ำกรองที่มีไคโตซาน O80 (Limpanavech และคณะ, 2003) ความเข้มข้น 10 ppm ปริมาตร 500 มิลลิลิตร จนชุ่มทั่วทั้งต้น

2.2 หลังจากการฉีดพ่น เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สกัด total RNA จากบริเวณใบอ่อนของกล้วยไม้สกุลหวายทั้ง 2 ชุดการทดลอง โดยใช้วิธีที่เหมาะสม ที่ได้จากขั้นตอนที่ 1

2.3 ทำลาย DNA ที่ปนเปื้อนใน total RNA โดยใช้เอนไซม์ DNase I (RNase-free) ตามวิธีที่แนะนำโดยบริษัท TAKARA BIO INC, Shiga, ประเทศญี่ปุ่น

2.4 ทำการสังเคราะห์ cDNA ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase (Invitrogen, CA, USA) โดยใช้ oligo dT_{11} NN primer จำนวน 8 ไพรเมอร์ ดังนี้

- oligo dT1: 5'-TTT-TTT-TTT-TT A-T-3'
- oligo dT2: 5'-TTT-TTT-TTT-TT C-G-3'
- oligo dT3: 5'-TTT-TTT-TTT-TT G-C-3'
- oligo dT4: 5'-TTT-TTT-TTT-TT C-A-3'
- oligo dT5: 5'-TTT-TTT-TTT-TT A-C-3'
- oligo dT6: 5'-TTT-TTT-TTT-TT T-A-3'
- oligo dT7: 5'-TTT-TTT-TTT-TT C-C-3'
- oligo dT8: 5'-TTT-TTT-TTT-TT G-G-3'

โดยทำตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือของเอนไซม์ (Invitrogen, CA, USA) ซึ่งในปฏิกิริยา reverse transcription (RT) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มีรายละเอียดดังนี้

Total RNA	2	µg
oligo dT_{11} NN primer ความเข้มข้น 500 ng/µl	1	µl
10 mM dNTP mixture	1	µl
5X first-stand buffer	4	µl
0.1 M DTT	2	µl
เอนไซม์ SuperScript II RT (200 units)	1	µl
(Invitrogen, CA, USA)		
ปรับปริมาตรด้วย sterile, distilled water จนเป็น 20 ไมโครลิตร		

2.5 เพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยเอนไซม์ Taq DNA polymerase โดยใช้ oligo dT_{11} NN primer จำนวน 8 ไพรเมอร์ ร่วมกับ arbitrary primer จำนวน 9 ไพรเมอร์ ได้แก่ A-12, A-15, A-16, A-19, A-20, B-11, B-12, B-13, B-14 ที่ออกแบบโดยบริษัท GENSET Oligos โดยใช้ปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งมีปริมาตร 50 ไมโครลิตร มีรายละเอียดดังนี้

First-strand cDNA (10% of reverse transcription reaction)	2	µl
10 mM dNTP mixture	1	µl
10X PCR buffer (ที่มี $MgCl_2$)	5	µl
DyNAzyme II DNA polymerase	2	units
(FINZYMESE, Espoo, Finland)		
10 µM oligo $dT_{11}NN$ primer	1	µl
10 µM arbitrary primer (GENSET Oligos)	1	µl

ปรับปริมาตรด้วย sterile, distilled water จนเป็น 50 ไมโครลิตร

ทำการแยกสาย cDNA ด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการเพิ่มปริมาณ cDNA โดยมีสภาวะการทำปฏิกิริยาดังนี้ แยกสาย cDNA เพื่อให้เป็นสายเดี่ยว ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ลดอุณหภูมิลงมาที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ไพรเมอร์ไปเกาะกับ cDNA ที่เป็นสายต้นแบบ จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์สาย cDNA ทำการเพิ่มปริมาณ cDNA เช่นนี้ จำนวน 40 รอบ แล้วต่อด้วยอุณหภูมิเป็น 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาการสร้างสาย cDNA

2.6 ทำการตรวจสอบ cDNA ที่ได้จากการทำ PCR นำมาแยกในสารละลาย 1X TBE ภายใต้สนามไฟฟ้าที่มีตัวกลางเป็น polyacrylamide gel ที่มีความเข้มข้น 6% (v/w) (ภาคผนวก ก) โดยใช้เครื่อง vertical slab gel electrophoresis units รุ่น Hoefer SE400 series (Amersham pharmacia biotech, NJ, USA) และใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 90 โวลต์ เป็นเวลา 7 ชั่วโมง

2.7 ย้อมแถบ cDNA ด้วยวิธี silver stain ที่ดัดแปลงจากวิธีของ De Moreno และคณะ (1985) (ภาคผนวก ข) และบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel Doc™ 2000 (Bio-Rad, CA, USA) ภายใต้แสงขาว

3. โคลนชิ้นส่วน cDNA ที่แตกต่างระหว่างกลางไม้ทั้ง 2 ชุดการทดลอง เข้าในเวกเตอร์ที่เหมาะสม

3.1 เปรียบเทียบรูปแบบของแถบ cDNA ที่สังเคราะห์จากแต่ละคู่ไพรเมอร์ของกล้วยไม้ทั้ง 2 ชุดการทดลอง จากขั้นตอนที่ 2.7

3.2 ตัดชิ้น polyacrylamide gel ที่มีแถบ cDNA ที่ได้จากกล้วยไม้ทั้ง 2 ชุด แสดงความแตกต่างกัน แล้วนำมาแยก cDNA ออกจากเจล ด้วยวิธี crush and soak (Sambrook และคณะ,1989) (ภาคผนวก ข)

3.3 เพิ่มปริมาณ cDNA ที่แยกได้ ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ และสภาวะการทำปฏิกิริยา ดังระบุในข้อ 2.5

3.4 ตรวจสอบผลการทำ PCR โดยนำ DNA ที่ได้จากการทำ PCR โดยนำมาแยกในสารละลาย 1X TBE ภายใต้สนามไฟฟ้าที่มีตัวกลางเป็น agarose gel ที่มีความเข้มข้น 1% (v/w) และใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 90 โวลต์ เป็นเวลา 80 นาที จากนั้นย้อมเจลด้วย ethidium bromide ที่ความเข้มข้น 0.5 µg/ml เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที

3.5 ตรวจสอบแถบ cDNA ที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (UV) และตัดชิ้นส่วนเจลที่มีแถบ cDNA ที่ต้องการ

3.6 สกัด cDNA ออกจากเจล โดยใช้ Ultra Clean™ 15 DNA purification kit (MO BIO Laboratories, Inc., CA, USA) ตามวิธีการที่ระบุไว้ในคู่มือ และเปรียบเทียบกับขนาดของชิ้นส่วน cDNA ที่สนใจ ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ดังข้อ 3.4 ก่อนนำมาทำการโคลนเข้าในเวกเตอร์ที่เหมาะสม

3.7 โคลน cDNA ที่ต้องการเข้าในเวกเตอร์ pGEM-T โดยใช้ pGEM-T cloning kit (Promega, MD, USA) ตามวิธีการที่ระบุไว้ในคู่มือ แล้วถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM 109 ที่อยู่ในสภาพพร้อมรับ DNA จากภายนอก (competent cell) (ภาคผนวก ข) โดยวิธี heat shock transformation (ภาคผนวก ข) คัดเลือก transformant โดยใช้ยาปฏิชีวนะแอมพลิซิลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.8 เมื่อได้โคโลนีที่คาดว่าจะมีส่วนของ DNA ที่ต้องการ ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ แล้วสกัด DNA plasmid ด้วยวิธี small-scale preparation of plasmid DNA by lysis in alkali solution (Sambrook และคณะ, 1989) (ภาคผนวก ข)

3.9 ตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนของ cDNA ที่โคลนได้ โดยการย่อยพลาสมิดด้วยเอนไซม์ *Pst*I (New England Biolabs, MA, USA) ก่อนนำมาเปรียบเทียบกับขนาดของชิ้นส่วน cDNA ที่สนใจอีกครั้ง

3.10 ทำ frozen stock (ภาคผนวก ข) เพื่อเก็บรักษาโคลนที่ได้ไว้ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

4. **วิเคราะห์ชนิดของยีนที่มีการตอบสนองต่อไคโตซานในกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอียสกุล'**

4.1 ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ที่มีปริมาณแตกต่างกันในกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอียสกุล' ที่ได้รับ และไม่ได้รับไคโตซานที่ได้จากขั้นตอนที่ 3.9 โดยการใช้บริการของหน่วยบริการชีวภาพศูนย์พันธุวิศวกรรม และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

4.2 ทำการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA กับข้อมูลในฐานข้อมูลสากล GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใช้โปรแกรม nucleotide-nucleotide BLAST (blastn) และ align two sequence (bl2seq) เพื่อตรวจสอบชนิดของยีนที่เป็นไปได้

4.3 ทำการแปลรหัสพันธุกรรมด้วยโปรแกรม Protein Translation ของเวบไซด์ ExPASy แล้วตรวจสอบความคล้ายคลึงกับโปรตีนในฐานข้อมูลของ European Molecular Biology Laboratory (EMBL) โดยใช้โปรแกรม Swiss-Prot / TrEMBL

5. **วิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่คัดเลือกได้จากการทำ** differential display

5.1 ศึกษาการแสดงออกของยีนที่โคลนได้จากกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอียสกุล' ทั้ง 2 ชุดการทดลอง โดยใช้วิธี RT-PCR analysis โดยทำทั้งสิ้น 3 ซ้ำจากเนื้อเยื่อพืชที่ทำการเก็บต่างครั้งกัน

5.1.1 ออกแบบ primer ที่จำเพาะต่อยีนที่ไคโตซานมีผลต่อการแสดงออก (*De362* และ *De7696*) โดยใช้ Actin specific primer ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะกับ actin mRNA ของ *Dendrobium thyrsiflorum* (Skipper, 2005) ในการเพิ่มปริมาณ actin cDNA เพื่อใช้เป็น internal control

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์จำเพาะของ *De362 De7696* และ *Actin* เป็นดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์จำเพาะ

Target genes	Primers
De362	Forward primer: 5'-TAA-GTG-CAG-ATA-AAG-CAG-CG-3'
	Reverse primer: 5'-TCA-TCC-TCC-TCT-ACA-TCA-TT-3'
De7696	Forward primer: 5'-GTA-GAC-CCG-TTA-GGT-ATG-AA-3'
	Reverse primer: 5'-TGT-AGA-CCC-GTA-TCA-ATA-AT-3'
Actin	Forward primer: 5'-GCT-GGT-CGT-GAC-CTG-ACT-GA-3'
	Reverse primer: 5'-TGG-GCA-ACG-GAA-CCT-CTC-AG-3'

5.1.2 สกัด total RNA ด้วยวิธีที่เหมาะสมที่ได้จากขั้นตอนที่ 1 และทำลาย DNA โดยใช้เอนไซม์ DNase I (RNase-free) (TAKARA BIO INC, Shiga, Japan) ตามข้อ 2.3

5.1.3 ทำการสังเคราะห์ cDNA ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase โดยใช้ oligo dT_{18} primer และวิธีตามคู่มือของเอนไซม์ (Invitrogen, CA, USA) โดยใช้ปฏิกิริยา reverse transcription ซึ่งมีปริมาตร 20 ไมโครลิตร มีรายละเอียดดังนี้

Total RNA	1	µg
oligo dT_{18} primer ความเข้มข้น 500 ng/µl	1	µl
10 mM dNTP mixture	1	µl
5X first-stand buffer	4	µl
0.1 M DTT	2	µl
เอนไซม์ SuperScript III RT (200 units)	1	µl
(Invitrogen, CA, USA)		
ปรับปริมาตรด้วย sterile, distilled water จนเป็น 20 ไมโครลิตร		

5.1.4 เพิ่มปริมาณ cDNA ที่สังเคราะห์ได้จากข้อ 5.1.3 ด้วยเอนไซม์ Taq DNA polymerase โดยใช้ primer ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับยีนที่ต้องการศึกษา โดยใช้ปฏิกิริยา polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งมีปริมาตร 50 ไมโครลิตร มีรายละเอียด ดังนี้

First-strand cDNA	2	µl
(10% of reverse transcription reaction)		
10 mM dNTP mixture	1	µl
10X PCR buffer (ที่มี $MgCl_2$)	5	µl
DyNAzyme II DNA polymerase	2	units
(FINZYMESE, Espoo, Finland)		
10 µM specific forward primer	1	µl
10 µM specific reverse primer	1	µl

ปรับปริมาตรด้วย sterile, distilled water จนเป็น 50 ไมโครลิตร

ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจสอบ *De362* และ *De7696* คือ ทำการแยกสาย cDNA ด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการเพิ่มปริมาณ cDNA โดยมีสภาวะการทำปฏิกิริยาดังนี้ แยกสาย cDNA เพื่อให้เป็นสายเดี่ยว ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ลดอุณหภูมิลงมาที่ 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ไพรเมอร์ไปเกาะกับ cDNA ที่เป็นสายต้นแบบ จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์สาย cDNA ทำการเพิ่มปริมาณ cDNA เช่นนี้ จำนวน 35 รอบ แล้วต่อด้วยอุณหภูมิเป็น 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาการสร้างสาย cDNA

ส่วนสภาวะการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมของยีน *Actin* เป็นดังนี้ ทำการแยกสาย cDNA ด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการเพิ่มปริมาณ cDNA โดยมีสภาวะการทำปฏิกิริยาดังนี้ แยกสาย cDNA เพื่อให้เป็นสายเดี่ยว ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ลดอุณหภูมิลงมาที่ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที เพื่อให้ไพรเมอร์ไปเกาะกับ cDNA ที่เป็นสายต้นแบบ จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที เพื่อให้เกิดการสังเคราะห์สาย cDNA ให้มีปริมาณเพิ่มขึ้น ทำเช่นนี้ 40 รอบ แล้วต่อด้วยอุณหภูมิเป็น 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อสิ้นสุดการต่อสาย cDNA

5.1.5 ทำการตรวจสอบ cDNA ที่ได้จากการทำ PCR โดยนำ DNA ปริมาตร 25 ไมโครลิตร มาแยกภายใต้สนามไฟฟ้าที่มีตัวกลางเป็น agarose gel ที่มีความเข้มข้น 1% (v/w) ในสารละลาย 1X TBE และใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 90 โวลต์ เป็นเวลา 80 นาที จากนั้นย้อมแถบ cDNA ด้วย ethidium bromide ที่ความเข้มข้น 0.5 µg/ml เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที

5.1.6 บันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel Doc™ 2000 (Bio-Rad, CA, USA) ภายใต้รังสียูวี