

ผลการทดลอง

1. การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค differential display

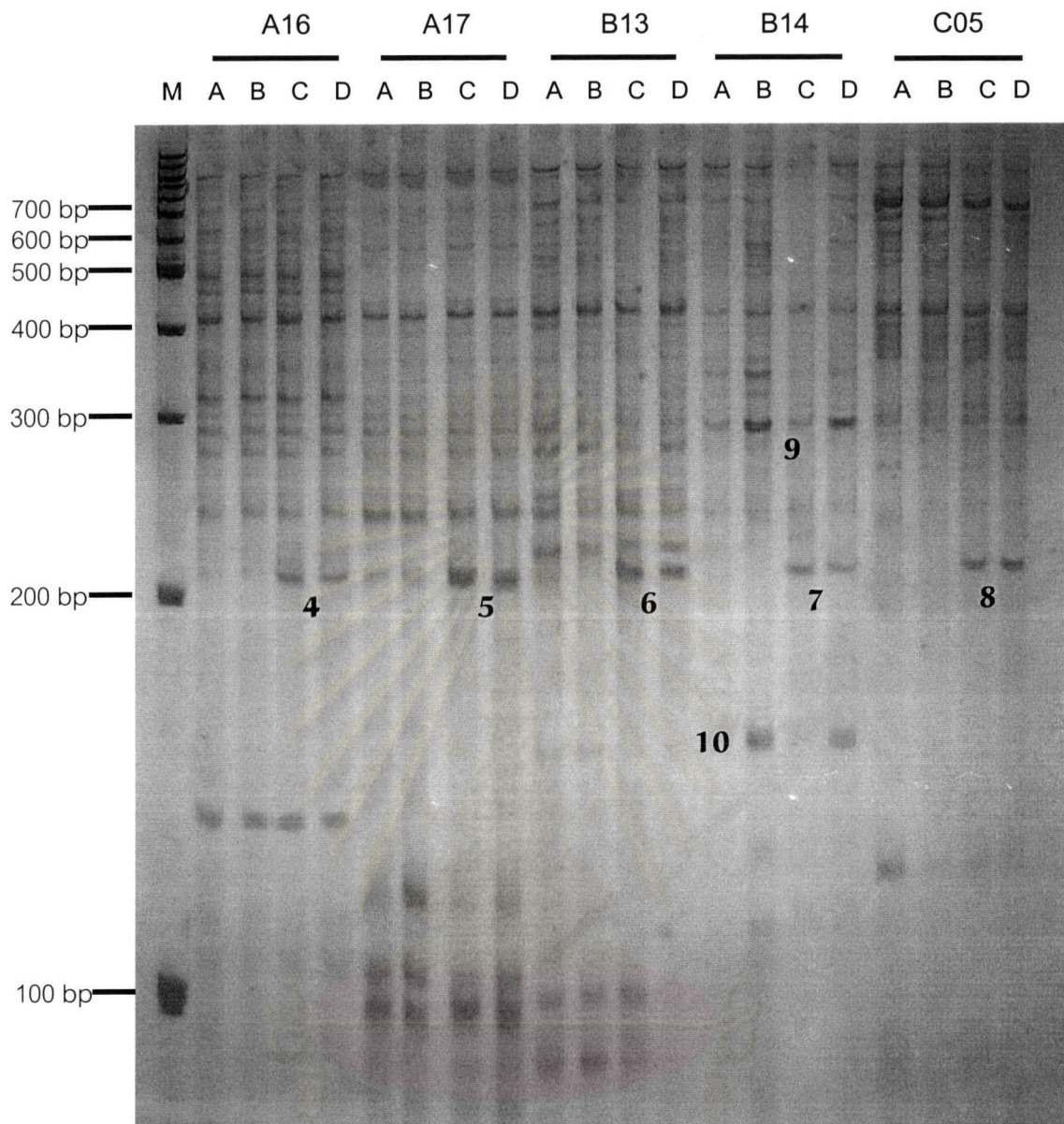
จากการศึกษาการแสดงออกของยีนในข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 ในภาวะเค็ม ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (W/V) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยมีข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ ที่ปลูกในสารละลายธาตุอาหารสูตรดัดแปลง WP No.2 เป็นชุดควบคุม โดยใช้เทคนิค differential display ซึ่งมีการใช้ oligo dT primer จำนวน 8 ชนิด และ arbitrary primer จำนวน 20 ชนิด คิดเป็นจำนวนทั้งหมด 160 คู่ primers ทำให้มีผลรวมของตัวอย่างในการทดลองทั้งหมด 640 ตัวอย่าง พบ 47 คู่ primers ที่ให้แถบ DNA แตกต่างกัน ดังตารางที่ 1

การเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในครั้งนี้พบยีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกัน โดยพิจารณาจากแถบ cDNA ที่ต่างกัน ได้จำนวน 108 แถบ โดยคู่ primer oligo dT1-arbitrary สามารถให้แถบ cDNA ที่แตกต่างกันจำนวน 61 แถบ คู่ primer oligo dT2-arbitrary ให้แถบ cDNA ที่แตกต่างกันจำนวน 3 แถบ คู่ primer oligo dT3-arbitrary ให้แถบ cDNA ที่แตกต่างกันจำนวน 5 แถบ คู่ primer oligo dT4-arbitrary ให้แถบ cDNA ที่แตกต่างกันจำนวน 13 แถบ คู่ primer oligo dT5-arbitrary ให้แถบ cDNA ที่แตกต่างกันจำนวน 10 แถบ และคู่ primer oligo dT8-arbitrary ให้แถบ cDNA ที่แตกต่างกันจำนวน 16 แถบ ส่วนการใช้คู่ primer oligo dT6-arbitrary และ oligo dT7-arbitrary ไม่พบแถบ cDNA ที่แตกต่างกัน ผลสรุปคู่ของ primer ที่ให้แถบ cDNA ที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จำนวนแถบ cDNA ที่แตกต่างกันจากคู่ primer ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนในข้าว LPT123 และ LPT123-TC171 ที่ปลูกในภาวะต่างๆ ด้วยวิธี differential display

Primers	dT1	dT2	dT3	dT4	dT5	dT6	dT7	dT8	รวม
A11	3	-	4	-	-	-	-	-	7
A12	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A13	1	-	-	-	-	-	-	1	2
A14	5	-	-	1	-	-	-	1	7
A15	3	-	-	-	-	-	-	1	4
A16	4	-	-	-	-	-	-	1	5
A17	3	-	-	-	-	-	-	1	4
B13	2	-	-	-	-	-	-	1	3
B14	4	-	-	5	-	-	-	3	12
C05	2	-	-	3	3	-	-	1	9
B15	5	2	1	-	-	-	-	-	8
B16	6	-	-	-	-	-	-	-	6
B17	5	-	-	-	-	-	-	1	6
B18	2	-	-	-	1	-	-	-	3
B19	1	-	-	1	1	-	-	1	4
C01	3	1	-	1	3	-	-	-	8
C03	1	-	-	-	-	-	-	1	2
C04	5	-	-	2	-	-	-	1	8
C09	4	-	-	-	-	-	-	-	4
C10	2	-	-	-	2	-	-	2	6
รวม	61	3	5	13	10	-	-	16	108

ทั้งนี้การกำหนดชื่อแถบ cDNA ที่แตกต่างกันทั้ง 108 แถบ จะกำหนดโดยใช้หมายเลขของคู่ primer และหมายเลขตำแหน่งของแถบ DNA ในแผ่นเจล เช่น OsD8A16-4 หมายถึง แถบ DNA ที่เกิดจากการใช้คู่ primer ที่เป็น oligo dT8 กับ arbitrary primer หมายเลข A16 ตรงกับแถบ DNA หมายเลข 4 ในแผ่นเจล ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 รูปแบบของแถบ DNA ที่ได้จากการทำ differential display โดยใช้คู่ primer oligo dT8 กับ arbitrary primer A16, A17, B13, B14 และ C05

โดยที่ M = DNA marker

A = LPT123 ในภาวะปกติ

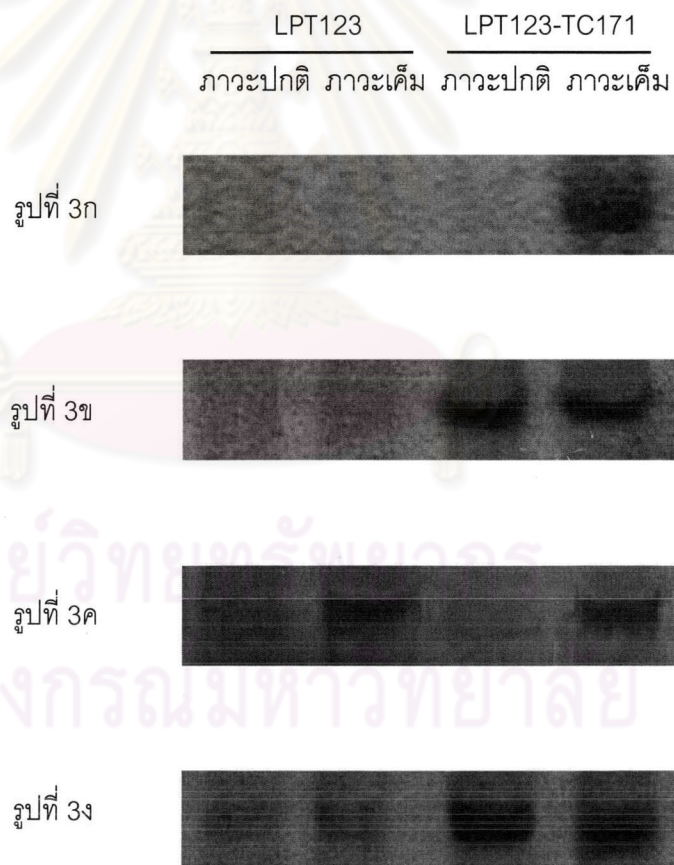
B = LPT123 ในภาวะเค็ม

C = LPT123-TC171 ในภาวะปกติ

D = LPT123-TC171 ในภาวะเค็ม

ผลการเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของยีนในข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 ในภาวะเค็ม พบว่าสามารถจัดรูปแบบของแถบ DNA ที่มีการแสดงออกต่างกันได้ 4 รูปแบบ ดังรูปที่ 3

1. รูปแบบของแถบ cDNA แบบที่ 1 พบเฉพาะในข้าว LPT123-TC171 หลังจากที่ได้รับภาวะเค็มเท่านั้น มีจำนวน 67 แถบ (รูปที่ 3ก)
2. รูปแบบของแถบ cDNA แบบที่ 2 พบเฉพาะในข้าว LPT123-TC171 ทั้งในภาวะปกติ และในภาวะเค็มเท่านั้น มีจำนวน 19 แถบ (รูปที่ 3ข)
3. รูปแบบของแถบ cDNA แบบที่ 3 พบในข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ หลังจากได้รับภาวะเค็มเท่านั้น มีจำนวน 10 แถบ (รูปที่ 3ค)
4. รูปแบบของแถบ cDNA แบบที่ 4 พบในข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ ทั้งในภาวะปกติ และในภาวะเค็ม แต่มีระดับความเข้มของแถบ cDNA ไม่เท่ากัน จำนวน 12 แถบ (รูปที่ 3ง)



รูปที่ 3 รูปแบบของแถบ cDNA ที่พบในการทำ differential display

## 2. การโคลนชิ้นส่วน DNA ที่แตกต่างกัน

เมื่อนำชิ้นส่วน cDNA ทั้ง 108 ชิ้นส่วน ไปทำปฏิกิริยา PCR ใหม่อีกครั้ง โดยใช้คู่ primer เดียวกับการทำ differential display พบว่าสามารถทำการสังเคราะห์ DNA เพิ่มได้จำนวน 84 ชิ้นส่วน โดยในจำนวนนี้มีชิ้นส่วน cDNA จำนวน 61 ชิ้นส่วน ที่มีปริมาณมากพอที่จะนำไปโคลนได้ และมีชิ้นส่วน cDNA ที่ไม่สามารถสังเคราะห์ได้จำนวน 24 ชิ้นส่วน (ตารางที่ 2) โดยตัวอย่างลักษณะของแถบ cDNA ที่สามารถสังเคราะห์ DNA เพิ่มได้แสดงในรูปที่ 4

นำชิ้นส่วน DNA OsD1A11-2 OsD1A11-3 OsD1A16-1 OsD1A16-3 และ OsD1A16-4 โคลนเข้าสู่ plasmid pBluescript II KS+ โดยทำการเชื่อมต่อกับชิ้นส่วน DNA ที่ทำให้เป็นปลายทู่แล้ว เข้ากับตำแหน่งของ plasmid ที่ตัดด้วย เอนไซม์ *EcoRV* เมื่อนำโคโลนีสีขาวที่ได้จากการ transform plasmid เข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia coli* มาสกัดแยก plasmid DNA และนำ plasmid DNA ของแต่ละโคลนมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* และ *HindIII* ซึ่งสามารถตรวจสอบ plasmid DNA ที่มีชิ้นส่วน DNA แทรกอยู่ได้ พบว่ามีโคลนที่มีชิ้นส่วน DNA แทรกอยู่ใน plasmid DNA จำนวน 1 โคลน คือ OsD1A16-1 ดังนั้นจึงทำการเปลี่ยน plasmid โดยใช้ pGEM<sup>®</sup> - T Vector System I Cloning kit (Promega) ซึ่งมี pGEM-T ที่มีปลาย T-overhang เป็น DNA พาหะ มาทำการโคลนแทน pBluescript II KS+ ซึ่งพบว่าหลังจากที่ทำการโคลนชิ้นส่วน DNA จำนวน 56 ชิ้นส่วนที่เหลือ เมื่อนำไปตรวจสอบผลการโคลน ด้วยการคัดเลือกโคโลนีสีขาวมาสกัดแยก plasmid DNA และนำ plasmid DNA ของแต่ละโคลนมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *PstI* ซึ่งสามารถตรวจสอบ plasmid DNA ที่มีชิ้นส่วน DNA แทรกอยู่ใน pGEM-T vector ได้ พบว่ามีโคลนที่มีชิ้นส่วน DNA แทรกอยู่ใน plasmid ที่มี pGEM-T เป็น DNA พาหะจำนวน 53 โคลน (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 รูปแบบของแถบ DNA และผลการสังเคราะห์ DNA เพิ่มใหม่อีกครั้ง จาก 108 แถบ cDNA ที่มีการแสดงออกแตกต่างกัน ที่ได้จากการทำ differential display

รหัสแถบ DNA	รูปแบบ	ผล PCR
OsD1A11-1	1	-
OsD1A11-2	1	++
OsD1A11-3	1	++
OsD1A13-4	1	++
OsD1A14-5	1	++
OsD1A14-6	1	++
OsD1A14-7	1	-
OsD1A14-8	1	+
OsD1A14-9	1	++
OsD1A15-10	1	++
OsD1A15-11	1	++
OsD1A15-12	1	++
OsD1A16-1	1	++
OsD1A16-2	1	-
OsD1A16-3	1	++
OsD1A16-4	2	++
OsD1A17-5	2	+
OsD1A17-6	1	+
OsD1A17-7	1	++
OsD1B13-8	1	++
OsD1B13-9	1	++
OsD1B14-10	1	++
OsD1B14-11	1	++
OsD1B14-12	1	++
OsD1B14-13	1	++
OsD1B15-1	2	++

รหัสแถบ DNA	รูปแบบ	ผล PCR
OsD1B15-2	2	++
OsD1B15-3	2	-
OsD1B15-4	4	++
OsD1B15-5	1	++
OsD1B16-6	1	++
OsD1B16-7	1	++
OsD1B16-8	1	-
OsD1B16-9	1	++
OsD1B16-10	1	++
OsD1B16-11	1	++
OsD1B17-12	1	++
OsD1B17-13	1	++
OsD1B17-14	1	++
OsD1B17-15	1	++
OsD1B17-16	1	++
OsD1B18-17	2	++
OsD1B18-18	2	++
OsD1B19-19	2	++
OsD1C01-1	1	++
OsD1C01-2	1	+
OsD1C01-3	1	++
OsD1C03-4	1	+
OsD1C04-5	1	++
OsD1C04-6	1	++
OsD1C04-7	1	++
OsD1C04-8	1	+

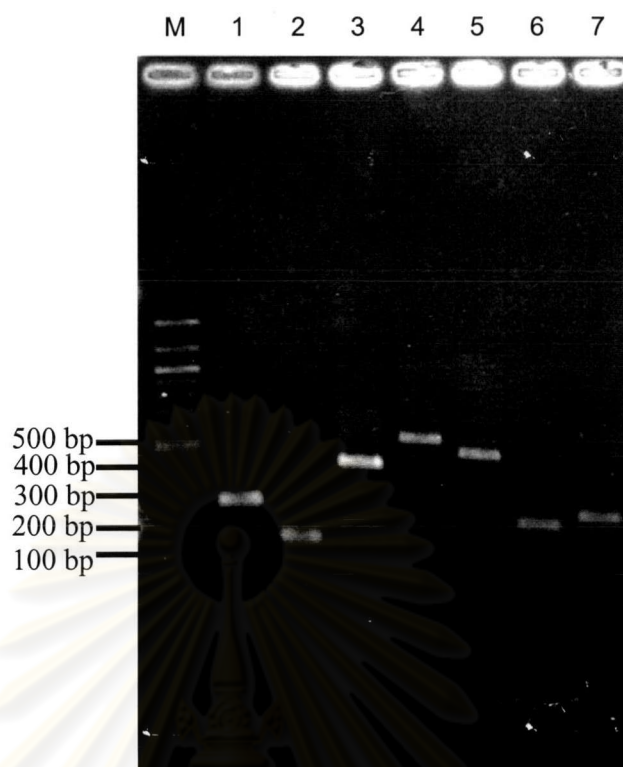
ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัสแถบ DNA	รูปแบบ	ผล PCR
OsD1C04-9	1	+
OsD1C05-14	1	-
OsD1C05-15	1	-
OsD1C09-10	1	++
OsD1C09-11	1	++
OsD1C09-12	1	+
OsD1C09-13	1	++
OsD1C10-14	1	++
OsD1C10-15	1	+
OsD2B15-1	4	++
OsD2B15-2	1	++
OsD2C01-3	2	++
OsD3A11-1	3	++
OsD3A11-2	3	++
OsD3A11-3	3	++
OsD3A11-4	3	+
OsD3B15-1	2	-
OsD4A14-1	4	+
OsD4B14-2	1	+
OsD4B14-3	1	++
OsD4B14-4	1	+
OsD4B14-5	1	-
OsD4B14-6	1	-
OsD4B19-4	3	-
OsD4C01-1	1	+
OsD4C04-2	3	+
OsD4C04-3	3	+
OsD4C05-7	1	-

รหัสแถบ DNA	รูปแบบ	ผล PCR
OsD4C05-8	1	+
OsD4C05-9	3	+
OsD5B18-1	4	+
OsD5B19-2	1	++
OsD5C01-3	1	++
OsD5C01-4	1	++
OsD5C01-5	1	++
OsD5C05-1	1	+
OsD5C05-2	4	++
OsD5C05-3	4	++
OsD5C10-6	2	++
OsD5C10-7	1	++
OsD8A13-1	2	-
OsD8A14-2	2	-
OsD8A15-3	2	-
OsD8A16-4	4	-
OsD8A17-5	4	-
OsD8B13-6	2	+
OsD8B14-7	2	-
OsD8B14-9	4	-
OsD8B14-10	3	-
OsD8B17-1	4	+
OsD8B19-2	3	++
OsD8C03-3	2	-
OsD8C04-4	2	+
OsD8C05-8	2	-
OsD8C10-5	4	-
OsD8C10-6	4	-

- โดย 1 = รูปแบบของแถบ cDNA แบบที่ 1 ที่พบเฉพาะในข้าว LPT123-TC171  
หลังจากที่ได้รับภาวะเค็มเท่านั้น
- 2 = รูปแบบของแถบ cDNA แบบที่ 2 ที่พบเฉพาะในข้าว LPT123-TC171 ทั้ง  
ในภาวะปกติ และในภาวะเค็ม
- 3 = รูปแบบของแถบ cDNA แบบที่ 3 ที่พบในข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์  
หลังจากได้รับภาวะเค็มเท่านั้น
- 4 = รูปแบบของแถบ cDNA แบบที่ 4 ที่พบในข้าวทั้งสองพันธุ์/สายพันธุ์ แต่มี  
ระดับความเข้มของแถบ cDNA ไม่เท่ากัน
- = ชิ้นส่วน cDNA ที่ไม่สามารถสังเคราะห์ปริมาณเพิ่มใหม่ได้
  - + = ชิ้นส่วน cDNA ที่ผ่านการสังเคราะห์ปริมาณเพิ่มใหม่ แต่มีปริมาณน้อยไม่  
สามารถนำไปโคลนได้
  - ++ = ชิ้นส่วน cDNA ที่ผ่านการสังเคราะห์ปริมาณเพิ่มใหม่ และมีปริมาณมาก  
พอที่จะนำไปโคลนได้





รูปที่ 4 รูปแบบของแถบ DNA ที่สังเคราะห์เพิ่มปริมาณจาก PCR ใหม่ได้

M = DNA marker

1 = PCR จากชิ้นส่วน cDNA ของ OsD1B14-12

2 = PCR จากชิ้นส่วน cDNA ของ OsD1B18-18

3 = PCR จากชิ้นส่วน cDNA ของ OsD1A13-4

4 = PCR จากชิ้นส่วน cDNA ของ OsD1A14-5

5 = PCR จากชิ้นส่วน cDNA ของ OsD1A14-6

6 = PCR จากชิ้นส่วน cDNA ของ OsD5C05-2

7 = PCR จากชิ้นส่วน cDNA ของ OsD1A14-9

ตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ derived amino acid sequence ของ cDNA โคลน เมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลสากลของ EMBL databases โดยใช้ Blast algorithm ของ Altschul และคณะ (1997)

No.	cDNA Fragment	Fragment size (bp)	Proteins that show the most similarity	Organism	Accession no. (EMBL)	Percent amino acid similarity	Percent amino acid identity	Remark
1	OsD1B16-1	260	RIM2 protein	<i>Oryza sativa</i>	Q9XEW2	100	100	
2	OsD1B15-5	152	putative 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphate 2-phosphatase	<i>Oryza sativa</i>	Q8W170	100	100	
3	OsD5C05-2	259	Expressed protein, having alternative splicing products	<i>Oryza sativa</i>	Q75GB9	100	100	
4	OsD1B14-12	290	Hypothetical protein	<i>Oryza sativa</i>	Q7XU53	100	100	
5	OsD1B18-18	204	Hypothetical protein	<i>Oryza sativa</i>	Q7XTT4	100	100	

ตารางที่ 3 (ต่อ)

No.	cDNA Fragment	Fragment size (bp)	Proteins that show the most similarity	Organism	Accession no. (EMBL)	Percent amino acid similarity	Percent amino acid identity	Remark
6	OsD3A11-3	667	Glutamate synthase small subunit	<i>Klebsiella aerogenes</i>	Q93913	99	97	
7	OsD5C05-3	418	Putative cell wall protein	<i>Oryza sativa</i>	Q6F3A8	98	98	
8	OsD2B15-2	280	NAD(P) H-quinone oxidoreductase	<i>Oryza sativa</i>	P12159	98	98	
9	OsD3A11-1	669	Glutamate synthase small subunit	<i>Klebsiella aerogenes</i>	Q93913	98	97	
10	OsD3A11-2	666	Glutamate synthase small subunit	<i>Klebsiella aerogenes</i>	Q93913	98	97	

ตารางที่ 3 (ต่อ)

No.	cDNA Fragment	Fragment size (bp)	Proteins that show the most similarity	Organism	Accession no. (EMBL)	Percent amino acid similarity	Percent amino acid identity	Remark
11	OsD1B15-4	349	PRLI-interacting factor L-like	<i>Oryza sativa</i>	Q69IK7	98	97	
12	OsD1A14-9	284	Hypothetical protein	<i>Oryza sativa</i>	Q947X8	98	95	
13	OsD1B14-10	385	Hypothetical protein	<i>Acinetobacter</i> sp.(strain ADP1)	Q6FF51	96	96	
14	OsD1B14-13	384	Hypothetical protein	<i>Acinetobacter</i> sp.(strain ADP1)	Q6FF51	94	94	
15	OsD1A13-4	427	Putative sulfate permease	<i>Acinetobacter</i> sp.(strain ADP1)	Q6F7B7	94	87	

ตารางที่ 3 (ต่อ)

No.	cDNA Fragment	Fragment size (bp)	Proteins that show the most similarity	Organism	Accession no. (EMBL)	Percent amino acid similarity	Percent amino acid identity	Remark
16	OsD1A15-12	541	Alkanesulfonate transport protein (ABC superfamily)	<i>Acinetobacter sp.</i> (strain ADP1)	Q6FFY7	88	80	
17	OsD1A16-1 (pBluescript II KS <sup>+</sup> )	283	High affinity Zn transport protein (ABC superfamily)	<i>Acinetobacter sp.</i> (strain ADP1)	Q6FFK8	89	76	
18	OsD1B17-12	441	D-alanine/D-serine/glycine transport protein (APC family)	<i>Acinetobacter sp.</i> (strain ADP1)	Q6F947	85	79	
19	OsD5C10-7	462	Putative acyl-CoA synthetase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9CAP8	87	72	
20	OsD5C01-5	491	Putative molybdenum cofactor biosynthesis protein A	<i>Oryza sativa</i>	Q6K248	80	76	

ตารางที่ 3 (ต่อ)

No.	cDNA Fragment	Fragment size (bp)	Proteins that show the most similarity	Organism	Accession no. (EMBL)	Percent amino acid similarity	Percent amino acid identity	Remark
21	OsD1A14-5	543	Succinyl-CoA synthetase beta	<i>Pseudomonas solanacearum</i>	Q8Y1Y3	74	64	
22	OsD1B14-11	350	HmsR protein	<i>Xanthomonas axonopodis</i>	Q8PLI7	76	57	
23	OsD5B19-2	318	Transcriptional regulator, AraC family	<i>Streptococcus faecalis</i>	Q834Q1	74	58	
24	OsD1C10-14	272	Putative disease resistance protein	<i>Oryza sativa</i>	Q8S5G6	64	64	
25	OsD1A17-7	252	Hypothetical protein	<i>Oryza sativa</i>	Q69UE5	61	57	

ตารางที่ 3 (ต่อ)

No.	cDNA Fragment	Fragment size (bp)	Proteins that show the most similarity	Organism	Accession no. (EMBL)	Percent amino acid similarity	Percent amino acid identity	Remark
26	OsD2C01-3	279	Putative reverse transcriptase	<i>Oryza sativa</i>	Q8EK18	59	57	
27	OsD1B19-19	346	Alpha-amylase	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Q88ZW5	67	48	
28	OsD8B19-2	311	Putative phosphofructokinase beta subunit	<i>Arabidopsis thaliana</i>	O81437	65	46	
29	OsD1B15-1	280	AcrB/AcrD/AcrF-family cation efflux system protein	<i>Bacteroides fragilis</i>	Q64PF1	65	45	

ตารางที่ 3 (ต่อ)

No.	cDNA Fragment	Fragment size (bp)	Proteins that show the most similarity	Organism	Accession no. (EMBL)	Percent amino acid similarity	Percent amino acid identity	Remark
30	OsD1A15-11	309	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(P)+] (NAD(P)H-dependent glycerol-3- phosphate dehydrogenase)	<i>Leptospira interrogans</i>	Q8EZB6	59	42	
31	OsD1C01-1	252	Hypothetical protein	<i>Oryza sativa</i>	Q75KC4	55	44	
32	OsD1A14-6	489	Putative RING zinc finger protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Q9SZS2	51	48	
33	OsD1A15-10	408	Two-component hybrid sensor and regulator	<i>Anabaena sp. (strain PCC 7120)</i>	Q8YLX3	53	33	
34	OsD5C01-4	586	L-zip+NBS+LRR	<i>Oryza sativa</i>	Q9ZQT7	50	29	



ตารางที่ 3 (ต่อ)

No.	cDNA Fragment	Fragment size (bp)	Proteins that show the most similarity	Organism	Accession no. (EMBL)	Percent amino acid similarity	Percent amino acid identity	Remark
35	OsD1B17-15	318	Hypothetical protein	<i>Dictyostelium discoideum</i> (Slime mold)	Q861Y3	47	31	
36	OsD1B13-8	507	Hypothetical protein	<i>Vibrio cholerae</i>		44	29	
37	OsD1B16-9	580						*
38	OsD1B17-14	440						*
39	OsD1B16-7	440						*
40	OsD1B16-6	440						*
41	OsD1B16-10	440						*
42	OsD1C09-13	370						*

ตารางที่ 3 (ต่อ)

No.	cDNA Fragment	Fragment size (bp)	Proteins that show the most similarity	Organism	Accession no. (EMBL)	Percent amino acid similarity	Percent amino acid identity	Remark
43	OsD1B17-16	340						*
44	OsD1B17-13	330						*
45	OsD5C01-3	300						*
46	OsD1B18-17	300						*
47	OsD1B15-2	240						*
48	OsD1B13-9							*
49	OsD1C01-3							*
50	OsD1C04-6							*
51	OsD1C09-10							*
52	OsD1C09-11							*
53	OsD4B14-3							*
54	OsD5C10-6							*

ตารางที่ 3 (ต่อ)

No.	cDNA Fragment	Fragment size (bp)	Proteins that show the most similarity	Organism	Accession no. (EMBL)	Percent amino acid similarity	Percent amino acid identity	Remark
55	OsD1A11-2							**
56	OsD1A11-3							**
57	OsD1A16-3							**
58	OsD1A16-4							**
59	OsD1C04-5							**
60	OsD1C04-7							**
61	OsD2B15-1							**

หมายเหตุ:

\* ไม่สามารถวิเคราะห์ผลลำดับเบสได้

\*\* ไม่สามารถโคลนได้

### 3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน DNA

หลังจากนำ cDNA จำนวน 54 โคลน ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการให้บริการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ของหน่วยบริการทางชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรม และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ จากนั้นจึงนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มา translate ให้เป็นลำดับกรดอะมิโนใน ExPASy homepage (Gasteiger และคณะ, 2003) แล้วจึงทำการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ได้กับฐานข้อมูลสากล EMBL databases โดยใช้ Blast algorithm ของ Altschul และคณะ (1997) เพื่อตรวจสอบชนิด และวิเคราะห์หน้าที่ของยีนดังกล่าว โดยทำการเปรียบเทียบในระดับโปรตีน พบว่าชิ้นส่วน cDNA ที่ได้มี derived amino acid sequence คล้ายคลึงกับโปรตีนหลายชนิด ทั้งในข้าว *Arabidopsis* และแบคทีเรีย โดยโปรตีน 27 ชนิด มีการศึกษาหน้าที่แล้ว ในขณะที่โปรตีน 9 ชนิด ยังไม่มีรายงานหน้าที่ สำหรับลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนอีกจำนวน 18 โคลนไม่สามารถอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ แต่สามารถประมาณขนาดของ insert DNA ได้ ซึ่งโปรตีนที่มีการศึกษาหน้าที่แล้ว เป็นโปรตีนที่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนในข้าว 10 โคลน คล้ายคลึงกับโปรตีนใน *Arabidopsis* 3 โคลน และ คล้ายคลึงกับโปรตีนของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ 14 โคลน ส่วนโคลนที่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่นั้น เป็นโปรตีนที่คล้ายคลึงกับโปรตีนของข้าว 5 โคลน และ คล้ายคลึงกับโปรตีนของจุลินทรีย์ 4 โคลน (ตารางที่ 3)

### 4. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่โคลนได้ด้วย northern blot analysis

จากการนำ total RNA มาวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่โคลนได้ด้วยวิธี northern blot analysis โดยทำการแยกแถบ RNA ด้วย formaldehyde gel electrophoresis และใช้ชิ้นส่วน cDNA ที่โคลนได้เป็น probe โดยได้ทำการคัดเลือกโคลนที่นำมาใช้เป็น probe เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนดังนี้ OsD1B16-11 (RIM2 protein) OsD1B15-5 (putative 6-phosphofructo-2-kinase/ fructose-2, 6-bisphosphate 2-phosphatase) OsD5C05-2 (expressed protein, having alternative splicing products) OsD1B14-12 (hypothetical protein) OsD1B18-18 (hypothetical protein) OsD5C05-3 (putative cell wall protein) OsD2B15-2 (NAD(P)H-quinone oxidoreductase) OsD3A11-1 (glutamate synthase small subunit) OsD1B15-4 (PRLI-interacting factor L-like) พบว่า จาก probe ทั้ง 9 ชนิด สามารถตรวจสอบการแสดงออกของยีนได้จาก probe 4 ชนิด

คือ OsD1B16-11 OsD1B15-5 OsD1B18-18 และ OsD2B15-2 โดยผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนใน total RNA ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อพืช 2 ชุดการทดลอง ให้ผลดังนี้

#### 4.1 การแสดงออกของยีนเมื่อใช้ OsD1B16-11 เป็น probe

ผลจากการใช้ OsD1B16-11 เป็น probe พบว่ามีสัญญาณการแสดงออกของยีนจำนวน 1 แถบ ขนาดประมาณ 3.4 kb เฉพาะในข้าว LPT123-TC171 ทั้งที่อยู่ในภาวะปกติและได้รับภาวะเค็มเท่านั้น แต่สัญญาณการแสดงออกของยีนในข้าว LPT123-TC171 ที่ได้รับภาวะเค็มมีมากกว่าในภาวะปกติ โดยผลการทดลองจากเนื้อเยื่อพืชทั้ง 2 ชุด ให้ผลสอดคล้องกัน (รูปที่ 5ข)

#### 4.2 การแสดงออกของยีนเมื่อใช้ OsD1B15-5 เป็น probe

ผลจากการใช้ OsD1B15-5 เป็น probe พบว่ามีสัญญาณการแสดงออกของยีนจำนวน 1 แถบ ขนาดประมาณ 3.5 kb ในข้าว LPT123 ที่ได้รับในภาวะเค็ม และข้าว LPT123-TC171 ทั้งที่อยู่ในภาวะปกติและได้รับภาวะเค็มเท่านั้น โดยที่ไม่พบสัญญาณการแสดงออกของยีนในข้าว LPT123 ที่อยู่ในภาวะปกติ ซึ่งผลการทดลองจากเนื้อเยื่อพืชทั้ง 2 ชุด ให้ผลสอดคล้องกัน (รูปที่ 6ข)

#### 4.3 การแสดงออกของยีนเมื่อใช้ OsD1B18-18 เป็น probe

ผลจากการใช้ OsD1B18-18 เป็น probe พบว่ามีสัญญาณการแสดงออกของยีนจำนวน 1 แถบ ขนาดประมาณ 3.5 kb เฉพาะข้าว LPT123 ที่ได้รับในภาวะเค็ม และข้าว LPT123-TC171 ทั้งที่อยู่ในภาวะปกติและได้รับภาวะเค็มเท่านั้น โดยมีระดับสัญญาณการแสดงออกของยีนไม่แตกต่างกัน ซึ่งผลการทดลองจากเนื้อเยื่อพืชทั้ง 2 ชุด ให้ผลสอดคล้องกัน (รูปที่ 7ข)

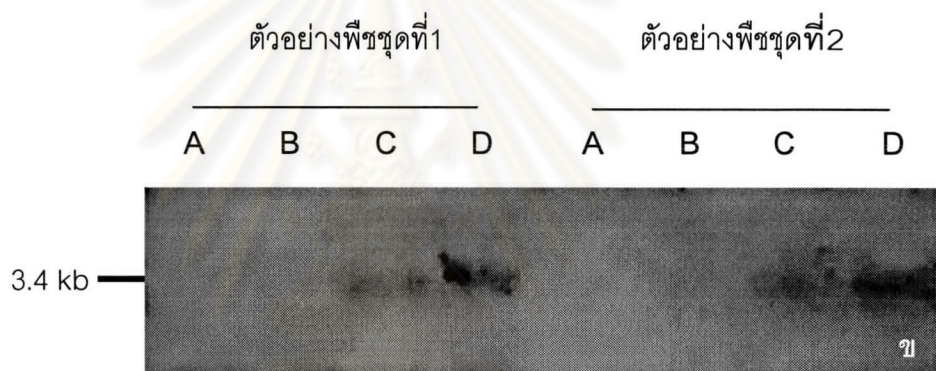
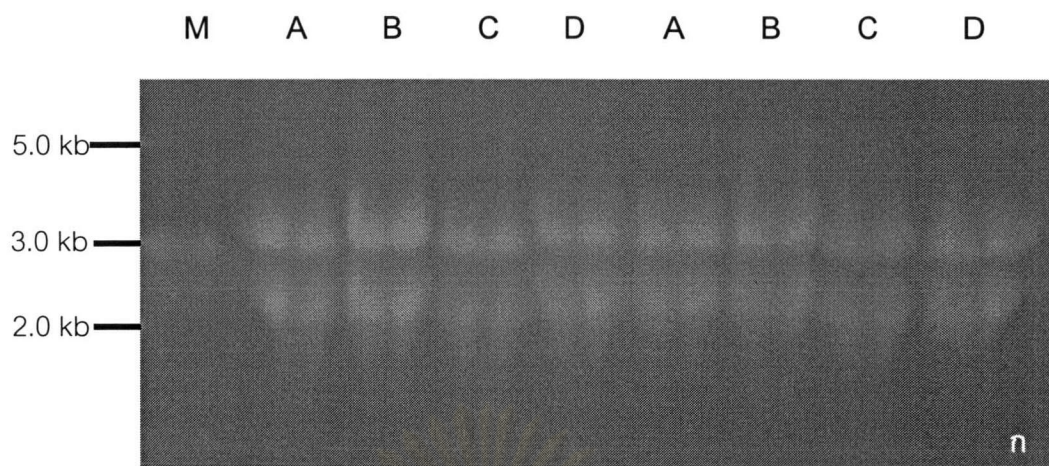
#### 4.4 การแสดงออกของยีนเมื่อใช้ OsD2B15-2 เป็น probe

ผลจากการใช้ OsD2B15-2 เป็น probe พบว่ามีสัญญาณการแสดงออกของยีนจำนวน 1 แถบ ขนาดประมาณ 3.4 kb ซึ่งพบในทุกตัวอย่างของข้าวที่ใช้ในการทดลอง แต่มีระดับการแสดงออกที่แตกต่างกัน โดยพบว่าข้าว LPT123 ที่อยู่ในภาวะปกติ มีสัญญาณการแสดงออกของยีนน้อยกว่า ข้าว LPT123 ที่ได้รับภาวะเค็ม และข้าว LPT123-TC171 ทั้งที่อยู่ในภาวะปกติ และได้รับภาวะเค็ม ทั้ง 2 ชุดการทดลอง แต่เนื้อเยื่อพืชชุดที่ 1 พบสัญญาณการแสดงออกของยีนในข้าว LPT123-TC171 ที่ได้รับภาวะเค็มมากกว่า ข้าว LPT123-

TC171 ที่อยู่ในภาวะปกติ ในขณะที่เนื้อเยื่อพืชชุดที่ 2 พบสัญญาณการแสดงออกของยีนใน  
ข้าว LPT123-TC171 ที่ได้รับภาวะเค็มน้อยกว่า ข้าว LPT123-TC171 ที่อยู่ในภาวะปกติ  
(รูปที่ 8๗)



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี northern blot analysis เมื่อใช้ OsD1B16-11 เป็น probe

(ก) รูปแบบของ total RNA ที่สกัดจากข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 เมื่อแยกด้วย 1% formaldehyde gel

(ข) northern blot analysis ของข้าว LPT123 และ LPT123-TC171 ที่ปลูกในภาวะปกติ และภาวะเค็ม

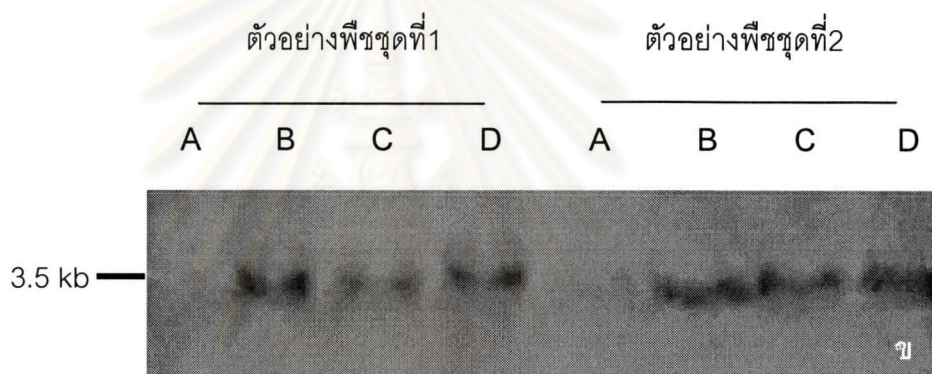
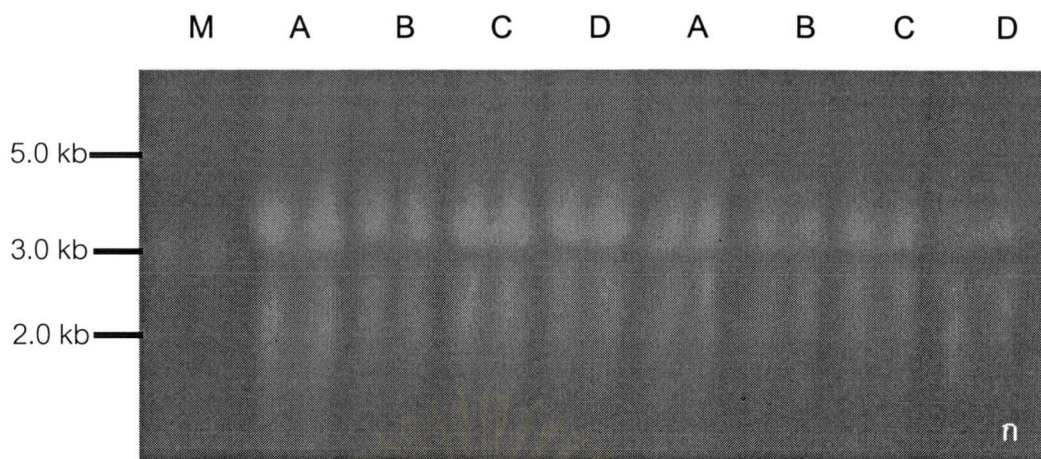
โดย M = RNA marker

A = LPT123 ภาวะปกติ

B = LPT123 ภาวะเค็ม

C = LPT123-TC171 ภาวะปกติ

D = LPT123-TC171 ภาวะเค็ม



รูปที่ 6 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี northern blot analysis เมื่อใช้ OsD1B15-5 เป็น probe

(ก) รูปแบบของ total RNA ที่สกัดจากข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 เมื่อแยกด้วย 1% formaldehyde gel

(ข) northern blot analysis ของข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 ที่ปลูกในภาวะปกติ และภาวะเค็ม

โดย M = RNA marker

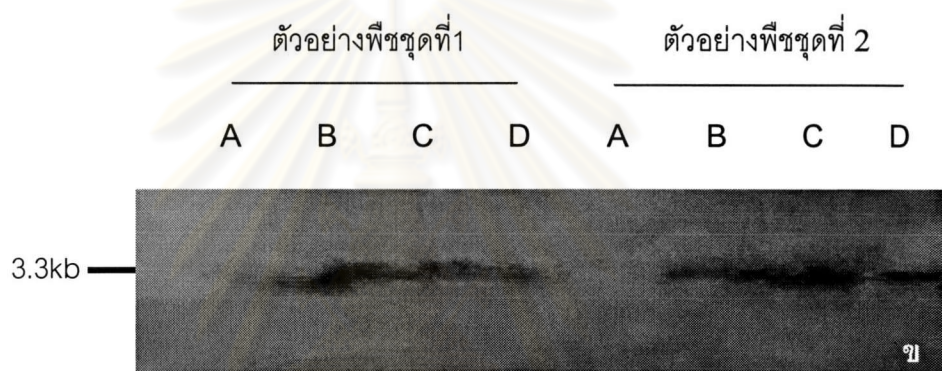
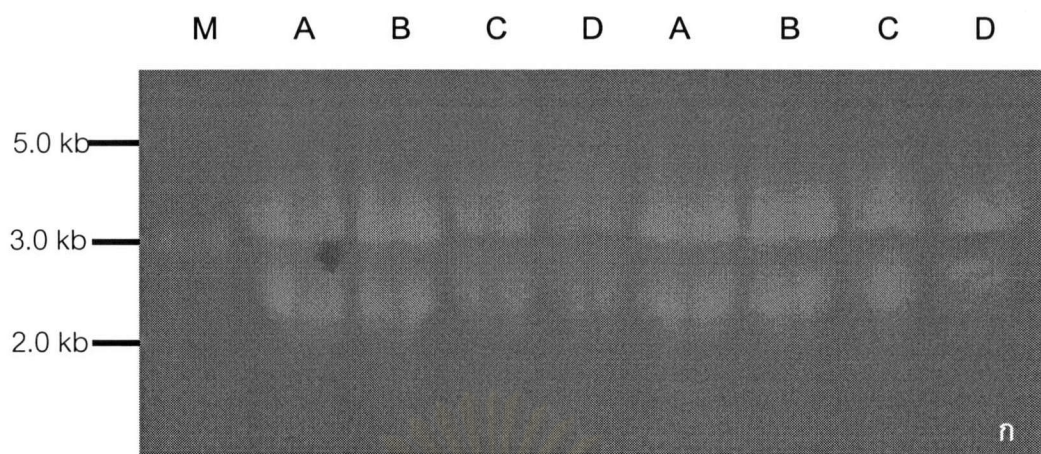
A = LPT123 ภาวะปกติ

B = LPT123 ภาวะเค็ม

C = LPT123 -TC171 ภาวะปกติ

D = LPT123-TC171 ภาวะเค็ม





รูปที่ 7 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี northern blot analysis เมื่อใช้ OsD1B18-18 เป็น probe

(ก) รูปแบบของ total RNA ที่สกัดจากข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 เมื่อแยกด้วย 1% formaldehyde gel

(ข) northern blot analysis ของข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 ที่ปลูกในภาวะปกติ และภาวะเค็ม

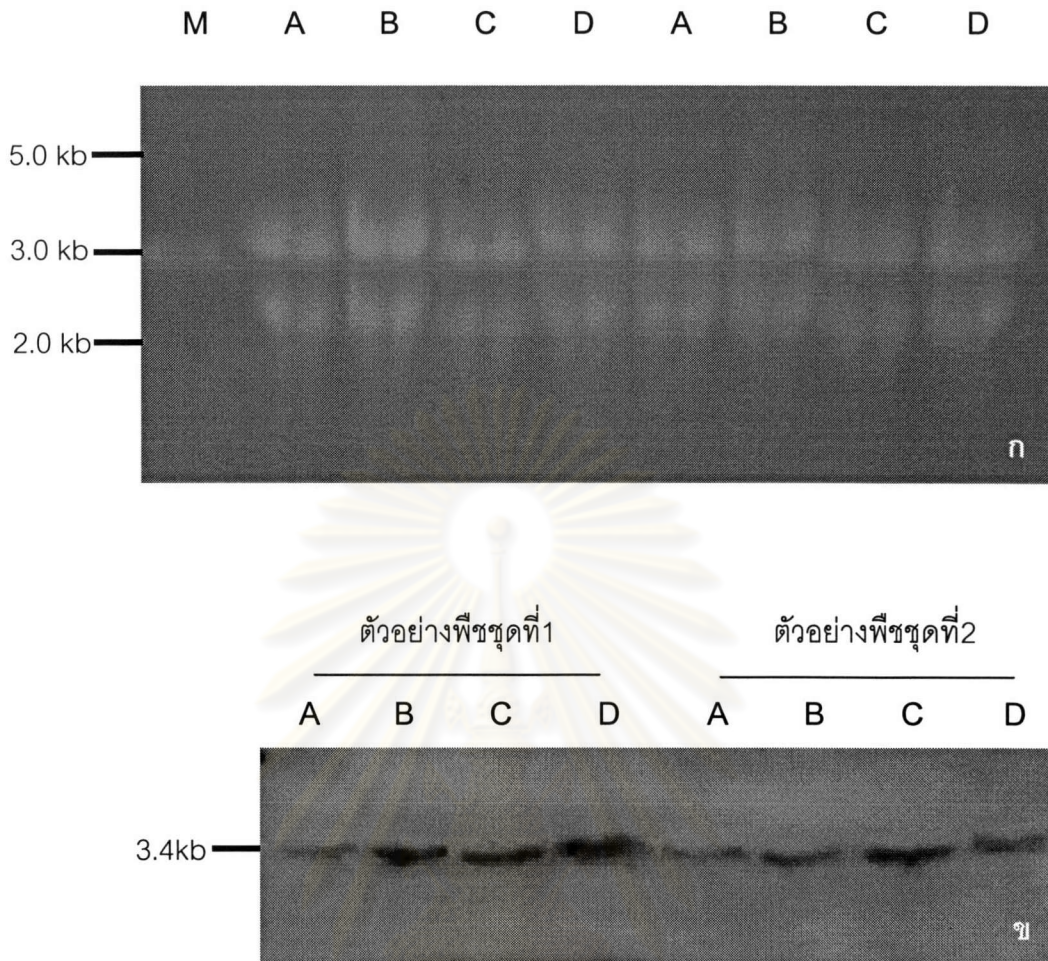
โดย M = RNA marker

A = LPT123 ภาวะปกติ

B = LPT123 ภาวะเค็ม

C = LPT123-TC171 ภาวะปกติ

D = LPT123-TC171 ภาวะเค็ม



รูปที่ 8 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี northern blot analysis เมื่อใช้ OsD2B15-2 เป็น probe

(ก) รูปแบบของ total RNA ที่สกัดจากข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 เมื่อแยกด้วย 1% formaldehyde gel

(ข) northern blot analysis ของข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 ที่ปลูกในภาวะปกติ และภาวะเค็ม

โดย M = RNA marker

A = LPT123 ภาวะปกติ

B = LPT123 ภาวะเค็ม

C = LPT123-TC171 ภาวะปกติ

D = LPT123-TC171 ภาวะเค็ม

หลังจากที่ตรวจพบสัญญาณการแสดงออกยีนใน total RNA ด้วยการทำ northern blot analysis จากโคลน OsD1B16-11 OsD1B15-5 OsD1B18-18 และ OsD2B15-2 จึงได้ทำการ submit ข้อมูลของยีนจากทั้ง 4 โคลนในฐานะข้อมูลของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) ซึ่งทาง NCBI ได้กำหนด accession number แก่โคลนทั้ง 4 ดังนี้

OsD1B16-11 : accession number DQ012287

OsD1B15-5 : accession number DQ012288

OsD1B18-18 : accession number DQ012289

OsD2B15-2 : accession number DQ012290



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย