

บทที่ 4

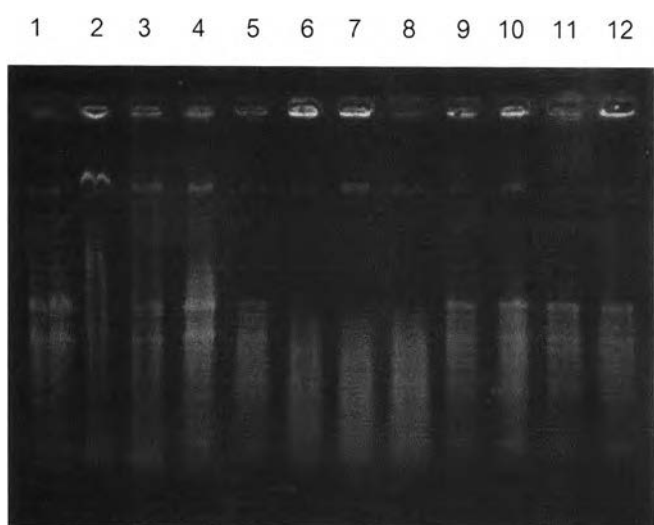
ผลการทดลอง

1. ศึกษาวิธีการสกัด total RNA ที่เหมาะสมสำหรับกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอื้องสกุล'

1.1 เปรียบเทียบปริมาณ และคุณภาพของ total RNA ที่สกัดจากใบอ่อนของกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอื้องสกุล' ที่ได้จากวิธีการสกัด total RNA 3 วิธี ได้แก่ วิธีของ Thikart และคณะ (2005) วิธีดัดแปลง Yu และ Goh (2000) แบบที่ 1 และวิธีดัดแปลง Yu และ Goh (2000) แบบที่ 2

เมื่อเปรียบเทียบคุณภาพ total RNA ที่สกัดได้ โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า ในตัวกลาง คือ 0.8% agarose gel ใน 1X TBE บัฟเฟอร์ พบว่า total RNA ตามวิธีของ Thikart และคณะ (2005) สามารถสกัด total RNA ได้ แต่แถบ RNA ที่เกิดขึ้นนั้น ไม่มีความสม่ำเสมอ และพบการปนเปื้อนของ genomic DNA จำนวนมาก (รูปที่ 4, lane 1-4) นอกจากนี้พบการสลายตัวของ total RNA ในบางตัวอย่าง (รูปที่ 4, lane 2) สำหรับวิธีดัดแปลง Yu และ Goh (2000) แบบที่ 1 สามารถสกัด total RNA ได้ปริมาณน้อย แต่มีการปนเปื้อนของ genomic DNA น้อยกว่าวิธีของ Thikart และคณะ (2005) (รูปที่ 4, lane 5 และ 8) อย่างไรก็ตามก็ยังพบการสลายตัวของ RNA (รูปที่ 4, lane 6-8) ในขณะที่วิธีดัดแปลง Yu และ Goh (2000) แบบที่ 2 พบว่าแถบ RNA ที่ได้มีความคมชัด และไม่มีการสลายตัวของ RNA เกิดขึ้น นอกจากนี้ยังมีการปนเปื้อนของ genomic DNA น้อยกว่าวิธีของ Thikart และคณะ (2005) (รูปที่ 4, lane 9-12)

เมื่อเปรียบเทียบคุณภาพ และปริมาณของ total RNA ที่สกัดได้ โดยวิธี spectrophotometric measurement (Sambrook และคณะ, 1989) ซึ่งวัดค่าดูดกลืนแสงของ total RNA ที่ค่าความยาวคลื่น 230 260 และ 280 นาโนเมตร พบว่าสัดส่วนการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260/280 นาโนเมตร ($OD_{260/280}$) ซึ่งแสดงคุณภาพของ total RNA จากวิธีของ Thikart และคณะ (2005) วิธีดัดแปลง Yu และ Goh (2000) แบบที่ 1 และวิธีดัดแปลง Yu และ Goh (2000) แบบที่ 2 มีค่าเฉลี่ยทั้ง 4 ซ้ำเป็น 1.84 1.40 และ 1.30 ตามลำดับ สำหรับความเข้มข้นของ total RNA (ไมโครกรัมต่อ 100 มิลลิกรัมปริมาณเนื้อเยื่อ) ที่สกัดได้จากทั้ง 3 วิธี มีค่าเฉลี่ยทั้ง 4 ซ้ำเป็น 2.70 0.89 และ 1.38 $\mu\text{g}/100 \text{ mg}$ ปริมาณเนื้อเยื่อ ตามลำดับ (ตารางที่ 3)



รูปที่ 4 คุณภาพของ total RNA ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อใบอ่อนของกล้วยไม้ น้ำหนัก 0.4 กรัม โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า ในตัวกลาง คือ 0.8% agarose gel ใน 1X TBE บัฟเฟอร์ ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที

lane 1-4 : total RNA ที่สกัดโดยวิธี Thikart และคณะ (2005)

lane 5-8 : total RNA ที่สกัดโดยวิธีดัดแปลง Yu และ Goh (2000) แบบที่ 1

lane 9-12: total RNA ที่สกัดโดยวิธีดัดแปลง Yu และ Goh (2000) แบบที่ 2

ตารางที่ 3 คุณภาพ และปริมาณของ total RNA ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อใบอ่อนของกล้วยไม้ น้ำหนัก 0.4 กรัม ที่สกัดด้วยวิธีต่างๆ เมื่อตรวจสอบโดยวิธี spectrophotometric measurement

วิธีสกัด total RNA (ครั้งที่)	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น (nm)			สัดส่วนการ ดูดกลืนแสง ที่ความยาว คลื่น (nm)	ความเข้มข้นของ total RNA ที่สกัด ได้ ($\mu\text{g}/100\text{mg}$ ปริมาณเนื้อเยื่อ)
	230	260	280		
THI 1	2.29E-02	3.89E-02	2.20E-02	1.768	1.56
THI 2	2.77E-02	4.28E-02	2.49E-02	1.719	1.71
THI 3	6.30E-02	1.21E-01	6.18E-02	1.958	4.48
THI 4	3.89E-02	7.64E-02	3.98E-02	1.920	3.06
PVP 1	2.51E-02	2.62E-02	1.87E-02	1.401	1.05
PVP 2	9.50E-03	1.22E-02	9.85E-03	1.239	0.49
PVP 3	1.42E-02	1.61E-02	1.19E-02	1.353	0.64
PVP 4	2.27E-02	3.47E-02	2.16E-02	1.606	1.39
PVPP 1	2.20E-02	2.54E-02	1.84E-02	1.380	1.02
PVPP 2	3.50E-02	4.37E-02	3.35E-02	1.304	1.75
PVPP 3	4.03E-02	3.93E-02	3.38E-02	1.163	1.57
PVPP 4	2.61E-02	2.92E-02	2.11E-02	1.384	1.17

หมายเหตุ

THI : วิธี Thikart และคณะ (2005)

PVP : วิธีดัดแปลง Yu และ Goh (2000) แบบที่ 1

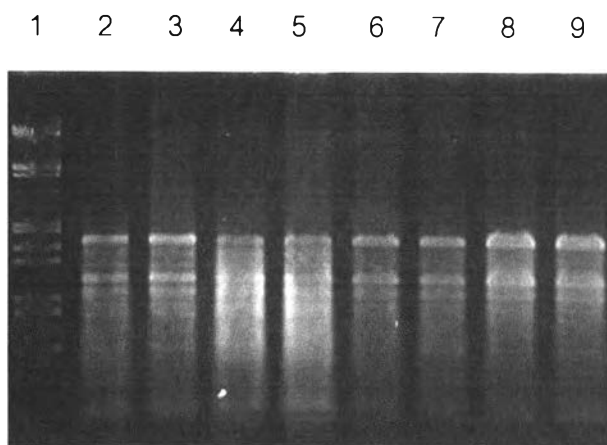
PVPP: วิธีดัดแปลง Yu และ Goh (2000) แบบที่ 2

1.2 ศึกษาปริมาณเนื้อเยื่อที่เหมาะสมต่อการสกัด total RNA ของกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอื้องสกุล'

จากการศึกษาในข้อ 1.1 พบว่าวิธีดัดแปลง Yu และ Goh (2000) แบบที่ 2 ซึ่งเป็นวิธีที่ลดขั้นตอนการบ่มเนื้อเยื่อพืชที่บดละเอียดใน extraction buffer ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของ extraction buffer โดยการใช้ PVPP แทนการใช้ PVP เป็นวิธีที่เหมาะสมกว่าวิธีอื่น จึงนำมาศึกษาปริมาณเนื้อเยื่อที่เหมาะสมต่อการสกัด โดยเปรียบเทียบน้ำหนักเนื้อเยื่อ 0.1 0.2 0.3 และ 0.4 กรัม ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบคุณภาพ total RNA ที่สกัดได้ โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า ในตัวกลาง คือ 0.8% agarose gel ใน 1X TBE บัฟเฟอร์ พบว่าแถบของ RNA ที่สกัดจากเนื้อเยื่อจากใบอ่อนของกล้วยไม้ปริมาณ 0.1 กรัม (รูปที่ 5, lane 2-3) มีความคมชัดที่สุดในขณะที่แถบของ RNA ที่สกัดจากเนื้อเยื่อจากใบอ่อนของกล้วยไม้ปริมาณ 0.2 กรัม (รูปที่ 5, lane 4-5) 0.3 กรัม (รูปที่ 5, lane 6-7) 0.4 กรัม (รูปที่ 5, lane 8-9) มีความคมชัดรองลงมาตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบคุณภาพ และปริมาณของ total RNA ที่สกัดได้ โดยวิธี spectrophotometric measurement พบว่าสัดส่วน $OD_{260/280}$ ของ RNA ที่สกัดจากเนื้อเยื่อใบอ่อนของกล้วยไม้ปริมาณ 0.1 กรัม มีค่ามากที่สุด ขณะที่สัดส่วน $OD_{260/280}$ ของ total RNA ที่สกัดจากเนื้อเยื่อใบอ่อนของกล้วยไม้ปริมาณ 0.2 0.3 และ 0.4 กรัม มีค่ารองลงมาตามลำดับ สำหรับปริมาณ total RNA ที่สกัดได้ เมื่อเทียบเป็นไมโครกรัม total RNA / 100 มิลลิกรัมของเนื้อเยื่อจากใบอ่อนของกล้วยไม้ พบว่า total RNA ที่สกัดจากเนื้อเยื่อจากใบอ่อนของกล้วยไม้ปริมาณ 0.2 กรัม มีปริมาณมากที่สุด รองลงมาคือ total RNA ที่สกัดจากเนื้อเยื่อจากใบอ่อนของกล้วยไม้ปริมาณ 0.1 0.3 และ 0.4 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 4)



รูปที่ 5 คุณภาพของ total RNA ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อใบอ่อนของกล้าวัยไม้ ปริมาณ 0.1 0.2 0.3 และ 0.4 กรัม ตามลำดับ โดยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า ในตัวกลาง คือ 0.8% agarose gel ใน 1X TBE บัฟเฟอร์ ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที

lane 1 : Lamda DNA digested with *EcoRI* and *HindIII*

lane 2-3 : total RNA ที่สกัดจากเนื้อเยื่อใบอ่อนของกล้าวัยไม้ 0.1 กรัม

lane 4-5 : total RNA ที่สกัดจากเนื้อเยื่อใบอ่อนของกล้าวัยไม้ 0.2 กรัม

lane 6-7 : total RNA ที่สกัดจากเนื้อเยื่อใบอ่อนของกล้าวัยไม้ 0.3 กรัม

lane 8-9 : total RNA ที่สกัดจากเนื้อเยื่อใบอ่อนของกล้าวัยไม้ 0.4 กรัม

ตารางที่ 4 คุณภาพ และปริมาณของ total RNA ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อใบอ่อนของกล้วยไม้ ปริมาณ 0.1 0.2 0.3 และ 0.4 กรัม ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบโดยวิธี spectrophotometric measurement

ปริมาณเนื้อเยื่อ (g)	ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น (nm)			สัดส่วนการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น (nm)	ความเข้มข้นของ total RNA ที่สกัดได้ ($\mu\text{g} / 100 \text{ mg}$ ปริมาณเนื้อเยื่อ)
	230	260	280		
0.1	1.32E-03	2.01E-02	1.10E-02	1.83	1.61
0.1	1.21E-03	2.58E-02	1.40E-02	1.84	2.06
0.2	1.73E-02	5.39E-02	3.17E-02	1.70	2.15
0.2	1.04E-02	4.17E-02	2.47E-02	1.69	1.67
0.3	2.98E-02	5.66E-02	3.75E-02	1.51	1.51
0.3	1.64E-02	4.71E-02	2.91E-02	1.62	1.26
0.4	1.50E-02	4.73E-02	2.90E-02	1.63	0.92
0.4	2.46E-02	4.65E-02	3.22E-02	1.44	0.92



2. ศึกษาการแสดงออกของยีน โดยวิธี differential display

จากการศึกษาความแตกต่างในการแสดงออกของยีนในกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอื้องสกุล' ชุดควบคุม และชุดที่ได้รับโคโตซาน โดยวิธี differential display (Liang และ Pardee, 1992) โดยใช้ oligo dT₁₁ NN primer จำนวน 8 โพรเมอร์ ร่วมกับ arbitrary primers จำนวน 9 โพรเมอร์ รวมเป็น 72 คู่โพรเมอร์ (ภาคผนวก ค) พบความแตกต่างของแถบ cDNA ที่สังเคราะห์ได้จากกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอื้องสกุล' ชุดควบคุม และชุดที่ได้รับโคโตซาน ระหว่างคู่โพรเมอร์ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 คู่โพรเมอร์ที่ตรวจพบความแตกต่างของแถบ cDNA ที่สังเคราะห์ได้จากกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอื้องสกุล' ทั้ง 2 ชุดการทดลอง

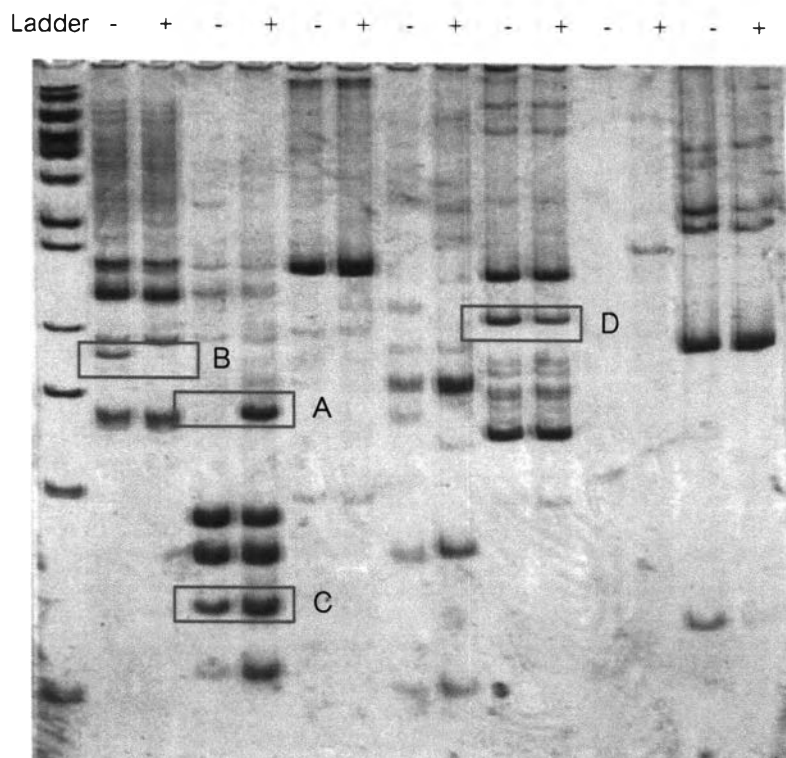
anchored primer arbitrary primer	A-12	A-15	A-16	A-19	A-20	B-11	B-12	B-13	B-14
dT1	√	-	√	-	-	√	√	√	√
dT2	-	√	√	√	-	√	-	-	-
dT3	√	√	√	-	√	√	√	√	-
dT4	√	√	√	√	√	√	√	√	√
dT5	-	√	√	√	-	-	√	√	√
dT6	√	√	√	√	√	√	-	√	-
dT7	-	√	√	√	-	√	√	√	√
dT8	√	√	√	√	√	√	√	√	-

หมายเหตุ : เครื่องหมาย √ คือ คู่โพรเมอร์ที่พบความแตกต่างของแถบ cDNA ที่สังเคราะห์ได้จากกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอื้องสกุล' ทั้ง 2 ชุดการทดลอง

เครื่องหมาย - คือ ไม่พบความแตกต่างของแถบ cDNA เมื่อตรวจสอบด้วยคู่โพรเมอร์ดังกล่าว

รูปแบบความแตกต่างของ cDNA ที่ได้จากการศึกษาการแสดงออกของยีนระหว่างกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอี้ยสกุล' ชุดควบคุม และชุดที่ได้รับโคโตซาน โดยวิธี differential display สามารถแบ่งได้เป็น 4 แบบ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งไม่ได้รับโคโตซาน โดยพบแถบ cDNA ที่แตกต่างรวมทั้งสิ้น 145 แถบ ดังตัวอย่างแสดงในรูปที่ 6

- แบบที่ 1 พบการสร้างแถบ cDNA ขึ้นมาใหม่ หลังจากกล้วยไม้ได้รับโคโตซาน (รูปที่ 6A) จำนวน 27 แถบ
- แบบที่ 2 พบการหายไปของแถบ cDNA หลังจากกล้วยไม้ได้รับโคโตซาน (รูปที่ 6B) จำนวน 36 แถบ
- แบบที่ 3 ความเข้มของแถบ cDNA เพิ่มขึ้น หลังจากกล้วยไม้ได้รับโคโตซาน (รูปที่ 6C) จำนวน 45 แถบ
- แบบที่ 4 ความเข้มของแถบ cDNA ลดลง หลังจากกล้วยไม้ได้รับโคโตซาน (รูปที่ 6D) จำนวน 37 แถบ



รูปที่ 6 รูปแบบความแตกต่างของ cDNA ที่ได้จากการศึกษาการแสดงออกของยีนโดยวิธี differential display - : ชุดการทดลองที่ไม่ได้รับโคโตซาน (ชุดควบคุม)
+ : ชุดการทดลองที่ได้รับโคโตซาน

A คือ พบการสร้างแถบ cDNA ขึ้นมาใหม่ หลังจากกล้วยไม้ได้รับโคโตซาน

B คือ พบการหายไปของแถบ cDNA หลังจากกล้วยไม้ได้รับโคโตซาน

C คือ ความเข้มของแถบ cDNA เพิ่มขึ้น หลังจากกล้วยไม้ได้รับโคโตซาน

D คือ ความเข้มของแถบ cDNA ลดลง หลังจากกล้วยไม้ได้รับโคโตซาน

3. โคลนชิ้นส่วน cDNA ที่แตกต่างกันระหว่างกล้วยไม้ทั้ง 2 ชุดการทดลอง เข้าในเวกเตอร์ที่เหมาะสม

การกำหนดการเรียกคู่ไพรเมอร์ ใช้ระบบตัวเลข 2 ตัว ตัวเลขตัวหน้า หมายถึง oligo dT primer ส่วนตัวเลขตัวหลัง หมายถึง arbitrary primer โดยมีรายละเอียด ดังตารางที่ 6 เช่น ตัวอย่างคู่ไพรเมอร์ 36 หมายถึง การใช้ oligo dT3 primer ร่วมกับ arbitrary primers B-11 เป็นต้น

หลังจากการเปรียบเทียบรูปแบบของแถบ cDNA ที่ได้จากกล้วยไม้ทั้ง 2 ชุดการทดลอง จึงทำการคัดเลือกแถบ cDNA ที่แตกต่างกันจำนวน 67 แถบ จากแถบ cDNA ที่แตกต่างกันทั้งหมด 145 แถบ (ตารางที่ 5) เพื่อทำการโคลนในขั้นต่อไป

ตารางที่ 6 การกำหนดการเรียกคู่ไพรเมอร์

หมายเลขตัวหน้า	ชื่อ oligo dT primer
1	dT1
2	dT2
3	dT3
4	dT4
5	dT5
6	dT6
7	dT7
8	dT8

หมายเลขตัวหลัง	ชื่อ arbitrary primer
1	A-12
2	A-15
3	A-16
4	A-19
5	A-20
6	B-11
7	B-12
8	B-13
9	B-14

ตารางที่ 7 แถบ cDNA ที่มีรูปแบบแตกต่างกัน จำนวน 67 แถบที่คัดเลือกจากคูโพรเมอร์ทั้งหมด เพื่อทำการโคลน

คูโพรเมอร์	จำนวนแถบ cDNA ที่คัดเลือก จาก polyacrylamide gel	คูโพรเมอร์	จำนวนแถบ cDNA ที่คัดเลือก จาก polyacrylamide gel
16	2	49	2
18	5	52	1
19	1	53	2
23	2	54	2
24	1	58	2
26	2	59	2
31	1	63	3
33	3	64	2
35	2	65	1
36	3	66	3
42	3	73	3
43	2	76	5
44	1	77	1
45	1	86	4
46	1	87	1
47	3	รวม	67

ทำการสกัด cDNA ที่คัดเลือกออกจาก polyacrylamide gel ด้วยวิธี crush and soak (Sambrook และคณะ, 1989) แล้วทำการเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยวิธี PCR โดยใช้คูโพรเมอร์เดิม จากนั้นทำการตรวจสอบชิ้นส่วน cDNA ที่ได้ ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis และสกัด cDNA ที่ต้องการออกจากเจล โดยใช้ Ultra Clean™ 15 DNA purification kit (MO BIO Laboratories, Inc., CA, USA) แล้วโคลนชิ้นส่วน cDNA ดังกล่าวเข้าในเวกเตอร์ pGEM-T โดยใช้ pGEM-T cloning kit (Promega, MD, USA)

พบชิ้นส่วน cDNA ที่แตกต่างระหว่างกล้วยไม้ทั้ง 2 ชุดการทดลองที่สามารถโคลนได้ จำนวน 19 ชิ้น จาก 13 คู่ไพรเมอร์ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 คู่ไพรเมอร์ และชิ้นส่วน cDNA ที่สามารถโคลนได้ในเวกเตอร์ pGEM-T

คู่ไพรเมอร์	ชื่อชิ้นส่วน cDNA ที่สามารถโคลนได้	ขนาดชิ้นส่วน cDNA (bp)	รูปแบบความแตกต่าง ของ cDNA จาก differential display
16	<i>De161</i>	400	D
	<i>De163</i>	400	D
	<i>De164</i>	200	D
18	<i>De181</i>	500	A
	<i>De182</i>	720	A
	<i>De183</i>	700	A
19	<i>De192</i>	700	C
36	<i>De362</i>	450	A
44	<i>De441</i>	750	D
46	<i>De461</i>	300	A
52	<i>De521</i>	300	B
54	<i>De541</i>	900	D
63	<i>De631</i>	300	B
64	<i>De642</i>	350	B
	<i>De643</i>	400	B
73	<i>De7323</i>	300	C
76	<i>De7625</i>	250	C
	<i>De7696</i>	200	C
86	<i>De8612</i>	200	A

หมายเหตุ

- A คือ เกิดการสร้างแถบ cDNA ขึ้นมาใหม่ หลังจากกล้วยไม้ได้รับโคโตซาน
- B คือ เกิดการหายไปของแถบ cDNA หลังจากกล้วยไม้ได้รับโคโตซาน
- C คือ ความเข้มของแถบ cDNA เพิ่มขึ้น หลังจากกล้วยไม้ได้รับโคโตซาน
- D คือ ความเข้มของแถบ cDNA ลดลง หลังจากกล้วยไม้ได้รับโคโตซาน

4. วิเคราะห์ชนิดของยีนที่มีการตอบสนองต่อโคโคซานในกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอี้ยสกุล'

ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ที่มีการแสดงออกแตกต่างกันในกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอี้ยสกุล' ชุดควบคุม และชุดที่ได้รับโคโคซาน ทั้ง 19 โคลน โดยการใช้บริการของหน่วยบริการชีวภาพศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ แล้วทำการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA กับข้อมูลในฐานข้อมูลสากล ได้แก่ GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใช้โปรแกรม nucleotide-nucleotide BLAST (blastn) (ภาคผนวก ค) และ align two sequence (bl2seq) เพื่อตรวจสอบความคล้ายคลึงกับยีนที่มีผู้ศึกษาไว้ พบว่า 5 โคลนมีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลสากล ในขณะที่อีก 14 โคลน ไม่พบว่ามี ความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ใดในฐานข้อมูลนี้ (ตารางที่ 9)

ทำการศึกษเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน โดยการแปลรหัสพันธุกรรมด้วยโปรแกรม Protein Translation ของเว็บไซต์ ExpASY แล้วตรวจสอบความคล้ายคลึงกับโปรตีนในฐานข้อมูลของ European Molecular Biology Laboratory (EMBL) โดยใช้โปรแกรม Swiss-Prot/TrEMBL พบว่าลำดับกรดอะมิโนของ cDNA จำนวน 10 โคลน มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนในฐานข้อมูล ในขณะที่ 9 โคลน ไม่พบว่ามี ความคล้ายคลึงโปรตีนใดในฐานข้อมูลนี้ (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 9 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ที่โคลนได้กับข้อมูลในฐานข้อมูลสากล GenBank ของ NCBI โดยใช้โปรแกรม bl2seq

หมายเลขโคลน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลที่คล้ายคลึงกัน	สิ่งมีชีวิต	Accession no.	Percent nucleotide sequence identity
<i>De164</i> (177 bp)	<i>Calycanthus fertilis</i> var. <i>ferax</i> complete chloroplast genome (3-170) ^a	<i>Calycanthus floridus</i> var. <i>glaucus</i>	AJ428413 (90662-90829) ^b (149453-149620) ^b	85% (144/168) ^c
<i>De362</i> (389 bp)	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) genomic DNA, chromosome 7, complete sequence (185-272) ^a	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	AP008213 (27026313-27026400) ^b	85% (75/88) ^c
	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group) genomic DNA, chromosome 7, PAC clone:P0427D10 (185-272) ^a	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	AP004272 (29554-29641) ^b	85% (75/88) ^c

ตารางที่ 9 (ต่อ)

หมายเลขโคลน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลที่คล้ายคลึงกัน	สิ่งมีชีวิต	Accession no.	Percent nucleotide sequence identity
De541 (561 bp)	<i>Drimys sp.</i> YLQ-2003 26S ribosomal RNA gene, partial sequence (14-560) ^a	<i>Drimys sp.</i>	AY292882 (2613-3158) ^b	97% (534/547) ^c
	<i>Drimys winteri</i> large subunit 26S ribosomal RNA gene, partial (14-560) ^a	<i>Drimys winteri</i>	AF036491 (2634-3179) ^b	97% (534/547) ^c
De642 (372 bp)	<i>Glycine max</i> Gm cnx-1 mRNA for calnexin, complete cds (7-150) ^a	<i>Glycine max</i>	AB196933 (1158-1301) ^b	83% (120/144) ^c
	<i>Glycine max</i> calnexin mRNA, complete cds (7-150) ^a	<i>Glycine max</i>	U20502 (1098-1241) ^b	83% (120/144) ^c

ตารางที่ 9 (ต่อ)

หมายเลขโคลน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลที่คล้ายคลึงกัน	สิ่งมีชีวิต	Accession no.	Percent nucleotide sequence identity
De7696 (177 bp)	<i>Calycanthus fertilis</i> var. <i>ferax</i> complete chloroplast genome (8-175) ^a	<i>Calycanthus floridus</i> var. <i>glaucus</i>	AJ428413 (90662-90829) ^b (149453-149620) ^b	86% (145/168) ^c
De161 (377 bp)				*
De163 (316 bp)				*
De181 (235 bp)				*
De182 (727 bp)				*
De183 (734 bp)				*

ตารางที่ 9 (ต่อ)

หมายเลขโคลน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลที่คล้ายคลึงกัน	สิ่งมีชีวิต	Accession no.	Percent nucleotide sequence identity
<i>De192</i> (607 bp)				*
<i>De441</i> (691 bp)				*
<i>De461</i> (296 bp)				*
<i>De521</i> (318 bp)				*
<i>De631</i> (296 bp)				*
<i>De643</i> (404 bp)				*

ตารางที่ 9 (ต่อ)

หมายเลขโคลน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลที่คล้ายคลึงกัน	สิ่งมีชีวิต	Accession no.	Percent nucleotide sequence identity
<i>De7323</i> (281 bp)				*
<i>De7625</i> (245 bp)				*
<i>De8612</i> (175 bp)				*

หมายเหตุ:

- ^a หมายถึง ช่วงลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนที่ใช้เปรียบเทียบ
- ^b หมายถึง ช่วงลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้อมูลในฐานข้อมูลสากลที่ใช้เปรียบเทียบ
- ^c หมายถึง จำนวนนิวคลีโอไทด์ของกล้วยไม้ / จำนวนนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตที่ใช้เปรียบเทียบ
- * หมายถึง ไม่พบว่ามี ความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ใดในฐานข้อมูลสากล GenBank ของ NCBI

ตารางที่ 10 ผลการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของ cDNA ที่โคลนได้กับข้อมูลในฐานข้อมูลของ EMBL โดยใช้โปรแกรม Swiss-Prot / TrEMBL

หมายเลข โคลน	โปรตีนในฐานข้อมูลที่ตรวจพบความ คล้ายคลึงกัน	สิ่งมีชีวิต	Accession no. (EMBL)	Percent amino acid similarity	Percent amino acid identity
De161 (125 aa)	Hypothetical outer membrane usher protein yhcD [Precursor] (32-116) ^a	<i>Escherichia coli</i>	P45420 (159-242) ^b	55% (48/85) ^c	31% (27/85) ^c
De164 (58 aa)	Orf204 protein (7-59) ^a	<i>Beta vulgaris L.</i>	Q9MF42 (1-53) ^b	80% (40/50) ^c	84% (42/50) ^c
De182 (242 aa)	Hypothetical protein OSJNBa0055N24.35 (37-203) ^a	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	Q5Z6I5 (175-347) ^b	64% (113/173) ^c	50% (88/173) ^c



ตารางที่ 10 (ต่อ)

หมายเลข โคลน	โปรตีนในฐานข้อมูลที่ตรวจพบความ คล้ายคลึงกัน	สิ่งมีชีวิต	Accession no. (EMBL)	Percent amino acid similarity	Percent amino acid identity
<i>De183</i> (244 aa)	Hypothetical protein OSJNBa0055N24.35 (65-160) ^a	<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)	Q5Z6I5 (210-308) ^b	62% (62/99) ^c	47% (47/99) ^c
<i>De192</i> (198 aa)	Hypothetical protein (4-81) ^a	<i>Xylella fastidiosa</i>	Q87CY1 (9-87) ^b	44% (36/80) ^c	33% (27/80) ^c
<i>De362</i> (129 aa)	A_IG005I10.24 protein (synonym F5I10.24 protein Hypothetical protein AT4g00450) (5-129) ^a	<i>Arabidopsis thaliana</i> (<i>Mouse-ear cress</i>)	O23057 (1216-1342) ^b	55% (71/127) ^c	45% (58/127) ^c

ตารางที่ 10 (ต่อ)

หมายเลข โคลน	โปรตีนในฐานข้อมูลที่ตรวจพบความ คล้ายคลึงกัน	สิ่งมีชีวิต	Accession no. (EMBL)	Percent amino acid similarity	Percent amino acid identity
<i>De441</i> (230 aa)	Hypothetical protein (9-226) ^a	<i>Acinetobacter sp.</i> strain ADP1	Q6F7K8 (24-242) ^b	45% (103/223) ^c	27% (61/223) ^c
<i>De642</i> (123 aa)	Calnexin [Fragment] (1-123) ^a	<i>Zea mays</i>	Q41798 (234-330) ^b	64% (80/123) ^c	52% (65/123) ^c
<i>De7625</i> (88 aa)	Putative sensor histidine kinase/ response regulator (2-73) ^a	<i>Photobacterium profundum</i>	Q6LMS6 (378-449) ^b	70% (51/72) ^c	47% (34/72) ^c
<i>De7696</i> (58 aa)	Orf204 protein (8-57) ^a	<i>Beta vulgaris L.</i>	Q5U6J4 (1-50) ^b	84% (42/50) ^c	80% (40/50) ^c

ตารางที่ 10 (ต่อ)

หมายเลข โคลน	โปรตีนในฐานข้อมูลที่ตรวจพบความ คล้ายคลึงกัน	สิ่งมีชีวิต	Accession no. (EMBL)	Percent amino acid similarity	Percent amino acid identity
<i>De163</i>				*	*
<i>De181</i>				*	*
<i>De461</i>				*	*
<i>De521</i>				*	*
<i>De541</i>				*	*
<i>De631</i>				*	*
<i>De643</i>				*	*
<i>De7323</i>				*	*
<i>De8612</i>				*	*

หมายเหตุ:

- ^a หมายถึง ช่วงลำดับกรดอะมิโนของโคลนที่ใช้เปรียบเทียบ
- ^b หมายถึง ช่วงลำดับกรดอะมิโนของข้อมูลในฐานข้อมูลสากลที่ใช้เปรียบเทียบ
- ^c หมายถึง จำนวนกรดอะมิโนของกล้วยไม้ / จำนวนกรดอะมิโนของสิ่งมีชีวิตที่ใช้เปรียบเทียบ
- * หมายถึง ไม่พบว่ามี ความคล้ายคลึงกับโปรตีนใดในฐานข้อมูลสากลของ EMBL

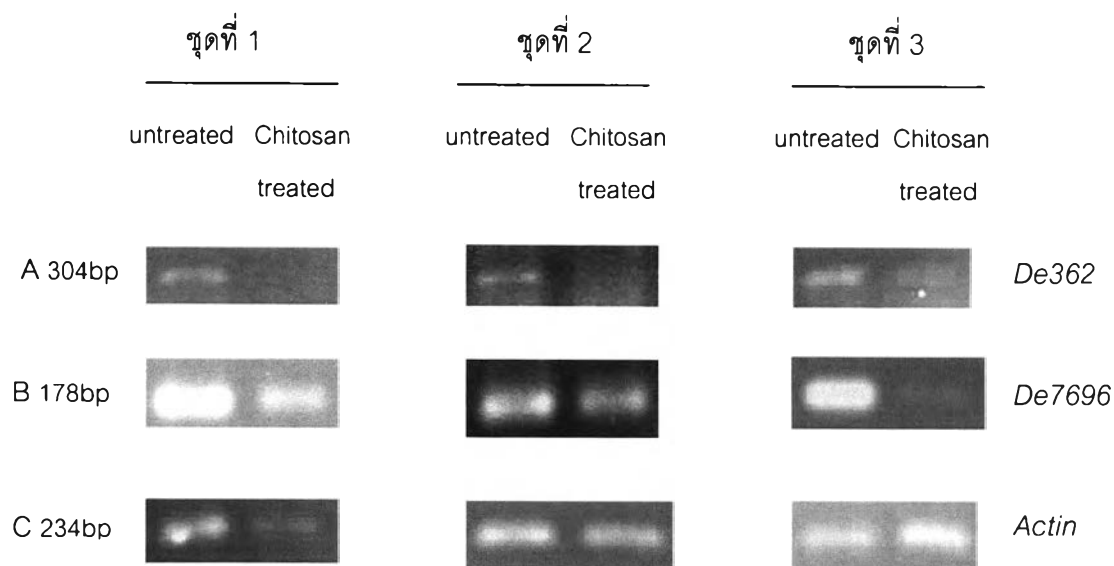
5. วิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่คัดเลือกได้จากการทำ differential display

ศึกษาการแสดงออกของยีนที่โคลนได้จากกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอี้ยสกุล' ทั้ง 2 ชุด การทดลอง โดยใช้วิธี RT-PCR analysis ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนแต่ละยีน ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง จากเนื้อเยื่อ 3 ชุด โดยแต่ละชุดประกอบด้วยเนื้อเยื่อใบอ่อนของกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอี้ยสกุล' ที่ฉีดพ่นด้วยน้ำกรอง และที่ฉีดพ่นด้วยสารละลายโคโตซาน 'O80' ที่ความเข้มข้น 10 ppm แล้ว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เมื่อศึกษาการแสดงออกของ *De362* ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับโครโมโซมที่ 7 ของข้าว (*Oryza sativa*) โดยการใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อ *De362* ในการตรวจสอบการแสดงออกของ *De362* พบว่าเมื่อต้นกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอี้ยสกุล' ได้รับโคโตซาน จะมีการแสดงออกของยีนดังกล่าวลดลง โดยผลการทดลองจากเนื้อเยื่อพืชทั้ง 3 ชุด ให้ผลสอดคล้องกัน (รูปที่ 7A)

เมื่อศึกษาการแสดงออกของ *De7696* ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับคลอโรพลาสต์จีโนมของ *Calycanthus floridus* var. *glaucus* พบว่าเมื่อต้นกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอี้ยสกุล' ได้รับโคโตซาน *De7696* มีการแสดงออกลดลง และเมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนดังกล่าวในเนื้อเยื่อกล้วยไม้อีก 2 ชุด ก็ให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกัน (รูปที่ 7B)

ในการทดลองนี้ใช้ Actin specific primer ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะกับ actin mRNA ของ *Dendrobium thyrsiflorum* (Skipper, 2005) เป็นไพรเมอร์ควบคุม ปริมาณ total RNA และปฏิกิริยา reverse transcription ที่ได้จาก total RNA ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อใบอ่อน แต่ละชุด การทดลอง (รูปที่ 7C) ส่วนการทดลองชุดควบคุมที่ปราศจาก RT-product ไม่ปรากฏแถบ DNA (ไม่แสดงภาพ)



รูปที่ 7 เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนต่างๆ ระหว่างกล้วยไม้สกุลหวายชุดควบคุม และชุดที่ได้รับโคโตซาน ที่ศึกษาจากเนื้อเยื่อกล้วยไม้จำนวน 3 ชุด

A คือ ผลการตรวจสอบการแสดงออกของ *De362* ในกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอี้ยสกุล'

B คือ ผลการตรวจสอบการแสดงออกของ *De7696* ในกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอี้ยสกุล'

C คือ ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *Actin* ในกล้วยไม้สกุลหวาย 'เอี้ยสกุล'