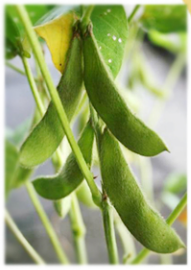
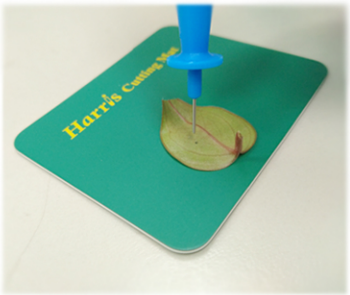
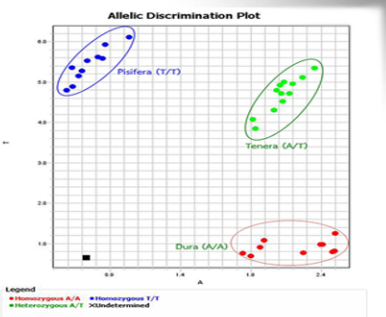
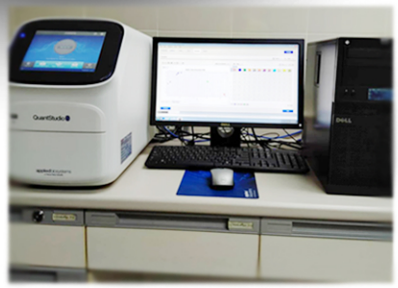
การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบดีเอ็นเอพืชอย่างรวดเร็ว

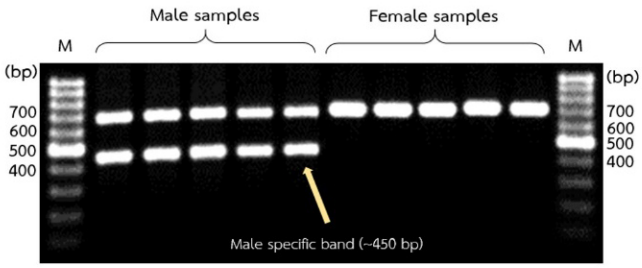
กรมวิชาการเกษตร

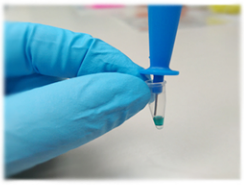












กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร

การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบ ดีเอ็นเอพืชอย่างรวดเร็ว

เอกสารฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการจัดการความรู้
กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร
ประจำปี 2563

คำนำ

ปัจจุบันเทคโนโลยีชีวภาพมีบทบาทสำคัญในด้านการเกษตร เช่น การขยายพันธุ์พืชให้ได้ปริมาณมากในเวลาที่รวดเร็วโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีลักษณะทางการเกษตรตามต้องการโดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม และการตรวจสอบ จำแนก และคัดเลือกพันธุ์พืชให้มีลักษณะตามต้องการโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ เป็นต้น ข้อมูลระดับสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอสามารถบอกถึงความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตได้ละเอียดและแม่นยำกว่าการแยกความแตกต่างจากสิ่งที่เห็นภายนอกที่อาจได้รับอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อม เครื่องหมายดีเอ็นเอมีประโยชน์หลายด้าน เช่น ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืช ได้แก่ การคัดเลือกลูกผสม การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์ นอกจากนี้ใช้ในการระบุสายพันธุ์และการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต

เอกสารเรื่อง การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบดีเอ็นเอพืชอย่างรวดเร็ว ฉบับนี้ได้รวบรวมความรู้เกี่ยวกับดีเอ็นเอและการสกัดดีเอ็นเอ ทฤษฎีพีซีอาร์ การใช้ประโยชน์ของเครื่องหมายดีเอ็นเอ รวมถึงการประยุกต์ใช้เทคนิคต่างๆ ในการตรวจสอบพืชอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะเป็นประโยชน์และช่วยให้นักวิจัยและผู้ปฏิบัติงานด้านการตรวจสอบดีเอ็นเอพืชได้ทราบความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับดีเอ็นเอและหลักการในการตรวจสอบพืชด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลระดับดีเอ็นเอ รวมถึงการพัฒนาประยุกต์วิธีการให้สะดวกรวดเร็วและมีความปลอดภัยยิ่งขึ้น เพื่อเป็นการประหยัดเวลา ค่าใช้จ่าย และปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงาน ซึ่งนักวิจัยหรือผู้ปฏิบัติงานด้านนี้สามารถนำวิธีการเหล่านี้ไปใช้การตรวจสอบพืชได้และเป็นประโยชน์แก่งานวิจัยต่อไป

(นายดนัย นาคประเสริฐ)
ผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
สิงหาคม 2563

กิตติกรรมประกาศ

เอกสารประกอบการฝึกอบรม เรื่อง การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบดีเอ็นเอพืชอย่างรวดเร็ว ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการจัดการความรู้ (Knowledge Management) ของสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ตามแผนจัดการความรู้ของกรมวิชาการเกษตร โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเป็นการรวบรวมและจัดการความรู้ด้านการสกัดและตรวจสอบดีเอ็นเอพืชให้เป็นระบบ สามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการปฏิบัติงานได้

การจัดทำเอกสารฉบับนี้สำเร็จลงด้วยความร่วมมือของคณะทำงานตัวชี้วัดระดับความสำเร็จของการจัดการความรู้ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปี 2563 ทุกท่าน และขอขอบพระคุณ ดร. หทัยรัตน์ อุไรรงค์ มหาวิทยาลัยรังสิต อดีตผู้เชี่ยวชาญด้านเทคโนโลยีชีวภาพของกรมวิชาการเกษตร ที่ได้เสียสละเวลาในการเพิ่มเติมตรวจแก้ไขเอกสารฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น และขอขอบพระคุณผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ รวมทั้งผู้มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่านที่ให้การสนับสนุนในการจัดทำเอกสารและการฝึกอบรมในครั้งนี้

คณะทำงานตัวชี้วัดระดับความสำเร็จของการจัดการความรู้ ประจำปี 2563

สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

31 สิงหาคม 2563

สารบัญ

บทนำ	1
ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับดีเอ็นเอและการสกัดดีเอ็นเอจากพืช	3
ทฤษฎีพีซีอาร์	12
เครื่องหมายดีเอ็นเอในการตรวจสอบพืช	18
การประยุกต์ใช้เทคนิคการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี SDS/NaCl ในถั่วเหลือง	30
การประยุกต์ใช้เทคนิคการบดชิ้นส่วนพืชโดยการตีด้วยเม็ดลูกเหล็กเพื่อสกัดดีเอ็นเอ อย่างรวดเร็วสำหรับการตรวจเพศอินทผลัม	35
การประยุกต์ใช้การเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบอย่างรวดเร็วเพื่อตรวจสอบตำแหน่งสนิปส์ ในปาล์มน้ำมันด้วยเทคนิค Real-time PCR	41
การประยุกต์ใช้เทคนิคการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบในการตรวจสอบยีนที่ได้รับการถ่ายฝาก ในหน้าวัวและยาสูบโดยวิธี Direct PCR	46

บทนำ

มัลลิกา แก้ววิเศษ

ปัจจุบันการตรวจสอบสิ่งมีชีวิตโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นแนวทางหนึ่งที่มีผู้สนใจและมีพัฒนาการที่รวดเร็ว และนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ทั้งด้านการเกษตร สิ่งแวดล้อม การแพทย์ โบราณคดี กระบวนการยุติธรรม โดยด้านการเกษตรการพัฒนาวิธีการตรวจสอบพืชอย่างง่ายและรวดเร็วด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอจะช่วยให้การดำเนินงานวิจัยเป็นไปได้อย่างสะดวกและรวดเร็ว รวมทั้งใช้ประโยชน์ในแง่การปรับปรุงพันธุ์ได้ด้วย ซึ่งองค์ความรู้ในการพัฒนาวิธีการตรวจสอบพืชดังกล่าวยังสามารถถ่ายทอดให้กับบุคลากรภายในและภายนอกหน่วยงาน รวมถึงนักศึกษาและผู้สนใจ

วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ใช้อยู่เดิมมีหลายขั้นตอน มีความยุ่งยากซับซ้อน ใช้เวลา มีค่าใช้จ่ายสูง และมีความจำเป็นต้องใช้อุปกรณ์และเครื่องมือหลายอย่าง รวมถึงมีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์อันตราย เช่น ฟีนอล คลอโรฟอร์ม ซึ่งเป็นสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อผิวหนังและระบบประสาท ต้องใช้ด้วยความระมัดระวัง ดังนั้นนักวิจัยจึงได้พยายามพัฒนาการสกัดและตรวจสอบดีเอ็นเอพืชที่ง่ายไม่ยุ่งยาก ลดการใช้สารเคมีอันตราย ลดขั้นตอนทำให้ลดระยะเวลาในการปฏิบัติงานและลดค่าใช้จ่าย เพื่อให้สะดวกและปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงาน รวมถึงได้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องแม่นยำตามหลักวิชาการและได้ผลไม่แตกต่างจากวิธีการเดิม

ในการที่จะทำงานทางด้านการตรวจสอบดีเอ็นเอพืชอย่างรวดเร็วจำเป็นจะต้องมีความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับดีเอ็นเอและการสกัดดีเอ็นเอจากพืช เพื่อให้ทราบถึงองค์ประกอบ โครงการของดีเอ็นเอ ขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA Replication) วิธีการสกัดดีเอ็นเอ และการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญก่อนที่จะนำดีเอ็นเอไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ได้มีการศึกษาและประยุกต์ใช้เทคนิคต่างๆ เพื่อทำให้การสกัดดีเอ็นเอมีความสะดวกรวดเร็วขึ้น เช่น การประยุกต์ใช้เทคนิคการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี SDS/NaCl ในถั่วเหลือง เป็นการสกัดดีเอ็นเอที่ไม่ต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์อันตรายทำให้ปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงานและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม สามารถสกัดดีเอ็นเอได้จำนวนตัวอย่างมากกว่าวิธี CTAB ในระยะเวลาที่เท่ากัน และประหยัดค่าใช้จ่าย นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้เทคนิคการบดชิ้นส่วนพืชโดยการตีด้วยเม็ดลูกเหล็กเพื่อสกัดดีเอ็นเออย่างรวดเร็วสำหรับการตรวจเพศอินทผลัม ซึ่งสะดวกและรวดเร็วกว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB และดีเอ็นเอที่ได้มีคุณภาพไม่ต่างกัน ซึ่งหลังจากได้ดีเอ็นเอตามขั้นตอนวิธีการต่างๆ แล้ว การตรวจสอบหรือจำแนกลักษณะพืชเบื้องต้นสามารถทำได้ด้วยเทคนิคการทำพีซีอาร์ ซึ่งมีองค์ประกอบที่สำคัญคือ ดีเอ็นเอต้นแบบ ไพรเมอร์ dNTP สารละลายบัฟเฟอร์ เอนไซม์ DNA polymerase และสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

นอกจากนี้ได้มีการนำดีเอ็นเอมาใช้ประโยชน์ในการเป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมสำหรับประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบพืชหลายๆ ด้าน เช่น การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ การจำแนกพันธุ์และวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม การจัดทำแผนที่ทางพันธุกรรม การใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยทางสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพได้มีการศึกษาวิจัยการใช้ประโยชน์ในหลายๆ ด้าน ทั้งการตรวจสอบเพศอินทผลัมซึ่งสามารถตรวจสอบเพศได้ตั้งแต่ในระยะกล้า จากเดิมที่จะต้องเพาะด้วยเมล็ดและต้องรอเวลา 3-7 ปีถึงจะทราบเพศ ซึ่งจะช่วยประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายให้กับเกษตรกร และยังมีการศึกษาประยุกต์ใช้การเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบอย่างรวดเร็วเพื่อตรวจสอบตำแหน่งสนิปส์ในปาล์มน้ำมันด้วยเทคนิค Real-time PCR ทำให้สามารถจำแนกชนิดของปาล์มน้ำมันได้อย่างถูกต้อง นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาการตรวจสอบยีนที่ถูกถ่ายฝากในหน้าวัวและยาสูบตัดต่อพันธุกรรมโดยใช้เทคนิคไดเร็คพีซีอาร์ ซึ่งใช้ตัวอย่างน้อย ไม่ต้องมีขั้นตอนสกัดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ (DNA Purification) และใช้ระยะเวลาสั้น

การประยุกต์ใช้การตรวจสอบดีเอ็นเออย่างรวดเร็วในพืชต่างๆ ได้แก่ ถั่วเหลือง ปาล์มน้ำมัน อินทผลัม ยาสูบ หน้าวัว จะช่วยให้ผู้อ่านสามารถทราบหลักการพื้นฐานเบื้องต้นในการตรวจสอบพืชด้วยเทคนิคทางชีวภาพที่นิยมใช้ทั่วไป และการพัฒนาประยุกต์วิธีการให้ง่ายขึ้น สะดวกรวดเร็ว ปลอดภัย เพื่อเป็นการประหยัดเวลา ประหยัดค่าใช้จ่าย และปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงาน ซึ่งนักวิจัยหรือผู้ทำงานด้านนี้สามารถนำวิธีการเหล่านี้ไปทำการตรวจสอบพืชดังกล่าวได้

ความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับดีเอ็นเอและการสกัดดีเอ็นเอจากพืช

สุภาวดี ง้อเหรียญ

สารพันธุกรรม

สิ่งมีชีวิตจะถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมไปยังรุ่นลูกหลานโดยอาศัยสารพันธุกรรมคือ กรดนิวคลีอิก ซึ่งจัดเป็นสารจำพวกแมคโครโมเลกุล เป็นโพลีเมอร์ของนิวคลีโอไทด์เรียกว่า polynucleotide ในธรรมชาติมีกรดนิวคลีอิกอยู่เพียง 2 ชนิด ได้แก่ กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (deoxyribonucleic acid) หรือดีเอ็นเอ (DNA) ประกอบด้วยน้ำตาล 2′ deoxyribos และกรดไรโบนิวคลีอิก (ribonucleic acid) หรืออาร์เอ็นเอ (RNA) ประกอบด้วยน้ำตาล ribose ซึ่งความแตกต่างของน้ำตาล 2 ชนิดนี้ คือ น้ำตาลที่พบใน RNA จะมีกลุ่มไฮดรอกซีล (OH) ที่ตำแหน่ง 2′ ในขณะที่น้ำตาลที่พบใน DNA ไม่มีกลุ่ม OH ที่ตำแหน่ง 2′ น้ำตาลจะเชื่อมต่อกับหมู่ฟอสเฟต (PO_4) ที่ตำแหน่ง 3′ หรือ 5′ เรียกพันธะนี้ว่า 5′ $\rightarrow$ 3′ phosphodiester bone

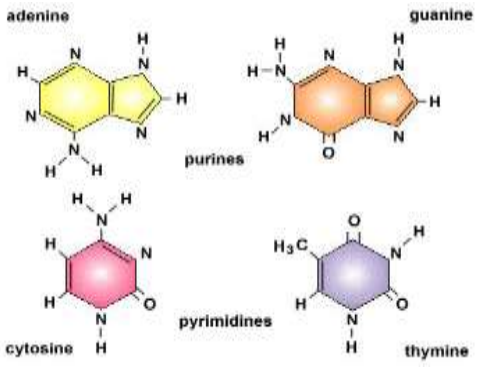
ดีเอ็นเอ (DNA)

ดีเอ็นเอ (deoxyribonucleic acid) เป็นสารชีวโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ที่สุด เป็นกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) ทำหน้าที่เก็บข้อมูลและถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต DNA ส่วนใหญ่อยู่ในส่วนของโครโมโซม (chromosome) ซึ่งอยู่ในนิวเคลียสภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต DNA มีหน้าที่สำคัญ 2 ประการคือ (1) การจำลองตัวเอง (DNA replication) DNA ของสิ่งมีชีวิตมีความสามารถสร้างและจำลองตัวเองขณะเกิดกระบวนการแบ่งเซลล์ เพื่อสร้าง DNA ที่เหมือนเดิมทุกประการให้แก่เซลล์ใหม่ (2) การถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมผ่านกระบวนการสังเคราะห์ RNA (RNA synthesis) โดยที่ DNA สามารถถูกถอดรหัส (transcription) เพื่อสร้างเป็น RNA (ribonucleic acid; RNA) ซึ่ง RNA ที่ได้จะทำหน้าที่กำหนดการเรียงตัวของกรดอะมิโนในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน จากนั้นโปรตีนจะถูกนำมาเป็นส่วนประกอบสำคัญในโครงสร้างขององค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ และเป็นสารเร่งปฏิกิริยาทางชีวเคมีหรือเอนไซม์ (enzyme) ในสิ่งมีชีวิต ด้วยหน้าที่ทั้ง 2 ประการของ DNA ทำให้สิ่งมีชีวิตสามารถสืบทอดลักษณะประจำพันธุ์ และดำรงเผ่าพันธุ์อยู่ได้ นอกจากนี้ยังทำหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโตและกระบวนการต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต

องค์ประกอบทางเคมีของดีเอ็นเอ (Chemical composition of DNA)

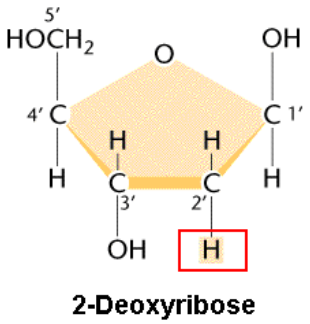
ดีเอ็นเอ (DNA) ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เรียกว่า นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ซึ่งมีส่วนประกอบ 3 ส่วน ได้แก่ สารประกอบพวกเบส (nitrogenous base) น้ำตาล และหมู่ฟอสเฟต (มยุรี, 2549)

1. ไนโตรจีนัสเบส (nitrogenous base) แบ่งเป็น 2 ประเภทคือ เบสพิวรีน (purine base) มีวงแหวน 2 วง แบ่งเป็น 2 ชนิด ได้แก่ อะดีนีน (Adenine; A), กัวนีน (Guanine; G) และ เบสไพริมิดีน (pyrimidine base) มีวงแหวน 1 วง มี 2 ชนิด ได้แก่ ไทมีน (Thymine; T), ไซโตซีน (Cytosine; C) **(ภาพที่ 1)**



ภาพที่ 1 โครงสร้างของไนโตรจีนัสเบส
(ที่มา: http://www.thaibiotech.info**)**

2. น้ำตาลดีออกซีไรโบส (deoxyribose sugar) **มีสูตรโมเลกุล** $C_5H_{10}O_4$ ซึ่งเป็นน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม โดยที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 จะไม่มีหมู่ไฮดรอกซีล (OH-group) **(ภาพที่ 2)**



ภาพที่ 2 โครงสร้างของน้ำตาลดีออกซีไรโบส
(ที่มา: http://www.thaibiotech.info**)**

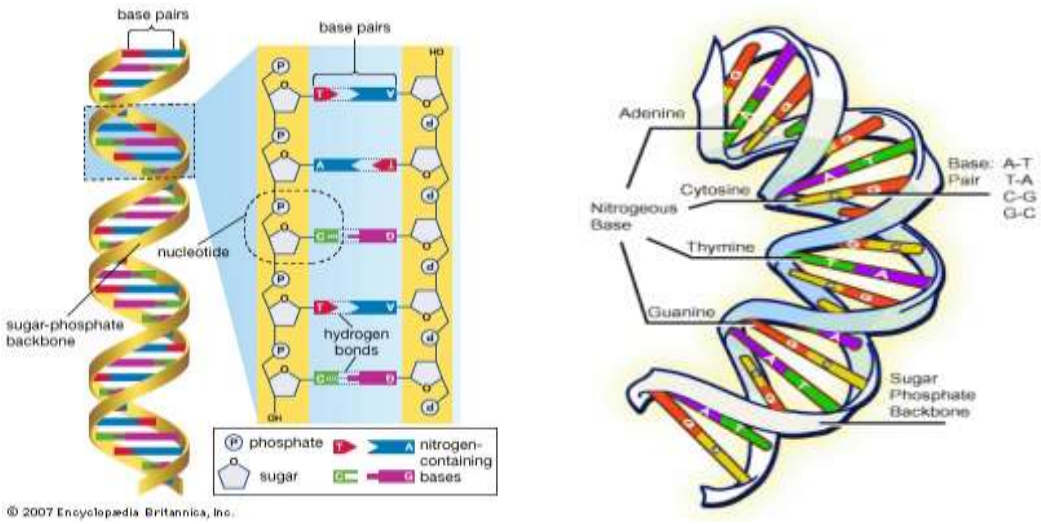
3. หมู่ฟอสเฟต (phosphate group) โครงสร้างของนิวคลีโอไทด์ที่ประกอบขึ้นเป็นนิวคลีโอไทด์นั้นทั้งสามส่วนจะประกอบกันโดยมีน้ำตาลเป็นแกนหลัก มีไนโตรจีนัสเบสอยู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และหมู่ฟอสเฟตอยู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ดังนั้นจึงสามารถจำแนกนิวคลีโอไทด์ใน DNA ได้ 4 ชนิด ซึ่งจะแตกต่างกันตามองค์ประกอบที่เป็นเบส ได้แก่ เบส A เบส T เบส C และ เบส G **(ภาพที่ 3)**

ภาพที่ 3 โครงสร้างของหมู่ฟอสเฟต (phosphate group)
(ที่มา: http://www.thaibiotech.info**)**

โครงสร้างของดีเอ็นเอ (Structure of DNA)

โครงสร้างของ DNA จะประกอบด้วยสายพอลินิวคลีโอไทด์ (polynucleotide) ที่เกิดจากการเชื่อมต่อกันของนิวคลีโอไทด์หลายๆ หน่วยด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์จำนวน 2 สายเรียงตัวขนานกันในทิศทางตรงกันข้าม (antiparallel) พันกันเป็นเกลียวคู่เวียนขวา เรียกว่า ดับเบิ้ลเฮลิกซ์ (double helix) โดยที่สายพอลินิวคลีโอไทด์ทั้งสองเส้นที่มีลำดับเบสคู่สม (complementary bases) มาเชื่อมต่อกัน แต่ละคู่เบสห่างกัน 3.4 อังสตรอม (0.34 nm) เอียงทำมุม 36 องศา 1 รอบ = 10 คู่เบส = 34 อังสตรอมเส้นผ่าศูนย์กลาง 20 อังสตรอม น้ำตาลและหมู่ฟอสเฟตทำหน้าที่เป็นแกนอยู่ด้านนอกโมเลกุล การเข้าคู่กันของสายพอลินิวคลีโอไทด์เกิดจากการเข้าคู่กันระหว่างเบสพิวรีนและเบสไพริมิดีน จากการสร้างพันธะไฮโดรเจน โดย A จะสร้างพันธะจำนวน 2 พันธะ กับ T (A = T) และ G จะสร้างพันธะจำนวน 3 พันธะกับ C (G ≡ C) **(ภาพที่ 4)** การจับคู่เบสแบบนี้เรียกว่า การจับคู่เบสแบบวัตสันและคริก (Watson-Crick base-pairing) จึงทำให้ดีเอ็นเอมีคุณสมบัติทางเคมี 3 ประการคือ

1. ปริมาณของเบสพิวรีนและเบสไพริมิดีนจะเท่ากันเสมอ (A+G = G+T) ในสิ่งมีชีวิตทุกๆ ชนิด
2. ปริมาณของ Adenine (A) จะเท่ากับ Thymine (T) และ Guanine (G) จะเท่ากับ Cytosine (C) ดังนั้นองค์ประกอบเบสของดีเอ็นเอจึงมีสัดส่วน G + C หรือ % GC = % G + % C ซึ่งอยู่ในช่วง 26 – 74% เช่น ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งมี % GC = 42% หมายความว่า ดีเอ็นเอนี้มี เบส G = 21% เบส C = 21% เบส A = 29% และ เบส T = 29% (อุไรวรรณ, 2545)
3. อัตราส่วนของ A+T / G+C จะไม่คงที่ในสิ่งมีชีวิตทั่วๆ ไป แต่จะคงที่ในสิ่งมีชีวิตหนึ่งๆ ทำให้สิ่งมีชีวิตมีความหลากหลาย

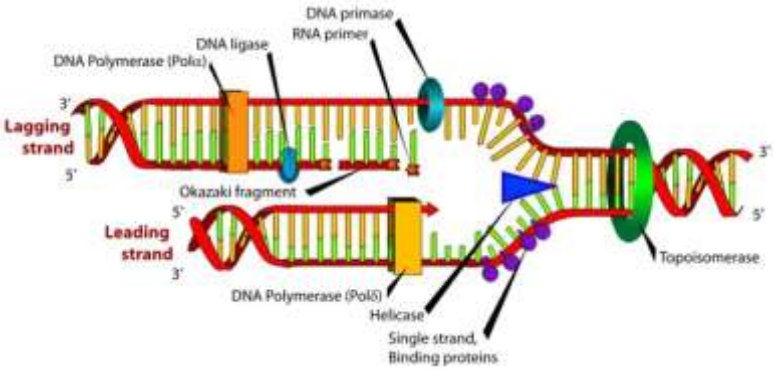


ภาพที่ 4 โครงสร้างของดีเอ็นเอ (DNA)

(ที่มา: http://www.biogang.thmy.com , http://www.thaigoodview.com**)**

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA Replication)

DNA สามารถทำหน้าที่เป็นแหล่งข้อมูลทางพันธุกรรม (heredity) ของสิ่งมีชีวิตได้ โดยอาศัยการเก็บในรูปของรหัสพันธุกรรม (genetic code) และสามารถเพิ่มจำนวนได้โดยการจำลองตัวเอง (self replication) ซึ่งเป็นคุณสมบัติพิเศษที่สำคัญมากในการทำหน้าที่ถ่ายลักษณะทางพันธุกรรมจากสิ่งมีชีวิตรุ่นหนึ่งไปยังอีกรุ่นหนึ่ง เมื่อถึงเวลาที่เซลล์ต้องการแบ่งตัวนั้นส่วนของ DNA ก็จะมีการจำลองตัวเอง (DNA replication) **(ภาพที่ 5)** การสังเคราะห์ DNA หรือ การจำลองตัวเองของ DNA เริ่มต้นจาก DNA เกลียวคู่จะแยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยวเพื่อใช้เป็นต้นแบบ (template) ให้กับการสังเคราะห์พอลินิวคลีโอไทด์สายใหม่ขึ้นมา ขบวนการนี้อาศัยเอนไซม์ topoisomerase เพื่อคลายเกลียว supercoil ออกโดยกลไกการตัดสายออกชั่วคราวเพื่อคลายเกลียวแล้วต่อสาย DNA เหมือนเดิม จากนั้นเอนไซม์ helicase จะทำหน้าที่คลายเกลียว helix และแยกสายทั้งสองของ DNA ออกจากกันโดยมี ssDNA binding protein ช่วยยึดจับให้สายทั้งสองคงอยู่ในสภาพสายเดี่ยวได้ การทำงานของเอนไซม์ helicase ต้องการ ATP 2 โมเลกุลสำหรับการแยกเบสหนึ่งคู่ การสร้าง DNA สายใหม่เริ่มจากการทำงานของเอนไซม์ primase ร่วมกับการทำงานของ primosome สร้างสาย RNA primer ซึ่งเป็น RNA สายสั้นๆ (ประมาณ 10 – 200 นิวคลีโอไทด์) โดยใช้ DNA สายเดี่ยวเป็นแม่พิมพ์ ต่อจากนั้น DNA polymerase จะทำหน้าที่ต่อสาย RNA primer นี้ด้วย precursor dNTP ซึ่งชนิดของแต่ละ nucleotide ที่จะนำมาต่อจะถูกกำหนดด้วยลำดับเบสบนสาย DNA แม่พิมพ์ เอนไซม์นี้จะต่อหมู่ฟอสเฟตที่ติดอยู่บนคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของ dNTP ใหม่เข้ากับหมู่ hydroxyl บนคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของสาย primer ไปเรื่อยๆ ด้วย phosphodiester bond จนได้เป็นสาย DNA การทำงานของเอนไซม์ primase และ DNA polymerase ทิศทางของการสังเคราะห์มีทิศทางเดียวโดยจะเริ่มจากปลาย $5' \rightarrow 3'$ แต่เนื่องจาก DNA จัดตัวแบบ antiparallel ดังนั้นจากจุดเริ่มต้น replication origin ด้านที่ DNA สายแม่พิมพ์มีทิศทางจากปลาย $3' \rightarrow 5'$ การสร้าง DNA สายใหม่ตาม replication fork จะมีความต่อเนื่องเพราะจะเป็นไปในทิศทาง $5' \rightarrow 3'$ เรียกสาย DNA ใหม่นี้ว่า leading stand ในขณะที่สายตรงกันข้ามนับจากจุดเริ่มต้นไปตาม replication fork จะมีทิศทาง $5' \rightarrow 3'$ DNA สายใหม่นี้มีกลไกพิเศษคือ จะเริ่มสร้างจาก fork movement ไปทาง replication origin ($5' \rightarrow 3'$) เป็น DNA สายสั้นๆ เรียกว่า Okazaki fragment การสร้างจะเริ่มตาม replication fork ไปเรื่อยๆ แล้วจึงต่อ fragment เหล่านี้เป็น DNA สายเดียวกันเรียก DNA สายใหม่นี้ว่า lagging strand ดังนั้นในการสังเคราะห์ DNA เกลียวคู่ของสายพอลินิวคลีโอไทด์ที่จำลองขึ้นใหม่จะประกอบด้วยพอลินิวคลีโอไทด์จากสายต้นแบบเดิมกับสายที่เกิดจากการสังเคราะห์ใหม่เสมอ จึงเรียกการจำลองตัวเองในลักษณะนี้ว่า การจำลองตัวเองแบบกึ่งอนุรักษ์ (semiconservative replication) (ตวงพร, 2542)



ภาพที่ 5 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA replication)

(ที่มา: https://www.bloggang.com/mainblog.php?id=dnahunsa&month=24-09-2010&group=4&gblog=2**)**

การสกัดดีเอ็นเอจากพืช

ปัจจุบันวิทยาการทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพมีการพัฒนาก้าวหน้าไปมาก โดยเฉพาะการศึกษาทางชีววิทยาโมเลกุล (molecular biology) มีการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุล (molecular technique) มาใช้ประโยชน์ในการศึกษาวิจัยกับพืชในด้านต่างๆ อาทิเช่น การปรับปรุงพันธุ์ การจำแนกและตรวจสอบพันธุ์ เป็นต้น การใช้เทคนิคเหล่านี้ส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นศึกษาเกี่ยวกับดีเอ็นเอ (DNA) ซึ่งเป็นสารพันธุกรรม (genetic material) ในนิวเคลียสของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นขั้นตอนการสกัดแยกดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตจึงเป็นขั้นตอนที่สำคัญอย่างยิ่ง วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิต มีหลายวิธีด้วยกัน แตกต่างกันไปตามสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด หรือแม้แต่ในพืชต่างชนิดกันก็จะมีองค์ประกอบทางชีวเคมีที่แตกต่างกันไป ซึ่งวิธีการสกัด genomic DNA จากพืช สามารถเตรียมได้จากเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น ใบ ลำต้น ราก เมล็ด และเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นต้น เพื่อให้ได้ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่มีความเหมาะสมสำหรับนำไปใช้เพื่อการศึกษาวิจัยในด้านต่างๆ นั้น โดยมีหลักการและขั้นตอนวิธีการ ดังนี้

1) การทำให้เซลล์แตก (Cell lysis) โดยการทำให้ผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ และเยื่อหุ้มนิวเคลียสแตกออก เพื่อปลดปล่อยดีเอ็นเอออกมา โดยใช้สารพวก detergent ได้แก่ sodium dodecyl sulfate (SDS) โดย SDS จะเข้าไปละลายไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักของเยื่อเซลล์และเยื่อนิวเคลียส รวมทั้งจับกับโปรตีนพวก hydrophobic protein ทำให้เซลล์แตกปลดปล่อยองค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต เกลือต่างๆ น้ำตาล อาร์เอ็นเอและดีเอ็นเอ ออกมาในสารละลาย การผสมในขั้นนี้จึงต้องระวังไม่เขย่าหรือคนสารละลายแรงเกินไป

2) การย่อยโปรตีนและอาร์เอ็นเอ (Deproteinization) ออกจากดีเอ็นเอ โดยใช้ protease และ RNase จากนั้นตกตะกอนโปรตีนด้วย phenol/chloroform บางครั้งอาจเติมเกลือ sodium chloride หรือ sodium acetate เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตกตะกอนโปรตีน

3) การตกตะกอนดีเอ็นเอ (DNA precipitation) ดีเอ็นเอสามารถตกตะกอนโดยใช้ 70% iso-propanol หรือ absolute ethanol (แช่เย็น) เนื่องจาก ethanol มีความหนาแน่นมากกว่าน้ำ ดังนั้นเมื่อเติม ethanol ลงไป ethanol จะลอยอยู่ด้านบนและละลายในน้ำได้ดีกว่าดีเอ็นเอมาก จึงไปแย่งโมเลกุลของน้ำที่จับกับดีเอ็นเออยู่ ทำให้ดีเอ็นเอจับตัวกันเองแล้วตกตะกอนเป็นสีขาวอยู่ก้นหลอด อาจเติมเกลือ sodium acetate ด้วย เพื่อให้เกิด dehydrate water ออกจากสายดีเอ็นเอ จากนั้นละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำหรือ TE buffer และเก็บดีเอ็นเอไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส

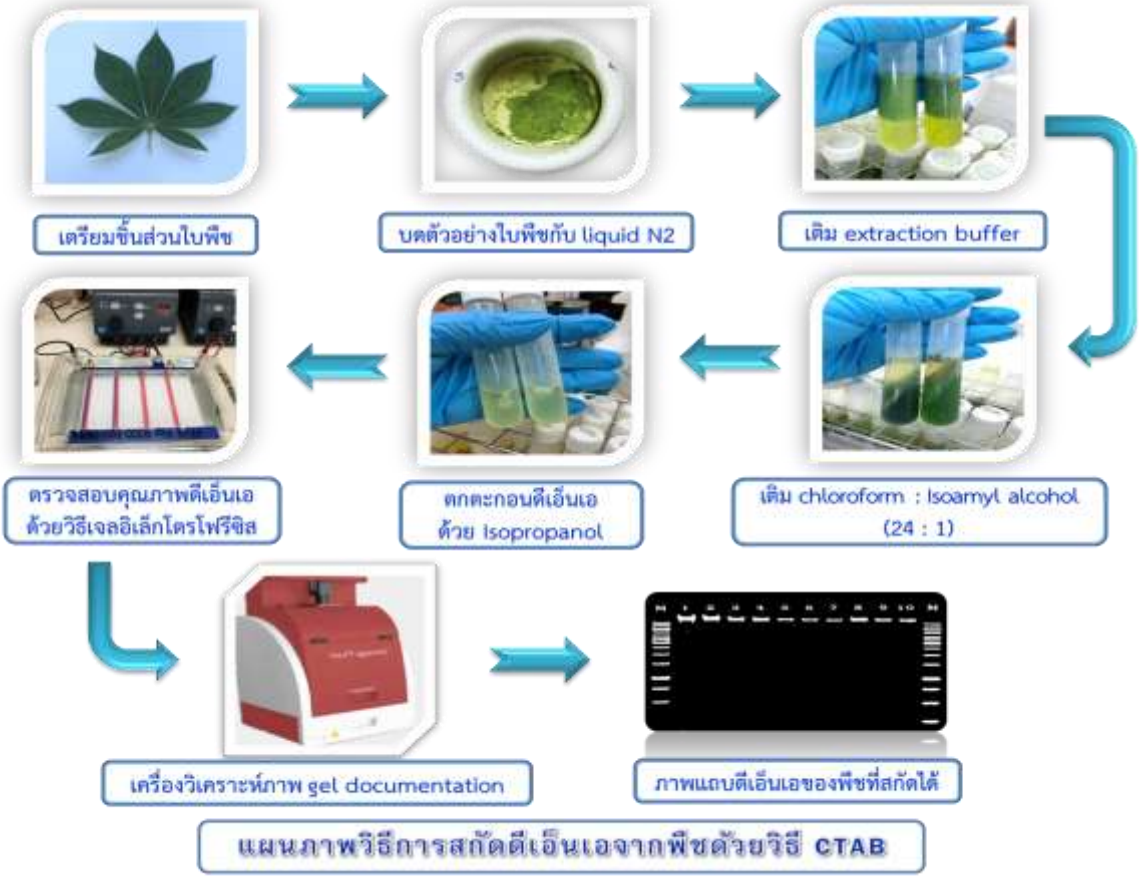
การสกัดดีเอ็นเอของพืช มักพบปัญหาหลายประการคือ 1) โมเลกุลดีเอ็นเอมีขนาดใหญ่อาจถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์ nucleases ซึ่งอยู่ภายในเซลล์พืชเอง 2) การปนเปื้อนของสารประกอบ polysaccharides 3) การปะปนของ phenol และสารประกอบ secondary metabolites ซึ่งอาจทำลายโมเลกุลดีเอ็นเอ และขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ตัดจำเพาะ หรือ Taq polymerase ที่เกิดในระหว่างการทำปฏิกิริยา PCR ในพืชบางชนิดดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้อาจมีสีน้ำตาลซึ่งเกิดจาก oxidation ของสารประกอบ phenol เป็นสารประกอบ quinine มีฤทธิ์ในการ oxidize สูง สามารถทำลายดีเอ็นเอและโปรตีน ส่งผลให้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากพืชมีคุณภาพต่ำ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการปรับวิธีการสกัดดีเอ็นเอให้เหมาะสมกับเนื้อเยื่อพืชและชนิดของพืชแต่ละชนิด สารประกอบส่วนใหญ่ที่ใช้ในการปกป้องดีเอ็นเอไม่ให้ถูกย่อยหรือถูกทำลาย เช่น ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ทำหน้าที่เป็นตัวจับไอออนที่มีประจุบวกสอง Mg^{2+} ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ต่างๆ เพื่อช่วยป้องกันไม่ให้ดีเอ็นเอถูกย่อย โดยเอนไซม์ DNase นอกจากนี้ยังมีสาร β-mercaptoethanol ทำหน้าที่ช่วยขัดขวางการเกิดปฏิกิริยา oxidation ที่อาจส่งผลต่อขบวนการทำงานของดีเอ็นเอด้วย

การสกัดดีเอ็นเอจากพืชนิยมใช้วิธี CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) ซึ่งเป็นสารประกอบ detergent ที่มีประจุบวก สามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และจับโมเลกุลของกรดนิวคลีอิก ซึ่งเป็นสารประกอบเชิงซ้อนหลังจากทำให้เซลล์แตกและบ่มกับสารละลายบัฟเฟอร์ CTAB ที่ 65°C ดีเอ็นเอสามารถตกตะกอนได้ด้วย isopropanol หรือ ethanol ในบางกรณีจะเห็นการตกตะกอนเป็นลักษณะขาวขุ่น สามารถแยกดีเอ็นเอออกได้ด้วยการปั่นเหวี่ยงให้ดีเอ็นเอตกตะกอนหรือใช้แท่งแก้วงอเกี่ยวดีเอ็นเอขึ้นมา จากนั้นทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยการกำจัด RNA, polysaccharides, polyphenols และสิ่งปนเปื้อนอื่นๆ นอกจากนี้ยังมีวิธีสกัดดีเอ็นเออีกหลายวิธี เช่น วิธี potassium acetate/SDS เป็นการตกตะกอนรวมกันของโปรตีน และ polysaccharides ใน potassium acetate ที่มีความเข้มข้นสูงในสารละลาย SDS วิธีนี้มีข้อดีคือไม่จำเป็นต้องสกัดสารประกอบอินทรีย์ออก แต่เป็นวิธีที่มีหลายขั้นตอน ซึ่งใช้เวลามากกว่าการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ CTAB (กิตติพัฒน์, ม.ป.ป.) หรือการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปซึ่งมีอยู่หลายบริษัทให้เลือกใช้ อย่างไรก็ตามการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีใดก็ตามขึ้นอยู่กับเนื้อเยื่อพืช ชนิดของพืช และวัตถุประสงค์ในการนำไปใช้ ซึ่งถ้าในงานวิจัยมีตัวอย่างพืชที่ต้องการสกัดดีเอ็นเอจำนวนหลายตัวอย่าง และต้องการดีเอ็นเอในปริมาณมาก เพื่อให้เพียงพอต่อการศึกษาวิจัย อาจเลือกใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ซึ่งจะมีขั้นตอน (ภาพที่ 6) และข้อปฏิบัติ ดังนี้

ข้อปฏิบัติการสกัดดีเอ็นเอพืช ด้วยวิธี CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide)

ประยุกต์จาก Agrawal และคณะ (1992)

1. ตัดใบอ่อนพืช ประมาณ 1 กรัม บดในโกร่งพร้อมกับไนโตรเจนเหลวจนละเอียดเป็นผงแป้ง
2. นำใบพืชที่บดแล้ว ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม extraction buffer [(เตรียม 500 มิลลิลิตร : CTAB (hexadecyltrimetyl ammonium bromide) 10 กรัม, NaCl 40.9 กรัม, 0.5M EDTA (pH 8.0) 20 มิลลิลิตร, 2M Tris-HCl (pH 8.0) 25 มิลลิลิตร, PVP-40T 5 กรัม)] 700 ไมโครลิตร และเติม mercaptoethanol 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เขย่าทุกๆ 10 นาที
3. เติม chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการกลับหลอดไปมาเบาๆ หรือใช้เครื่อง shaker เบาๆ นาน 10 นาที
4. ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใสส่วนบน 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่
5. เติม isopropanol 300 ไมโครลิตร (0.6 เท่าของสารละลาย DNA) และ 3M sodium acetate 50 ไมโครลิตร (0.1 เท่าของสารละลาย DNA) กลับหลอดไปมาเบาๆ บ่มที่ –20 องศาเซลเซียส หรือแช่ในน้ำแข็ง 30 นาที ระยะนี้จะเห็นตะกอน DNA เป็นเส้นใยสีขาวใส
6. ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอน DNA เทน้ำใสทิ้ง
7. ล้างตะกอน DNA ด้วย 70% ethanol 500 ไมโครลิตร (2 ครั้ง) โดยเขย่าเบาๆ 2 – 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทน้ำใสทิ้ง ปล่อยตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง
8. ละลายตะกอนด้วย TE 100 ไมโครลิตร และเติม RNase A (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หรือ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
9. นำดีเอ็นเอที่ไปวัดปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเครื่อง spectrophotometer แล้วเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการศึกษาวิจัยต่อไป



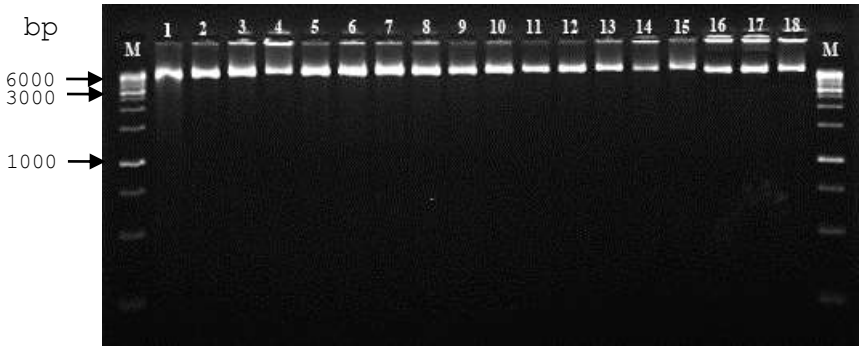
ภาพที่ 6 แสดงขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากพืช ด้วยวิธี CTAB

การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ

เมื่อแยกสกัดดีเอ็นเอจากเซลล์พืชได้แล้ว ต้องมีการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอก่อนนำไปทำการวิจัยต่อไป สามารถทำได้ 2 วิธี คือ

1) วิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotometry ซึ่งเป็นการวัดปริมาณการดูดกลืนแสงของ nucleic acid (DNA และ RNA) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร โดยดีเอ็นเอสามารถดูดกลืนแสงได้มากที่สุดที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ในส่วนของอาร์เอ็นเอการวัดค่าการดูดกลืนแสงจะคล้ายกับดีเอ็นเอ โดยวัดค่าความยาวคลื่นที่ A_{260}/A_{280} ถ้าค่าที่วัดได้อยู่ในช่วง 1.7 – 2.0 แสดงว่า อาร์เอ็นเอที่สกัดได้บริสุทธิ์หรือมีคุณภาพดี ส่วนโปรตีนสามารถดูดกลืนแสงได้ดีที่สุดที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จากนั้นนำผลที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ จากสูตร “ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = A_{260} x 50 x dilution factor” ดังนั้น ถ้าวัดค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยวัดที่ค่าความยาวคลื่นที่ A_{260} หรือ OD_{260} ได้เท่ากับ 1 จะพบว่า สารละลายดีเอ็นเอมีความเข้มข้นเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนสารละลายอาร์เอ็นเอหรือโอลิโกนิวคลีโอไทด์ มีความเข้มข้นเท่ากับ 40 และ 33 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีนี้จะใช้ได้ดีในกรณีที่สารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ค่อนข้างบริสุทธิ์ไม่มีอาร์เอ็นเอหรือโอลิโกนิวคลีโอไทด์เจือปน และต้องมีปริมาณมากพอที่จะอ่านค่า OD ได้ ซึ่งต้องอยู่ในระดับไมโครกรัม ถ้าค่าที่วัดได้จากความยาวคลื่นที่ A_{260}/A_{280} อยู่ในช่วง 1.7 – 1.8 แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้บริสุทธิ์หรือมีคุณภาพดี ถ้าต่ำกว่า 1.7 แสดงว่ามีโปรตีนและฟีนอลปนเปื้อนอยู่ในสารละลาย และถ้าค่าที่วัดได้มากกว่า 1.8 แสดงว่า มีอาร์เอ็นเอปนอยู่ในสารละลาย (สุรินทร์, 2545)

2) วิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) อิเล็กโตรโฟริซิสเป็นเทคนิคที่ใช้แยกโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิกซึ่งอยู่ในสนามไฟฟ้าออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุล ซึ่งเป็นผลมาจากความแตกต่างของชนิดและปริมาณของประจุ ขนาดและโครงรูปโมเลกุลของสาร การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอนิยมใช้อะกาโรสเป็นตัวกลาง สามารถทำได้โดยใช้หลักการที่โมเลกุลของเอธิเดียมโบรไมด์จะเข้าไปแทรกอยู่ในเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ เมื่อนำไปส่องด้วยแสงอุลตราไวโอเลตจะเกิดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence) โดยความเข้มของแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณการย้อมอะกาโรสด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ดังนั้นปริมาณแสงที่วัดได้จากปริมาณเอธิเดียมโบรไมด์จะสะท้อนถึงปริมาณโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ถูกเอธิเดียมโบรไมด์เข้าไปแทรกจับ ซึ่งสามารถตรวจหาสารเชิงซ้อนของเอธิเดียมโบรไมด์กับดีเอ็นเอได้ (ภาพที่ 7) นอกจากนี้การตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสยังสามารถบอกคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้อีกด้วยว่ามีการปนเปื้อนจากอาร์เอ็นเอซึ่งจะเห็นเป็นปื้นอยู่บริเวณด้านล่างของแผ่นเจลและดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดโมเลกุลใหญ่ขนาดไหนหรือเกิดการแตกต่างหักของโมเลกุลมากน้อยเพียงใด ซึ่งวิธีการปฏิบัติทำโดยการหยดดีเอ็นเอที่สกัดได้ลงในแผ่นอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ และทำอิเล็กโตรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดและปริมาณความเข้มข้น เมื่อสิ้นสุดการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสแล้วจึงย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปส่องผ่านด้วยแสงอุลตราไวโอเลต การวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA molecular weight marker) ที่ทราบความเข้มข้นแล้ว วิธีการนี้สามารถวิเคราะห์ ดีเอ็นเอที่มีปริมาณต่ำเพียง 10 นาโนกรัม (สุรินทร์, 2545 ; Beckmann and Thomas, 1992; Walker, 1984)



ภาพที่ 7 จีโนมิกดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้จากมันสำปะหลัง จำนวน 18 ตัวอย่าง โดยใช้วิธี CTAB และตรวจสอบคุณภาพ โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis)

การเก็บรักษาดีเอ็นเอ (DNA Storage)

เมื่อสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอเรียบร้อยแล้ว การเก็บรักษาดีเอ็นเอเป็นอีกหนึ่งขั้นตอนที่มีความสำคัญ โดยสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ ควรเก็บไว้ที่ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส หรือถ้าต้องการเก็บไว้เป็นระยะเวลานาน ควรเก็บที่ตู้เย็น -80 องศาเซลเซียส ส่วนสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการหยิบใช้บ่อยครั้ง ให้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และแบ่งสารละลายดีเอ็นเอแยกเก็บไว้ในตู้เย็นหลายๆ หลอด เพื่อป้องกันเหตุการณ์ที่ไม่คาดคิด เช่น การปนเปื้อนดีเอ็นเออื่นในขณะที่มีการเปิดใช้งานบ่อยๆ หรือเกิดการแตกหักของดีเอ็นเอจากการทำให้สารละลายดีเอ็นเอที่แข็งตัวละลาย ที่สำคัญควรลดเวลาที่สารละลายดีเอ็นเออยู่ในอุณหภูมิห้องให้น้อยที่สุด (สุรินทร์ ปิยะโชคณากูล, 2552)

เอกสารอ้างอิง

มยุรี เฟื่องทอง. 2549. *ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับสารพันธุกรรม*. เอกสารประกอบการอบรมเรื่อง เทคนิคชีวโมเลกุลทางด้านพืช. สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร. หน้า 1 – 5.

ตวงพร สุทธิพงษ์ชัย. 2542. *การสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก การถอดรหัส และการสังเคราะห์โปรตีน*. เอกสารประกอบการอบรมเรื่อง ดีเอ็นเอเทคโนโลยี. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. หน้า 7 – 18.

อุไรวรรณ วิจารณกุล. 2545. *ดีเอ็นเอเทคโนโลยี*. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏพิบูลสงคราม. 313 หน้า.

กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ. ม.ป.ป. *ปฏิบัติการพันธุวิศวกรรมเบื้องต้น*. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต. 85 หน้า.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. *จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี*. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 115 หน้า.

Agrawal, G.K., Pandey, R.N. and V.P., Agrawal. 1992. Isolation of DNA from *Choerospondias asillaris* leaves, *Biotech. Biodiv. Lett*. 2: 19–24.

Beckmann, J.S. and C.O. Thomas. 1992. *Plant genome : methods for genetic and physical mapping*. Kluwer academic publisher, Dordrecht. 250 p.

Walker, J.M. 1984. *Methods in molecular biology v.2 nucleic acids*. The Humana Press Inc., New Jersey. 375 p.

ทฤษฎีพีซีอาร์

นัยเนตร เจริญสันติ ทานากะ

Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นปฏิกิริยาที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชนิดใดชนิดหนึ่งในหลอดทดลอง โดยสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้ได้มากกว่าเดิมหลายล้านเท่า PCR ถูกคิดค้นครั้งแรกโดย Mullis และคณะ (1983) จากบริษัท Cetus Corporation ในปี 1983 และต่อมาได้มีการนำเอนไซม์ DNA polymerase (Taq polymerase) ที่สามารถทนความร้อนได้มาใช้ทำปฏิกิริยา โดย Saiki และคณะ (1988) ทำให้การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย PCR มีความถูกต้องและมีประสิทธิภาพสูงขึ้น

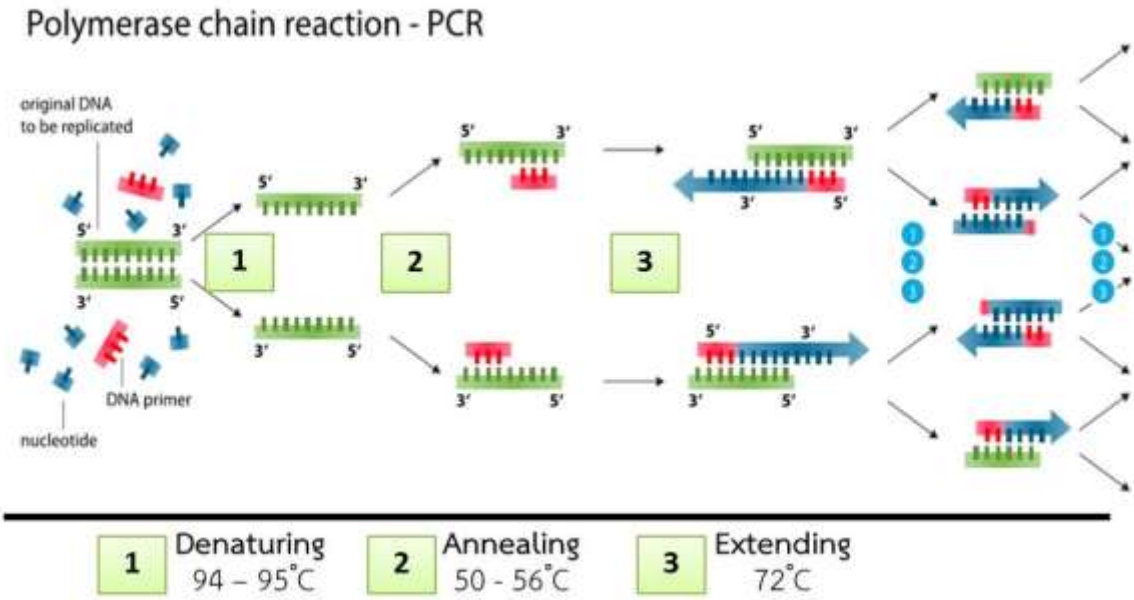
เทคนิค PCR ได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในงานต่างๆได้หลากหลาย เช่น ด้านอณูชีววิทยา นำเทคนิค PCR มาใช้ในการโคลนยีนหรือใช้ศึกษาลำดับเบสที่ยังไม่มีข้อมูลมาก่อน ด้านการแพทย์ใช้ในการวินิจฉัยโรคต่างๆ เช่น เอดส์หรือมะเร็ง ด้านอาหารนำมาใช้ตรวจเชื้อโรคปนเปื้อนหรือตรวจพืชอาหารดัดแปลงพันธุกรรม เป็นต้น นอกจากนี้ ปัจจุบันเทคนิคในการตรวจปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นระหว่างการทำปฏิกิริยาที่เรียกว่า Real-time PCR ได้ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย ทำให้สามารถตรวจปริมาณดีเอ็นเอที่มีอยู่ในตัวอย่างหรือนำมาใช้วิเคราะห์ปริมาณ mRNA ได้อย่างแม่นยำและรวดเร็วอีกด้วย

หลักการของ PCR

ปฏิกิริยา PCR อาศัยการเลียนแบบหลักการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิต ตามที่ได้กล่าวไว้ในบทที่ 1 โดยอาศัยดีเอ็นเอต้นแบบเป็นตัวเริ่มต้น โดยสามารถเปรียบเทียบได้ ดังนี้

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอในเซลล์	PCR
1. การคลายเกลียวคู่ของดีเอ็นเอโดย DNA Helicase 2. การทำให้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวคงตัวด้วย Single strand binding protein	1. Denaturing : ขั้นตอนการทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกเป็นสายเดี่ยวรวมถึงคงตัวอยู่ในรูปสายเดี่ยวโดยอาศัยความร้อน
3. การสร้าง RNA primer สั้นๆ ด้วย DNA primase	2. Primer annealing : เมื่อลดอุณหภูมิของปฏิกิริยาลง primer ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวสังเคราะห์จะเข้าไปจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นต้นแบบ
4. DNA polymerase ใช้ RNA primer เป็นจุดเริ่มและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 5. dNTPs ถูกต่อตามชนิดเบสที่เป็นคู่จำเพาะกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวต้นแบบ	3. Primer extension : ปฏิกิริยาสร้างดีเอ็นเอสายใหม่จากทาง 3’ ของ primer ด้วย DNA polymerase ดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นคู่สมกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวต้นแบบจะถูกสังเคราะห์ขึ้น

ทั้งนี้เมื่อ 3 ขั้นตอนของ PCR ดังภาพที่ 1 ได้เสร็จสิ้นลงจะเรียกว่าทำปฏิกิริยาได้ 1 รอบ จากดีเอ็นเอต้นแบบ 2 สาย จะได้ดีเอ็นเอ 4 สาย โดยทั้งดีเอ็นเอต้นแบบและดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่จะเป็นต้นแบบของปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบต่อไป ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยา 2 รอบ จะได้ดีเอ็นเอ 8 สาย ดังนั้น จะเห็นได้ว่าดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นในอัตราทวีคูณ จะได้ DNA= 2^n โดย n คือจำนวนรอบการทำปฏิกิริยา



(แก้ไขภาพจาก By Enzoklop - Own work, CC BY-SA 3.0, https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=32003643)

ภาพที่ 1 ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR

องค์ประกอบในปฏิกิริยา PCR

1. ดีเอ็นเอต้นแบบ (Template DNA) ใช้ได้ทั้งดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีและดีเอ็นเอที่มีคุณภาพไม่ดีนัก ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ในการทำปฏิกิริยาPCR เช่น กรณีที่ทำปฏิกิริยาPCR เพื่อตรวจสอบพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล ก็ไม่จำเป็นต้องใช้ดีเอ็นเอที่คุณภาพดีมากได้ เป็นต้น ปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยาPCR ใช้ได้ตั้งแต่ 5-500 ng โดยทั่วไปนิยมใช้ 10-50 ng ต่อปฏิกิริยา

2. ไพรเมอร์ (Primer) เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ถูกออกแบบให้มีลำดับเบสจับคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาPCR ต้องใช้ primer 2 สายที่ออกแบบให้ชนิดเบสเป็นคู่จำเพาะกับปลายหัวและท้ายของบริเวณดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณ โดยปลาย 3'ของไพรเมอร์ทั้งสองมีทิศทางเข้าสู่บริเวณดีเอ็นเอที่ต้องการสังเคราะห์ ความยาวของไพรเมอร์ นิยมใช้อยู่ที่ 18-30 นิวคลีโอไทด์แล้วแต่ลักษณะงาน มีองค์ประกอบของชนิดเบส C และ G อยู่ที่ 40-60 เปอร์เซ็นต์ ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาควรมีค่า T_m ใกล้เคียงกัน (Melting temperature; T_m คือ อุณหภูมิที่ทำให้ 50 เปอร์เซ็นต์ของดีเอ็นเอเกลียวคู่แยกเป็นสายเดี่ยว) โดยทั่วไปค่า T_m ควรอยู่ระหว่าง 55-80 องศา นอกจากนี้การออกแบบไพรเมอร์ควรหลีกเลี่ยงลำดับเบสที่จะทำให้เกิดคู่สมกันเองระหว่างไพรเมอร์หรือภายในไพรเมอร์เส้นเดียวกันเอง

3. dNTPs ประกอบด้วย dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ปกติจะใช้ความเข้มข้นของแต่ละ dNTPs ระหว่าง 50-200 μM ในปัจจุบัน dNTPs มักจะอยู่ในรูปแบบสารละลายรวมที่ให้มากับ DNA polymerase หรือถูกผสมรวมกับบัฟเฟอร์ (buffer) ในรูปแบบมาสเตอร์มิกซ์

4. บัฟเฟอร์สำหรับปฏิกิริยา PCR (PCR buffer) โดยทั่วไปจะมีส่วนประกอบ Tris-HCl, KCl, $MgCl_2$ และ Glycerol การใช้บัฟเฟอร์จะช่วยปรับความเข้มข้นของเกลือและภาวะ pH ที่เหมาะสมให้ DNA polymerase ทำงานได้ดี โดยแต่ละผู้ผลิตจะทำบัฟเฟอร์ให้เพื่อให้การทำงานของ DNA polymerase ของบริษัทตนเองเกิดประสิทธิภาพสูงสุด นอกจากนี้ในผู้ผลิตบางรายจะมีการแยก $MgCl_2$ ออกมาต่างหากเพื่อให้สามารถปรับใช้ได้ในปริมาณที่เหมาะสม เนื่องจาก $MgCl_2$ จำเป็นต่อการทำงานของ DNA polymerase ที่สามารถทนความร้อน

(เช่น *Taq* DNA polymerase) รวมถึงมีผลต่อการ annealing ของไพรเมอร์ โดยทั่วไปมักใช้ $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้นท้ายสุด เป็น 1.5 mM

5. เอนไซม์ DNA polymerase

ในปัจจุบัน DNA polymerase ที่มีจำหน่ายสามารถแยกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ เอนไซม์กลุ่ม Pol I (Family A) และเอนไซม์กลุ่ม α (Family B)

5.1 เอนไซม์กลุ่ม Pol I เป็น Thermostable DNA polymerase โดยแรกเริ่มได้รับการพัฒนามาจากเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญได้ในน้ำพุร้อนชื่อ *Thermus aquaticus* (*Taq*) ที่มีคุณสมบัติทนความร้อนได้สูงและไม่เสียคุณสมบัติของเอนไซม์ในขั้นตอน denaturing เอนไซม์กลุ่ม Pol I มี 5'-3'exonuclease activity ทำให้ชิ้นส่วน PCR ที่ได้จะมี dA ติดอยู่ตรงปลาย 3' แต่ขาดคุณสมบัติ proofreading เนื่องจากเอนไซม์กลุ่ม Pol I ไม่มี 3'-5'exonuclease activity ทำให้มีเปอร์เซ็นต์ที่จะเกิดความผิดพลาดในการสังเคราะห์ลำดับเบสได้มากกว่า DNA polymerase อีกกลุ่ม

5.2 เอนไซม์กลุ่ม α (Family B) เอนไซม์นี้ได้รับจากพัฒนามาจากแบคทีเรียกลุ่ม Hyperthermophile archaea มีคุณสมบัติทนความร้อนสูงและมี 3'-5'exonuclease activity ทำให้มีคุณสมบัติ proofreading ที่ทำให้การสังเคราะห์ดีเอ็นเอตามดีเอ็นเอต้นแบบมีความแม่นยำสูง (High Fidelity) ชิ้นส่วน PCR ที่ได้จากการใช้เอนไซม์กลุ่ม α จะมีลักษณะปลายเรียบ

นอกจากนี้ ในระยะหลังได้มีการพัฒนาวิธีการทำปฏิกิริยา PCR ให้เอนไซม์ DNA polymerase เริ่มทำงานได้อย่างแม่นยำมากขึ้น เรียกว่า Hot start PCR โดยในระยะที่อุณหภูมิของปฏิกิริยาต่ำ เช่น ที่อุณหภูมิห้อง DNA polymerase จะถูกยับยั้งการทำงานโดยแอนติบอดี เมื่ออุณหภูมิของปฏิกิริยาสูงถึงจุดของอุณหภูมิ denaturing (>90˚C) แอนติบอดีจะเสียสภาพ ทำให้ DNA polymerase ถูกกระตุ้นให้เริ่มทำงาน

การเลือกใช้ DNA polymerase ในการทำปฏิกิริยา PCR ขึ้นอยู่กับลักษณะงาน หากงานที่ต้องการความแม่นยำสูง เช่น งานโคลนยีนที่ต้องการนำชิ้นส่วน PCR ที่ได้ไปใช้ตัดต่อเข้าเวคเตอร์เพื่อการแสดงออกของโปรตีน ก็ควรจะใช้ DNA polymerase กลุ่ม α แต่หากงานที่ต้องการเพิ่มชิ้นส่วน PCR ในปริมาณมากเพื่อการตรวจสอบยีนหรือสายพันธุ์โดยใช้ต้นทุนต่ำ ก็สามารถเลือกใช้ DNA polymerase กลุ่ม Pol I เป็นต้น

ตัวอย่างเทคนิค PCR แบบประยุกต์ที่นิยมใช้ในปัจจุบัน

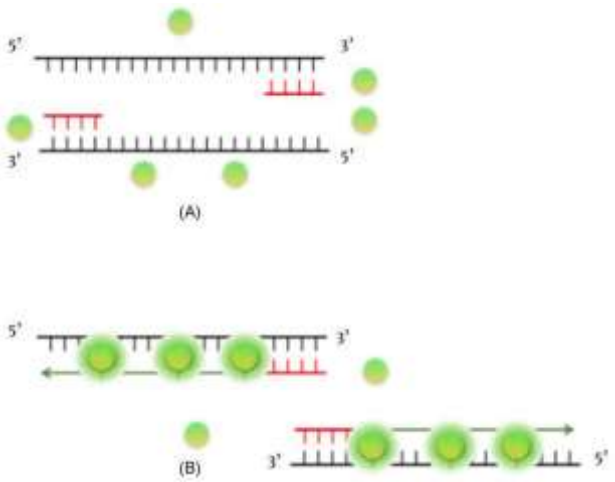
- Quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR)

เป็นการทำ PCR โดยใช้สารตั้งต้นเป็น RNA ลำดับแรกของวิธีการนี้จะทำการถอดรหัส RNA สายเดี่ยวเป็น complementary DNA (cDNA) โดยใช้เอนไซม์ Reverse transcriptase และ cDNA ที่ได้จะนำมาใช้เป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา Quantitative PCR (qPCR) qPCR หรือ Real-time PCR นั้น สามารถติดตามการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอภายในรอบปฏิกิริยา PCR ได้อย่างแม่นยำ ทำให้สามารถวัดปริมาณผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้นในแต่ละรอบได้

เทคนิค Real-time PCR ได้ถูกนำไปใช้กว้างขวาง เช่น การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน การตรวจสอบเชื้อโรค การตรวจสอบพันธุกรรม เป็นต้น การทำปฏิกิริยาจะใช้เครื่อง thermal cycler ที่สามารถให้แสงกระตุ้นต่อทุกตัวอย่างด้วยความยาวของแสงที่กำหนด และสามารถตรวจปริมาณแสงที่เปล่งออกมาจากการถูกกระตุ้น นอกจากนี้เครื่อง thermal cycler ที่ใช้ต้องสามารถปรับอุณหภูมิให้ความร้อนและแช่เย็นลงอย่างรวดเร็วเพื่อให้สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงทางเคมีกายภาพของกรดนิวคลีโอไทด์และ DNA polymerase ได้อีกด้วย

เทคนิค Real-time PCR สามารถแยกเป็น 2 ประเภทใหญ่ ตามกลไกทางเคมีที่ใช้ในการตรวจการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอ ได้ดังนี้

1) Generic dye based : การใช้สารสี (dye) ที่สามารถจับกับดีเอ็นเอทั่วไปได้ สารสีที่นิยมใช้กัน คือ SYBR Green Dye I กลไกการทำงานของสารสีนี้ คือ ในปฏิกิริยา PCR ขั้นตอน denaturing ดีเอ็นเอจะอยู่ในสภาพสายเดี่ยว ทำให้ SYBR Green Dye I อยู่ในสภาพอิสระและเปล่งแสงได้น้อย แต่เมื่อดีเอ็นเอถูกสังเคราะห์ขึ้นใหม่อยู่ในสภาพสายคู่ SYBR Green Dye I จะเข้าไปจับกับดีเอ็นเอสายคู่และเปล่งแสงได้มาก การวิเคราะห์ปริมาณแสงที่ถูกเปล่งออกมาในแต่ละรอบปฏิกิริยา PCR ทำให้สามารถวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นได้ (ภาพที่ 2)

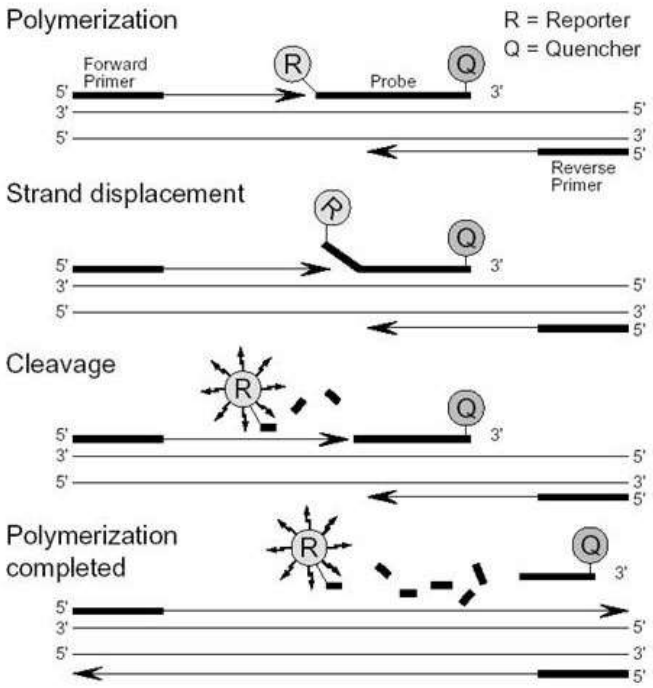


(ที่มา In Vivo Animal Modeling)

ภาพที่ 2 กลไกการทำงานของ SYBR green Dye

2) Probe based : ใช้ probe ซึ่งเป็นสาย DNA เส้นเดี่ยวที่ออกแบบให้มีลำดับเบสจำเพาะกับลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ต้องการวิเคราะห์ แล้วติดฉลาก (label) ด้วย fluorophore ลักษณะต่างๆกัน การออกแบบ probe นี้สามารถทำได้ในหลายลักษณะ เพื่อเอื้อต่อการตรวจวัดโดยวิธี real-time PCR เช่น Taqman/Dual-labelled probes, MGB Hybridization probes เป็นต้น

Probe based Real-time PCR นิยมนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจเครื่องหมายโมเลกุลสนิปส์ (Single Nucleotide Polymorphisms – SNPs) ยกตัวอย่างเทคนิค Taqman assay อาศัยการทำงานของ 5’-3’ exonuclease และการใช้ probe ติดฉลากสีฟลูออเรสเซนต์ ที่จำเพาะจับคู่เบสกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอต้นแบบที่ต้องการวิเคราะห์ ในระหว่างการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ โพรบที่จำเพาะกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอต้นแบบเท่านั้นที่จะถูก5’-3’ exonuclease ตัด เมื่อโพรบถูกตัด จะทำให้สี (reporter) ถูกแยกออกจากตัวยับยั้ง (quencher) และทำให้เกิดการเปล่งสีที่สามารถตรวจได้ (ภาพที่ 3) ความแม่นยำในการวิเคราะห์สนิปส์ขึ้นอยู่กับโพรบที่ออกแบบ โพรบต้องมีความจำเพาะกับจีโนมดีเอ็นเอ เพื่อไม่ให้เกิดการสะสมของสัญญาณสีที่เกิดจากการจับกันแบบไม่จำเพาะของโพรบและสายดีเอ็นเอ (Olivia et al., 2009)



(ที่มา http://www.e-oligos.com/eoweb/products/eo-taqman.asp)

ภาพที่ 3 กลไกการทำงานของ Taqman assay

เอกสารอ้างอิง

อโณทัย โภคาธิกรณ์. 2549. ใน: *เอกสารประกอบประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่อง Introduction to Real time-PCR and its applications*, 16 - 17 พฤศจิกายน ห้องประชุม 2 ชั้น 4 ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. and P.M., Williams. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research*. 6:986-994.

Koch, W. 2004.Technology platforms for pharmacogenomic diagnostic assays. *Nat Rev Drug Discov*. 3: 749–761.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G and H. Erlich. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 51 Pt 1:263-73.

Olivia, M. Popa., B.Mihai, B.Violeta, C.Claudia, B.Constantin and P.O.Luis. 2009. Introduction to SNP Genotyping by Real-time PCR. *The Journal of "Grigore Antipa" National Museum of Natural History*. 52:515-522.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 239(4839):487-91.

เอกสารอิเล็กทรอนิกส์เผยแพร่ของบริษัท TaKaRa Bio ; http://www.takara-bio.co.jp/kensa/pdfs/book_1.pdf. [Accessed 23 Jan, 2020]

Madeleine Price Ball, Available from Wikipedia; https://commons.wikimedia.org/wiki/File:DNA_chemical_structure.svg#/media/[Accessed 13 Feb, 2020]

By Enzoklop - Own work, CC BY-SA 3.0, Available from Wikipedia; https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=32003643[Accessed 30 Aug, 2020]

In Vivo Animal Modeling - Scientific Figure on ResearchGate. Available from: https://www.researchgate.net/figure/Action-of-SYBR-Green-I-Dye-A-When-DNA-is-denatured-SYBR-Green-I-Dye-floats-free-and_fig1_315866219 [Accessed 24 Feb, 2020]

Taqman probes. Gene Link. Available from: http://www.e-oligos.com/eoweb/products/eo-taqman.asp [Accessed 30 Aug, 2020]

เครื่องหมายดีเอ็นเอในการตรวจสอบพืช

ประสาน สืบสุข

เครื่องหมายโมเลกุล (Molecular markers) หมายถึง ลักษณะหรือตัวบ่งชี้ที่มีความเฉพาะเจาะจง สามารถนำมาใช้แยกความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตทั้งทางปริมาณและคุณภาพ อาจเป็นการจำแนกความแตกต่างในระหว่างและภายในสปีชีส์ ระหว่างและภายในประชากร หรือระหว่างแต่ละตัว (between individuals) ก็ได้ (สุรินทร์, 2552) โดยเครื่องหมายทางพันธุกรรมสามารถถ่ายทอดลักษณะนั้น ๆ ไปยังรุ่นลูกได้ เครื่องหมายที่ใช้บ่งบอกความแตกต่างนี้สามารถแบ่งได้ 2 ประเภท คือ

1. เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (Morphological marker)

เป็นเครื่องหมายที่บ่งบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต โดยใช้วิธีเปรียบเทียบลักษณะภายนอกทางสัณฐานวิทยา หรือทางสรีรวิทยา เช่น การใช้ลักษณะรูปพรรณสัณฐานพืชที่มีความแตกต่างกันมาใช้เป็นเครื่องหมาย เช่น ความสูง ลักษณะทรงพุ่ม สีของลำต้น ขนาด รูปร่างและสีของเมล็ด อายุวันออกดอก และวันเก็บเกี่ยว เป็นต้น อย่างไรก็ตามพบว่าลักษณะดังกล่าวมักผันแปรไปตามสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป ทำให้เกิดความผิดพลาดในการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ นอกจากนั้นแล้วการเปรียบเทียบลักษณะภายนอกนี้ยังไม่สามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์พืชบางชนิดที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้ หรือบางครั้งต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ และต้องมีวิธีที่จะบอกจีโนไทป์ที่ถูกต้องจากฟีโนไทป์ที่ตรวจสอบได้ อย่างไรก็ตามการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยายังมีความจำเป็นต้องทำเป็นอันดับแรก แล้วจึงใช้วิธีอื่นประกอบเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ขึ้น หรือแก้ปัญหาในกรณีที่ไม่สามารถใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาเครื่องหมายบ่งชี้ชนิดอื่นมาประกอบ เพื่อช่วยให้การจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์มีความถูกต้อง

2. เครื่องหมายทางโมเลกุล (Molecular marker)

เครื่องหมายทางโมเลกุล สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ระดับ คือ ระดับโปรตีน เป็นการตรวจสอบที่โมเลกุลของโปรตีนชนิดต่าง ๆ และระดับดีเอ็นเอ เป็นการตรวจสอบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ

2.1 เครื่องหมายโปรตีน (Protein marker)

เป็นเครื่องหมายที่สร้างขึ้นจากการศึกษาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในสิ่งมีชีวิตเพื่อตรวจสอบสิ่งมีชีวิตโดยใช้ความแตกต่างของโมเลกุลของโปรตีน โดยใช้วิธีแยกโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วจึงย้อมดูแถบของโปรตีนจำเพาะโดยใช้สารที่เหมาะสม เช่น การตรวจสอบโปรตีนที่สะสมในเมล็ดพืช นอกจากนี้ยังตรวจสอบในรูปแบบของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ หรือ ไอโซไซม์ วิธีการศึกษาเอนไซม์ค่อนข้างง่าย ข้อดีของการตรวจสอบในระดับโปรตีน คือสามารถตรวจได้หลายตำแหน่ง ค่าใช้จ่ายไม่สูงมากนัก และแถบของโปรตีนหรือไอโซไซม์นี้ยังมีการข่มร่วมกันแบบ codominance ช่วยให้แยกความแตกต่างระหว่างแถบโปรตีนแบบโฮโมโลกัส และเฮเทอโรไซกัสได้ ส่วนข้อจำกัดของการตรวจสอบโปรตีนหรือเอนไซม์นั้น คือจำนวนยีนที่ตรวจสอบได้มีไม่มากนัก ไม่กระจายครอบคลุมทั้งจีโนม และผลการแสดงออกของเอนไซม์ได้รับผลกระทบโดยตรงจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง และต้องศึกษาในระยะที่ยีนมีการแสดงออก จึงต้องเลือกเนื้อเยื่อ และระยะเวลาที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ ผลที่ได้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อ ระยะการเจริญเติบโตของพืช และระยะเวลาที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ นอกจากนี้โปรตีนและเอนไซม์ยังสูญเสียสภาพธรรมชาติได้ง่าย จึงต้องวิเคราะห์ผลในเวลาจำกัด ไม่สามารถเก็บตัวอย่างไว้ได้นาน ในแง่ของโอกาสการตรวจพบความแตกต่างในระดับโปรตีนยังมีค่าต่ำมากเมื่อเทียบกับการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอ เนื่องจาก

แอลลีลหรือรูปแบบของยีนที่แตกต่างกัน บางครั้งแม้ว่าจะมีการเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งแล้วก็ตาม อาจจะไม่มีผลต่อระยะทางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลโปรตีนเมื่อทำอิเล็กโทรโฟรีซิส ทำให้ไม่สามารถตรวจพบความแตกต่างนั้น ๆ ได้ พบว่าการตรวจสอบระดับโปรตีนสามารถตรวจพบความแตกต่างของเครื่องหมายโปรตีนได้เพียง 30 เปอร์เซ็นต์ของที่เกิดการแทนที่เบสทั้งหมดเท่านั้น ทำให้ผลที่ตรวจสอบได้พบความแตกต่างต่ำกว่าที่เป็นจริง (สุรินทร์, 2552) เครื่องหมายโปรตีนถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์พืชในธุรกิจเมล็ดพันธุ์ เนื่องจากค่าใช้จ่ายไม่สูงมากนัก เป็นการลดต้นทุนในธุรกิจเมล็ดพันธุ์

2.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)

เครื่องหมายดีเอ็นเอ หมายถึงลำดับเบสช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต โดยอาจมีตำแหน่งบนโครโมโซมในนิวเคลียส (nuclear DNA) หรือในออร์แกเนลล์ (mitochondria DNA หรือ chloroplast DNA) และสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ พืชแต่ละชนิดแต่ละสายพันธุ์ มีการจัดเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ ความแตกต่างหรือโพลีมอร์ฟิซึม (polymorphisms) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอทำให้สิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างกัน และสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลได้

การตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอมีข้อได้เปรียบกว่าการตรวจสอบในระดับโปรตีน คือ โมเลกุลของดีเอ็นเอมีความเสถียรกว่าจึงเก็บไว้ได้นานกว่า โดยสามารถวิเคราะห์จากตัวอย่างที่ถูกเก็บไว้เป็นเวลายาวนานได้ และเนื่องจากดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในเซลล์เกือบทุกเซลล์ในปริมาณเท่ากัน จึงสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อชนิดใด ๆ ระยะการเจริญเติบโต หรือสภาพทางสรีรวิทยาใด ๆ ก็ได้ โดยไม่ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม การตรวจอาจใช้ดีเอ็นเอจากส่วนที่เป็นยีนหรือไม่ใช่ยีนก็ได้ จะมีการแสดงออกหรือไม่มีการแสดงออกก็ได้ จึงตรวจสอบได้โดยไม่จำกัด และครอบคลุมทั้งจีโนม และมีวิธีการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบต่าง ๆ ให้เลือกใช้มากมาย ทำให้การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ และมีการประยุกต์ใช้ในงานด้านต่าง ๆ ได้กว้างขวาง

การที่สามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้เนื่องจากเกิดความแปรปรวน (variation) ของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ หรือ ที่เรียกว่าเกิดโพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ของลำดับเบสในโมเลกุลของสายดีเอ็นเอนั้น ๆ วิธีการตรวจสอบโพลิมอร์ฟิซึมของดีเอ็นเอ ทำให้โดยการหาลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) หรือตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายในการบ่งบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต สามารถทำได้โดยการเปรียบเทียบลักษณะของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ โดยเทคนิคทางอณูวิทยา ซึ่งเป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปว่า “ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ” (DNA Fingerprinting) ซึ่งความแตกต่างที่เกิดขึ้น หมายถึง แบบแผนดีเอ็นเอที่จำเพาะของสิ่งมีชีวิตหนึ่ง ๆ นั่นเอง สามารถนำมาตรวจสอบความแตกต่างหรือโพลีเมอร์ฟิซึมของสิ่งมีชีวิตหรือสายพันธุ์พืชที่ต้องการตรวจสอบได้ (สุรินทร์, 2552)

ประเภทของเครื่องหมายดีเอ็นเอ

ในปัจจุบันมีการคิดค้นสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอขึ้นมากมายหลายชนิด มีการใช้อักษรย่อ และชื่อทางเทคนิคอย่างหลากหลาย ในบางกรณีมีอักษรย่อของเทคนิคต่างกัน แต่เป็นเทคนิควิธีเดียวกัน ทำให้เกิดความสับสนสำหรับผู้เริ่มทำงานวิจัยด้านนี้ ดังนั้นการจัดกลุ่มของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เหมาะสมจะทำให้ผู้ที่สนใจทางด้านนี้ทำความเข้าใจได้ง่าย ซึ่งการจัดประเภทของเครื่องหมายดีเอ็นเอสามารถแบ่งออกเป็นประเภทใหญ่ๆ ได้ 2 ประเภท คือ

1. Hybridization-based marker เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ ซึ่งพัฒนาขึ้นโดยอาศัยหลักการเข้าคู่ของลำดับเบสดีเอ็นเอที่เป็นคู่สมกันระหว่างดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) กับดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ โดยใช้เทคนิคไฮบริไดเซชัน (hybridization) ตัวอย่างได้แก่ เครื่องหมายอาร์เอฟแอลพี (RFLP marker) (Tanksley *et al*., 1989, McCouch and Tankslay, 1991) โพลิมอร์ฟิซึมของ RFLP ที่เกิดขึ้นเป็นลักษณะของขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ซึ่งเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสแบบการขาดหายไป (deletion) หรือการเพิ่มเบสขึ้นมา (insertion) หรือแบบอื่น ๆ ก็ได้

2. PCR-based marker เป็นเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้น โดยอาศัยหลักการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase chain reaction : PCR) ซึ่งเทคนิคพีซีอาร์มีข้อดีคือใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นน้อย ใช้ระยะเวลาสั้น แรงงานน้อย ค่าใช้จ่ายต่ำ และแปลผลง่าย เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้รับการพัฒนามาจากเทคนิค PCR สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ

2.1 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ไพรเมอร์ชนิดไม่จำเพาะเจาะจง (random primer)

เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้มีการตรวจสอบดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ที่ใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม เพื่อให้สามารถเกาะกับดีเอ็นเอเป้าหมายได้หลายตำแหน่ง และเพิ่มปริมาณได้จากหลายบริเวณ เกิดเป็นแบบแผนดีเอ็นเอที่จำเพาะโดยใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว ตัวอย่างเครื่องหมายดีเอ็นเอที่นิยมใช้ ได้แก่ เครื่องหมาย RAPD (random amplified polymorphic DNA)(William *et al*., 1990) เครื่องหมาย AFLP (Vos *et al*., 1995), เครื่องหมาย ISSR (inter-simple sequence repeats) (Bornet et al., 2004) เป็นต้น

2.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ไพรเมอร์ชนิดจำเพาะเจาะจง (specific primer)

เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด ที่จำเพาะกับช่วงของดีเอ็นเอ หรือยีนหนึ่ง ๆ โดยจะต้องทราบข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายก่อน เพื่อเป็นข้อมูลในการออกแบบและสังเคราะห์ ไพรเมอร์ เพื่อนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตำแหน่งจำเพาะเพียงตำแหน่งเดียว (single locus) เครื่องหมายชนิดนี้ ได้แก่ STS (Sequence-tagged site) และ SSLP (simple sequence length polymorphism) หรือ microsatellite หรือ SSR (Simple Sequence Repeat) (Brown *et al*., 1996, Powell *et al*., 1996), SCAR (Sequence characterized amplified region) เป็นต้น

การประยุกต์ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ

การศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล (molecular genetics) ซึ่งเป็นการศึกษาลึกลงไปถึงความแตกต่างระดับโมเลกุลของยีนที่ทำหน้าที่เป็นส่วนควบคุมการแสดงออกของลักษณะต่างๆในสิ่งมีชีวิต จึงมีประโยชน์ที่จะนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ การใช้เครื่องหมายระดับโมเลกุล (molecular markers) เป็นการใช้ดีเอ็นเอเพื่อเป็นเครื่องหมายในการตรวจสอบในระดับของยีน หรือดีเอ็นเอ ถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชในหลาย ๆ ด้าน เช่น

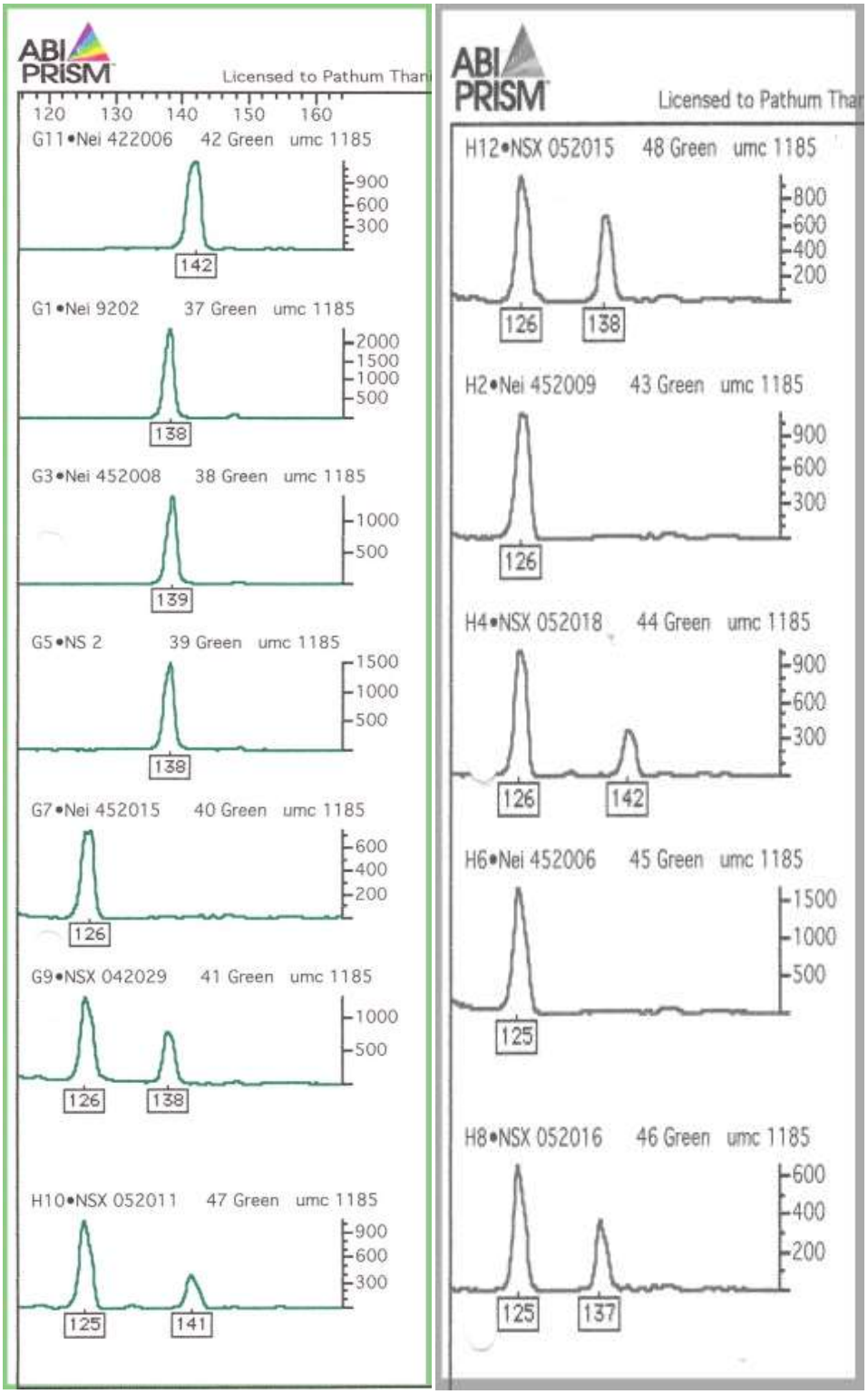
1. การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

การประยุกต์ใช้ตัวเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้ในการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ หรือ การสร้างเอกลักษณ์พันธุกรรม (DNA Fingerprint) ของพืชนับว่ามีความสำคัญ เนื่องจากมีการปลูก ขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ใหม่ๆ ขึ้นมาหลากหลายสายพันธุ์ โดยหน่วยงานของรัฐ และบริษัทเอกชน ซึ่งประสบปัญหาการขโมยพันธุ์ และการปลอมปนเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออก ดังนั้นบริษัทเอกชนและหน่วยงานของรัฐที่ผลิตเมล็ดพันธุ์ต่าง ต้องมีการสร้างเอกลักษณ์พันธุกรรมสำหรับพันธุ์ของตนไว้เพื่อเป็นฐานข้อมูลอ้างอิง และจดทะเบียนพันธุ์เพื่อเป็นตัวยืนยันเมื่อมีการตรวจสายพันธุ์ นอกจากนี้ยังมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการหาความแตกต่างหรือ

ความหลากหลายทางพันธุกรรม การนำเครื่องหมายระดับดีเอ็นเอมาใช้เป็นตัวกำหนดสายพันธุ์ หรือแยกสายพันธุ์ สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพถูกต้องแม่นยำ

การประยุกต์ใช้ตัวเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพ ช่วยลดปัญหาต่างๆ ของการผลิตและการตรวจคุณภาพสินค้า การตรวจการปลอมปนพันธุ์พืชลูกผสมการค้า ซึ่งคุณภาพของเมล็ดพันธุ์เป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่ง เครื่องหมายดีเอ็นเอจึงเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสูง ให้ความถูกต้องแน่นอน และทำได้รวดเร็วโดยไม่จำเป็นต้องปลูกทดสอบในแปลง ในปัจจุบันเครื่องหมายดีเอ็นเอได้เข้ามามีบทบาทอย่างมากในการรับรองพันธุ์ นอกจากนี้ได้มีการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอมาประยุกต์ใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์พ่อแม่ เพื่อการผลิตพันธุ์ลูกผสม โดยสายพันธุ์พ่อแม่ต้องมีความสม่ำเสมอ ตรงตามพันธุ์ นับว่าสำคัญอย่างยิ่งต่อการผลิตพันธุ์ลูกผสม ซึ่งการใช้ลักษณะภายนอกที่มองเห็นมีความไม่แน่นอน เครื่องหมายดีเอ็นเอสามารถทำให้ขั้นตอนการคัดเลือกต้นพันธุ์ที่ถูกต้องทำได้ง่ายและรวดเร็ว จึงเป็นการลดต้นทุนการผลิตและได้พันธุ์ที่ตรงตามพันธุ์มากขึ้น (http://www.dna.kps.ku.ac.th)

ตัวอย่างการประยุกต์ใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA Fingerprint) ของข้าวโพด เป็นการสร้างเอกลักษณ์พันธุกรรมประจำพันธุ์ข้าวโพดทนแล้งของกรมวิชาการเกษตร ในการวิจัยนี้ได้จัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวโพด จำนวน 26 พันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิด microsatellite จำนวน 36 คู่ จัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวโพด จำนวน 26 พันธุ์ พบแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่าง จำนวน 139 แถบ ที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะระดับดีเอ็นเอ (ภาพที่ 1) สำหรับใช้เป็นฐานข้อมูลอ้างอิง และจดทะเบียนพันธุ์เพื่อเป็นตัวยืนยันเมื่อมีการตรวจสายพันธุ์ข้าวโพด (ประสาน และคณะ, 2554)



ภาพที่ 1 แสดงลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวโพด จำนวน 12 พันธุ์ โดยใช้เทคนิค microsatellite ไพรเมอร์ umc 1185 ที่แยกขนาดของดีเอ็นเอด้วยเครื่องอัตโนมัติ ABI 310 Genetic Analyzer (ประสาน และคณะ, 2554)

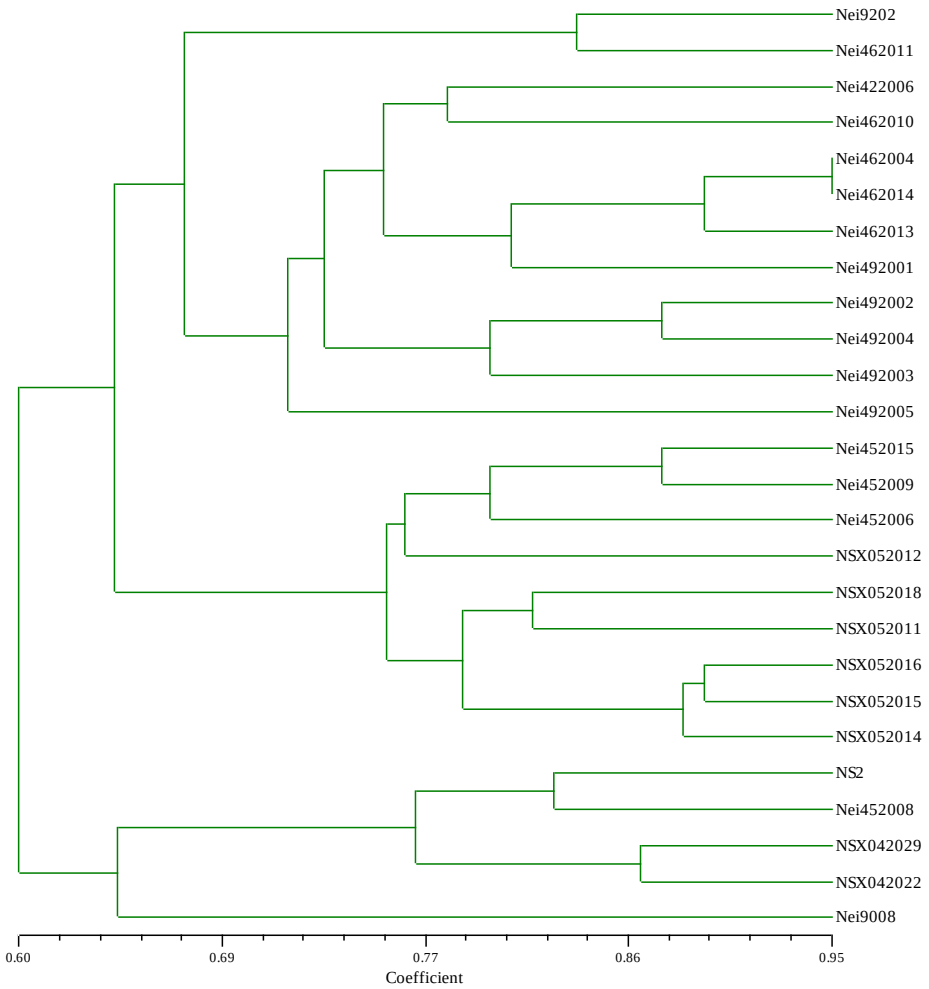
2. การจำแนกพันธุ์และวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยการจำแนกลักษณะประจำพันธุ์ของเชื้อพันธุกรรมพืชที่รวบรวมไว้ ส่วนใหญ่เป็นการประเมินจากลักษณะทางฟีโนไทป์ รวมถึงลักษณะทางการเกษตรต่าง ๆ ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาและพื้นที่ในการศึกษา แต่การศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมพืชในระดับดีเอ็นเอทำให้การใช้ประโยชน์จากเชื้อพันธุกรรมได้อย่างเต็มที่ นอกจากนี้การจำแนกด้วยลักษณะภายนอกเพียงอย่างเดียวอาจให้ข้อมูลที่ไม่ถูกต้อง เพราะลักษณะบางอย่างแยกจากกันได้ยาก บางลักษณะจะเป็นผลจากสภาพแวดล้อมภายนอกที่แตกต่างกัน การประเมินลักษณะประจำพันธุ์ที่ถูกต้องจะส่งผลดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งงานปรับปรุงพันธุ์ซึ่งนอกจากต้องมีการบ่งบอกพันธุ์และลักษณะประจำพันธุ์ที่ถูกต้องแม่นยำแล้ว ยังต้องมีข้อมูลที่สามารถระบุความใกล้ชิดทางพันธุกรรมอีกด้วย เพื่อการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่เหมาะสม การนำความแตกต่างในระดับเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้เป็นข้อมูลประกอบหรือสนับสนุนข้อมูลลักษณะภายนอก จึงทำให้การจำแนกพันธุ์มีความแม่นยำ รวดเร็ว และมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น สามารถระบุความใกล้ชิดทางพันธุกรรมได้อย่างจำเพาะ ซึ่งลักษณะภายนอกไม่สามารถแยกได้ทั้งหมด การหาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอ จึงเป็นวิธีที่ตอบสนองความต้องการดังกล่าวได้เป็นอย่างดี สามารถใช้เป็นหลักฐานยืนยันลักษณะจำเพาะของพันธุ์ต่าง ๆ ได้ รวมทั้งเป็นฐานข้อมูลสำหรับการปรับปรุงพันธุ์พืช ในปัจจุบันได้มีการใช้ข้อมูลในระดับดีเอ็นเอเพื่อสร้างเอกลักษณ์เฉพาะประจำพันธุ์พืชหลายชนิด สำหรับใช้ตรวจสอบข้อมูลพันธุกรรม และสร้างเอกลักษณ์พันธุกรรมสำหรับพันธุ์ของตนไว้เพื่อเป็นฐานข้อมูลอ้างอิง และจดทะเบียนพันธุ์เพื่อยืนยันเมื่อมีการตรวจสายพันธุ์

ตัวอย่างการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวโพดพันธุ์ทนแล้ง จำนวน 26 พันธุ์ โดยใช้เทคนิค microsatellite ที่ใช้ไพรเมอร์ 36 คู่ ได้รูปแบบแถบดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่าง โดยใช้ระบบตัวเลข 1 และ 0 โดยตัวเลข 1 แสดงการมีแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง 1 สำหรับ 0 แสดงการไม่มีแถบดีเอ็นเอขนาดเดียวกันนั้น ได้จำนวนรูปแบบการเกิดแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในข้าวโพดพันธุ์ต่าง ๆ รวมทั้งสิ้น 2,860 ตำแหน่ง นำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.2 ด้วยวิธี UPGMA พบว่าสามารถจัดกลุ่มและสร้างเดนโดรแกรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพดได้ดังแสดงในภาพที่ 2 โดยมีค่าความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมระหว่าง 0.65-0.95 พบว่าพันธุ์ที่มีพันธุกรรมใกล้ชิดกันที่สุดคือ Nei462004 และ Nei462014 มีค่าความใกล้ชิดทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.95 (ประสาน, 2554)

3. การจัดทำแผนที่ทางพันธุกรรม

การนำเอาเครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้ในการทำแผนที่ทางพันธุกรรม (genetic mapping) หรือแผนที่จีโนม (genome mapping) ได้มีการศึกษากันมานานแล้ว แต่แผนที่ที่ได้มีความละเอียดค่อนข้างน้อยเนื่องจากจำนวนยีนที่ศึกษามีน้อย การทำแผนที่ยีนบนโครโมโซมได้เริ่มทำในแมลงหวี่ ซึ่งเป็นการทำแผนที่โดยใช้จำนวนยีนไม่กี่ยีนที่เรียงตัวบนโครโมโซม x ของแมลงหวี่ ผลจากการพัฒนาเทคนิคทางด้านเครื่องหมายดีเอ็นเอหลายชนิด เช่น RFLP ทำให้มีการสร้างแผนที่จีโนมมากขึ้นในพืชหลายชนิด ต่อจากนั้นได้มีการพัฒนาเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ และพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สามารถตรวจสอบได้ครั้งละหลาย ๆ ตำแหน่ง เช่น RAPD และ AFLP ตลอดจนการพัฒนาโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำหรับวิเคราะห์ความเชื่อมโยงของเครื่องหมายดีเอ็นเอจำนวนมาก ทำให้การสร้างแผนที่พันธุกรรมก้าวหน้าขึ้นอย่างรวดเร็ว มีการทำแผนที่พันธุกรรมแล้วในพืชหลายชนิด ในการสร้างแผนที่พันธุกรรมนั้นแผนที่ที่ได้ต้องมีความหนาแน่นสูง หรือมีความละเอียดมาก ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญในงานด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช เพราะสามารถระบุตำแหน่งของยีนที่ควบคุมลักษณะต่าง ๆ ทั้งที่ควบคุมด้วยยีนเดี่ยว และยีนที่ควบคุมด้วยยีนหลายตำแหน่ง ซึ่งสามารถนำมาใช้คัดเลือกพันธุ์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ (marker-assisted selection)



ภาพที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข้าวโพด จำนวน 26 พันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ SSR จำนวน 36 คู่ 2,860 ตำแหน่ง (ประสาน และคณะ, 2554)

การสร้างแผนที่พันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ ใช้วิธีการเดียวกับการสร้างแผนที่ยีนบนโครโมโซมที่ต้องหายีนที่ควบคุมลักษณะที่มีความแตกต่างกัน มีการกลายพันธุ์ของยีนนั้น แล้วนำพ่อแม่พันธุ์ที่มีจีโนไทป์ต่างกันมาผสมกัน และศึกษาอัตราส่วนการกระจายตัวของยีนนั้นในลูกผสมจำนวนมาก ซึ่งในคู่ผสมหนึ่งสามารถศึกษาได้เพียงไม่กี่ลักษณะเท่านั้น และใช้เวลานาน การผสมพันธุ์ระหว่างคู่ผสมที่มีลักษณะต่างกันมากกว่า 1 ลักษณะ ถ้ายีนที่ควบคุมลักษณะเหล่านั้นอยู่คนละโครโมโซม การแยกตัวของยีนจะเป็นอิสระต่อกัน แต่ถ้ายีนนั้นอยู่ใกล้ชิดกันบนโครโมโซมเดียวกัน การแยกตัวจะไม่เป็นอิสระต่อกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับระยะทางระหว่างยีนทั้งสองตำแหน่ง ถ้าอยู่ใกล้กันมากโอกาสจะเกิดรีคอมบิเนชั่นก็น้อย จึงมักจะติดไปด้วยกัน เครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นส่วนของดีเอ็นเอที่อยู่บนโครโมโซม เปรียบเทียบได้กับยีนที่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมนั่นเอง และมีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมไปสู่ลูกหลาน ถ้าเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งอยู่ใกล้ชิดกันบนโครโมโซมก็มักจะถ่ายทอดไปด้วยกัน การสร้างแผนที่พันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ จะทำโดยการคัดเลือกพันธุ์พ่อและพันธุ์แม่ที่มีรูปแบบของเครื่องหมายดีเอ็นเอแตกต่างกัน นำมาผสมกันเพื่อสร้างลูกผสมที่มีการกระจายตัวของเครื่องหมายดีเอ็นเอในรูปแบบต่าง ๆ แล้วจึงวิเคราะห์ผลความเชื่อมโยงของเครื่องหมายดีเอ็นเอแต่ละกลุ่ม ในประชากรหนึ่ง ๆ นั้นสามารถศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอได้ไม่จำกัด สามารถทำแผนที่พันธุกรรมได้หลายตำแหน่ง เนื่องจากสามารถใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอได้หลายชนิด ทั้งที่ตรวจสอบได้ครั้งละ 1

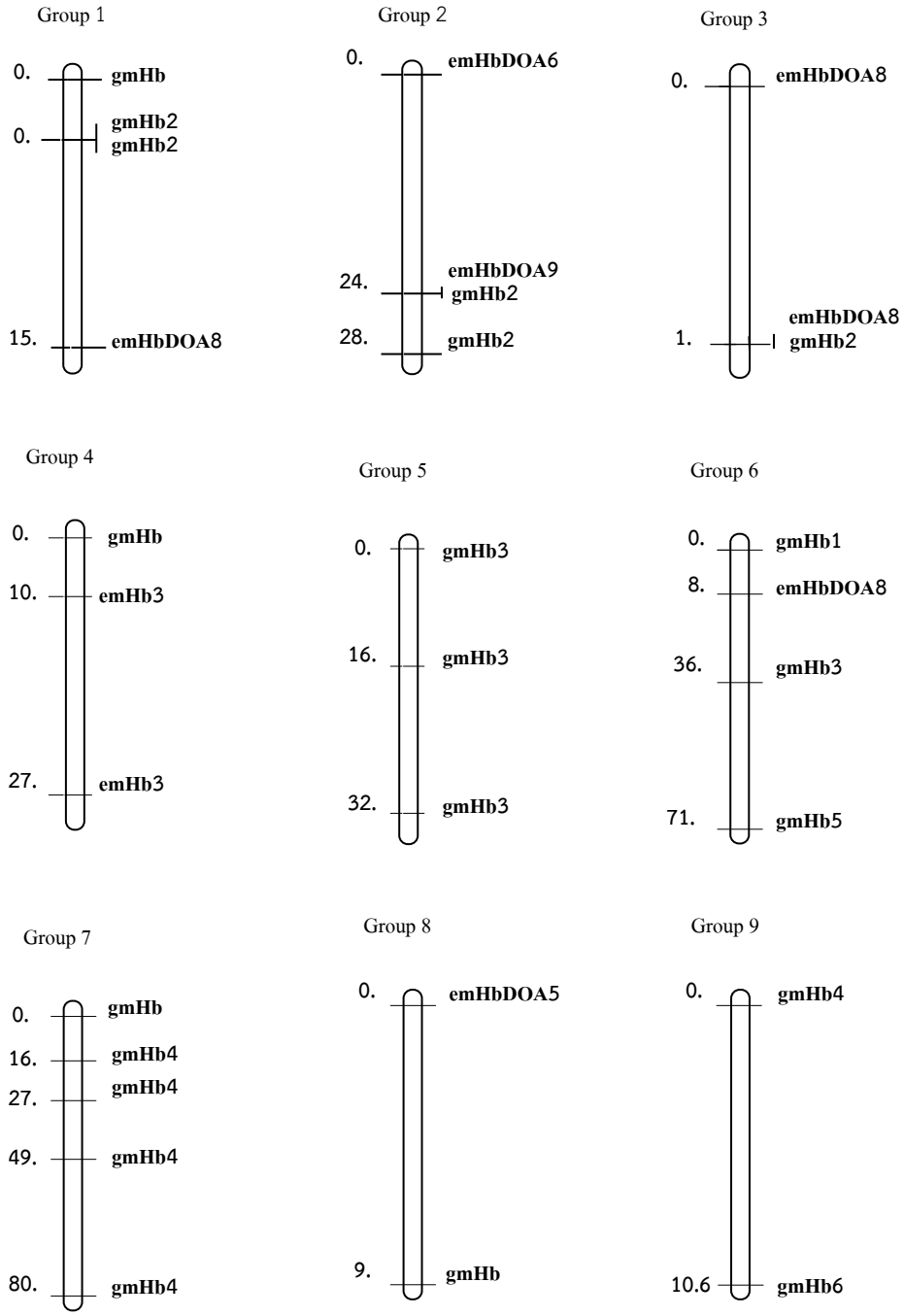
ตำแหน่ง หรือหลายตำแหน่ง ไม่ว่าจะเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่แสดงการข่มร่วมกัน หรือข่มแบบสมบูรณ์ นอกจากนี้สามารถใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอสร้างแผนที่พันธุกรรมได้โดยไม่ขึ้นอยู่กับระยะการแสดงออกของยีน และไม่ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม จึงสามารถสร้างแผนที่พันธุกรรมได้อย่างรวดเร็ว โดยไม่ต้องรอให้สิ่งมีชีวิตที่ศึกษาแสดงลักษณะออกมา (สุรินทร์, 2552)

ตัวอย่างการใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอสร้างแผนที่พันธุกรรมของยางพารา

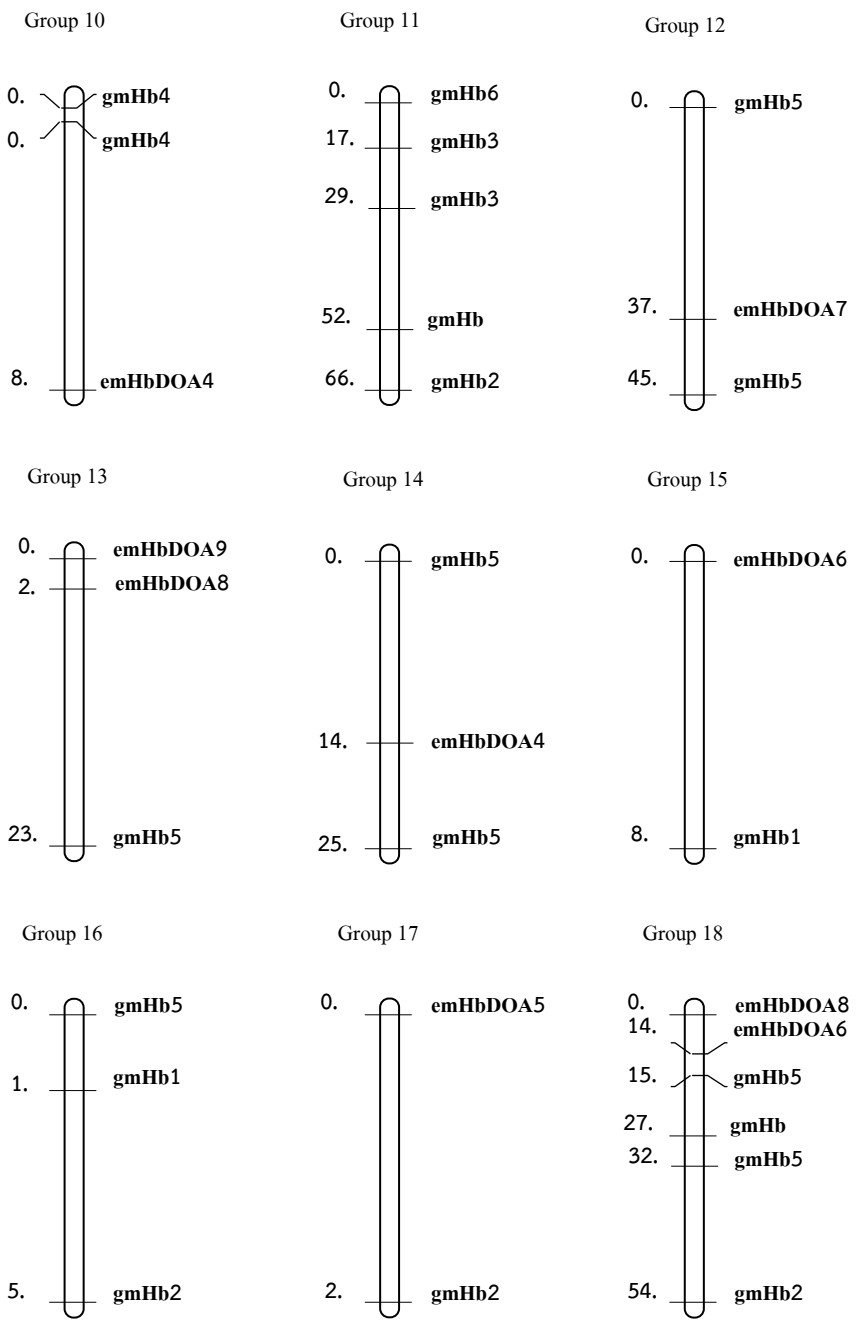
ที่ผ่านมาในยางพาราเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ทำการศึกษา เช่น RFLP RAPD AFLP และ microsatellite (SSR) แต่เครื่องหมายโมเลกุลชนิด RFLP มีข้อจำกัดในเรื่องเวลานาน ค่าใช้จ่ายสูง และขั้นตอนยุ่งยาก ส่วน AFLP และ RAPD ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีขั้นตอนไม่ยุ่งยากเนื่องจากอาศัยพื้นฐานของเทคนิคพีซีอาร์ แต่มีข้อจำกัดที่ส่วนใหญ่เป็นลักษณะ dominant ส่วน SSR นั้นมีข้อดีที่นำไปใช้ประโยชน์ได้ง่ายเนื่องจากอาศัยเทคนิคของพีซีอาร์ และมีลักษณะเป็น co-dominant การศึกษาทางพันธุศาสตร์ที่เกี่ยวกับการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด microsatellite ในสมัยแรกได้ค้นหาส่วนที่มีลำดับเบสซ้ำกันโดยแยกจาก genomic DNA library หรือเรียกว่า g-SSR ซึ่งต้องใช้ต้นทุนสูงในการคัดเลือกโคลนและหาลำดับเบสเพื่อหาคู่ของ primer ที่ขนาบข้างชิ้นส่วน SSR ในปัจจุบันมีการรายงานลำดับเบสที่เกิดจากการถอดรหัสของยีนที่เรียกว่า EST (Expressed sequence tags) ในฐานข้อมูลจำนวนมากซึ่งเป็นแหล่งที่น่าสนใจมากสำหรับนำมาใช้พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด microsatellite ได้อย่างมีศักยภาพ เรียกเครื่องหมายโมเลกุลชนิดนี้ว่า EST-SSR หรือ eSSR ซึ่งเป็นการค้นหา SSR ที่ใช้เวลาและค่าใช้จ่ายน้อย อีกทั้งยังเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่เกิดขึ้นจากการแสดงออกของยีน ซึ่งมีประโยชน์มากในการนำไปใช้ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์พืชและการทำแผนที่พันธุกรรม สำหรับในยางพาราได้มีรายงานลำดับเบสที่เกิดจากการแสดงออกของยีนในระดับการถอดรหัสและได้ถูกนำไปวิเคราะห์และออกแบบไพรเมอร์ เพื่อพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ EST-SSR (ประสาน และคณะ 2553) และได้นำไปใช้สร้างแผนที่พันธุกรรมของยางพารา โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด microsatellite ที่ได้จากที่พัฒนาจากข้อมูล EST และ g-SSR จำนวน 81 เครื่องหมาย ได้นำมาวิเคราะห์ความเชื่อมโยง (linkage) ระหว่างเครื่องหมายดีเอ็นเอ โดยใช้ประชากรยางพาราลูกผสม 100 สายพันธุ์ และทำการวิเคราะห์ความเชื่อมโยงระหว่างเครื่องหมายครั้งละ 2 เครื่องหมาย และวิเคราะห์ตำแหน่งการวางตัวของแต่ละเครื่องหมาย โดยใช้โปรแกรม OneMap (Margarido *et al*., 2007) ซึ่งทำงานอยู่บนโปรแกรม R โดยกำหนดค่า LOD score เท่ากับ 5 ค่า recombination fraction ที่ 0.35 ระยะห่างระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลใช้แบบ Kosambi function การวิเคราะห์อาศัยหลักการที่ว่า ถ้าเครื่องหมายโมเลกุลอยู่ต่างโครโมโซมกัน การแยกตัวจะเป็นอิสระต่อกัน (independent assortment) แต่ถ้าเครื่องหมายโมเลกุลเหล่านั้นอยู่ใกล้ชิดกันบนโครโมโซมเดียวกัน การแยกตัวจะไม่เป็นอิสระ ซึ่งขึ้นอยู่กับระยะทางระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลของทั้งสองตำแหน่งนั้น ถ้าอยู่ใกล้กันมากโอกาสจะเกิดรีคอมบิเนชั่นก็น้อย จึงมักไปด้วยกัน

จากการวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอทั้งหมด 81 เครื่องหมาย พบว่าเครื่องหมายที่วิเคราะห์ความเชื่อมโยงได้ จำนวน 60 เครื่องหมาย จำแนกเป็นเครื่องหมายโมเลกุลชนิด EST-SSR จำนวน 16 เครื่องหมาย และเครื่องหมายโมเลกุลชนิด g-SSR จำนวน 44 เครื่องหมาย ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลที่ไม่สามารถวิเคราะห์ความเชื่อมโยงได้มีจำนวน 21 เครื่องหมาย จำแนกเป็นเครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR จำนวน 3 เครื่องหมาย และเครื่องหมายโมเลกุล g-SSR จำนวน 18 เครื่องหมาย โดยเครื่องหมายโมเลกุลทั้ง 60 เครื่องหมาย สามารถวิเคราะห์การจัดกลุ่มความเชื่อมโยงได้ทั้งหมด 18 กลุ่ม ซึ่งตรงกับจำนวน haploid genome ของยางพารา ดังแสดงในภาพที่ 3 แสดงว่าเครื่องหมายโมเลกุลที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน หรือโครโมโซมเดียวกันนั้น จะมีแนวโน้มที่จะแยกตัวไปด้วยกัน (co-segregation) แต่ถ้าเครื่องหมายโมเลกุลอยู่ห่างกันมาก

หรือต่างกลุ่มกัน จะมีการแยกตัวเป็นอิสระต่อกัน แผนที่พันธุกรรมยางพาราที่สร้างได้มีประโยชน์อย่างมากในการใช้เป็นเครื่องหมายกำกับหน้าที่ (functional markers) ที่สัมพันธ์กับยีนที่ควบคุมลักษณะที่สนใจ หรือยีนที่ควบคุมลักษณะทางปริมาณ (QTL) ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการปรับปรุงพันธุ์ยางพาราโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล ทำให้เพิ่มความแม่นยำในการคัดเลือกพันธุ์ และช่วยลดระยะเวลาลงได้ (ประสาน, 2554)



ภาพที่ 3 แสดงแผนที่พันธุกรรมของยางพาราที่สร้างจากประชากรลูกผสม ที่เกิดจากการผสมระหว่างยางพันธุ์ RRIM600 และ PB217 จำนวน 100 สายพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR (emHbDOA) และ g-SSR (gmHb) (ประสาน, 2554)



ภาพที่ 3 (ต่อ) แสดงแผนที่พันธุกรรมของยางพาราที่สร้างจากประชากรลูกผสม ที่เกิดจากการผสมระหว่างยางพันธุ์ RRIM600 และ PB217 จำนวน 100 สายพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR (emHbDOA) และ g-SSR (gmHb) (ประสาน, 2554)

4. การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการปรับปรุงพันธุ์พืช

การปรับปรุงพันธุ์พืชจัดเป็นหัวใจสำคัญในการสร้างพืชพันธุ์ใหม่ ๆ ให้มีลักษณะดีตรงตามต้องการ เช่น ให้ผลผลิตสูง ต้านทานโรค แมลง และสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม ฯลฯ โดยรวมลักษณะทางพันธุกรรมที่ดีเด่นจากพันธุ์พืชในแหล่งต่าง ๆ สร้างพืชพันธุ์ใหม่ โดยใช้กระบวนการผสมพันธุ์ และคัดเลือกพันธุ์โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา หรือลักษณะทางการเกษตรต่าง ๆ (ลักษณะทางฟีโนไทป์) เป็นตัวบ่งชี้ ซึ่งบางลักษณะอาจจะคัดเลือกได้ยาก และใช้เวลานาน

เครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นลำดับเบสช่วงหนึ่งของดีเอ็นเอที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความเป็นเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต ที่สามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ พืชแต่ละสายพันธุ์มีลำดับเบสของดีเอ็นเอที่เป็นเอกลักษณ์ ความแตกต่างของลำดับเบสในดีเอ็นเอทำให้สิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างกัน และสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุล เพื่อคัดเลือกลักษณะที่ต้องการในระดับดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นการคัดเลือกที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการคัดเลือกให้ได้จีโนไทป์ตามต้องการ การคัดเลือกพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (Marker-assisted selection : MAS) เป็นการนำเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ทราบแล้วว่ามีตำแหน่งอยู่ใกล้กับยีนที่ควบคุมลักษณะที่ต้องการ มาใช้ช่วยในการคัดเลือกพันธุ์พืชที่คาดว่ามีลักษณะนั้น ๆ โดยไม่จำเป็นต้องดูฟีโนไทป์ของพืชที่ต้องการ ไม่ต้องทราบว่ายีนที่ควบคุมลักษณะเหล่านั้นมีการทำงานหรือให้ผลผลิตอะไร ไม่ต้องทราบลำดับเบสของยีน หรือตำแหน่งที่แน่นอนบนโครโมโซม โดยเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้สำหรับการคัดเลือกนั้นต้องอยู่ใกล้กับยีนที่สนใจ ยิ่งอยู่ใกล้มากเท่าใด ประสิทธิภาพในการใช้เพื่อช่วยคัดเลือกลักษณะก็ยิ่งสูง และมีความแม่นยำมากขึ้น เครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้เป็นได้ทั้งชนิดที่มีการข่มร่วมกัน และข่มสมบูรณ์ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งอยู่ใกล้ยีนที่สนใจ จะถ่ายทอดไปพร้อมกับยีนนั้น เนื่องจากอยู่บนโครโมโซมเดียวกัน แต่ก็อาจจะถูกแยกจากกันได้ ถ้าเกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนโครโมโซม และมีการรวมตัวกันใหม่ของยีน เครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้กับยีนที่สนใจยิ่งมากเท่าไร โอกาสที่จะเกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นโครโมโซมและแยกตัวออกจากกันก็น้อย ถือเป็นเครื่องหมายที่มีประสิทธิภาพสูงในการใช้ช่วยเพื่อคัดเลือกพันธุ์ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่อยู่ใกล้กับยีนมากนี้จะถ่ายทอดไปด้วยกันแบบ linkage disequilibrium (LD) ส่วนเครื่องหมายที่อยู่ห่างจากยีนจะเกิดการแยกตัวออกจากกันได้แบบ linkage equilibrium ซึ่งถือว่ามีประสิทธิภาพต่ำในการใช้เพื่อคัดเลือกพันธุ์ ซึ่งเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการคัดเลือก คือ เครื่องหมายที่เป็นส่วนหนึ่งของยีนที่ควบคุมลักษณะนั้นโดยตรง ในกรณีนี้อาจเรียกได้เป็น gene-assisted selection (GAS) (สุรินทร์, 2552) ซึ่งในปัจจุบันมีการศึกษากันมาก นอกจากนี้การมีจำนวนเครื่องหมายโมเลกุลหลาย ๆ ตำแหน่งที่วางอยู่บนแผนที่ยีน สามารถใช้เป็นเครื่องมือที่จะช่วยให้นักปรับปรุงพันธุ์พืชได้ทราบถึงตำแหน่ง และอิทธิพลของยีนที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ใช้เป็นแนวทางในการวบรวมยีนที่ดีเด่นต่าง ๆ เข้ามาอยู่ในพืชพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะที่ต้องการได้อย่างรวดเร็ว ถูกต้อง และแม่นยำ

การคัดเลือกพันธุ์ที่มีลักษณะที่จัดว่าเป็นลักษณะที่คัดเลือกได้ยาก ได้แก่ ลักษณะเชิงปริมาณ (quantitative trait loci) ซึ่งเป็นลักษณะที่แสดงออกส่วนใหญ่ในพืช คือมียีนหลายตัว (polygene) ในการควบคุมการแสดงออกของลักษณะ และสภาพแวดล้อมจะมีผลต่อการแสดงออกสูง เช่น ผลผลิต เหตุผลที่ลักษณะเหล่านี้คัดเลือกยากเพราะลักษณะเหล่านี้ต้องอาศัยวิธีการหรือกระบวนการที่พัฒนาขึ้นมาใช้คัดเลือกเฉพาะ เนื่องจากลักษณะเหล่านี้ไม่ปรากฏให้เห็นด้วยสายตาเปล่า จำเป็นต้องมีวิธีทดสอบ ซึ่งต่างจากการคัดเลือกพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ ที่การคัดเลือกจะดำเนินการภายในห้องปฏิบัติการ จึงไม่จำเป็นต้องคัดเลือกฟีโนไทป์ต่อไปอีก เช่น การปรับปรุงพันธุ์พืชต้านทานโรคก็สามารถที่จะทำการคัดเลือกได้ในระยะแรกของการเจริญเติบโต (ระยะต้นกล้า) หรือระยะก่อนที่จะมีการเจริญเติบโต (ระยะเมล็ด) โดยไม่จำเป็นต้องปลูกเชื้อ (จุลภาค, 2548)

เอกสารอ้างอิง

จุลภาค คุ้นวงศ์. 2548. การใช้ดีเอ็นเอเครื่องหมายช่วยคัดเลือก. เอกสารประกอบการฝึกอบรม Molecular breeding. วันที่ 25 – 26 เมษายน 2548 ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ จ.ปทุมธานี

ประสาน สืบสุข กุหลาบ คงทอง และกรรณิการ์ ธีระวัฒนสุข. 2554. การทำแผนที่ยีนของยางพาราโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR. หน้า 14-27. ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2553 สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร.

ประสาน สืบสุข ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ กุหลาบ คงทอง กิ่งกาญจน์ พิชญกุล และพิเชษฐ์ กรุดลอยมา. 2554. การจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวโพดทนแล้ง. หน้า 454-459. ใน: การประชุมวิชาการข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติ ครั้งที่ ๓๕ วันที่ 24-27 พฤษภาคม 2554 ณ โรงแรมมารวย การ์เด้น กรุงเทพฯ.

ประสาน สืบสุข กุหลาบ คงทอง และกรรณิการ์ ธีระวัฒนสุข. 2553. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล EST-SSR จากยางพารา. หน้า 18-33. ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2551-2552 สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ : จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. ภาควิชาพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 269 หน้า.

ห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี. 2011. การจัดทำเอกลักษณ์พันธุกรรมของข้าวโพด. แหล่งข้อมูล http://dnatec.kps.ku.ac.th. สืบค้น: 28 June 2011

Bornet B., B. Antoine and B.C. Marcaillou-Le. 2004. ISSR as new markers for genetic characterization and evaluation of relationships among phytoplankton. *Journal of Applied Phycology* 16 : (4) 285 – 290.

Margarido G.R.A., A.P. Souza and A.A.F. Garcia. 2007. OneMap: software for genetic mapping in outcrossing species. *Hereditas* 144: 78-79.

McCouch S and S.D. Tankslay. 1991. Development and use of restriction fragment length polymorphisms in rice breeding and genetic. Page 109- 133. *In*: *Rice biotechnology*. Khush, G.S. and Toenniessen, G.H. CAB International. Wallingford Oxon UK.

Powell W., C. Machray and J. Provan. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Sci*. 1: 215-222.

Tankslay S.D., N.D. Young, A.H. Paterson and M.W. Bonierbale. 1989. RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. *Biotechnology*. 7:257-264.

Vos P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. and M. Zebeau. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprintings. *Nucleic. Acids. Res*. 23: 4407-4414.

การประยุกต์ใช้เทคนิคการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี SDS/NaCl ในถั่วเหลือง

จีราพร แก่นทรัพย์

เนื้อหาในบทนี้เกี่ยวกับวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากพืชอย่างง่ายและรวดเร็วโดยใช้ SDS/NaCl ซึ่งถูกคิดค้นโดย Edwards และคณะ (1991) จากนั้นมีการปรับปรุงโดย Kotchoni และ Gachomo (2009) และมีเนื้อหาเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้วิธีดังกล่าวในการสกัดดีเอ็นเอจากถั่วเหลือง

การสกัดดีเอ็นเอในพืชชั้นสูงส่วนใหญ่มีปัญหาเรื่องสารรบกวน (interfering substance) เช่น โพลีฟีนอล โพลีแซคคาไรด์และน้ำยาง ซึ่งส่งผลกระทบต่อคุณภาพของดีเอ็นเอ โพลีแซคคาไรด์ขัดขวางเอนไซม์ในการเข้าถึงดีเอ็นเอจึงส่งผลให้เกิดการยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสและปฏิกิริยาของเอนไซม์อื่นๆ ที่มีดีเอ็นเอของพืชเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) การสกัดดีเอ็นเอโดยทั่วไปใช้ตัวทำละลายอินทรีย์อันตรายต่างๆ เช่น ฟีนอล คลอโรฟอร์ม เพื่อกำจัดสารรบกวน นอกจากนี้วิธีการส่วนใหญ่ใช้ไนโตรเจนเหลวหรือการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (lyophilization) กับเนื้อเยื่อสำหรับการบดเบื้องต้น ซึ่งกระบวนการเหล่านี้ไม่สามารถดำเนินการได้ในสถานที่ที่ไม่มีความพร้อมของไนโตรเจนเหลว

วิธีการสกัดดีเอ็นเอแบบดั้งเดิมที่ใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับสิ่งมีชีวิตเกือบทั้งหมดมีการใช้สารลดแรงตึงผิวประจุบวก (cationic detergent) ได้แก่ CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) ตามด้วยฟีนอล-คลอโรฟอร์มเพื่อแยกโปรตีนออกจากกรดนิวคลิอิก และการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยแอลกอฮอล์ โปรโตคอลนี้มักเรียกว่าวิธี CTAB (Murray and Thompson, 1980) วิธี CTAB นี้ไม่เพียงแต่มีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์อันตราย แต่ยังมีหลายขั้นตอนทำให้ใช้เวลานานจึงไม่เหมาะกับการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างจำนวนมาก ซึ่งขั้นตอนดังกล่าวประกอบด้วย การบดเนื้อเยื่อโดยใช้ไนโตรเจนเหลว ตามด้วยการแยกโปรตีนออกจากกรดนิวคลิอิก การตกตะกอนดีเอ็นเอ การล้างก้อนดีเอ็นเอ (DNA pellet) และการทำให้แห้ง (drying) มีการปั่นเหวี่ยงหลายครั้ง ในกรณีที่มีตัวอย่างจำนวนมากและมีความจำเป็นต้องทำการคัดเลือก (screening) หรือวิเคราะห์ภายใน 1 วัน การลดระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจึงเป็นความท้าทายที่สำคัญ โดยเป็นการปรับให้มีขั้นตอนที่รวดเร็วและง่าย รวมถึงได้คุณภาพของดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ที่หลากหลาย

วิธีการสกัดดีเอ็นเอแบบรวดเร็วโดยไม่ใช้ CTAB ถูกเสนอโดย Dellaporta และคณะ (1983) และดัดแปลงโดย Edwards และคณะ (1991) หลักการของวิธีการนี้ ได้แก่ การบดเชิงกลร่วมกับสารละลายบัฟเฟอร์สกัดดีเอ็นเอที่มี sodium dodecyl sulfate (SDS) 0.5 - 2% เป็นส่วนประกอบ ซึ่ง SDS มีหน้าที่ในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มนิวเคลียสเพื่อปลดปล่อยดีเอ็นเอออกมาละลายในสายละลายบัฟเฟอร์ หลังจากนั้นดีเอ็นเอจะถูกทำให้แยกออกมาโดยขั้นตอนปั่นเหวี่ยงให้เกิดการตกตะกอน โพลีแซคคาไรด์และโปรตีนส่วนใหญ่จะถูกอัดแน่นด้วย SDS ที่ไม่ละลายน้ำและตกตะกอนในระหว่างการปั่นเหวี่ยงครั้งแรก ขณะที่ดีเอ็นเอจะอยู่ในน้ำใสส่วนบน (supernatant) น้ำใสส่วนบนดังกล่าวจะถูกย้ายไปยังหลอดใหม่และดีเอ็นเอจะถูกทำให้ตกตะกอนด้วยไอโซโพรพานอล

การสกัดดีเอ็นเอจากพืชโดยใช้ SDS/NaCl ตามวิธีของ Edwards และคณะ (1991)

Edwards และคณะ (1991) ได้พัฒนาโปรโตคอลสำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากพืชโดยใช้ SDS/NaCl ที่รวดเร็วเรียบง่าย ปราศจากตัวทำละลายอินทรีย์อันตราย เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ไม่จำเป็นต้องใช้ไนโตรเจนเหลวและสามารถทำได้แม้ไม่ใช่ผู้เชี่ยวชาญ ด้วยโปรโตคอลนี้สามารถสกัดตัวอย่างดีเอ็นเอได้มากกว่า 100 ตัวอย่างต่อ 1 วัน ทำให้สามารถรับมือกับความท้าทายของตัวอย่างจำนวนมากในการสกัดดีเอ็นเอและการวิเคราะห์ทางพันธุกรรมต่างๆ ผลงานวิจัยของ Edwards และคณะ (1991) พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดจากพืช

Brassica napus ด้วยวิธี SDS/NaCl สามารถนำมาตรวจสอบชิ้นส่วนของยีน *β-glucuronidase* (GUS) ที่ถูกถ่ายฝากลงในพืชดังกล่าวโดยวิธีพีซีอาร์ได้

การสกัดดีเอ็นเอจากพืชโดยใช้ SDS/NaCl ตามวิธีของ Edwards และคณะ (1991) มีขั้นตอนดังนี้

1. เก็บใบอ่อนโดยใช้หลอด 1.5 ml ใช้ส่วนฝากดเพื่อตัดส่วนใบให้ลงไปในหลอด ซึ่งวิธีการตัดใบเช่นนี้ช่วยให้ตัวอย่างที่เก็บมีขนาดสม่ำเสมอ ทำการบดตัวอย่างด้วยก้านบด 15 วินาทีที่อุณหภูมิห้องโดยไม่ใส่บัฟเฟอร์
2. เติมสารละลายบัฟเฟอร์สกัดดีเอ็นเอ SDS/NaCl (SDS/NaCl Extraction Buffer ตามวิธีของ Edwards และคณะ (1991): 200 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS) ปริมาณ 400 ไมโครลิตร และทำการผสมแบบหมุนวน (vortex) 5 วินาที
3. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ดูดน้ำใสส่วนบน (supernatant) 300 ไมโครลิตรใส่ในหลอด 1.5 ml อันใหม่
4. ใส่ isopropanol ที่แช่เย็น 300 ไมโครลิตร และผสมเบา ๆ จากนั้นวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที
5. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เทน้ำใสส่วนบนทิ้ง
6. ก้อนดีเอ็นเอถูกทำให้แห้งด้วยเครื่องสุญญากาศ (vacuum)
7. ใส่ 1XTE ปริมาณ 100 ไมโครลิตรเพื่อละลายดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจากพืชโดยใช้ SDS/NaCl ตามวิธีของ Kotchoni และ Gachomo (2009)

Kotchoni และ Gachomo (2009) ทำการปรับปรุงวิธีการสกัดดีเอ็นเอของ Edwards และคณะ (1991) โดยไม่ใช้ EDTA และ Tris-HCl เป็นส่วนประกอบในสารละลายบัฟเฟอร์สกัดดีเอ็นเอ (SDS/NaCl Extraction Buffer ตามวิธีของ Kotchoni และ Gachomo (2009): 500 mM NaCl, 1% SDS) ทำให้ช่วยลดขั้นตอนการปรับค่า pH ในการเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์สกัดดีเอ็นเอและสามารถดำเนินการได้ในห้องปฏิบัติการที่ไม่ได้ติดตั้งตู้ดูดไอสารเคมี (fume hood) นอกจากนี้มีการเพิ่มขั้นตอนการล้างก้อนดีเอ็นเอ (DNA pellet) ด้วย 70% (v/v) เอทานอลเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่มีความสะอาดมากขึ้น ผลงานวิจัยของ Kotchoni และ Gachomo (2009) พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดจากพืชต้นแบบ *Arabidopsis thaliana* ด้วยวิธี SDS/NaCl สามารถนำมาตรวจสอบชิ้นส่วนของ T-DNA ในพืช *Arabidopsis thaliana* พันธุ์กลาย และชิ้นส่วนของยีนเป้าหมายที่ถูกทำให้ผิดปกติไม่สามารถแสดงออกหรือยีนน็อกเอาต์ (gene knockout) โดยวิธีพีซีอาร์ได้

การสกัดดีเอ็นเอจากพืชโดยใช้ SDS/NaCl ตามวิธีของ Kotchoni และ Gachomo (2009) มีขั้นตอนดังนี้

1. เก็บเนื้อเยื่อพืช (plant tissue) 10 – 50 มิลลิกรัมใส่ในหลอด 1.5 ml หรือในกรณีที่ตัวอย่างเป็นใบอ่อน ใช้ส่วนฝากดเพื่อตัดส่วนใบให้ลงไปในหลอด เช่นเดียวกับวิธีของ Edwards และคณะ (1991) ทำการบดตัวอย่างด้วยก้านบดที่อุณหภูมิห้องโดยไม่ใส่บัฟเฟอร์
2. เติมสารละลายบัฟเฟอร์สกัดดีเอ็นเอ SDS/NaCl (SDS/NaCl Extraction Buffer ตามวิธีของ Kotchoni และ Gachomo (2009): 500 mM NaCl, 1% SDS) ปริมาณ 400 ไมโครลิตร และทำการผสมแบบหมุนวน (vortex) 20 วินาที
3. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ดูดน้ำใสส่วนบน (supernatant) 400 ไมโครลิตรใส่ในหลอด 1.5 ml อันใหม่
4. ใส่ isopropanol ที่แช่เย็น 400 ไมโครลิตร และผสมเบา ๆ โดยการพลิกหลอดกลับไปมา (inversion)

5. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทน้ำใสส่วนบนทิ้ง
6. ใส่ 70% (v/v) เอทานอล 500 ไมโครลิตร เพื่อล้างก้อนดีเอ็นเอ
7. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เทน้ำใสส่วนบนทิ้ง
8. ซับเอทานอลส่วนเกินจากก้อนดีเอ็นเอโดยคว่ำหลอด 1.5 ml ลงบนกระดาษชำระที่สะอาดเพื่อผึ่งดีเอ็นเอให้แห้ง
9. ใส่น้ำ (ddH_2O) ปริมาณ 50 ไมโครลิตรเพื่อละลายดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจากถั่วเหลืองโดยใช้วิธี SDS/NaCl แบบประยุกต์

ผู้วิจัยได้ทำการสกัดดีเอ็นเอจากถั่วเหลืองโดยใช้ SDS/NaCl ซึ่งประยุกต์จากวิธีของ Edwards และคณะ (1991) ผสมผสานกับวิธีของ Kotchoni และ Gachomo (2009) กล่าวคือ ใช้สารละลายบัฟเฟอร์สกัดดีเอ็นเอ SDS/NaCl ตามวิธีของ Edwards และคณะ (1991) และเพิ่มขั้นตอนการล้างก้อนดีเอ็นเอด้วย 70% (v/v) เอทานอล เช่นเดียวกับวิธีของ Kotchoni และ Gachomo (2009) สาเหตุที่เลือกใช้สารละลายบัฟเฟอร์สกัดดีเอ็นเอ SDS/NaCl ตามวิธีของ Edwards และคณะ (1991) เนื่องจากมีส่วนประกอบของ EDTA และ Tris-HCl ซึ่ง EDTA มีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของ DNase ทำให้ดีเอ็นเอถูกปกป้องจากการย่อยของ DNase สำหรับ Tris-HCl ช่วยในการควบคุมระดับความเป็นกรด-ด่างในสารละลายให้เหมาะสม สารละลายบัฟเฟอร์ที่เป็นด่างเล็กน้อยช่วยลดแรงดึงดูดทางประจุไฟฟ้าระหว่างดีเอ็นเอกับโปรตีน และสาเหตุที่เพิ่มขั้นตอนการล้างก้อนดีเอ็นเอ (DNA pellet) ด้วย 70% (v/v) เอทานอล ตามวิธีของ Kotchoni และ Gachomo (2009) เนื่องจากต้องการล้างดีเอ็นเอให้มีความสะอาดมากขึ้น

การสกัดดีเอ็นเอจากพืชถั่วเหลืองโดยใช้ SDS/NaCl ประยุกต์จากวิธีของ Edwards และคณะ (1991) และวิธีของ Kotchoni และ Gachomo (2009) มีขั้นตอนดังนี้

1. เก็บใบอ่อนและลำต้นอ่อนของถั่วเหลืองประมาณ 30 มิลลิกรัมมาใส่ในโกร่ง
2. เติมสารละลายบัฟเฟอร์สกัดดีเอ็นเอ SDS/NaCl (SDS/NaCl Extraction Buffer ตามวิธีของ Edwards และคณะ (1991): 200 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS) ปริมาณ 400 ไมโครลิตร ทำการบดตัวอย่างด้วยโกร่งและสาก (mortar and pestle) ที่อุณหภูมิห้อง ดูดสารที่บดตัวอย่างใส่ในหลอด 1.5 ml
3. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ดูดน้ำใสส่วนบน (supernatant) 300 ไมโครลิตรใส่ในหลอด 1.5 ml อันใหม่
4. ใส่ isopropanol ที่แช่เย็น 300 ไมโครลิตร และผสมเบา ๆ จากนั้นวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที
5. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เทน้ำใสส่วนบนทิ้ง
6. ใส่ 70% (v/v) เอทานอล 500 ไมโครลิตร เพื่อล้างก้อนดีเอ็นเอ
7. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เทน้ำใสส่วนบนทิ้งด้วยความระมัดระวัง เพื่อไม่ให้ตะกอนดีเอ็นเอตกหล่นออกไป
8. ดูดน้ำส่วนที่เหลือออกให้หมด และผึ่งดีเอ็นเอให้แห้ง
9. ใส่น้ำที่ไม่มีนิวคลีเอส (nuclease-free water) 60 ไมโครลิตรเพื่อละลายดีเอ็นเอ

ในงานวิจัย เรื่อง การคัดเลือกพันธุ์ถั่วเหลืองโปรตีนสูงโดยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล ผู้วิจัยทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างถั่วเหลืองจำนวนทั้งสิ้น 180 สายพันธุ์/พันธุ์ โดยใช้วิธี SDS/NaCl แบบประยุกต์ดังกล่าวข้างต้น (ภาพที่ 1) ผลการสกัดดีเอ็นเอพบว่า ได้ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของดีเอ็นเอตัวอย่างละประมาณ

600 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ค่าความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ มีค่าเฉลี่ย OD260/OD280 เท่ากับ 1.97 ซึ่งถือว่าเป็นดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดี เนื่องจากมีรายงานว่าดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีนั้นต้องมีต้องมีค่า OD260/OD280 อยู่ในช่วง 1.7-2.0 (Maniatis *et al.*, 1982) สามารถนำไปใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับการตรวจสอบสายพันธุ์ การคัดเลือกพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล (ภาพที่ 2) และการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (sequencing) ได้ นอกจากนี้วิธี SDS/NaCl แบบประยุกต์ดังกล่าว อำไพ และคณะ (2559) ได้ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากใบของกระทือและพบว่าสามารถสกัดดีเอ็นเอได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นกัน

ข้อดีของการสกัดดีเอ็นเอจากพืชโดยใช้วิธี SDS/NaCl เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี CTAB

วิธี SDS/NaCl ไม่ต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์อันตรายทำให้ปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงานและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม สามารถสกัดดีเอ็นเอได้จำนวนตัวอย่างมากกว่าวิธี CTAB ในระยะเวลาที่เท่ากัน และประหยัดค่าใช้จ่าย

ข้อดีของการสกัดดีเอ็นเอจากพืชโดยใช้วิธี SDS/NaCl เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำยาสำเร็จรูป

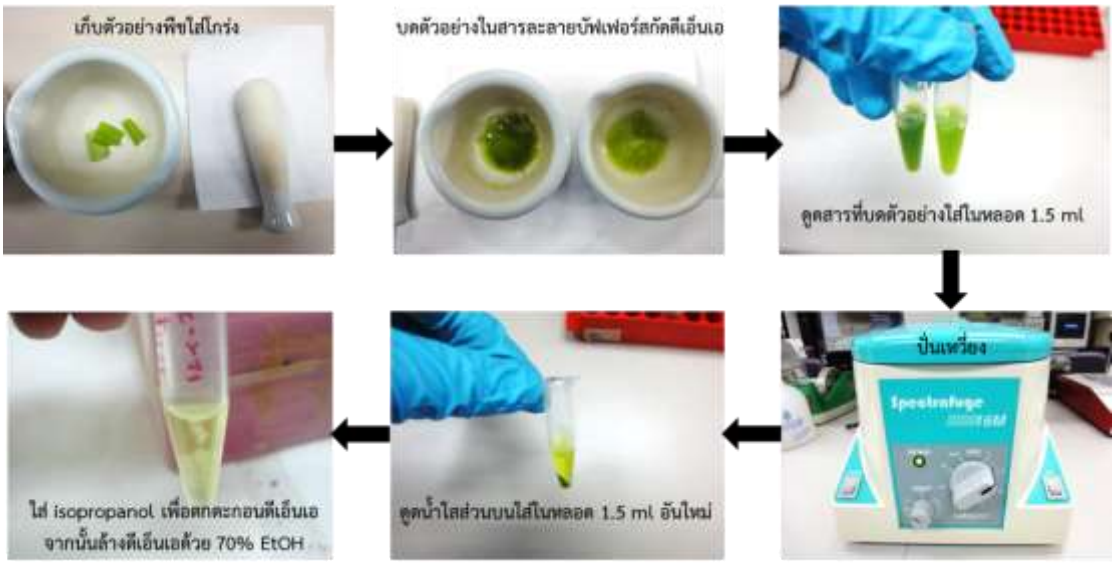
ประหยัดค่าใช้จ่าย

ข้อจำกัดของการสกัดดีเอ็นเอจากพืชโดยใช้วิธี SDS/NaCl

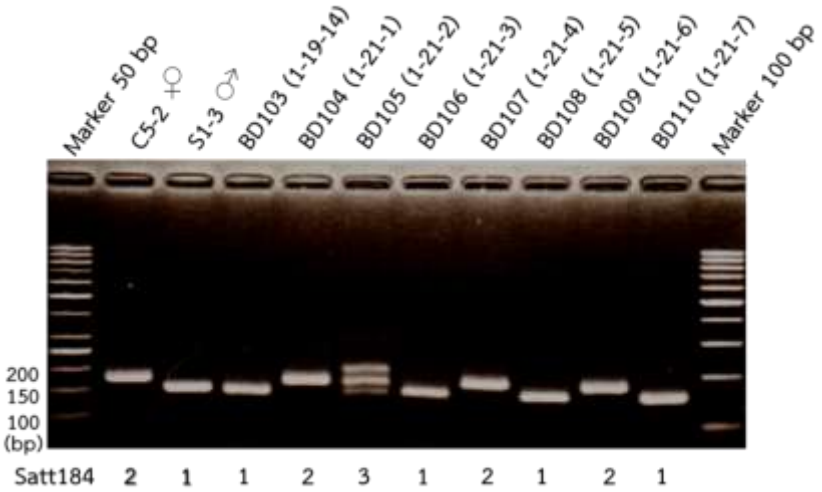
ตัวอย่างพืชที่มีแป้งหรือยาง เช่น ใบของถั่วเขียว และใบมันสำปะหลัง ไม่เหมาะกับการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธี SDS/NaCl ผู้วิจัยพบว่าดีเอ็นเอที่สกัดแบบ SDS/NaCl ของตัวอย่างเหล่านี้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ DNA polymerase แบบธรรมดาที่ไม่มีคุณสมบัติในการแข่งขันกับสารรบกวนได้

การนำไปใช้ประโยชน์

การสกัดดีเอ็นเอจากพืชโดยใช้วิธี SDS/NaCl มีขั้นตอนที่สะดวกรวดเร็ว ประหยัดค่าใช้จ่าย รวมถึงได้คุณภาพของดีเอ็นเอที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ที่หลากหลาย เช่น สามารถนำไปใช้ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์สำหรับการตรวจสอบสายพันธุ์พืช การตรวจสอบชิ้นส่วนของยีนที่ถูกถ่ายฝากลงในพืช การคัดเลือกพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล และการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (sequencing) อย่างไรก็ตามมีข้อจำกัดคือตัวอย่างพืชที่มีแป้งหรือยางไม่เหมาะกับการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธี SDS/NaCl



ภาพที่ 1 สรุปขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้วิธี SDS/NaCl แบบประยุกต์



ภาพที่ 2 การทดสอบจีโนไทป์คัดเลือกพันธุ์ถั่วเหลืองโปรตีนสูงโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล Satt184 ในประชากรสายพันธุ์แท้รุ่น F_8จากคู่ผสม C5-2 x S1-3

Lane1, 12: DNA Marker, Lane 2: พันธุ์แม่ C5-2, Lane 3: พันธุ์พ่อS1-3 (โปรตีนสูง), Lane 4 – 11: ประชากรสายพันธุ์แท้รุ่น F_8 , 1: แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์พ่อ S1-3, 2: แสดงแถบดีเอ็นเอเหมือนพันธุ์แม่ C5-2, 3: แสดงแถบดีเอ็นเอแตกต่างจากพันธุ์พ่อ S1-3 และพันธุ์แม่ C5-2

เอกสารอ้างอิง

อำไพ สินพัฒนานนท์ จีราพร แก่นทรัพย์ ภุมรินทร์ วณิชชนานันท์ นาตยา ดำอำไพ และหทัยรัตน์ อุไรรงค์. 2559. การฉายรังสีเนื้อเยื่อกระทือให้เกิดการกลายพันธุ์. เรื่องเต็ม. กรมวิชาการเกษตร. 25 หน้า.

Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Mol Biol Rep* 1:19–21.

Edwards, K., C. Johnstone and C. Thompson. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* 19:1349.

Kotchoni, S.O. and E.W. Gachomo. 2009. A rapid and hazardous reagent free protocol for genomic DNA extraction suitable for genetic studies in plants. *Mol Biol Rep* 36**:** 1633–1636.

Maniatis,T., J. Sambrook and E.F. Fritsch. 1982. Molecular Cloning - A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 76-85.

Murray, M.G. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 19:4321–4325.

การประยุกต์ใช้เทคนิคการบดชิ้นส่วนพืช โดยการตีด้วยเม็ดลูกเหล็กเพื่อสกัดดีเอ็นเออย่างรวดเร็วสำหรับการตรวจเพศอินทผลัม

อรุโณทัย ซาววา

อินทผลัมเริ่มนำเข้ามาปลูกในประเทศไทยประมาณปี 2555 เป็นผลไม้ที่ได้รับความนิยมเนื่องจากเป็นผลไม้ที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง มีเส้นใยและวิตามินบีหลายชนิดแต่แคลอรี่ต่ำ รับประทานได้ทั้งผลสดและอบแห้ง ราคาจำหน่ายอยู่ที่กิโลกรัมละ 500-800 บาท แล้วแต่ขนาดและสายพันธุ์ เกษตรกรจึงให้ความสนใจปลูกเป็นพืชทางเลือกที่มีราคาสูง การปลูกอินทผลัมมีหลากหลายสายพันธุ์ มีทั้งอินทผลัมประดับ อินทผลัมบริโภคผลสดและผลแห้ง โดยพันธุ์ที่นิยมปลูกมากทางภาคเหนือคือ พันธุ์ KL1 (Maejo 36) ซึ่งเป็นพันธุ์บริโภคผลสด ที่มีการพัฒนาสายพันธุ์ในอำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่ มีแหล่งปลูกมากทางภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคอีสานในบางพื้นที่ รองลงมาคือ พันธุ์ Deglet Nour และ Medjun ซึ่งเป็นพันธุ์บริโภคผลแห้ง ซึ่งปลูกมากทางภาคอีสาน

การขยายพันธุ์อินทผลัม สามารถขยายพันธุ์ได้ 3 วิธี คือ การเพาะเมล็ด การแยกเหง้า และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ วิธีแรกการเพาะเมล็ด ถือเป็นการปลูกอินทผลัมที่เป็นการลงทุนที่ต่ำที่สุด แต่เนื่องจากอินทผลัมเป็นต้นพืชที่แยกเพศ การทราบเพศต้องรอ 3-7 ปี จึงจะทราบว่าเป็นต้นตัวผู้ หรือต้นตัวเมีย วิธีที่สองการแยกเหง้า อินทผลัมจะมีเหง้าแตกออกมาทางโคนด้านล่างของต้น สามารถขุดแยกเหง้า เพื่อนำมาปลูกให้ได้ต้นตามพันธุ์นั้นๆ แต่ต้นแม่พันธุ์ดีต้นหนึ่งจะได้เหง้าตลอดอายุเพียงไม่เกิน ๒๐ เหง้า หากจะขยายจำนวนมากๆ ต้องอาศัยต้นแม่จำนวนมาก เหง้าที่เกิดจะไปดึงต้นให้โตช้าลงและให้ผลช้ากว่าการปลูกด้วยเมล็ด และวิธีสุดท้าย คือ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นการขยายต้นตัวเมียพันธุ์ดีๆ แบบจำนวนมาก ได้ต้นตรงตามพันธุ์ เป็นอีกวิธีการปลูกที่ต่างประเทศนิยมนำไปปลูกในเชิงพาณิชย์ ราคาต่อต้นค่อนข้างสูง และในประเทศไทยยังคงต้องสั่งนำเข้าจากต่างประเทศ ดังนั้นต้องใช้ทุนจำนวนมากในการปลูก และต้องพิจารณาดูว่าห้องปฏิบัติการเพาะเนื้อเยื่อขายน่าเชื่อถือระดับไหน ต้องดูแหล่งข้อมูลว่าเคยมีปัญหาอะไรหรือไม่ มีมาตรฐานระดับไหน ส่งไปขายที่ประเทศไหนบ้าง เคยมีประวัติการฟ้องร้องกันหรือไม่ เป็นต้น ข้อมูลเหล่านี้จะช่วยสร้างความมั่นใจเพราะห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงบางที่อาจไม่ได้มาตรฐาน เลือกต้นพันธุ์แม่ที่ไม่ได้มาตรฐาน (พันธุ์แม่ไม่ดี หรือพันธุ์ยังไม่นิ่ง) มาหลอกขาย เป็นต้น

การปลูกแบบเพาะเมล็ดอาจมีความเสี่ยงเรื่องเพศของต้นและการกลายพันธุ์ แต่ก็มีข้อดี คือ ประหยัดต้นทุนการปลูกมากกว่า มีโอกาสได้พันธุ์ใหม่ๆ ที่เกิดจากการผสมข้ามต้น มีการปรับตัวเข้ากับสภาพภูมิศาสตร์ของประเทศไทยได้ดี การเริ่มต้นพัฒนาการปลูกด้วยการเพาะเมล็ดน่าจะช่วยเพิ่มประสบการณ์และการเรียนรู้เกี่ยวกับอินทผลัมมากยิ่งขึ้น และอนาคตค่อยนำไปสู่การพัฒนาเรื่องการปลูกด้วยวิธีอื่นๆ มากยิ่งขึ้น การเพาะเมล็ดจะช่วยสร้างพันธุ์อินทผลัมพันธุ์ใหม่ๆ เกิดขึ้นได้ เนื่องจากอินทผลัมเป็นต้นแยกเพศ ต้นตัวผู้และต้นตัวเมียอยู่คนละต้น และต้องรอ 3-7 ปี ถึงจะทราบเพศ ทำให้เสียทั้งเวลาและค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษา เช่น ปุ๋ย และสารเคมี เป็นต้น ดังนั้น การตรวจเพศอินทผลัมโดยเครื่องหมายโมเลกุลในระยะต้นกล้า ทำให้ทราบเพศได้เร็วขึ้น สามารถกำหนดจำนวนต้นตัวผู้และต้นตัวเมียต่อแปลง และลดค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษาต้นตัวผู้ที่ไม่ต้องการได้

เทคนิคการตรวจเพศอินทผลัมด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจงต่อเพศอินทผลัมได้มีการพัฒนากันอย่างแพร่หลาย เช่น เครื่องหมาย SSR SCAR และ SNP เป็นต้น อย่างไรก็ตาม การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์นั้น จำเป็นต้องทำการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อพืชให้บริสุทธิ์ ซึ่งการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB เป็นวิธีที่ให้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพที่ดีที่สุด แต่มีหลายขั้นตอน

ใช้ระยะเวลาในการสกัดที่นานมาก รวมถึงต้องใช้ไนโตรเจนเหลวในการบดเซลล์ให้แตกก่อนเริ่มการสกัดด้วยน้ำยาและขั้นตอนอื่นๆ ดังนั้นบทนี้จึงได้กล่าวถึงการประยุกต์ใช้เทคนิคการสกัดดีเอ็นเอด้วยการตีเม็ดลูกเหล็กเพื่อลดระยะเวลาและสารเคมี สำหรับการตรวจสอบเพศอินทผลัมด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยทำการเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากใบอินทผลัมด้วยวิธี CTAB ที่บดด้วยไนโตรเจนเหลว และสกัดดีเอ็นเออย่างรวดเร็วด้วยการตีเม็ดลูกเหล็ก

การสกัดดีเอ็นเอจากใบอินทผลัม

1. การสกัดดีเอ็นเอจากใบอินทผลัมด้วยวิธี CTAB ที่บดด้วยไนโตรเจนเหลว

ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ดัดแปลงจาก Lodhi *et al.*(1994) ตามรายงานของอรุโณทัยและคณะ (2552) ดังนี้

- เตรียมบัฟเฟอร์สำหรับสกัดดีเอ็นเอ (Extraction buffer) [ประกอบด้วย 20 mM sodium EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl และ 2% (W/V) CTAB (cetyltrimethylammonium bromide)] เติม 0.2% β-mercaptoethanol นำบัฟเฟอร์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ก่อนการใช้งาน
- ชั่งใบอินทผลัม 0.5 กรัม ใส่โกร่งพร้อมด้วยไนโตรเจนเหลวแล้วบดให้ละเอียดจนเป็นผงแป้ง ใส่หลอด 15 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์สำหรับสกัดดีเอ็นเอ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
- นำหลอดบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (เขย่าทุก 20 นาที) แล้วนำหลอดออกมาวางที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เติม Choroform:Isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมโดยการกลับหลอดไปมา 10 นาที
- นำหลอดไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที
- ดูดน้ำใสปริมาตร 750 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Choroform:Isoamyl alcohol (24:1) 750 ไมโครลิตร ผสมกลับหลอดไปมา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที
- ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม 3M NaOAC ปริมาตร 0.1 เท่า และ Isopropanol ปริมาตร 0.6 เท่า
- นำไปตกตะกอนดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
- นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 750 ไมโครลิตร สองครั้ง
- ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และเติม RNaseA (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 4 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง (O.D.) โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น A260/A280

2. การสกัดดีเอ็นเอโดยการบดชิ้นส่วนพืชด้วยการตีเม็ดลูกเหล็ก

- เตรียมสารละลายสำหรับการสกัดดีเอ็นเอดัดแปลงจาก Miller *et al.* (1999) ตามรายงานของอรุโณทัยและคณะ (2563) ดังนี้

สารละลายที่ 1: 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 M NaCl, 0.2 M Sucrose และ 10 mM EDTA

สารละลายที่ 2: 400 mM Tris-HCl pH 9.2, 250 mM EDTA และ 2.5% SDS

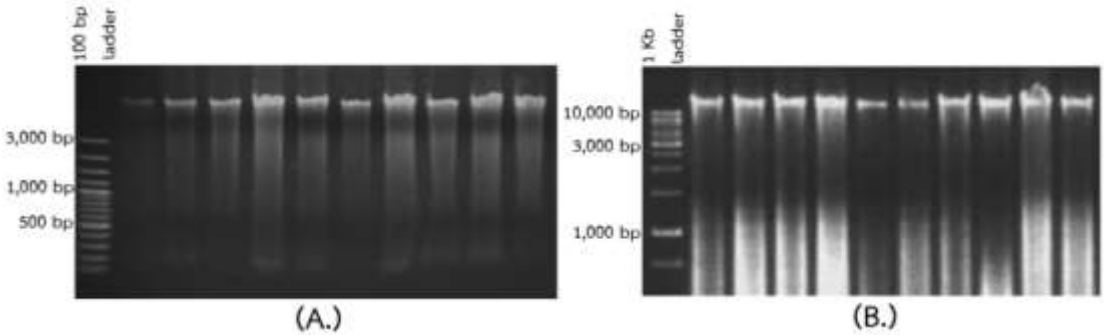
สารละลายที่ 3: เตรียมปริมาตร 400 มิลลิลิตร มีส่วนผสมดังนี้ 5M KOAc ปริมาตร 240 มิลลิลิตร, 96% Acetic acid ปริมาตร 46 มิลลิลิตร และ ddH_2O ปริมาตร 114 มิลลิลิตร

- ตัดใบอินทผลัมด้วยใบมีดผ่าตัดให้ได้จำนวน 0.05 กรัม ใส่ในหลอด 2 มิลลิลิตร ที่มีลูกเหล็กขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4 เซนติเมตร จำนวน 2 ลูก
- เติมสารละลายที่ 1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วตีด้วยเครื่อง Tissue homogenizer ที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที
- เติมสารละลายที่ 2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที
- เติมสารละลายที่ 3 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และคลอโรฟอร์ม 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยกลับหลอดขึ้นลงนาน 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที
- ดูดส่วนใสปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- เติม Iso-propanol ที่แช่เย็นจัดปริมาตร 500 ไมโครลิตร
- นำหลอดไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที
- ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 700 ไมโครลิตร จำนวน 2 รอบ
- ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเติม RNaseA (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง (O.D.) โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น A260/A280

การเปรียบเทียบการสกัดดีเอ็นเอจากใบอินผลัมด้วยวิธี CTAB ที่บดด้วยไนโตรเจนเหลว และการสกัดดีเอ็นเอโดยการบดชิ้นส่วนพืชด้วยการตีเม็ดลูกเหล็ก จำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่า การสกัดดีเอ็นเออย่างรวดเร็วด้วยการตีเม็ดลูกเหล็กได้ปริมาณดีเอ็นเอมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 318 นาโนกรัม/ไมโครลิตร สำหรับการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ที่บดด้วยไนโตรเจนเหลวมีปริมาณดีเอ็นเอค่าเฉลี่ยเท่ากับ 499 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ซึ่งพบว่าการสกัดดีเอ็นเอทั้งสองวิธี มีความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอไม่มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 1 และภาพที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการเปรียบเทียบปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอจากใบอินทผลัมที่สกัดด้วยวิธี CTAB และวิธีการตีลูกเหล็ก

No.	การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB		การสกัดดีเอ็นเออย่างรวดเร็วโดยการตีด้วยลูกเหล็ก	
	ปริมาณดีเอ็นเอ (ng/ul)	ความบริสุทธิ์ (A260/A280)	ปริมาณดีเอ็นเอ (ng/ul)	ความบริสุทธิ์ (A260/A280)
1	237	1.814	200	1.921
2	316	2.014	451	1.866
3	357	1.775	218	1.822
4	449	1.817	478	1.978
5	626	1.914	336	1.926
6	561	1.794	103	1.811
7	561	1.934	386	1.886
8	556	1.883	285	1.964
9	684	1.947	367	1.881
10	644	1.786	353	1.803
ค่าเฉลี่ย	499	1.868	318	1.886



ภาพที่ 1 ดีเอ็นเออินทผลัม (A.) สกัดด้วยวิธี CTAB และ (B.) สกัดด้วยวิธีการตีลูกเหล็ก โดยหยดดีเอ็นเอ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร บนเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์

ข้อดีของการสกัดดีเอ็นเอโดยการบดชิ้นส่วนพืชด้วยการตีเม็ดลูกเหล็กเปรียบเทียบกับวิธี CTAB

ลดระยะเวลา ลดปริมาณสารเคมีช่วยให้ประหยัดค่าใช้จ่าย ใช้จำนวนตัวอย่างใบน้อยกว่า ขั้นตอนการดำเนินการน้อยกว่าทำให้สามารถสกัดดีเอ็นเอได้จำนวนตัวอย่างมากกว่าในระยะเวลาที่เท่ากัน

ข้อจำกัดของการสกัดดีเอ็นเอโดยการบดชิ้นส่วนพืชด้วยการตีเม็ดลูกเหล็กเปรียบเทียบกับวิธี CTAB

ระยะเวลาและความแรงของการตีด้วยเม็ดลูกเหล็กมีผลต่อการฉีกขาดของดีเอ็นเอ หากเปลี่ยนชนิดพืชจำเป็นต้องทำการทดสอบระยะเวลาการตีใบพืชก่อนการสกัดจริงทุกครั้ง นอกจากนี้เครื่องตี (Homoginizer) ที่ใช้ในการตีด้วยเม็ดลูกปัด (beat bead) หรือเม็ดลูกเหล็ก (metal bead) ส่วนใหญ่มีราคาสูง

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์

เตรียมส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้น้ำยา Green Gotaq® Flexi ยี่ห้อ Promega ดังนี้ ดีเอ็นเอต้นแบบ (100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร บัฟเฟอร์ 5X Green Gotaq® Flexi ปริมาตร 5 ไมโครลิตร 25 mM $MgCl_2$ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร 2 mM dNTP ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ forward (5uM) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ reverse (5uM) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร Gotaq DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.15 ไมโครลิตร ในปฏิกิริยาปริมาตรทั้งหมด 25 ไมโครลิตร โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง thermal cycle, Gene Amp 9700 ตามขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอน	อุณหภูมิ	เวลา	จำนวน cycles
Initial denaturation	94 °C	3 นาที	1 cycle
Denaturation	94 °C	30 วินาที	35 cycle
Annealing	60 °C	30 วินาที	
Extension	72 °C	30 วินาที	
Final extension	72 °C	7 นาที	1 cycle

การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์

ทำการตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็คโทรโฟรีซีส (electrophoresis) โดยหยดผลผลิตพีซีอาร์ปริมาตร 4 ไมโครลิตร บนเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ในบัฟเฟอร์ 1xTBE ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที ย้อมด้วยสีเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วบันทึกแถบดีเอ็นเอด้วยชุดถ่ายภาพ UV Transilluminators ยี่ห้อ BIORAD)

การนำไปใช้ประโยชน์

ในปี 2559-2560 กลุ่มวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ได้ทำการศึกษาและพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบเพศอินทผลัมในระยะต้นกล้าด้วยวิธีพีซีอาร์ (ภาพที่ 2) โดยทำการศึกษากับต้นอินทผลัมที่ปลูกในประเทศไทย ได้แก่ พันธุ์ KL1 เดจเลทนัวร์ และบาฮี พบไพรเมอร์ที่สามารถใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการแยกเพศอินทผลัม คือ ไพรเมอร์ DpDOAmal5F และ DpDOAmal4R จะได้แถบดีเอ็นเอขนาด 450 เบส เมื่อทำพีซีอาร์แบบรวมร่วมกับชิ้นส่วนดีเอ็นเอหรือยีนอ้างอิง ผลที่ได้จะมองเห็นแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนสองแถบในเพศผู้และหนึ่งแถบในเพศเมีย สามารถใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเออ้างอิงที่ใช้ไพรเมอร์ PDK30sF และ PDK30sR ให้แถบดีเอ็นเอ ขนาด 693 เบส (ภาพที่ 3) สามารถนำไปใช้ตรวจสอบเพศอินทผลัมในระยะต้นกล้าอายุตั้งแต่ 4 เดือน ได้โดยไม่ต้องรอ 3-7 ปี

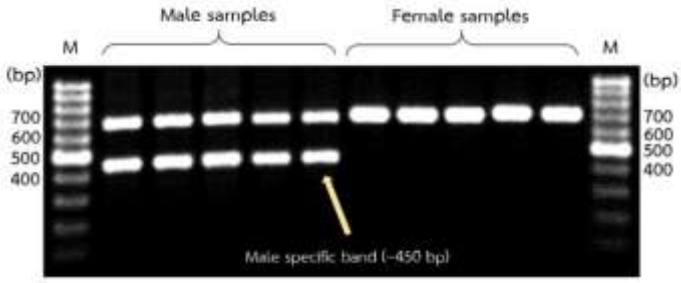
ใบอินทผลัมจากต้นกล้าอายุ 4-8 เดือน

การบดชิ้นส่วนพืชโดยการตีด้วยเม็ดลูกเหล็ก

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR (Polymerase Chain Reaction)

ตรวจสอบผลด้วยเจลอิเล็คโตรโฟรีซิส

ภาพที่ 2 สรุปขั้นตอนการตรวจสอบเพศอินทผลัมในระยะต้นกล้าด้วยวิธีการสกัดดีเอ็นเออย่างรวดเร็วโดยการตีด้วยเม็ดลูกเหล็ก



ภาพที่ 3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ DpDOAmale5F และ DpDOAmale4R ที่เฉพาะเจาะจงกับอินทผลัมเพศผู้ให้แถบดีเอ็นเอประมาณ 450 คู่เบส บนเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ (Sawwa and Seubsuk, 2019)

เอกสารอ้างอิง

อรุโณทัย ซาววา สุภาวดี ง้อเหรียญ อัญชลี ศรีสุวรรณ ประพิศ วองเทียม และหทัยรัตน์ อุไรรงค์. 2552. การศึกษาความหลากหลายของพันธุ์มันสำปะหลังในประเทศไทยโดยใช้เทคนิค SCAR (Sequence Characterized Amplified Region). รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2551-2552 สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร. หน้า 96-118.

อรุโณทัย ซาววา ศุภรัสมิ์ พูลพัฒนสุวรรณ และประสาน สืบสุข. 2563. การคัดเลือกไพรเมอร์และตรวจสอบเพศอินทผลัมด้วยเทคนิคพีซีอาร์. วารสารวิชาการเกษตร ปีที่ 38 ฉบับที่ 1. หน้า 13-22

Al-Mohmoud, M.E., E.K. Al-Dous. E.K. Al-Azwani and J.A. Malek. 2012. DNA-based assays to distinguish date palm (Arecaceae) gender. *American Journal of Botany*. e7-e10

Sawwa, A. and S. Seubsuk. 2019. Sex Determination of Date Palm (Phoenix Dectylifera L.) Using DNA marker. Intrenatiional research conference proceedings on April 16-17, 2019, Lisbon Portugal, page 340.

Lodhi, M., A. Guang-NingYe, N.F. Weeden and B.I. Reisch. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine Cultivars, Vitis species and Ampelopsis. *Plant Molecular Biology Reporter* 12(1): 6-13.

Miller, D. N., J. E Bryant, E.L. Madsen, and W.C. Ghiorse. 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Applied and environmental microbiology* 65(11): 4715–4724.

การประยุกต์ใช้การเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบอย่างรวดเร็วเพื่อตรวจสอบตำแหน่งสนิปส์ในปาล์มน้ำมันด้วยเทคนิค Real-time PCR

ประสาน สืบสุข

คำนำ

วิธีการสกัดดีเอ็นเอของพืชที่มีรายงานส่วนใหญ่มีความจำเพาะกับชนิดของพืชที่ต้องการสกัด ที่ผ่านมาชุดสกัดดีเอ็นเอที่ใช้ในเชิงพาณิชย์ส่วนมากมักมีราคาแพง จึงไม่เหมาะสมสำหรับใช้สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืชที่มีจำนวนมาก และอาจจะไม่เหมาะสมกับตัวอย่างของเนื้อเยื่อพืชบางชนิดที่มีปริมาณสารพวกโพลีฟีนอล (Pholyphenols) และ พอลิแซ็กคาไรด์ (Polysaccharide) การสกัดดีเอ็นเอจากพืชบางวิธีต้องการวัสดุที่มีความพิเศษพวก magnetic beads หรือ binding columns ซึ่งเป็นวิธีการที่มีราคาแพง ทำให้บางห้องปฏิบัติการไม่สามารถเข้าถึงได้ สำหรับการสกัดดีเอ็นเอแบบพื้นฐานโดยใช้ CTAB ได้มีการใช้กันอย่างแพร่หลายและให้ผลที่ประสพผลสำเร็จกับพืชหลายชนิด แต่ในพืชบางชนิดอาจจะได้ผลไม่ดีเท่าที่ควร การเตรียมดีเอ็นเอให้คุณภาพและปริมาณที่เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ของการนำดีเอ็นเอไปใช้จึงเป็นสิ่งจำเป็น การวิเคราะห์และตรวจสอบโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลที่อาศัยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์จำเป็นต้องใช้ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์ และปริมาณดีเอ็นเอที่เพียงพอ จึงจะให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง

การตรวจสอบจีโนไทป์ของพืชที่ใช้วิธีการตรวจตำแหน่งดีเอ็นเอที่มีการเปลี่ยนแปลงเบสแบบสนิปส์ (Single Nucleotide Polymorphism: SNP) โดยใช้เทคนิค Real-time PCR นับเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย ซึ่งต้องใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่ต้องผ่านขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืชด้วยวิธีพื้นฐานโดยใช้ CTAB หรือการใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวต้องใช้ระยะเวลานาน และค่าใช้จ่ายสูง บางวิธีมีขั้นตอนการสกัดที่ยุ่งยากซับซ้อน ปัจจุบันได้มีเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ชิ้นส่วนใบพืชที่มีขนาดเล็กใส่ลงในปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยตรง หรือการบดชิ้นส่วนของใบพืชในน้ำยา dilution buffer แล้วนำสารละลายที่ได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เรียกวิธีการนี้ว่า direct PCR ซึ่งวิธีการที่กล่าวมานี้เมื่อนำมาใช้ตรวจตำแหน่งสนิปส์ในปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิค Real-time PCR พบว่าให้ผลการตรวจสอบที่ผิดพลาด ดังนั้นจึงหาวิธีการเตรียมดีเอ็นเอเพื่อให้เป็นต้นแบบสำหรับการตรวจสอบตำแหน่งสนิปส์ด้วยเทคนิค Real-time PCR โดยนำวิธี Nested PCR มาประยุกต์ใช้

Nested PCR เป็นเทคนิคการทำ PCR เพื่อให้ได้ผลผลิต PCR ที่มากขึ้น ในกรณีดีเอ็นเอต้นแบบที่เพิ่มขยายยากหรือเพิ่มได้ปริมาณน้อย จุดเด่นของเทคนิค nested PCR คือเป็นการเพิ่มความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ในการเพิ่มจำนวนและการตรวจสอบดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการศึกษา Nested PCR ใช้หลักการแบ่งการทำ PCR 2 ขั้นตอนด้วยไพรเมอร์สองคู่ที่จำเพาะกับยีนเดียวกัน แต่ไพรเมอร์แต่ละตัวจะจับกับดีเอ็นเอต้นแบบในบริเวณที่แตกต่างกัน การทำ PCR ขั้นตอนแรก (first round PCR) ใช้ไพรเมอร์คู่ที่จับบริเวณรอบนอกของดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่กว่าดีเอ็นเอเป้าหมายแต่มีดีเอ็นเป้าหมายอยู่ภายในลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตของดีเอ็นเอ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบก่อน หลังจากนั้นนำผลผลิตของ PCR ขั้นตอนแรกไปทำ PCR ขั้นตอนที่สอง (second round PCR) โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่สองซึ่งออกแบบให้เพิ่มขยายได้เฉพาะดีเอ็นเอเป้าหมาย

วิธีดำเนินการ

ได้นำเทคนิค Nested PCR มาประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มดีเอ็นเอส่วนที่ต้องการตรวจสอบ สำหรับใช้ในปฏิกิริยาของ Real-time PCR เพื่อตรวจสอบตำแหน่งสนิปส์ของยีน MADS-box ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความหนาของกะลาปาล์มน้ำมัน (Singh et al., 2013) โดยมีวิธีดำเนินการ ดังนี้

1. การเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบโดยใช้สารละลาย dilution buffer

1.1 ตัดใบปาล์มน้ำมันให้มีเส้นขนาด 2 ตารางมิลลิเมตร ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีสารละลาย dilution buffer 20 ไมโครลิตร (Thermo Scientific, 2020) บดตัวอย่างใบกับผนังหลอดโดยใช้ pipette tip ขนาด 200 ไมโครลิตร จนสารละลายมีสีเขียว จากนั้นปั่นรวบรวมตัวอย่างไว้ที่ก้นหลอด (spin down) นำสารละลายส่วนบน 1 ไมโครลิตร ไปใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

1.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์รอบแรก โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยา แสดงในตารางที่ 1 และสภาวะการทำงานของเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (Solis BioDyne, 2020) แสดงในตารางที่ 2 ดังนี้

ตารางที่ 1 ส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรอบแรก

Compoment	Volume	Final concentration
5X HOT FIREPol Blend Master Mix	4 ul	1X
Forward primer (10 pmol/ul)[1]	0.6 ul	0.3 uM
Reverse primer (10 pmol/ul) [2]	0.6 ul	0.3 uM
DNA template in dilution buffer	1 ul	
H_2O	13.8	

[1] Forward primer (5’-CCAACTTCAGCAGACAGAGGTGAAAGAG-3’)

[2] Reverse primer (5’-GAGAAGGCGTCATCAAAGCATACCTGTT-3’)

ตารางที่ 2 สภาวะการทำงานของเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมรอบแรก

Operation	Temperature	Time	Cycles
Initial activation	95 °C	15 min	1
Denaturation	95 °C	10 sec	20
Annealing	55 °C	30 sec	
Extention	72 °C	30 sec	
Final extention	95 °C	10 min	1

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรอบที่สองเพื่อและตรวจสอบตำแหน่งสนิปส์

เมื่อปฏิกิริยาพีซีอาร์รอบแรกเสร็จสิ้น ให้นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรอบที่สอง และตรวจสอบตำแหน่งสนิปส์โดยใช้โพรบชนิด TaqMan Genotyping Assay โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังแสดงในตารางที่ 3 และกำหนดสภาวะการทำงานของเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ดังแสดงในตารางที่ 4 โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์จะได้ค่าการเกิดสีของฟลูออเรสเซนต์ ถูกบันทึกไว้ตามจำนวนรอบที่ทำพีซีอาร์ การวิเคราะห์ตำแหน่งสนิปส์ จะสร้าง allelic discrimination plot ของแต่ละตัวอย่างด้วยโปรแกรม QuantStudio Design & Analysis Software โดย allele ของแต่ละตำแหน่งสนิปส์จะอยู่ที่แกน X และ แกน Y ถ้าหากปรากฏตำแหน่งสนิปส์ทั้งสองจะอยู่กึ่งกลางระหว่างแกนทั้งสอง

ตารางที่ 3 ส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรอบที่สอง

Compoment	Volume	Final concentration
TaqMan GTXpress Master Mix (2X)	5 ul	1X
TaqMan genotyping assay (40X)[1]	0.25 ul	0.3 uM
DNA template	1 ul	
Nuclease-free H_2O	3.75	

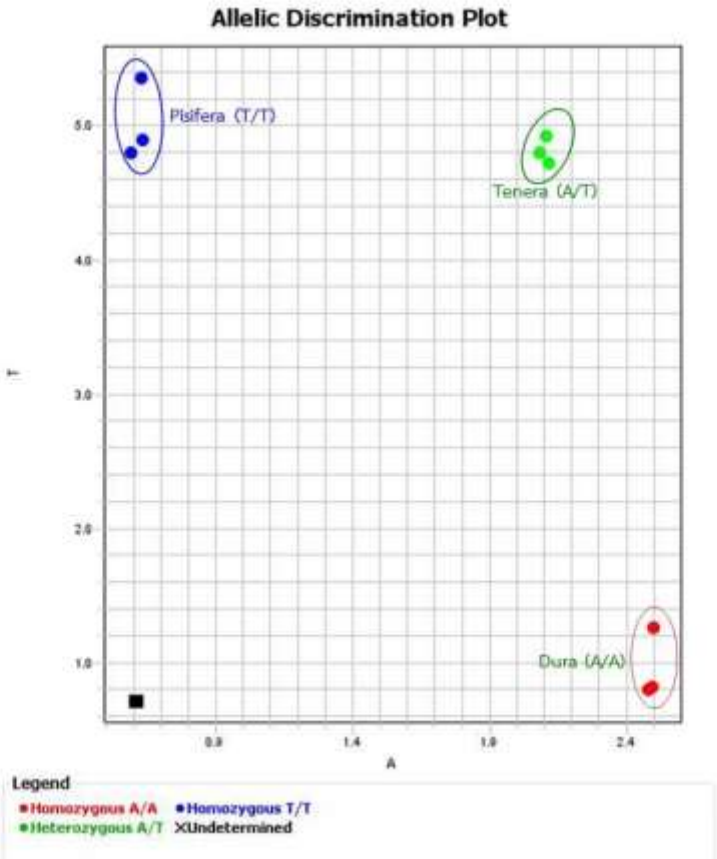
[1] TaqMan genotyping assay : Forward primer (5'-CTGCAAACGCCGAAATGGA-3'), Reverse primer (5'-CCTCAGCATCACAAAGGACAGA-3'), Reporter 1 (VIC-CAACTCATAAGCTTTCTTC-NFQ), Report 2 (FAM CTCATAAGCATTCTTC-NFQ)

ตารางที่ 4 สภาวะการทำงานของเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมรอบที่สอง

Operation	Temperature	Time	Cycles
DNA polymerase activation	95 °C	20 sec	1
Denaturation	95 °C	3 sec	40
Annealing/Extend	60 °C	20 sec	

ผลการทดลอง

จากการตรวจลักษณะผลของกะลาของปาล์มน้ำมันด้วยเทคโนโลยี TaqMan SNP Genotyping ที่ใช้เครื่อง Real-time PCR โดยใช้ดีเอ็นเอที่จากวิธีการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบอย่างง่าย ใช้โพรบและไพรเมอร์ตามเทคโนโลยี TaqMan SNP genotyping assays (Applied Biosystems, USA) ไพรเมอร์ 1 คู่ ขนาบข้างตำแหน่งของสนิปส์ที่ต้องการตรวจสอบ และโพรบ 2 เส้น ที่มีความจำเพาะและเป็นเบสคู่สมกับตำแหน่งสนิปส์ที่ต้องการตรวจสอบ โพรบแต่ละเส้นจะติดฉลากด้วยฟลูออเรสเซนต์ที่แตกต่างกัน ทำให้สามารถจำแนกแยกสนิปส์ที่มีความจำเพาะกับลักษณะผลของปาล์มน้ำมันต้นแม่ดูรา และต้นพ่อพิสิเฟอราออกจากกันได้ โดยติดฉลากด้วยฟลูออเรสเซนต์สี FAM และ VIC ที่ปลายด้าน 5' ตามลำดับ ส่วนปลายด้าน 3' ของโพรบทั้งสองเส้นติดฉลากด้วย nonfluorescent quencher (NFQ) เมื่อนำไพรเมอร์และโพรบที่ได้ไปตรวจสอบกับดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันด้วยเครื่อง Real-time PCR จะมีการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอและตรวจสอบสัญญาณของแสงฟลูออเรสเซนต์ตามชนิดของสีที่ติดฉลากไว้ ทำให้สามารถจำแนกชนิดของสนิปส์ที่เกิดขึ้นบนดีเอ็นเอตามลักษณะผลของปาล์มน้ำมันชนิดดูรา และพิสิเฟอราได้ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 ผลการตรวจตำแหน่งสนิปส์ของลักษณะกะลาปาล์มน้ำมันกลุ่มพันธุ์ Deli และ Tanzania (dura, pisifera and tenera) ด้วยเทคนิค Real-time PCR จากตัวอย่างปาล์มน้ำมันที่มีการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบอย่างง่าย โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบตรวจสอบที่ตำแหน่ง 274 (A/T)

ข้อดีและข้อจำกัด

การเตรียมดีเอ็นเออย่างง่ายเพื่อตรวจตำแหน่งสนิปส์ในปาล์มน้ำมันด้วยเทคนิค Real-time PCR วิธีนี้มีข้อดี ได้แก่ ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย ไม่ต้องใช้ไนโตรเจนเหลว และสะดวกในการปฏิบัติงาน ส่วนข้อจำกัดของการเตรียมดีเอ็นเออย่างง่ายวิธีนี้ คือ ต้องระวังการปนเปื้อนของตัวอย่างกันระหว่างการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ ในขั้นตอนของการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์รอบที่สอง เนื่องจากการมีการปนเปื้อนที่เกิดขึ้นได้ง่าย จะส่งผลให้การตรวจสอบเกิดความผิดพลาดได้

การนำไปใช้ประโยชน์

นักปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมัน และหน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการวิจัยปาล์มน้ำมัน สามารถนำวิธีการเตรียมดีเอ็นเออย่างง่ายไปใช้แทนการสกัดดีเอ็นเอแบบปกติ ทำให้ช่วยลดระยะเวลาในการสกัดดีเอ็นได้

เอกสารอ้างอิง

Applied Biosystems. 2017. TaqMan SNP Genotyping Assays User Guide. Available at http.//www.thermosher.com/ support. Accessed : July 22, 2020.

Singh, R. E.T. Low, L.C. Ooi, M. Ong-Abdullah, N.C. Ting, J. Nagappan, R. Nookiah, M.D. Amiruddin, R. Rosli, M.A. Manaf, K.L. Chan, M.A. Halim, N. Halim, N. Azizi, N. Lakey, S.W. Smith, M.A. Budiman, M. Hogan, B. Bacher, A.V. Brunt, C. Wang, J.M. Ordway, R. Sambanthamurthi and R.A. Martienssen. 2013. The oil palm SHELL gene control oil yield and encodes a homologue of SEEDSTICK. *Nature* 500 (7462): 340-344.

Solis BioDyne. 2020. 5 x HOT FIREPol® Blend Master Mix. Available at https://www.solisbiodyne.com. Accessed : July 22, 2020.

Thermo Scientific. 2020. Phire Plant Direct PCR Kit. Available at http.//www.thermosher.com. Accessed : July 22, 2020.

การประยุกต์ใช้เทคนิคการเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบในการตรวจสอบยีนที่ได้รับการถ่ายฝากในหน้าวัวและยาสูบ โดยวิธี Direct PCR

กุหลาบ คงทอง

คำนำ

การตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายโดยการใช้หลักการพีซีอาร์ได้มีการนำไปใช้ในงานวิจัยด้านพืชอย่างแพร่หลายเช่น การตรวจจีโนไทป์ และการตรวจยีนเป้าหมายที่ได้รับการถ่ายฝาก เป็นต้น การทำพีซีอาร์จากชิ้นส่วนพืชโดยทั่วไป จะต้องเริ่มต้นด้วยขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ ซึ่งวิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยทั่วไปอาจจะต้องใช้สารเคมีที่มีราคาแพง หรือใช้สารเคมีเป็นอันตราย ใช้ระยะเวลาในการทำงานนาน มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของดีเอ็นเอระหว่างตัวอย่างในขั้นตอนการสกัด

เทคนิค Direct PCR เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตรงจากตัวอย่างชิ้นส่วนพืช หรือสัตว์ โดยไม่ผ่านขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอและการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ การใช้เทคนิคนี้สามารถลดค่าใช้จ่ายและลดระยะเวลาในการทำงานวิจัยได้มาก ลดการปนเปื้อนของดีเอ็นเอระหว่างตัวอย่างที่ทำการสกัดได้ และเป็นทางเลือกที่ดีมากสำหรับการแก้ปัญหาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตัวอย่างที่มีปริมาณน้อย เช่น ตัวอย่างของชิ้นส่วนพืชที่ได้รับการถ่ายฝากยีนที่มีขนาดเล็กมากและมีจำนวนจำกัด สามารถแบ่งตัวอย่างปริมาณน้อยมาตรวจได้ โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ (DNA Purification) จะลดการสูญหายของดีเอ็นเอในตัวอย่างได้

การใช้เทคนิค Direct PCR ในการตรวจสอบพืชนั้นมีชุดน้ำยาสำเร็จรูปต่าง ๆ ที่ทำเป็นการค้าและมีจำหน่ายในท้องตลาดมีให้เลือกใช้หลายยี่ห้อ เช่น InstantAmp Plant *Direct PCR Kit* (Goldbio) ,FastAmp Plant *Direct PCR Kit* (IntactGenomics), KAPA3G Plant PCR Kit (Sigma-Aldrich) และ Phire Plant Direct PCR Kit (Thermo Scientific) เป็นต้น สำหรับงานการใช้เทคนิค Direct PCR ในการตรวจสอบจีโนไทป์พืชและตรวจสอบพืชที่ได้รับการถ่ายยีนในบทนี้ จะเลือกใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Phire Plant Direct PCR Kit (Thermo Scientific)

ชุดน้ำยาสำเร็จรูป Phire Plant Direct PCR (Thermo Scientific) ถูกออกแบบสำหรับการทำ PCR โดยตรงจากชิ้นส่วนใบและเมล็ดพืชโดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์มาก่อน การทำ PCR สามารถทำได้โดยวิธี Direct protocol ที่ใช้ใบพืชขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร หรือใช้วิธี Dilution protocol ที่ใช้ใบพืชขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร บดตัวอย่างพืชในสารละลาย Dilution Buffer แล้วนำสารละลายส่วนบน 0.5 ไมโครลิตร ไปทำ PCR วิธี Derect PCR เหมาะสำหรับใช้ในชิ้นส่วนพืชสด ชิ้นส่วนพืชที่เก็บไว้ใน 4 องศาเซนเซียส หรือในสภาพแช่แข็งรวมทั้งชิ้นส่วนพืชที่เก็บบนการ์ดสำหรับเก็บตัวอย่างพืชที่ผลิตเป็นการค้า เช่น Whatman 903 และ FTA cards

ในงานวิจัยได้ใช้เทคนิค Direct PCR ในการตรวจสอบยีนที่ได้รับการถ่ายฝากในหน้าวัว และยาสูบ โดยตรวจสอบยีน dihydroflavonol 4-reductase *(DFR)* ในรูป antisene ที่ควบคุมสีดอกในหน้าวัว และตรวจสอบยีน Flavonoid 3',5' hydroxylase *(F3' 5'H)* ที่ควบคุมสีดอกในยาสูบ

วิธีดำเนินการ

การประยุกต์ใช้เทคนิค Direct PCR ในตรวจสอบต้นหน้าวัวและต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน โดยใช้วิธี Dilution buffer จากชุด Phire Plant Direct PCR Kit มีวิธีการ ดังนี้

1. นำใบหน้าวัว หรือยาสูบ ที่ต้องการตรวจสอบการได้รับยีน ตัดตัวอย่างใบอ่อนพืช ให้ได้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 มิลลิเมตร ใส่ในสารละลาย Dilution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

2. ทำให้ใบแตกออกโดยการบดด้วยปลายปิเปตทิป กับข้างหลอด จนได้สารละลายสีเขียว

3. ปั่นเศษชิ้นส่วนให้ตกตะกอน

4. ดูดส่วนที่เป็นสารละลายไปใช้ในขั้นตอน ทำ PCR โดยใช้สารละลาย 0.5 µl ใส่ใน ปฏิกิริยาPCR ปริมาตร 20 µl

5. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยา แสดงในตารางที่ 1 และสภาวะการทำงานของเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม แสดงในตารางที่ 2

6. ตรวจสอบผลผลิตของ PCR ด้วยเทคนิค 2% Agarose gel electrophoresis

ตารางที่ 1 ส่วนผสมของปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

Component	20 µl rxn	Final conc.
H2O	Add to 20 µl	
2x Phire Plant PCR Buffer)	10 µl	1x
Primer A	x µl	0.5 µM
Primer B	x µl	0.5 µM
Phire Hot Start II DNA Polymerase	0.4 µl	
Plant tissue Dilution protocol	0.5 µl	

ตารางที่ 2 สภาวะการทำงานของเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

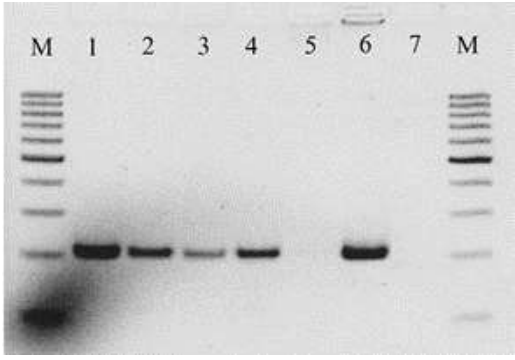
Cycle step	Temp.	Time	Cycles
Initial denaturation	98 ° C	5 minute	1
Duration Anealing Extension	98 ° C 65 ° C 72 ° C	5 s 5 s 20 s	40
Final extension	72 ° C 4 ° C	1 minute hold	1

ผลการทดลอง

1.การตรวจสอบต้นหน้าวัวที่ได้รับยีน DFRAS ด้วยเทคนิค PCR

ผลการตรวจสอบการปรากฏของยีน DFR ในรูป antisense (DFRAS) ในต้นหน้าวัวที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ NOSter204.F และ NOSter204.R พบว่าสามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 204 คู่เบส เพียงแถบเดียวเท่านั้น (ภาพที่16) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มีความจำเพาะกับตำแหน่งของยีน DFR และ Nos terminater ซึ่งเป็นชุดยีนที่ถ่ายเข้าสู่หน้าวัว จะเห็นได้ว่าไพรเมอร์ที่ใช้

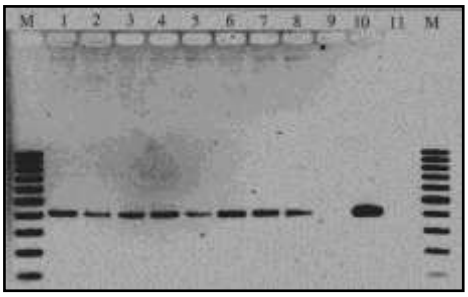
ตรวจสอบนั้นจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เฉพาะต้นหน้าวัวที่ได้รับการถ่ายยีนเท่านั้น ไม่สามารถเพิ่มปริมาณจากดีเอ็นเอของต้นหน้าวัวที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ภาพที่ 1)



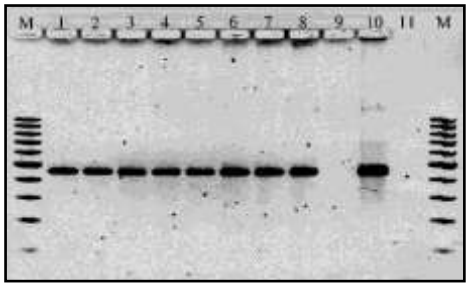
ภาพที่ 1 ผลการตรวจสอบต้นหน้าวัวที่ได้รับการถ่ายยีน DFR ในรูป antisene ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ NOSter204.F, NOSter204.R (204 bp) (1-4 : ต้นที่ได้รับการถ่ายยีน , 5 : ต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน , 6 : AaDFRAS_PMDC32, 7 : control, M : 100 bp marker)

2. การตรวจสอบต้นยาสูบได้รับยีน F3' 5'H ด้วยเทคนิค PCR

ผลการตรวจสอบการปรากฏของยีน F3' 5'H ในยาสูบที่ได้จากการถ่ายยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Nos.F1 และ CtF35H.R1 พบว่าสามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 405 คู่เบส เพียงแถบเดียวเท่านั้น (ภาพที่ 2) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มีความจำเพาะกับตำแหน่งของยีน F3' 5'H และ Nos terminater ซึ่งเป็นชุดยีนที่ถ่ายเข้าสู่ต้นยาสูบ จากการตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ CtF35H.F2 และ 2X35S.R2 พบว่าแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวขนาด 451 คู่เบส (ภาพที่ 2) และมีความจำเพาะกับตำแหน่งของยีน F3' 5'H และ 2X35S promoter ของชุดยีนที่ถ่ายเข้าสู่ต้นยาสูบเช่นเดียวกัน นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าไพรเมอร์ 2 ชุดที่ใช้ตรวจสอบนั้นจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เฉพาะต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนเท่านั้น ไม่สามารถเพิ่มปริมาณจากดีเอ็นเอของต้นยาสูบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน (ภาพที่ 2 และ 3)



ภาพที่ 2 ผลการตรวจสอบต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน F3' 5'H ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CtF35H.Nos.F1, CtF35H.Nos.R1 (405 bp) (Lane M : 100 bp DNA Ladder, 1-8 : ต้นที่ได้รับการถ่ายยีน , 9 : ต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน , 10 : Plasmid pMDC32 ที่มียีน F3’5’H, 11 : control)



ภาพที่ 3 ผลการตรวจสอบต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน F3' 5'H ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CtF35H.2X35S.F2 และ CtF35H.2X35S.R2 (415 bp) (Lane M : 100 bp DNA Ladder,1-8 : ต้นที่ได้รับการถ่ายยีน , 9 : ต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน , 10 : Plasmid pMDC32 ที่มียีน F3’5’H, 11 : control)

การตรวจสอบการปรากฏของยีนในต้นหน้าวัวและต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนด้วยเทคนิค Direct PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ พบว่าเทคนิค Direct PCR เป็นเทคนิคที่ใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ต้นที่ได้รับการถ่ายยีน จะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ ส่วนต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายฝากจะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ

ข้อดีและข้อจำกัด

ข้อดีของวิธีการตรวจสอบพืชโดยวิธี Direct PCR

ไม่ต้องการขั้นตอนการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ (DNA purification) ทำให้ลดเวลาและค่าใช้จ่าย ต้องการตัวอย่างในการวิเคราะห์ในปริมาณน้อย เช่น ตัวอย่างของชิ้นส่วนพืชที่ได้รับการถ่ายฝากยีนที่มีขนาดเล็กมากและมีจำนวนจำกัด สามารถแบ่งตัวอย่างปริมาณน้อยมาตรวจได้ และใช้ได้ในพืชหลายชนิด

ข้อจำกัดของวิธีการตรวจสอบพืชโดยวิธี Direct PCR

ชุดน้ำยาสำเร็จรูปมีราคาค่อนข้างสูง

การนำไปใช้ประโยชน์

นักปรับปรุงพันธุ์สามารถตรวจสอบยีนเป้าหมายได้อย่างสะดวกรวดเร็ว โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการสกัดดีเอ็น รวมทั้งสามารถนำเทคนิคและวิธีการไปใช้ในการการตรวจสอบยีนเป้าหมายในพืชที่ได้รับการถ่ายยีนชนิดอื่นได้

เอกสารอ้างอิง

กุหลาบ คงทอง ประสาน สืบสุข. และจีราพร แก่นทรัพย์ 2558. การโคลนยีนFlavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H) จากอัญชัน และ พิทูเนีย. ใน: รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2558. สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร.

กุหลาบ คงทอง ประสาน สืบสุข. และจีราพร แก่นทรัพย์ 2558. การถ่ายยีน Flavonoid 3',5' hydroxylase (F3' 5'H) จากอัญชันเข้าสู่ยาสูบ. ใน: งานการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 53 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กุหลาบ คงทอง ประสาน สืบสุข. กัลยา เกาะกากลาง และจีราพร แก่นทรัพย์ 2558. การควบคุมการแสดงออกของยีน dihydroflavonol 4-reductase (DFR) ในรูปเพื่อสร้างความหลากหลายของสีดอก หน้าวัว. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2558. สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร.

Thermo Scientific. 2020. Phire Tissue Direct PCR Master Mix. Available at: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/F-170_QR_TS_5.pdf. Accessed: July 22, 2020.

คำสั่งสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ที่ ๓ /๒๕๖๓

เรื่อง แต่งตั้งคณะทำงานตัวชี้วัดระดับความสำเร็จของการจัดการความรู้

ด้วยในปีงบประมาณ ๒๕๖๓ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ได้จัดทำคำรับรองการปฏิบัติราชการตัวชี้วัดที่ ๑๒ ระดับความสำเร็จของการจัดการความรู้ เพื่อให้การดำเนินงานสำเร็จตามเป้าหมาย จึงขอแต่งตั้งคณะทำงานฯ ดังนี้

๑. ผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ		ที่ปรึกษา
๒. นางสาวมัลลิกา แก้ววิเศษ	นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ	ประธาน
๓. นายประสาน สืบสุข	นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ	คณะทำงาน
๔. นางสาวกุหลาบ คงทอง	นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ	คณะทำงาน
๕. นางสุภาวดี ง้อเหรียญ	นักวิชาการเกษตรชำนาญการพิเศษ	คณะทำงาน
๖. นางสาวอรุโณทัย ซาววา	นักวิชาการเกษตรชำนาญการ	คณะทำงาน
๗. นางสาวจีราพร แก่นทรัพย์	นักวิชาการโรคพืชชำนาญการ	คณะทำงานและเลขานุการ
๘. นางนัยเนตร เจริญสันติ ทานากะ	นักวิชาการเกษตรปฏิบัติการ	คณะทำงานและผู้ช่วยเลขานุการ

โดยให้คณะทำงานชุดนี้มีหน้าที่ ดังนี้

๑. จำแนกองค์ความรู้ที่จำเป็นต่อการผลักดันความสำเร็จตามประเด็นยุทธศาสตร์ของกรมวิชาการเกษตร

๒. คัดเลือกองค์ความรู้ที่ได้จำแนกไว้และจัดทำแผนการจัดการความรู้ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๓ อย่างน้อย ๑ องค์ความรู้

๓. ดำเนินกิจกรรมตามแผนการจัดการความรู้และนำองค์ความรู้เผยแพร่ในระบบ E-learning ของกรมวิชาการเกษตร

๔. สรุปรายงานผลการดำเนินกิจกรรมตามแบบการจัดการความรู้ประจำปี พ.ศ. ๒๕๖๓ ตามกำหนด

ทั้งนี้ ตั้งแต่บัดนี้เป็นต้นไป

สั่ง ณ วันที่ ๒ มกราคม พ.ศ. ๒๕๖๓

(นายดนัย นาคประเสริฐ)

ผู้อำนวยการสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ