# การค้นหาชิ้นส่วนของสารพันธุกรรม ยีน ที่ควบคุมความหอม ของมะพร้าวน้ำหอมและมะพร้าวน้ำหอมกะทิ

## Genetic of Aromatic Gene in Aromatic Coconut

วีรา คล้ายพุก[๑/] ปริญดา หรูนหีม[๒/] วิไลวรรณ ทวิชศรี[๑/] ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล[๓/] ทิพยา ไกรทอง[๒/] และสมชาย วัฒนโยธิน[๑/]

บทคัดย่อ

ในการสกัดดีเอ็นเอมะพร้าวน้ำหอม Reaction mix ที่เหมาะสมคือ $H_{๒}O$ ๗.๖ µl, ๑๐X buffer ๑.๕ µl, ๒.๕ mMdNTP mix ๑.๒ µl, ๒๕ mM $MgCl_{๒}$ ๐.๙ µl, ๑๐ µM F๑ Primer ๐.๓µl, ๑๐ µM R๑ Primer๐.๓ µl, *Taq* polymerase ๐.๒ µl ดีเอ็นเอต้นแบบ ๓ µl และ Condition PCR ที่เหมาะสมคือ Pre denaturation ที่อุณหภูมิ ๙๔ องศาเซลเซียส นาน ๕ นาที จำนวน ๑ รอบ Denaturation ที่อุณหภูมิ ๙๔ องศาเซลเซียส นาน ๔๐ วินาที จำนวน ๓๕ รอบ Annealing ที่อุณหภูมิ ๕๐ องศาเซลเซียส นาน ๑ นาที จำนวน ๓๕ รอบ Extension ที่อุณหภูมิ ๗๒ องศาเซลเซียส นาน ๑ นาที จำนวน ๓๕ รอบ และLong Extension ที่อุณหภูมิ ๗๒ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๐ นาที โดย Aromarker มีความจำเพาะเจาะจงกับยีนในข้าวหอมมะลิ แต่ไม่จำเพาะเจาะจงกับมะพร้าวน้ำหอมและใบเตย

**คำสำคัญ:** ๒-Acetyl-๑-pyrroline กลิ่นมะพร้าวน้ำหอม Aromarker

[๑/] สถาบันวิจัยพืชสวน

[๒/] ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร

[๓/] ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

## Abstract

This study experimentally tests the hypothesis that aromatic gene in aromatic coconut can use the same primer of Fragrant Rice because aroma impact compound; ๒-Acetyl-๑-pyrroline (๒AP) in aromatic coconut, Fragrant pandan and fragrant rice were same. We found that the suitable Reaction mix for extract aromatic coconut DNA was $H_๒O$ ๗.๖ µl, ๑๐X buffer ๑.๕ µl, ๒.๕ mMdNTP mix ๑.๒ µl, ๒๕ mM $MgCl_๒$ ๐.๙ µl, ๑๐ µM F๑ Primer ๐.๓µl, ๑๐ µM R๑ Primer๐.๓ µl, *Taq* polymerase ๐.๒ µl and DNA template ๓ µl. And the suitable condition PCR was Pre denaturation at ๙๔°C, ๕ min, ๑ time. Denaturation at ๙๔ °C, ๔๐ sec, ๓๕ times. Annealing at ๕๐ °C, ๑ min, ๓๕ times. Extension at ๗๒ °C, ๑ min, ๓๕ times. And Long Extension at ๗๒ °C, ๑๐ min. And Aromarker was specific in Fragrant Rice.



Keywords: ๒-Acetyl-๑-pyrroline, coconut aroma, Aromarker

## คำนำ

มะพร้าวน้ำหอม (aromatic coconut) (*Cocos nucifera* Linn.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีมูลค่าส่งออกหลายร้อยล้านบาทต่อปี เป็นมะพร้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย โดยกลายมาจากพันธุ์หมูสีเขียว พบครั้งแรกที่ อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม (จุลพันธุ์ และคณะ, ๒๕๕๐; วิไลวรรณ, ๒๕๕๘) สารประกอบสำคัญที่ทำให้เกิดกลิ่นในมะพร้าวน้ำหอม คือ ๒-Acetyl-๑-pyrroline หรือ ๒AP ซึ่งเป็นสารประกอบตัวเดียวกันกับสารที่ทำให้เกิดกลิ่นในใบเตย และข้าวหอมมะลิ (นริศา, ๒๕๕๓; ศูนย์สื่อสารวิทยาศาสตร์ไทย, ๒๕๕๒) สาร ๒AP ในข้าว พบว่าถูกควบคุมด้วยยีน *Badh๒* และสามารถตรวจสอบได้ด้วย Aromarker (ไวพจน์, ๒๕๕๖)

งานวิจัยนี้จึงได้นำ Aromarker มาทดสอบในการตรวจสอบยีนในมะพร้าวน้ำหอม โดยเปรียบเทียบกับข้าวหอมมะลิ และใบเตย เพื่อเป็นแนวทางในการค้นหาชิ้นส่วนของสารพันธุกรรม ที่ควบคุมความหอมในมะพร้าวน้ำหอม และมะพร้าวน้ำหอมกะทิต่อไป

## วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

**อุปกรณ์**

๑. ใบจากต้นกล้าพันธุ์มะพร้าวน้ำหอม และพันธุ์ไทยต้นสูง จากศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร จังหวัดชุมพร ข้าวหอมมะลิ และใบเตย

<u>ชื่อตัวอย่างมะพร้าวเรียงตามลำดับ</u>

| | |
|---|---|
| ๑. CP TT ๐๑<br>๒. CP TT ๐๒<br>๓. CP TT ๐๓<br>๔. CP TT ๐๕<br>๕. CP TT ๐๔ | มะพร้าวพันธุ์ไทยต้นสูง |
| ๖. CPNH ๐๓<br>๗. CPNH ๐๔<br>๘. CPNH ๐๕<br>๙. CPNH ๐๒<br>๑๐. CPNH ๐๑ | มะพร้าวน้ำหอม |

๒. สารเคมี

๒.๑ สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

- Doyle & Meili buffer (CTAB, Tris-HCl, EDTA, PVP-๔๐T, ๒-Mercaptone Ethanol และ NaCl)
- ๑๐ mg/ug Protenase K
- Rnase A
- ๒๐% SDS
- ๓.๘% Sodium citrate

- ๕ M NaCl
- dicholomethan : Isoamly (๒๔:๑)
- Chloroform : Isoamyl Alcohol (๒๔:๑)
- ๓M Sodium Acetete
- ๗๐% Ethanol
- Isopropanol
- absolute ethanol
- SE buffer
- ไนโตรเจนเหลว
- Mercaptonethanol

๒.๒ สารเคมีที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ (PCR)

- *Taq* DNA Polymerase
- dNTP (dATP dTTP cTP gTP)
- DNA Sample
- $MgCl_{๒}$
- ๐.๕ x TE buffer
- buffer A (๑๐X)
- buffer S (๑๐X)
- buffer V๒ (๑๐X)
- Primer

  ๑. Aroma-F๑: ๕'-TGC TCC TTT GTC ATC ACA CC-๓'

  ๒. Aroma-R๑: ๕'-TTT CCA CCA AGT TCC AGT GA-๓'

๒.๓ สารเคมีที่ใช้ในการทำ Gel Electrophoresis

- agarose gel
- ๖ X loading buffer
- ethidium bromide
- ๐.๕ X TBE buffer

๓. เครื่องมือและอุปกรณ์

- หลอดไมโครเซนตริฟิว (microcentrifuge tube)
- ไมโครปิเปต (micropipette)
- ทิป (tip)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
- เครื่องเซนตริฟิว (centrifuge)
- เครื่องไมโครเซนตริฟิว (microcentrifuge)
- ปิเปต
- ตู้อบ
- เครื่อง UV Transilluminator
- ตู้อบฆ่าเชื้อ (Autoclave)

- เครื่อง Thermal Cycler
- เครื่อง Gel Electrophoresis
- ถุงมือยาง
- บีกเกอร์
- มีด/กรรไกร
- Parafilm
- แรค (Rack)
- กระบอกตวง

**วิธีการ**

๑. **การเตรียมสารสกัดดีเอ็นเอ (Extraction buffer)** (Doyle & Meili buffer)

๒% CTAB, ๐.๑ M Tris-HCl pH ๘.๐, ๐.๐๒ M EDTA pH ๘.๐, ๑% PVP-๔๐T, ๒-Mercaptone Ethanol และ ๑.๔ M NaCl

**เตรียมปริมาตร ๑,๐๐๐ ml**

| | | | |
|---|---|---|---|
| ๑. | ชั่ง CTAB | ๒๐ | g |
| ๒. | ชั่ง NaCl | ๘๑.๘ | g |
| ๓. | ตวง ๑M Tris-HCl pH ๘.๐ | ๑๐๐ | ml |
| ๔. | ตวง ๐.๕ M EDTA pH ๘.๐ | ๔๐ | ml |

นำสารและสารละลายข้อ ๑-๔ มาละลายให้เข้ากันในน้ำกลั่นปริมาตร ๘๐๐ ml

๕. ชั่ง PVP-๔๐T ๑๐ g แล้วใส่ลงในสารละลายจนละลายเป็นเนื้อเดียว โดยใช้ความร้อนและการปั่นตลอดเวลาจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็น นำไปปรับ pH ให้ได้ pH ๘.๐, แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ ๑๐๐๐ ml ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ ๑๒๑°C ความดัน ๑๕ ปอนด์ นาน ๑๕ นาที

โดยก่อนนำไปใช้สกัดดีเอ็นเอพืช ต้องเติมสารละลาย Mercaptonethanol ในอัตราส่วน ๑:๑,๐๐๐ ไมโครลิตร (µl)

๒. **การสกัดดีเอ็นเอ** (DNA Extraction)

<u>ใบมะพร้าว</u>

การสกัดดีเอ็นเอดัดแปลงมาจาก Li, M และ Midmore (๑๙๙๙) นำใบมะพร้าว ๐.๑ กรัม บดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว เติม extraction buffer ปริมาตร ๒,๔๐๐ ไมโครลิตร ลงในโกร่งบดตัวอย่าง บดใน extraction buffer อีกรอบ แล้วถ่ายใส่หลอดเซนตริฟิวส์ จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิ ๖๕°C เป็นเวลา ๓๐ นาที จากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ ๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที เป็นเวลา ๑๐ นาที ดูดสารละลายใสใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์ใหม่ เติม dicholomethan : Isoamly (๒๔:๑) ปริมาตร ๕๐๐ ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ ๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที เป็นเวลา ๑๐ นาที ดูดสารละลายใสใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์ใหม่ เติม Isopropanol ปริมาตร ๖๐๐ ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จนกระทั่งเห็นสายดีเอ็นเอ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ ๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที เป็นเวลา ๑ นาที ทำการล้างตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม ethanol ความเข้มข้น ๗๐ % ปริมาตร ๕๐๐ ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ ๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที เป็นเวลา ๑ นาที เทส่วนน้ำทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยวิธีเดิมซ้ำ ๓ ครั้ง จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง คว่ำหลอดบนกระดาษทิชชูและซับให้แห้งหรือปล่อยแห้งในอากาศเป็นเวลา ๑ ชั่วโมง จนตะกอนดีเอ็นเอแห้งดีแล้ว ทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วยการเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ($dH_2O$) ปริมาตร

๑๘๐ ไมโครลิตร เพื่อให้ดีเอ็นเอละลาย จากนั้นเติม ๕ M NaCl ปริมาตร ๒๐ ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติม ethanol ความเข้มข้น ๙๐ % ปริมาตร ๒๐๐ ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ ๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที เป็นเวลา ๑ นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethanol ความเข้มข้น ๗๐ % ปริมาตร ๕๐๐ ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ ๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที เป็นเวลา ๑ นาที ล้างตะกอนซ้ำด้วยวิธีเดิม ๓ ครั้ง เทส่วนใสทิ้ง คว่ำหลอดบนกระดาษทิชชูและซับให้แห้งหรือปล่อยแห้งในอากาศ ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE ผสมกับ RNase ปริมาตร ๔๐-๕๐ ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ ๔ องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้งาน

<u>เมล็ดข้าวหอมมะลิ</u> (ดัดแปลงจาก Li,M and Midmore, ๑๙๙๙.)

บดตัวอย่างเมล็ดข้าวด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด (ตัวอย่าง ๐.๑ กรัม : extraction buffer ๘๐๐ ไมโครลิตร) จากนั้นเติม extraction buffer ลงในโกร่งบดตัวอย่าง (ประมาณ ๒,๔๐๐ ไมโครลิตร) บดในextractionbuffer อีกรอบ ดูดตัวอย่างจากโกร่งลงในหลอด Microcentrifuge นำไปบ่มที่อุณหภูมิ ๖๕°C ประมาณ ๓๐ นาที, ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว ๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที เป็นเวลา ๑๐ นาที ดูดส่วนใสลงในหลอด Microcentrifuge ใหม่ เติม dicholomethan : Isoamly (๒๔:๑) ๕๐๐ µl ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกกลับไปมา ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว ๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที เป็นเวลา ๑๐ นาที ดูดส่วนใสลงใน Microcentrifuge ใหม่เติม Isopropanol ๖๐๐ µl ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกกลับไปมา จนกระทั่งเห็นสายดีเอ็นเอปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว ๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที ๑ นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย๗๐ % ethanol ๕๐๐ µl, ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที, ๑ นาที (ล้างตะกอนซ้ำ ๓ รอบ) ตากตะกอนดีเอ็นเอประมาณ ๑ชั่วโมง เมื่อตะกอนดีเอ็นเอแห้งดีแล้ว ทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วยการเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ($dH_2O$) ๑๘๐ µlเพื่อให้ดีเอ็นเอละลายหลังจากนั้นเติม ๕ M NaCl ๒๐ µl เขย่าให้เข้ากันเบา ๆ แล้วเติม ๙๕% ethanol ๒๐๐ µl ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกกลับไปมา ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว ๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที เป็นเวลา ๑ นาที ล้างตะกอนเอ็นเอด้วย ethanol ๗๐ % ๕๐๐ µ|, ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที, ๑ นาที (ล้างตะกอนซ้ำ ๓ รอบ) ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง ก่อนละลายด้วย TE + RNase๔๐-๕๐ µl ตรวจคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธี Agarosegel electrophoresis

<u>ใบเตย</u> (ดัดแปลงจาก Li,M and Midmore, ๑๙๙๙.)

บดตัวอย่างใบเตยด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด (ตัวอย่าง ๐.๑ กรัม : extraction buffer ๘๐๐ ไมโครลิตร) จากนั้นเติม extraction buffer ลงในโกร่งบดตัวอย่าง (ประมาณ ๒,๔๐๐ ไมโครลิตร) บดในextractionbuffer อีกรอบ ดูดตัวอย่างจากโกร่งลงในหลอด Microcentrifuge นำไปบ่มที่อุณหภูมิ ๖๕°C ประมาณ ๓๐ นาที, ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว ๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที เป็นเวลา ๑๐ นาที ดูดส่วนใสลงในหลอด Microcentrifuge ใหม่ เติม dicholomethan : Isoamly (๒๔:๑) ๕๐๐ µl ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกกลับไปมา ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว ๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที เป็นเวลา ๑๐ นาที ดูดส่วนใสลงใน Microcentrifuge ใหม่เติม Isopropanol ๖๐๐ µl ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกกลับไปมา จนกระทั่งเห็นสายดีเอ็นเอปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว ๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที ๑ นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย๗๐ % ethanol ๕๐๐ µl, ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที, ๑ นาที (ล้างตะกอนซ้ำ ๓ รอบ) ตากตะกอนดีเอ็นเอประมาณ ๑ชั่วโมง เมื่อตะกอนดีเอ็นเอแห้งดีแล้ว ทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ด้วยการเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ($dH_2O$) ๑๘๐ µlเพื่อให้ดีเอ็นเอละลายหลังจากนั้นเติม ๕ M NaCl ๒๐ µl เขย่าให้เข้ากันเบา ๆ แล้วเติม ๙๕% ethanol ๒๐๐ µl ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกกลับไปมา ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว ๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที เป็นเวลา ๑ นาที ล้างตะกอนเอ็นเอด้วย ethanol ๗๐ % ๕๐๐ µ|, ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที, ๑ นาที (ล้างตะกอนซ้ำ ๓ รอบ) ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง ก่อนละลายด้วย TE + RNase๔๐-๕๐ µl ตรวจคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธี Agarosegel electrophoresis

**๓. การตรวจคุณภาพของดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยา PCR** (Polymerase Chain Reaction)

นำดีเอ็นเอมาวัดหาปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ชนิด nano drop แล้วเจือจางดีเอ็นเอให้ได้ความเข้มข้น ๑๐๐ ng/µl สำหรับเปนสารตั้งต้นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งใช้ปริมาตรสุทธิของปริฏิริยาพีซีอาร์ ๑๕ µl,ประกอบด้วย $H_{๒}O$ ๗.๖ µl, ๑๐X buffer ๑.๕ µl, ๒.๕ mMdNTP mix ๑.๒ µl, ๒๕ mM $MgCl_{๒}$ ๐.๙ µl, ๑๐ µM F๑ Primer ๐.๓µl,๑๐ µM R๑ Primer๐.๓ µl, *Taq* polymerase ๐.๒ µl และดีเอ็นเอต้นแบบ ๓ µl

| ที่ | Primer | Sequence |
|---|---|---|
| ๑ | Aroma-F๑ | ๕'-TGC TCC TTT GTC ATC ACA CC-๓' |
| ๒ | Aroma-R๑ | ๕'-TTT CCA CCA AGT TCC AGT GA-๓' |

**PCR program**

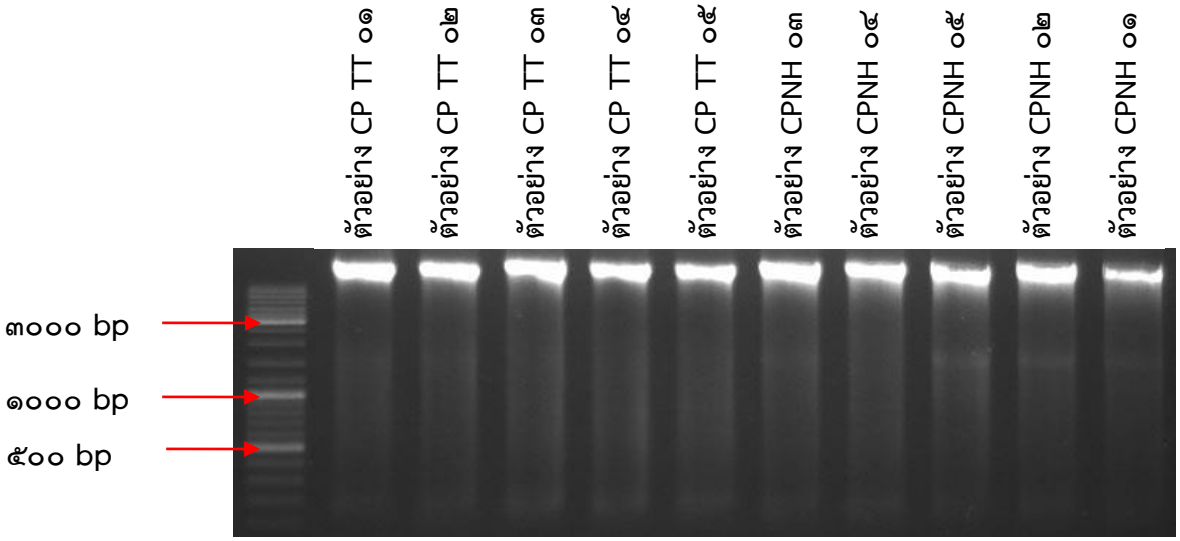
| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Pre denaturation | ๙๔ °C | ๕ | นาที | |
| Denaturation | ๙๔ °C | ๔๐ | วินาที | ๓๕ |
| Annealing | ๔๕ °C | ๑ | นาที | ๓๕ |
| Extension | ๗๒ °C | ๑ | นาที | ๓๕ |
| Long Extension | ๗๒ °C | ๑๐ | นาที | |
| Hold | ๒๕ °C∞ | | | |

ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์วิธี Agarosegel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ Agarose gel ๑.๐%

## ผลการวิจัย

**๑. ผลการสกัดดีเอ็นเอ**

ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบของมะพร้าวน้ำหอมและมะพร้าวพันธุ์ไทยต้นสูง โดยทำการสกัดดีเอ็นเอดัดแปลงจาก Li, M และ Midmore (๑๙๙๙) เมื่อนำมาตรวจวิเคราะห์พบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีคุณภาพดี แต่มีการปนเปื้อนของโปรตีนและอาร์เอ็นเอ (ภาพที่ ๑)




**<u>รูปภาพ ๑</u>** DNA ตัวอย่างต้นที่ ๑, ๒, ๓, ๔, ๕, ๖, ๗, ๘, ๙ และ ๑๐ (ตามลำดับ) ของมะพร้าวที่สกัดได้แล้วตรวจดู DNA ด้วยวิธี Agarosegel electrophoresis

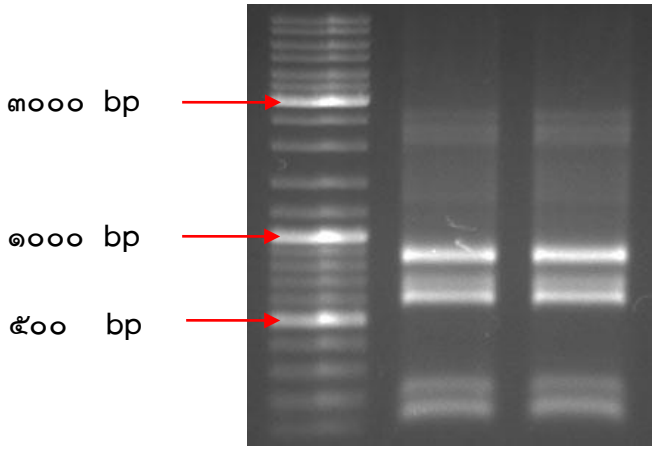
**๒. ผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD-PCR**

นำดีเอ็นเอของตัวอย่างพันธุ์ CPNH ๐๑ มาเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ Aromarker เพื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR โดยทำปฏิกิริยาในปริมาตร ๑๕ ไมโครลิตร ประกอบด้วย $H_{๒}O$ ๗.๖ µl, ๑๐X buffer ๑.๕ µl, ๒.๕ mMdNTP mix ๑.๒ µl, ๒๕ mM $MgCl_{๒}$ ๐.๙ µl, ๑๐ µM F๑ Primer ๐.๓µl,๑๐ µM R๑ Primer๐.๓ µl, *Taq* polymerase ๐.๒ µl และดีเอ็นเอต้นแบบ ๓ µl

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยมี PCR profile คือ

๑. Pre denaturation ที่อุณหภูมิ ๙๔ องศาเซลเซียส นาน ๕ นาที จำนวน ๑ รอบ
๒. Denaturation ที่อุณหภูมิ ๙๔ องศาเซลเซียส นาน ๔๐ วินาที
๓. Annealing ที่อุณหภูมิ ๔๕ องศาเซลเซียส นาน ๑ นาที
๔. Extension ที่อุณหภูมิ ๗๒ องศาเซลเซียส นาน ๑ นาที
(ขั้นตอนที่ ๒-๔ จำนวน ๓๕ รอบ)
๕. Long Extension ที่อุณหภูมิ ๗๒ องศาเซลเซียส นาน ๑๐ นาที
๖. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ ๒๕ องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้งาน

ทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ ตัวอย่างพันธุ์ CPNH ๐๑ โดยวิธี agarosegel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ Agarose gel ที่มีความเข้มข้น ๑% พบว่า แถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ติดกันเป็นแพ (ภาพที่ ๒)



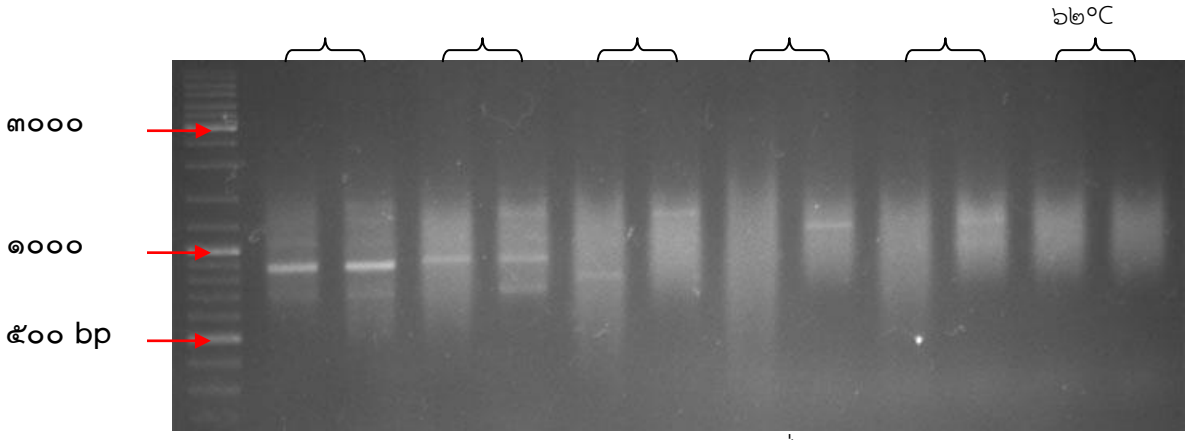

**<u>รูปภาพ ๒</u>** PCR products ตัวอย่างพันธุ์ CPNH ๐๑ของมะพร้าวที่ได้แล้วตรวจดูด้วยวิธี Agarosegel electrophoresis

**๓. ผลการศึกษาอุณหภูมิ Annealing ที่เหมาะสม**

นำดีเอ็นเอของตัวอย่างพันธุ์ CPNH ๐๑ มาเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ Aromarker เพื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR โดยทำปฏิกริยาในปริมาตร ๑๕ ไมโครลิตร ประกอบด้วย $H_{๒}O$ ๗.๖ µl, ๑๐X buffer ๑.๕ µl, ๒.๕ mMdNTP mix ๑.๒ µl, ๒๕ mM $MgCl_{๒}$ ๐.๙ µl, ๑๐ µM F๑ Primer ๐.๓µl,๑๐ µM R๑ Primer๐.๓ µl, *Taq* polymerase ๐.๒ µl และดีเอ็นเอต้นแบบ ๓ µl

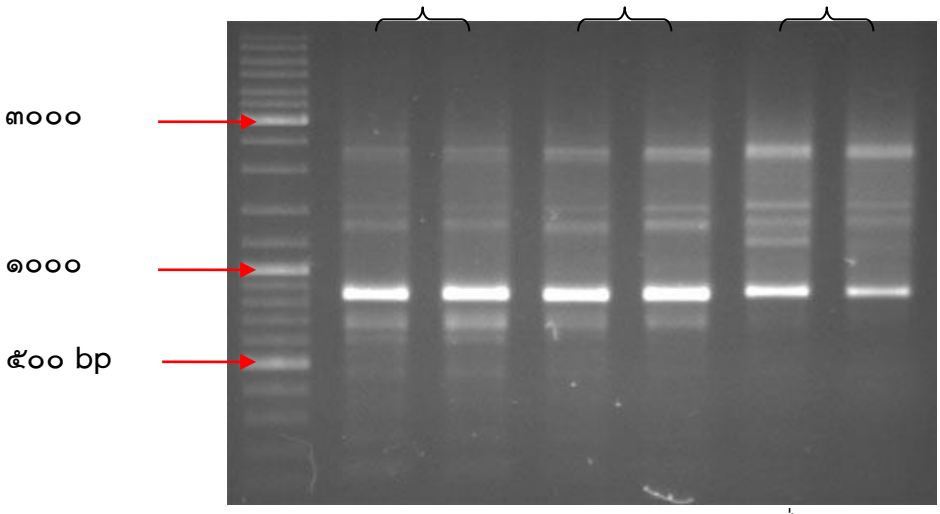
เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยกำหนด PCR profile เหมือนในการทดลองที่ ๒ แต่ทดสอบ Annealing ที่อุณหภูมิ ๕๒, ๕๔, ๕๖, ๕๘, ๖๐ และ ๖๒ องศาเซลเซียส

ทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ ตัวอย่างพันธุ์ CPNH ๐๑ โดยวิธี agarosegel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ Agarose gel ที่มีความเข้มข้น ๑% พบว่า อุณหภูมิ Annealing ที่เหมาะสม คือ ๕๒ องศาเซลเซียส (ภาพที่ ๓)




**<u>รูปภาพ ๓</u>** PCR productsตัวอย่างพันธุ์ CPNH ๐๑ของมะพร้าวที่ได้แล้วตรวจดูด้วยวิธี Agarosegel electrophoresis

จากนั้นศึกษาอุณหภูมิ Annealing เพิ่มเติมที่ ๔๘, ๕๐ และ ๕๒ องศาเซลเซียส พบว่า อุณหภูมิ Annealing ที่เหมาะสม คือ ๕๐ องศาเซลเซียส (ภาพที่ ๔)




**<u>รูปภาพ ๔</u>** PCR productsตัวอย่างพันธุ์ CPNH ๐๑ของมะพร้าวที่ได้แล้วตรวจดูด้วยวิธี Agarosegel electrophoresis

**๔. ผลการศึกษาปริมาณของ $MgCl_๒$**

ทำการศึกษาปริมาณของ $MgCl_๒$ ใน Reaction mix ที่ระดับความเข้มข้น ๐.๙, ๑.๒ และ ๑.๕ ไมโครลิตร ดังนี้

**Reaction mix ๑๕ µl**

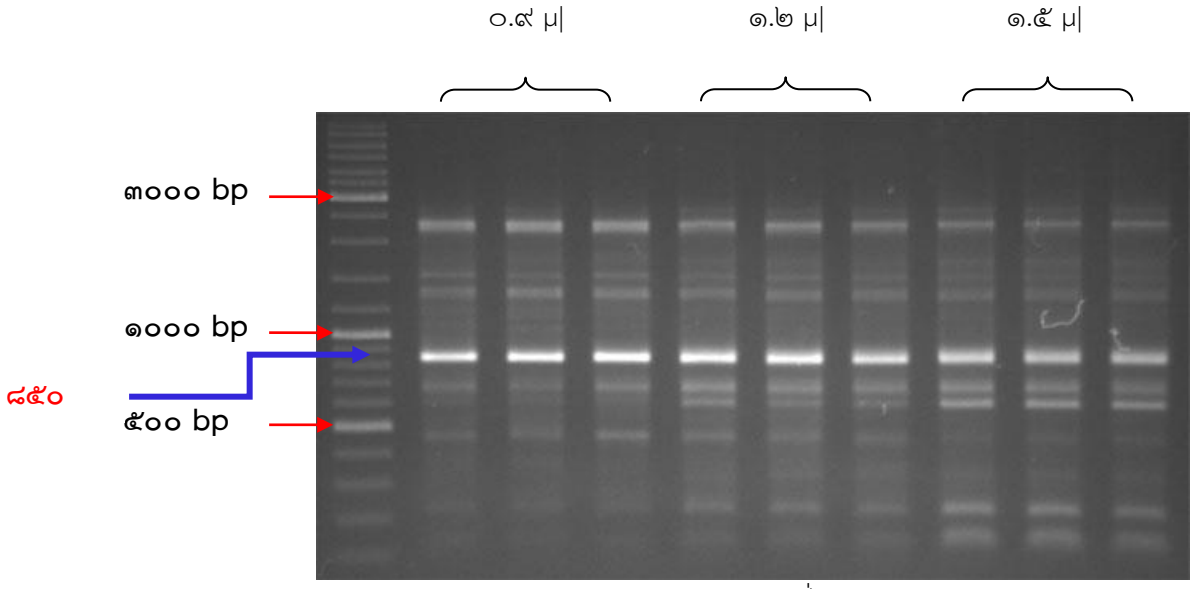
| | | |
|---|---|---|
| $H_๒O$ | ๗.๖ | µl |
| ๑๐X buffer | ๑.๕ | µl |
| ๒.๕ mMdNTP mix | ๑.๒ | µl |
| ๒๕ mM $MgCl_๒$ | | ๐.๙ µ |
| | ๑.๒ | µl |
| | ๑.๕ | µl |
| ๑๐ µM F๑ Primer | ๐.๓ | µl |
| ๑๐ µM R๑ Primer | | ๐.๓ µl |
| *Taq* polymerase ๕U/µl | ๐.๒ | µl |
| DNA template | ๓ | µl |
| Mineral Oil | | |

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยมี PCR profile คือ

๑. Pre denaturation ที่อุณหภูมิ ๙๔ องศาเซลเซียส นาน ๕ นาที จำนวน ๑ รอบ
๒. Denaturation ที่อุณหภูมิ ๙๔ องศาเซลเซียส นาน ๔๐ วินาที
๓. Annealing ที่อุณหภูมิ ๕๐ องศาเซลเซียส นาน ๑ นาที
๔. Extension ที่อุณหภูมิ ๗๒ องศาเซลเซียส นาน ๑ นาที
(ขั้นตอนที่ ๒-๔ จำนวน ๓๕ รอบ)
๕. Long Extension ที่อุณหภูมิ ๗๒ องศาเซลเซียส นาน ๑๐ นาที

๖. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ ๒๕ องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้งาน

ทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ ตัวอย่างพันธุ์ CPNH ๐๑ โดยวิธี agarosegel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ Agarose gel ที่มีความเข้มข้น ๑% พบว่า ปริมาณของ ๒๕ mM $MgCl_๒$ ใน Reaction mix ที่เหมาะสมคือ ๐.๙ ไมโครลิตร (ภาพที่ ๕)




**<u>รูปภาพ ๕</u>** PCR productsตัวอย่างพันธุ์ CPNH ๐๑ของมะพร้าวที่ได้แล้วตรวจดูด้วยวิธี Agarosegel electrophoresis

**๕. ผลการสังเคราะห์ลำดับเบส**

เมื่อทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ ตัวอย่างพันธุ์ CPNH ๐๑ ที่ได้จาก Reaction mix และ Condition PCR จากผลการทดลองที่ผ่าน ดังนี้

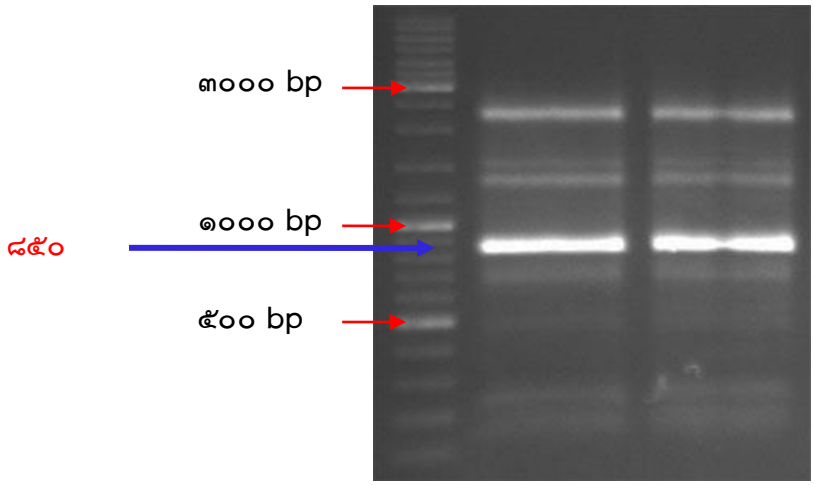
**Reaction mix ๑๕ µl**

| | | |
|---|---|---|
| $H_๒O$ | ๗.๖ | µl |
| ๑๐X buffer | ๑.๕ | µl |
| ๒.๕ mMdNTP mix | ๑.๒ | µl |
| ๒๕ mM $MgCl_๒$ | ๐.๙ | µl |
| ๑๐ µM F๑ Primer | ๐.๓ | µl |
| ๑๐ µM R๑ Primer | ๐.๓ | µl |
| *Taq* polymerase ๕U/µl | ๐.๒ | µl |
| DNA template | ๓ | µl |
| Mineral Oil | | |

PCR program

| | | | |
|---|---|---|---|
| Pre denaturation | ๙๔ °C | ๕ นาที | |
| Denaturation | ๙๔ °C | ๔๐ วินาที | ๓๕ |
| Annealing | ๕๐ °C | ๑ นาที | |
| Extension | ๗๒ °C | ๑ นาที | |
| Long Extension | ๗๒ °C | ๑๐ นาที | |
| Hold | ๒๕ °C | ∞ | |

นำผลผลิตพีซีอาร์ ตัวอย่างพันธุ์ CPNH ๐๑ มาตรวจสอบ โดยวิธี agarosegel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ Agarose gel ที่มีความเข้มข้น ๑% (ภาพที่ ๖)




**<u>รูปภาพ ๖</u>** PCR products ตัวอย่างพันธุ์ CPNH ๐๑ของมะพร้าวที่ได้แล้วตรวจดูด้วยวิธี Agarosegel electrophoresisก่อนนำไปคัดเจล

หลังจากตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการแล้วตัดส่วนผลผลิตพีซีอาร์ ซึ่งมีขนาด ๘๕๐ bp หลังจากนั้นทำการแยกผลผลิตพีซีอาร์ออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด HiYield™ (Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit) โดยนำชิ้นส่วนผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ลงในหลอด Micro tube เติม DF Buffer ให้ท่วมเจล ประมาณ ๔๐๐ µl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ ๖๐°C ประมาณ ๑๐ นาที (หรือจนกระทั่งวุ้นละลายจนหมด) เมื่อละลายแล้วดูดผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ลงในหลอดฟิลเตอร์ที่มากับชุดน้ำยาสำเร็จรูปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว ๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที,๑นาที แล้วล้างด้วย Wash Buffer ประมาณ ๔๐๐ µl (๒ รอบ) จากนั้นทำให้หลอดแห้งโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที, ๒ นาที เปลี่ยนฟิลเตอร์ลงในหลอด Micro tube ใหม่ (เพื่อเก็บผลผลิตพีซีอาร์) เติมน้ำ ๓๐ µl ทิ้งไว้ประมาณ ๑๐-๑๕ นาที แล้วปั่นเหวี่ยง ๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที, ๒ นาที เก็บส่วนผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปหาลำดับสงเคราะห์

ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของมะพร้าวพันธุ์ CPNH ๐๑

>coconut
GAAAAAAATCAACTAAGAGAGCATTGCACACCAATCTTTCGGATCAATCACCATCCTCATGATGATCCTA
TGGTCGGAAGCATTTTATGAGTTAATAATGATTATTCATATCTTAAATTTTCAACTTTTGAAAATATGAAT
TATCATTACCATTAACTCAAAGGATGTATCACAGACACTAAGTGCACATATGCGATAGAAAATCATCCATT
TTATTGATTATAGTCAAAATTATAATTTTGCCCCTAGAATTGTATTACAAGCGTCAGCCAATTCTGGCTTT
TATGGCATATATATCTAACAATCTTTCATTTGTCCTAAAGCTAATTGGCTACAAGTCTAAGTCCCATCTTC
TCAAGATGGGCTTCGATCTTCTGCTAGCCTAACAGCTTTATAAGTGGGTCTGCCATATTATCTATGGAGT
TGACTCTCTTGACCTCGACATAACTCTTGTTGAGGTAATCGCGGATGAGGTGGTATCGCCGCTCAATGTG
CTTGGATTTTTGGTAAGACCTTGGCTCCTTAGCAGGGGCTATGGCGCCATTATTATCACAGTATAGAGGA
ATGGCATCTGATGGTATTACTCCGATTTCTGCAGTAAACTTCTTGTACCAAAATGCTTCCTTCACAGCCTC
AAATGCAGCGATATATTCTGCTTCCATAGTGGAATCTGCTATCACCATTTGCTTGAAACTCTTCCATCTTA
CAGCACCACCATTGTACACAAACAGACTTCCAGATGTCGACTTCGATCATCTATATCGACAGAATCCGGG
TTC

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์นี้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์อื่นๆ บนฐานข้อมูล NCBI พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ดังกล่าวนี้ไม่ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนความหอมจึงอาจเป็นได้ว่าไพรเมอร์คู่นี้อาจจะไม่ใช่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนน้ำหอมของมะพร้าวน้ำหอม หรืออีกประการหนึ่งเนื่องจากยังไม่มีรายงานหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนน้ำหอมในมะพร้าวน้ำหอม ยีนนี้ก็อาจจะเกี่ยวข้องกับยีนความหอมก็ได้ซึ่งทั้งหมดก็ต้องทำการทดลองต่อไป

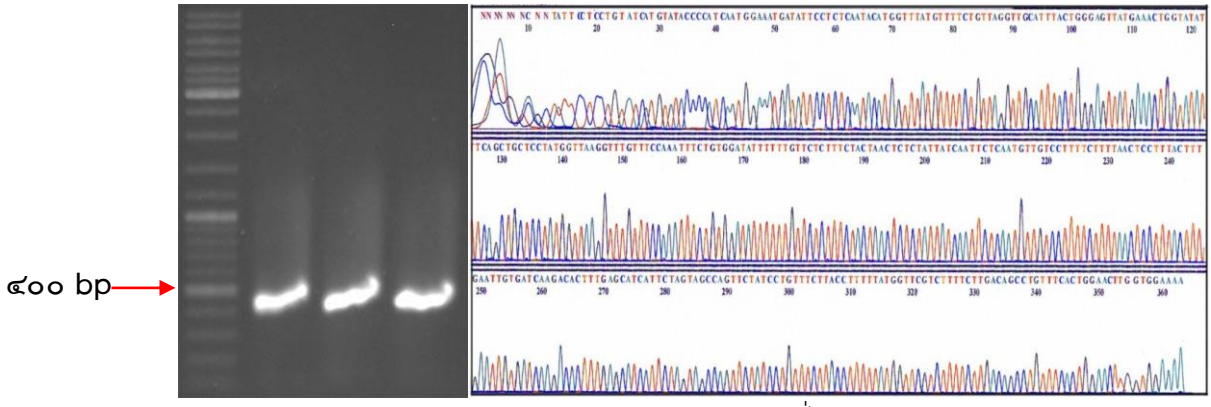
**๖. ผลการเพิ่มปริมาณยีนและตรวจลำดับเบสยีนสร้างสาร ๒AP ในข้าวหอมมะลิ**

นำดีเอ็นเอข้าวหอมมะลิที่สกัดได้มาทดสอบไพเมอร์ชนิดเดียวกันกับที่ทดสอบในมะพร้าวน้ำหอมก่อนหน้านี้

| ที่ | Primer | Sequence |
|---|---|---|
| ๑ | Aroma-F๑ | ๕'-TGC TCC TTT GTC ATC ACA CC-๓' |
| ๒ | Aroma-R๑ | ๕'-TTT CCA CCA AGT TCC AGT GA-๓' |

**ผลการตรวจลำดับเบสในข้าวหอมมะลิ**

นำผลผลิตพีซีอาร์ ข้าวหอมมะลิ มาตรวจสอบ โดยวิธี agarosegel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ Agarose gel ที่มีความเข้มข้น ๑% (ภาพที่ ๗)




**<u>รูปภาพ ๗</u>** PCR products ตัวอย่างข้าวหอมมะลิที่ได้แล้วตรวจดูด้วยวิธี Agarosegel electrophoresis ก่อนนำไปคัดเจล และผลการตรวจลำดับเบส

ผลการเพิ่มปริมาณยีนในข้าวหอมมะลิ ได้ชิ้นยีนขนาดประมาณ ๔๐๐ bp และไม่มีแถบดีเอ็นเออื่นปรากฏ แสดงให้เห็นว่า ไพร์เมอร์มีความจำเพาะกับยีนนี้ในข้าว สกัดชิ้นยีน ทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด HiYield™ (Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit) เก็บส่วนผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้เพื่อศึกษาลำดับเบส

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างข้าวหอมมะลิและยีน Badh๒ (JQ๓๐๘๔๒๗) ที่สร้างสาร ๒AP ในข้าว มาจัดเรียง โดยใช้ ClustalW (ภาพที่ ๘) พบว่า มีลำดับเบสที่เหมือนกัน แสดงว่าไพร์เมอร์ที่ใช้และสภาวะในการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ถูกต้อง

```
JQ๓๐๘๔๒๗    AGCCGGTGCTCCTTTGTCATCACACCCTGGTGTAGACAAGGTACAGCTATTCCTCCTGTA
๒๑๐๐rice    ------TGCTCCTTTGTCATCACACCCTGGTGTAGACAAGGTACAGCTATTCCTCCTGTA          ๕๔
             ************************************************************
JQ๓๐๘๔๒๗    ATCATGTATACCCCATCAATGGAAATGATATTCCTCTCAATACATGGTTTATGTTTTCTG
๒๑๖๐rice    ATCATGTATACCCCATCAATGGAAATGATATTCCTCTCAATACATGGTTTATGTTTTCTG          ๑๑๔
             ************************************************************
JQ๓๐๘๔๒๗    TTAGGTTGCATTTACTGGGAGTTATGAAACTGGTATATATTTCAGCTGCTCCTATGGTTA
๒๒๒๐rice    TTAGGTTGCATTTACTGGGAGTTATGAAACTGGTATATATTTCAGCTGCTCCTATGGTTA          ๑๗๔
             ************************************************************
JQ๓๐๘๔๒๗    AGGTTTGTTTCCAAATTTCTGTGGATATTTTTTGTTCTCTTTCTACTAACTCTCTATTAT
๒๒๘๐rice    AGGTTTGTTTCCAAATTTCTGTGGATATTTTTTGTTCTCTTTCTACTAACTCTCTATTAT          ๒๓๔
             ************************************************************
JQ๓๐๘๔๒๗    CAATTCTCAATGTTGTCCTTTTCTTTTAACTCCTTTACTTTTTAGAATTGTGATCAAGAC
๒๓๔๐rice    CAATTCTCAATGTTGTCCTTTTCTTTTAACTCCTTTACTTTTTAGAATTGTGATCAAGAC          ๒๙๔
             ************************************************************
JQ๓๐๘๔๒๗    ACTTTGAGCATCATTCTAGTAGCCAGTTCTATCCTGTTTCTTACCTTTTTATGGTTCGTC
๒๔๐๐rice    ACTTTGAGCATCATTCTAGTAGCCAGTTCTATCCTGTTTCTTACCTTTTTATGGTTCGTC          ๓๕๔
             ************************************************************
JQ๓๐๘๔๒๗    TTTTCTTGACAGCCTGTTTCACTGGAACTTGGTGGAAAAAGTCCTATAGTGGTGTTTGAT
๒๔๖๐rice    TTTTCTTGACAGCCTGTTTCACTGGAACTTGGTGG------------------------          ๓๘๙
             ************************************************************
```

**<u>รูปภาพ ๘</u>** ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างข้าวหอมมะลิและยีน Badh๒ (JQ๓๐๘๔๒๗)

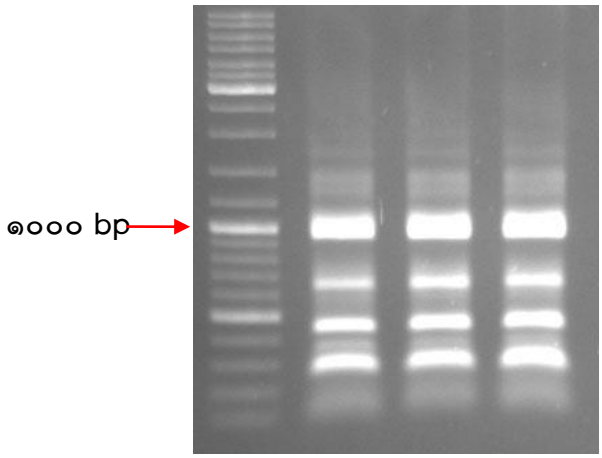
**๗. ผลการเพิ่มปริมาณยีนและตรวจลำดับเบสยีนสร้างสาร ๒AP ในใบเตย**

นำดีเอ็นเอใบเตยที่สกัดได้มาทดสอบไพเมอร์ชนิดเดียวกันกับที่ทดสอบในมะพร้าวน้ำหอมและข้าวหอมมะลิก่อนหน้านี้

| ที่ | Primer | Sequence |
|---|---|---|
| ๑ | Aroma-F๑ | ๕'-TGC TCC TTT GTC ATC ACA CC-๓' |
| ๒ | Aroma-R๑ | ๕'-TTT CCA CCA AGT TCC AGT GA-๓' |

**ผลการตรวจลำดับเบสในใบเตย**

นำผลผลิตพีซีอาร์ ใบเตย มาตรวจสอบ โดยวิธี agarosegel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ Agarose gel ที่มีความเข้มข้น ๑% (ภาพที่ ๙)




**<u>รูปภาพ ๙</u>** PCR products ตัวอย่างใบเตยที่ได้แล้วตรวจดูด้วยวิธี Agarosegel electrophoresis ก่อนนำไปคัดเจล

การทดลองตรวจสอบยีนสร้างสาร ๒AP ในใบเตย พบว่าได้แถบดีเอ็นเอมากกว่า ๑ แถบ และการทดลองสกัดชิ้นยีนขนาดประมาณ ๑๐๐๐ bp ผลการตรวจลำดับเบสพบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มีไม่บริสุทธิ์ มีสายดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสต่างกัน แต่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันปะปนกันอยู่ ทำให้ไม่สามารถอ่านลำดับเบสได้ชัดเจน

**สรุป**

จากการทดสอบ Reaction mix และ Condition PCR พบว่า Reaction mix ที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอมะพร้าวน้ำหอม คือ $H_{๒}O$ ๗.๖ µl, ๑๐X buffer ๑.๕ µl, ๒.๕ mMdNTP mix ๑.๒ µl, ๒๕ mM $MgCl_{๒}$ ๐.๙ µl, ๑๐ µM F๑ Primer ๐.๓µl, ๑๐ µM R๑ Primer๐.๓ µl, *Taq* polymerase ๐.๒ µl และดีเอ็นเอต้นแบบ ๓ µl และ Condition PCR ที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอมะพร้าวน้ำหอม คือ Pre denaturation ที่อุณหภูมิ ๙๔ องศาเซลเซียส นาน ๕ นาที จำนวน ๑ รอบ Denaturation ที่อุณหภูมิ ๙๔ องศาเซลเซียส นาน ๔๐ วินาที จำนวน ๓๕ รอบ Annealing ที่อุณหภูมิ ๕๐ องศาเซลเซียส นาน ๑ นาที จำนวน ๓๕ รอบ Extension ที่อุณหภูมิ ๗๒ องศาเซลเซียส นาน ๑ นาที จำนวน ๓๕ รอบ และLong Extension ที่อุณหภูมิ ๗๒ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๐ นาที โดยไพเมอร์ Aromarker มีความจำเพาะเจาะจงกับยีนในข้าวหอมมะลิ แต่ไม่จำเพาะเจาะจงกับมะพร้าวน้ำหอมและใบเตย

## เอกสารอ้างอิง


จุลพันธุ์ เพ็ชรพิรุณ จิตสำเริง พยัคพงศ์ อานุภาพ ธีระกุล และ คะนอง คลอดเพ็ง (๒๕๕๐) การปรับปรุงพันธุ์มะพร้าวน้ำหอมโดยการคัดเลือกพันธุ์และผสมพันธุ์. ในรายงานผลงานวิจัยประจำปี ๒๕๔๘-๒๕๕๐ ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร. หน้า๑๑-๓๑

นริศา เหละดุหวิ, ณัฏฐา เลาหกุลจิตต์, อรพิน เกิดชูชื่น และโศรดา วัลภา. ๒๕๕๓. การเพอร์แวบเพอเรชันสารหอมระเหยของสารสกัดใบเตย. ว. วิทย์. กษ. ๔๑(๓/๑) (พิเศษ): ๖๕๓-๖๕๖

วิไลวรรณ ทวิชศรี. ๒๕๕๘. พันธุ์มะพร้าวในประเทศไทย. สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร. ๓๒ หน้า

ไวพจน์ กันจู, สุกัญญา เรืองขำ, สุมน ห้อยมาลา, อนุชา พลับพลา, อภิชาติ วรรณวิจิตร และธีรยุทธ ตู้จินดา. ๒๕๕๖. การตรวจสอบความหอมในเชื้อพันธุกรรมข้าวไร่ไทยโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน Os๒AP และการวิเคราะห์คุณภาพหุงต้มและความหนาแน่นของธาตุเหล็กในเมล็ด. Thai J. Genet. ๖(๑): ๑๑-๒๔).

ศูนย์สื่อสารวิทยาศาสตร์ไทย. ๒๕๕๒. ข้าวขาวดอกมะลิและสิทธิบัตรเทคโนโลยีการใช้ยีนควบคุมความหอมในข้าว. ใน เอกสารประกอบการเสวนา เรื่อง “อนาคตข้าวไทย...ก้าวย่างสำคัญหลังจากจดสิทธิบัตรเทคโนโลยีการใช้ยีนควบคุมความหอมในข้าว” ศูนย์สื่อสารวิทยาศาสตร์ไทย สวทช. วันที่ ๑๓ สิงหาคม ๒๕๕๒ อาคาร สวทช. ถนนพระรามที่หก.