แบบฟอร์มรายงานเรื่องเต็ม ผลการทดลองสิ้นสุด ปีงบประมาณ 2555

1. **แผนงานวิจัย** วิจัยและพัฒนาไม้ดอกไม้ประดับ

2. โครงการวิจัยและพัฒนาอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมกล้วยไม้เพื่อใช้ประโยชน์

   กิจกรรมที่4 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิด micro satellite เพื่อจำแนกพันธุ์กล้วยไม้สกุลแวนดา

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์เพื่อบ่งชี้ลักษณะประจำสายพันธุ์ในกล้วยไม้สกุลแวนดา**

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ Isolation and characterization of microsatellites in the orchid *Vanda* spp.

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ[1/] นางสาวสุภาวดี ง้อเหรียญ[1/]
นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์[1/]

---

5. บทคัดย่อ

การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์เป็นที่ยอมรับในหมู่นักปรับปรุงพันธุ์มากอีกเทคนิคหนึ่ง เพราะเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวางโดยเฉพาะในด้านการปรับปรุงพันธุ์ ในการทดลองนี้ได้พัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด SSRs (Simple Sequence Repeat) ในกล้วยไม้สกุลแวนดาโดยใช้เทคนิคการสร้าง enrichment genomic library โดยใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 14 ชนิด เป็นโพรบร่วมกับ magnetic beads ทำการโคลนและคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการจำนวน 150 โคโลนีด้วยการทำโคโลนีพีซีอาร์ จากนั้นคัดเลือกเพียง 101 โคโลนีเพื่อนำไปหาลำดับกรดนิวคลีอิค ออกแบบไพรเมอร์ส่วนหัวและท้ายของสายดีเอ็นเอที่ได้ สำหรับเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่เป็นไมโครแซทเทลไลท์ที่ต้องการ เมื่อนำมาทดสอบกับกล้วยไม้สกุลแวนดา 5 สายพันธุ์พบว่ามีเพียง 42 ไพรเมอร์ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ในการทดลองนี้สามารถคัดเลือกและทดสอบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนไมโครแซทเทลไลท์ได้ 42 คู่ไพรเมอร์และการใช้เทคนิดการคัดแยกดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์ด้วยแมกเนติคบีดเป็นวิธีการที่ได้ผลดีซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับพืชอื่นได้ ไพรเมอร์ที่ได้สามารถนำไปตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลแวนดาสายพันธุ์อื่น ๆ ได้ต่อไป

6. คำนำ

แวนด้าเป็นกล้วยไม้ประเภทโมโนโพเดี้ยล ไม่แตกกอ เจริญเติบโตไปทางยอด รากเป็นรากอากาศ ใบมีลักษณะกลม แบนหรือร่อง ใบซ้อนสลับกัน ช่อดอกจะออกด้านข้างของลำต้นสลับกับใบ ช่อดอกยาวและแข็ง กลีบนอกและกลีบในมีรูปร่างคล้ายคลึงกัน โคนกลีบแคบ และไปรวมกันที่โคนเส้าเกสร กลีบดอกในล่างด้านใต้มีเดือยแหลมยื่นออกมาเป็นส่วนท้ายของปากกระเป๋า ปากกระเป๋าของแวนด้าเป็นแบบธรรมดาแบนเป็นแผ่นหนาแข็ง และพุ่งออกด้านหน้า รูปลักษณะคล้ายช้อน หูกระเป๋าทั้งสองข้างแข็งและตั้งขึ้น สีดอกมีมากมายแตกต่างกันตามแต่ละชนิด กล้วยไม้สกุลแวนด้าพบในป่าตามธรรมชาติประมาณ 40 ชนิด มีกระจายพันธุ์อยู่ในทวีปเอเชีย ตั้งแต่อินเดีย ศรีลังกา พม่า ไทย อินโดนีเซีย จนถึงฟิลิปปินส์ แวนด้าได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์ขึ้นอีกหลายพันธุ์ ปัจจุบันได้มีการจำแนกประเภทของแวนด้า โดยอาศัยรูปร่างลักษณะของใบออกเป็น 4 ประเภท คือ

- แวนด้าใบกลม มีลักษณะของใบกลมยาวทรงกระบอก ต้นสูง ข้อห่าง สังเกตได้ที่ใบติดอยู่ห่างๆ กัน มีดอกช่อละหลายดอก แต่ดอกจะบานติดต้นอยู่คราวละ 2–3 ดอกเท่านั้น เมื่อดอกข้างบนบานเพิ่มขึ้นดอกข้างล่างจะโรยไล่กันขึ้นไปเรื่อยๆ การปลูกใช้ดอกจึงนิยมปลิดดอกมากกว่าตัดดอกทั้งช่อ
- แวนด้าใบแบน ลักษณะใบแผ่แบนออก ถ้าตัดมาดูหน้าตัดจะเป็นรูปตัววี มีข้อถี่ปล้องสั้น ใบซ้อนชิดกัน ปลายใบโค้งลงและจักเป็นแฉก
- แวนด้าใบร่อง มีรูปทรงของใบและลำต้นคล้ายใบแบนมากกว่าใบกลม แวนด้าประเภทนี้ไม่พบในป่าธรรมชาติ การนำมาปลูกเลี้ยงเป็นพันธุ์ลูกผสมทั้งสิ้น โดยนำแวนด้าใบกลมมาผสมกับแวนด้าใบแบน
- แวนด้าก้างปลา มีรูปทรงของใบและลำต้น กึ่งใบกลมกับใบแบน พบตามป่าธรรมชาติน้อยมาก เพราะกล้วยไม้พันธุ์นี้เป็นหมันทั้งสิ้น

ไมโครแซทเทลไลท์ (simple sequence repeat (SSRs)) เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ความผันแปรสูงมาก จึงนิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในการจำแนกพันธุ์พืชในระดับสายพันธุ์ในชนิดเดียวกันได้ดี (Martin และคณะ, 2004) เนื่องจาก microsatellite markers จะไม่ถ่ายทอดในระหว่างพืชชนิดเดียวกัน แต่การนำมาใช้งานจะต้องพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้ในพืชแต่ละชนิดและมักจะใช้ร่วมกันได้ยาก ดังนั้นจึงต้องพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอนี้ใหม่ตลอดเวลา แม้ว่าบางครั้งจะพบการถ่ายทอด SSRs ระหว่างพืชชนิดที่ใกล้เคียงกันบ้าง ในการพัฒนาขึ้นมาจะต้องสร้างห้องสมุดของไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite-enriched libraries) ซึ่งปัจจุบันมีหลายเทคนิค จากการทดลองของ Martin และคณะ (2004) ได้ใช้เทคนิค magnetic capture พบว่า ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของไมโครแซทเทลไลท์มากถึง 95.8 % และมีชิ้นส่วนที่มีขนาดยาวอยู่ 30.8 % จึงเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงมากจึงใช้วิธีดังกล่าวในการทดลองครั้งนี้

7. วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

อุปกรณ์

1. กล้วยไม้สกุลแวนดา จำนวน 20 สายพันธุ์

2. M2-80 Dynabeads : Streptavidin – coated magnetic beads
3. Plant Oligonucleotide A, PO4-Oligonucleotide B, 3.-biotinylated oligonucleotide,50 X UV-safe TAE buffer
4. เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sau*3AI, *Mbo* I, *Hae* III, *Rsa*I
5. เครื่อง Spectrophotometer สำหรับใช้วัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D.)
6. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม PCR (Thermal Cycle 9700)
7. เครื่องอิเลคโตรโฟริซิส
8. อุปกรณ์ในการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ โกร่ง เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบสูงแบบควบคุมอุณหภูมิต่ำได้ (Refrigerated Centrifuge) หลอดใส่ตัวอย่างขนาดต่าง ๆ อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
9. อุปกรณ์การอ่านภาพ และบันทึกผล ได้แก่ Gel documentation พร้อมเครื่องพิมพ์
10. เครื่องมือในการวิเคราะห์ผลแบบ Image Analyzer พร้อมโปรแกรมวิเคราะห์ผล
11. ไมโครปิเปตขนาด P1,000 P200 P100 และ P2 ไมโครลิตร
10. สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (PCR Amplification)
11. สารเคมีที่ใช้ในการทำ Electrophoresis และ Molecular Weight Marker
12. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอพืช CTAB
13. สารเคมีที่ใช้ในการโคลนยีน (TA® PCR Cloning Kit) ของ Invitrogen
14. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอจากเจล (QIAquick Gel Extraction Kit) ของ QIAGEN
15. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit) ของ Fermentas
16. เชื้อแบคทีเรียเซลล์เจ้าบ้าน (Competent Cells) *Escherichia coli* สายพันธุ์ TOP 10 F'
17. การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปและโปรแกรมบนเครือข่ายอินเทอร์เน็ต
    - โปรแกรม BLAST จากเวปไซด์ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Blast/
    - โปรแกรม ClustalW Multiple Alignment จากเวปไซด์ http://www.ebi.ac.uk/clustalw/
    - โปรแกรมออกแบบไพรเมอร์ Primer3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)
    - โปรแกรม CromasPro version 1.33 จากเวปไซด์ http://www.technelysium.com.au/ChromasPro.html

วิธีการ

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์

1 สกัดแยกกรดนิวคลีอิกจากกล้วยไม้สกุลแวนดาที่ได้คัดเลือกไว้ 20 สายพันธุ์

เก็บตัวอย่างกล้วยไม้สกุลแวนดาจากสวนกล้วยไม้เกษตรกรในจังหวัดราชบุรีและจังหวัดเชียงใหม่ นำใบอ่อนมาบดในไนโตรเจนเหลวจนละเอียดเป็นผง แล้วนำไปสกัดดีเอ็นเอด้วย CTAB ตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยแยกด้วย 1% agrose gel electrophoresis แล้วย้อมเจลด้วยสารละลาย Ethidium bromide ความ

เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transluminators พร้อมบันทึกภาพ และทำการวัดปริมาณดีเอ็นเอ จากนั้นเจือจางดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C สำหรับนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่อไป

2 ตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเลคโตรโฟริซิส

นำดีเอ็นเอปริมาณรวม 2000 นาโนกรัม มาตัดด้วยเอนไซม์ *Mbo* I (Fast Digest Enzyme) โดยใช้ 10X Fast digest buffer 5 ไมโครลิตร เอนไซม์ 5 ไมโครลิตร และน้ำ (PCR grade water) 35 ไมโครลิตร รวมปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตร นำมาบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม PCR (Thermal Cycle 9700) เก็บตัวอย่างไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้งาน

3 การเตรียม Adaptor

ใช้อะแดบเตอร์ชนิดปลายเหนียว โดยการสังเคราะห์ oligo primer 2 สาย ที่มีปลายเป็นรอยตัดของเอนไซม์ *Mbo* I ซึ่งจะใช้ต่อกับดีเอ็นเอของกล้วยไม้ที่ตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกันแล้ว มีลำดับเบสดังนี้

Sticky end adaptor (*Sau*3A1*(Mbo* I)-specific).

Oligo A 5’GGC CAG AGA CCC CAA GCT TCG3’ [21-mer]

Oligo B 5’PO4 - GAT CCG AAG CTT GGG GTC TCT GGC C3’ [25-mer]

โดยการผสมอัตราส่วนดังนี้

Oligo A (ความเข้มข้น 200 พิโคโมล/ไมโครลิตร) จำนวน 20 ไมโครลิตร

Oligo B (ความเข้มข้น 200 พิโคโมล/ไมโครลิตร) จำนวน 20 ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันดีโดยการดูดปล่อยด้วยไปเปตนำไปตกตะกอนแล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาทีในเครื่องพีซีอาร์ แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่น 40 ไมโครลิตร แล้วเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้งานจะได้ดีเอ็นเอสายคู่ชนิดปลายเหนียวดังนี้

Adaptor GGC CAG AGA CCC CAA GCT TCG

CCG GTC TCT GGG GTT CGA AGC CTA G - PO4

4 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ Adaptor

นำดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมาทั้งหมด 90 ไมโครลิตร แล้วผสมสารละลายต่าง ๆ ดังนี้

2x T4 DNA ligase buffer	50 ul
น้ำ (PCR grade water : BDH)	6 ul
Adaptor	1 ul (25 uM)

T4 DNA ligase (Promega) 1.5 ul (100u)

ปริมาตรรวม 100 ul

ผสมให้เข้ากันโดยดูดสารละลายขึ้นลงด้วยไปเปต นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน หรือที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที ตรวจสอบผลการตัดต่อเอนไซม์ด้วยการทำ เจลอิเลคโตรโฟริซิสด้วยอะกะโรส 2 % นำดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ Oligo A และ Oligo B ให้มีปริมาณมากขึ้นสำหรับทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป

5. การคัดขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่คัดเลือก

นำดีเอ็นเอทั้งหมดที่เชื่อมต่อ Adapter และเพิ่มปริมาณด้วยการทำพีซีอาร์มา ทำเจลอิเลคโตรโฟริซิสโดยใช้ อะกะโรสชนิด low melting point 1 % แล้วตัดเจลบริเวณดีเอ็นเอที่มีขนาด 400-1000 คู่เบส ทำการแยกดีเอ็นเอจากเจลด้วยการใช้ QIAquick gel extraction kit (Qiagen) ตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยการทำเจลอิเลคโตรโฟริซิสอีกครั้งเพื่อดูว่ามีดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการหรือไม่ ซึ่งดีเอ็นเอนี้จะใช้เป็นต้นแบบสำหรับการทำพีซีอาร์ต่อไป

6. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาด 400-1000 คู่เบส

นำดีเอ็นเอที่ได้จากการแยกจากเจลมาเพิ่มปริมาณด้วยการทำพีซีอาร์อีกครั้งโดยครั้งนี้จะเพิ่มดีเอ็นเอเฉพาะขนาด 400- 1000 คู่เบส โดยการเติมสารละลายต่าง ๆ ดังนี้

OligoA (5 ul) 2.5 ul

น้ำ 18.5 ul

Hot star taq PCR Master Mix Kit (QIAgen) 25 ul

DNA-adaptor 4 ul

ปริมาตรรวม 50 ul

ผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในหลอดทดลอง ที่กำหนดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิเป็น 95 ^{o}C 7 นาที ในแต่ละรอบของ PCR กำหนดอุณหภูมิเป็น Denature 94 ^{o}C 30 วินาที, Anneal 55 ^{o}C 30 วินาที และ Extend 72 ^{o}C 1.30 นาที ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ ส่วนในรอบสุดท้ายตามด้วย 72 ^{o}C เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบด้วยอะกะโรสเจล 1.5 % ว่ามีดีเอ็นเอขนาด 400-1000 คู่เบสที่ต้องการหรือไม่ ใช้ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการโพรบต่อไป

7. การเตรียมโพรบสำหรับไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ

สังเคราะห์ดีเอ็นเอชนิดเบสแกนซ้ำ di-nucleotide , tri- nucleotide และ tetra-nucleotide repeat tandem พร้อมทั้ง ติดฉลากไบโอตินเพื่อทำเป็นโพรบตรวจจับดีเอ็นเอที่เราตัดและคัดเลือกขนาดไว้ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1. แสดงโพรบชนิด dinucleotide , tri-nucleotide และ tetra-nucleotide และอุณหภูมิสำหรับการเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับการเรียงตัวของเบส	Tm(°C)
Biotin-(GA)12	5'-GAG AGA GAG AGA GAG AGA GAG AGA-3'	62.7
Biotin-(GT)12	5'-GTG TGT GTG TGT GTG TGT GTG TGT-3'	62.7
Biotin-(CT)12	5'- CTC TCT CTC TCT CTC TCT CTC TCT-3'	62.7
Biotin-(AG)12	5'-AGA GAG AGA GAG AGA GAG AGA GAG -3'	62.7
Biotin-(TGT)9	5'-TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT TGT -3'	58.9
Biotin-(GTG)8	5'-GTG GTG GTG GTG GTG GTG GTG GTG -3'	69.6
Biotin-(GAG)8	5'-GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG GAG -3'	69.6
Biotin-(GCT)8	5'-GCT GCT GCT GCT GCT GCT GCT GCT -3'	69.6
Biotin-(TGTT)8	5'-TGTT TGTT TGTT TGTT TGTT TGTT TGTT TGTT -3'	59.2
Biotin-(TCT)10	5'-TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT TCT -3'	61.3
Biotin-(CGT)8	5'-CGT CGT CGT CGT CGT CGT CGT CGT -3'	69.6
Biotin-(AGT)10	5'-AGT AGT AGT AGT AGT AGT AGT AGT AGT AGT -3'	61.3
Biotin-(TGA)10	5'-TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA TGA -3'	61.3
Biotin-(GTAT)8	5'-GTAT GTAT GTAT GTAT GTAT GTAT GTAT GTAT-3'	59.2

8. การตรวจจับแถบดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์ด้วย Biotinylated oligonucleotide

8.1 การเตรียมโพรบ

ดูดสารละลาย streptavidine-coated magnetic beads (10 mg/ml) (M-280 Dynabeads) ปริมาตร 100 ul ลงในหลอดไมโครทิวจ์ ล้างด้วย 1x washing buffer ปริมาตร 100 ul จำนวน 2 ครั้ง แล้วล้างด้วย 1x SSC ปริมาตร 100 ul จำนวน 1 ครั้ง ละลายตะกอนด้วย 6X SSC ปริมาตร 100 ul แล้วเติมสารละลาย 5' biotinylated oligonucleotide (200 pmole/ul) จำนวน 40 ul นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30-60 นาที โดยพลิกหลอดทุก 15 นาที จากนั้นล้างด้วย 6X SSC ปริมาตร 400 ul จำนวน 3 ครั้ง ละลายตะกอนด้วย 6X SSC ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

8.2 การทำไฮบริไดเซชั่นด้วย streptavidine-coated magnetic beads

นำดีเอ็นเอขนาด 400-1000 คู่เบสที่เตรียมไว้จากข้อ 6 ปริมาตร 20-30 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดพีซีอาร์ นำไปบ่มในเครื่องพีซีอาร์ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกดีเอ็นเอให้เป็นสายเดี่ยว แล้วแช่น้ำแข็งทันที ดูดสารละลายที่มีดีเอ็นเอทั้งหมดนี้เติมลงในหลอดไมโครที่มีโพรบที่เตรียมไว้นั้น ผสมให้เข้ากันดีด้วยไปเปต นำไปบ่มในเครื่อง incubator shaker ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และเปิดเขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวางบน magnetic stand ดีเอ็นเอจะถูกดูดติดกับแม่เหล็กอยู่ข้างหลอด แล้วดูดน้ำทิ้งไป ดึงหลอดออกจากแท่นแม่เหล็ก แล้วละลายตะกอนข้างหลอดด้วย 2X SSC ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นล้างด้วย 2 X SSC ปริมาตร 1 มล. อีก 4 ครั้ง โดยแต่ละครั้งให้บ่มทิ้งไว้ 5 นาทีก่อนดูด 2X SSC ทิ้งไป แล้วล้างด้วย 1 X SSC ปริมาตร 1 มล. อีก 4 ครั้ง โดยแต่ละครั้งให้บ่มทิ้งไว้ 5 นาทีก่อนดูด 1X SSC ทิ้งไป ในขั้นตอนสุดท้าย ละลายตะกอนที่ได้ด้วย น้ำหรือ TE 50 ul บ่มทิ้งไว้ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้ววางบน magnetic stand ดูดน้ำใสเก็บไว้ทำพีซีอาร์ต่อไปส่วน beads นำไปละลายด้วย TE หรือน้ำ 50 ul เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

9 โคลนชิ้นดีเอ็นเอที่ได้เข้าในเวคเตอร์และคัดเลือกโคลนเพื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์

เมื่อได้ชิ้นดีเอ็นเอนำมาตรวจสอบด้วยอะกะโรสเจล 1.5 % ถ้ามีแถบดีเอ็นเอขนาด 400-1000 คู่เบสจึงนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออีกครั้งด้วยไพรเมอร์ OligoA ดีเอ็นเอที่ได้นี้จะเป็นไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ นำดีเอ็นเอที่ตรวจสอบแล้วนั้นมาโคลนเข้าในเวคเตอร์ TA Cloning Kit (Invitrogen) ซึ่งใช้เวคเตอร์ pCR 2.1 และใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase เป็นเอนไซม์เชื่อมต่อ โดยใช้ *E. coli* สายพันธุ์ TOP10F' ตามวิธีการของบริษัท คัดเลือกโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่เราสนใจที่มีสีขาว มาทั้งหมด 100โคลนแล้วนำไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณใน SOC media นำ *E. coli* ที่ได้มาสกัดพลาสมิด โดยใช้ ชุดสกัดพลาสมิดสำเร็จรูป GeneJET^{TM} Plasmid Miniprep Kit (Fermentas)โดยขั้นตอนที่บริษัทแนะนำ ตรวจสอบผลการโคลนด้วยการทำเจลอิเลคโตรโฟริซิสด้วย อะกะรส 1.5 % นำตัวอย่างส่งให้บริษัทเอกชนนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

10. การทดสอบดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์

1.01 การออกแบบไพรเมอร์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ประมาณ 101 สาย มาออกแบบไพรเมอร์จำเพาะของดีเอ็นเอแต่ละชิ้นโดยใช้โปรแกรม Prim3 แล้วสังเคราะห์ไพรเมอร์และนำมาคัดเลือกหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมด้วยการทดสอบการทำพีซีอาร์ต่อไป

10.2 การทดสอบและคัดเลือกไพรเมอร์

โดยการนำไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลแวนดา จำนวน 5 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ 100 คู่ โดยใช้ค่า Tm ตามโปรแกรมคำนวณได้ ตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้โดยใช้ เมตาพอร์ 3 % ซึ่งเตรียมโดยใช้ อะกะโรส 1 ส่วน เมตาพอร์ 2 ส่วน ซึ่งการละลายเมตาพอร์จะต้องค่อย ๆ เทผงวุ้นลงไปใน TE buffer ทีกวนด้วยเครื่อง magnetic sterer อยู่ตลอดเวลาให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปหลอมให้ละลายอย่างดีในไมโครเวฟที่เปิดไฟกลางนาน ราว 5 นาที โดยนำออกมาแกว่งทุก ๆ 1 นาที ก่อนนำไปใช้งานต่อไป ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเมทิเดียมโบรไมด์ อ่านแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏด้วยเครื่อง Gel documentation และบันทึกผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

8. ระยะเวลา (เริ่มต้น – สิ้นสุด)

เดือนตุลาคม 2554 - เดือนกันยายน 2555

9. สถานที่ดำเนินการ

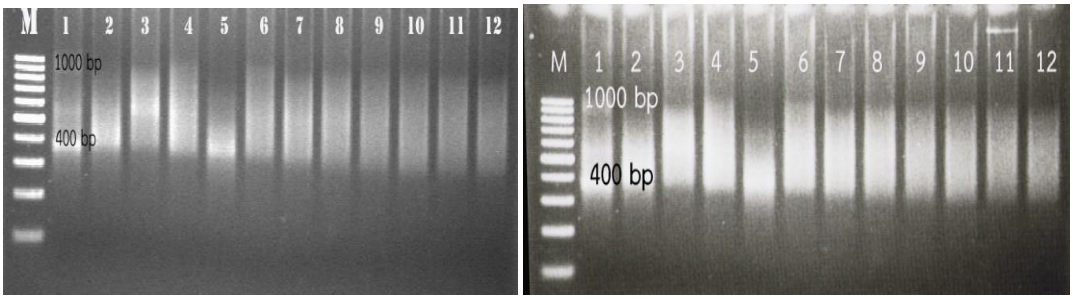
สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ อ. ธัญบุรี จ. ปทุมธานี

10. ผลการทดลองและวิจารณ์ (พร้อมภาพประกอบ)

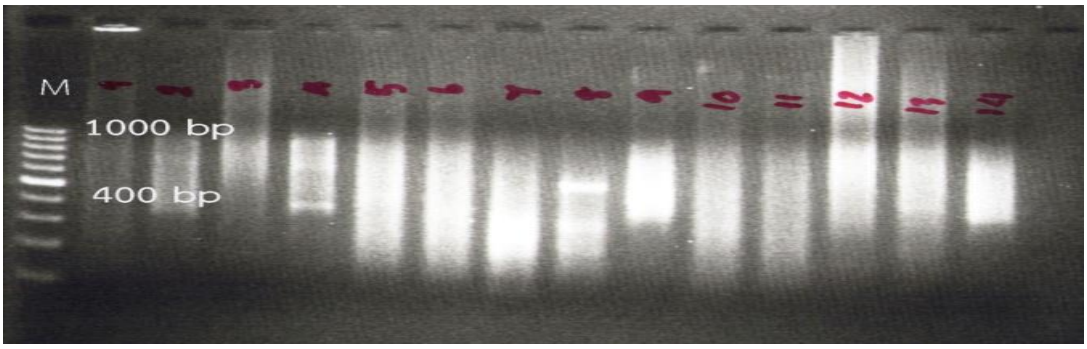
การสร้าง SSR-enrich library

การสร้าง SSR library โดยการตัดจีโนมิคดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Mbo* I แล้วนำไปเชื่อมต่อกับอะแดบเตอร์ชนิดปลายเหนียวเพื่อให้เป็นบริเวณสำหรับไพรเมอร์เข้าเกาะจับ โดยการเตรียมอะแดบเตอร์ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นสายตรงข้ามกับรอยตัดของเอนไซม์ *Mbo* I ซึ่งจะทำให้เพิ่มปริมาณได้เป็นจำนวนมากเพียงพอสำหรับการนำไปทำไฮบริไดเซชั่นกับโพรบดีเอ็นเอที่เตรียมไว้ด้วยการสังเคราะห์จำนวน 14 โพรบดังแสดงในตารางที่ 1 จากการทดลองเมื่อนำจีโนมิคดีเอ็นเอไปตัดและเชื่อมต่อแล้วได้ดีเอ็นเอตามต้องการ นำดีเอ็นเอที่ได้นี้ไปแยกด้วยอะกะโรสเจลชนิดหลอมละลายที่อุณหภูมิต่ำแล้วตัดแยกดีเอ็นเอโดยการตัดเอาจากเจลบริเวณที่มีขนาด 400-1000 คู่เบสโดยการเปรียบเทียบกับ 100 bp DNA marker แยกดีเอ็นเอจากเจลดังแสดงในภาพที่ 1 ก นำดีเอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ชนิดเดียวกับอะแดบเตอร์ทำให้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาด 400 -1000 คู่เบส ได้ปริมาณมาก ดังแสดงในภาพที่ 1 ข จากนั้นจึงนำดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคพีซีอาร์นี้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการโพรบต่อไป ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้นี้จะประกอบด้วยชิ้นดีเอ็นเอที่มีการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์หลากหลายแบบเพราะเป็นดีเอ็นเอจากจีโนมิคและการที่เราใช้ดีเอ็นเอขนาดนี้เพื่อความสะดวกในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องอัตโนมัติต่อไป เมื่อได้ดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการในปริมาณมากพอแล้วจึงนำไปทำไฮบริไดเซชั่นกับโพรบที่เตรียมไว้ โดยโพรบจะเชื่อมต่อด้วย biotin ที่ปลาย 5’ แล้วไบโอตินนี้จะไปทำปฏิกิริยากับ streptavidin ซึ่งเชื่อมต่ออยู่กับ magnetic bead มีคุณสมบัติเป็นแม่เหล็ก ในที่นี้ใช้ผลิตภัณฑ์ของ Invitrogen ได้แก่ M2-80 Dynabeads : Streptavidin-coated magnetic beads เมื่อจะใช้งานต้องนำมาวางบนแถบแม่เหล็ก โดยมีหลักการคือ magnetic beads ที่เชื่อมกับ Streptavidin แล้ว Biotin ที่เชื่อมต่ออยู่กับดีเอ็นเอโพรบก็จะเข้ามาเกาะกับ beads และเมื่อวางหลอดบนแท่นแม่เหล็กก็จะเกาะอยู่ข้างหลอด เมื่อเราเติมดีเอ็นเอขนาด 400-1000 คู่เบสลงไป สายดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เข้ากันได้กับโพรบแต่ละชนิดก็จะเข้าเกาะกับดีเอ็นเอคู่สม (complementary) ของตน แล้วล้างดีเอ็นเอที่ไม่ได้ใช้ทิ้งไป จะเหลือเฉพาะดีเอ็นเอที่มีเบสเรียงลำดับเป็นแกนซ้ำติดอยู่กับโพรบและติดอยู่ที่ข้างหลอดล้างดีเอ็นเอที่ได้แล้วแยกออกจากโพรบ นำดีเอ็นเอที่แยกได้นี้ไปเพิ่มปริมาณอีกครั้งด้วยเทคนิคพีซีอาร์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของโพรบจำนวน 14 โพรบดังภาพที่ 1 ค ซึ่งจะมีปริมาณมากพอสำหรับการโคลนเข้าสู่เวคเตอร์ TA cloning kit ต่อไป เมื่อนำดีเอ็นเอที่มีการเรียงลำดับดีเอ็นเอแบบ repetitive DNA เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ชุดเดิมแล้วไปโคลนเข้าสู่เวคเตอร์ของชุดโคลนสำเร็จรูป TA cloning kit คัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอที่ต้องการซึ่งจะมีโคโลนีสีขาว แต่ละโคลนจะมีดีเอ็นเอเข้าเพียง 1 สาย แล้วเลือกดีเอ็นเอมาชนิดละ 10-15 โคโลนี ตรวจสอบผลการโคลนด้วยการทำ colony PCR เพื่อตรวจสอบว่ามีชิ้นดี

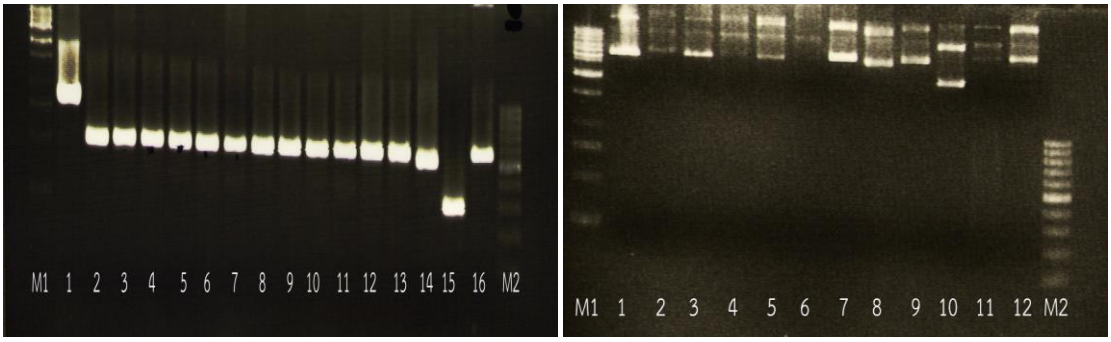
เอ็นเอที่ต้องการจริง ดังแสดงในภาพ ที่ 2 ก แล้วเพิ่มปริมาณด้วยการเลี้ยงในอาหาร SOC media นำไปสกัดพลาสมิด ตรวจดูอีกครั้งด้วยการทำเจลอิเลคโตรโฟริซิส พลาสมิดที่มีดีเอ็นเอจะมี 3 แถบดังภาพที่ 2 ข จากนั้นนำพลาสมิดไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป



ภาพที่ 1 ก และ 1 ข แสดงดีเอ็นเอขนาด 400 – 1000 คู่เบสก่อนและหลังจากเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ของอะแดบเตอร์ oligoA โดย M หมายถึง 100 bp DNA ladder บน 1% agarose gel



ภาพที่1 ค แสดงไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอขนาด 400 -1000 คู่เบสซึ่งได้จากการเพิ่มปริมาณจากดีเอ็นเอของโพรบ 14 ชนิด ชนิดละ 1 ไลบรารี่โดย M หมายถึง 100 bp DNA ladder บน 1% agarose gel



ภาพที่ 2 ก และ 2 ข แสดงผลของการทำ colony PCR และการสกัดพลาสมิด เพื่อนำไปหาลำดับกรดนิวคลีอิคโดย M หมายถึง 100 bp DNA ladder บน 1% agarose gel

ผลการหาลำดับกรดนิวคลีโอไทด์และการออกแบบไพรเมอร์

นำไปหาลำดับเบสโดยบริษัทเอกชนจำนวน 101 โคโลนี จากนั้นนำลำดับกรดนิวคลีอิคที่ได้ มาออกแบบไพรเมอร์ส่วนหัวและท้าย ด้วยโปรแกรม Primer3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)
ได้ไพรเมอร์ดังรายการ

1
Sequence (5'->3') Template strand Length Start Stop Tm GC% Self complementarity Self 3' complementarity
Forward primer CCACCCAACTGCTCTATCGG Plus 20 201 220 60.18 60.00 2.00 1.00
Reverse primer AGCTTCGTCCTCACTTGGTG Minus 20 560 541 59.97 55.00 4.00 3.00
2
OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 792 20 60.68 55.00 5.00 2.00 TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC
RIGHT PRIMER 993 20 60.13 50.00 3.00 0.00 CGAACCGAACAGGCTTATGT

3.
equence (5'->3'Template strand Length Start Stop Tm GC% Self complementarity Self 3' complementarity
Forward primer TGCACTCCCCCTTAGGTGAT Plus 20 414 433 60.25 55.00 5.00 2.00
Reverse primer CGAGGCATTTTTGTCCTGGC Minus 20 791 772 60.11 55.00 3.00 2.00
Product length378
4.
start len tm gc% any 3' seq
1 LEFT PRIMER 427 20 59.39 50.00 6.00 2.00 GCATCCAGCTGAAATCCTCT
RIGHT PRIMER 630 20 60.22 50.00 7.00 2.00 AGTTTACACGGTGTGCGTCA
PRODUCT SIZE: 204, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 1.00
5
LEFT PRIMER 808 20 60.68 55.00 5.00 2.00 TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC

RIGHT PRIMER 1011 20 60.13 50.00 3.00 2.00 ACGAACCGAACAGGCTTATG
PRODUCT SIZE: 204, PAIR ANY COMPL: 5.00, PAIR 3' COMPL: 1.00

6 start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 501 20 60.21 50.00 6.00 0.00 ATTCGAAGCTTGGGGTCTCT
RIGHT PRIMER 719 20 60.07 50.00 4.00 2.00 GATTTTAGACACGGGCCAGA
PRODUCT SIZE: 219, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 3.00

7
OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 147 20 60.21 50.00 6.00 2.00 CAAGCTTCGGATCAACCCTA
RIGHT PRIMER 346 20 60.10 50.00 4.00 0.00 GAGGTGCTTGGCATATTCGT

8
start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 900 20 59.94 45.00 4.00 2.00 CTGGGTCCAAAAACCTTTGA
RIGHT PRIMER 1107 20 59.93 45.00 4.00 2.00 CTTGGCTTCCCAATAAACCA
PRODUCT SIZE: 208, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 1.00

9
OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 369 20 60.23 50.00 4.00 0.00 GGCTCCATGTGCTCTGATTT
RIGHT PRIMER 568 20 59.57 60.00 4.00 0.00 CTCACTACCCGGCCTATCAC

10
OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 583 20 60.68 55.00 5.00 2.00 TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC
RIGHT PRIMER 784 20 60.13 50.00 3.00 0.00 CGAACCGAACAGGCTTATGT

11
OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 832 20 59.99 55.00 5.00 2.00 CCCAGTGGACATAAGCCTGT
RIGHT PRIMER 1032 20 60.39 55.00 4.00 2.00 CCAGGGAGTAACGAGCTTGA

12
start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 738 20 59.99 55.00 5.00 2.00 CCCAGTGGACATAAGCCTGT
RIGHT PRIMER 940 20 60.59 45.00 5.00 3.00 GGCGAAACGAAGATTGAATG

13
OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 356 20 59.43 55.00 8.00 1.00 TACTCGAAGCTTGGGGTCTC
RIGHT PRIMER 571 20 59.83 55.00 4.00 2.00 TAGAGACACGGGCCAGAGAT1η

14

	start	len	tm	gc%	any	3' seq
LEFT PRIMER	459	20	59.59	55.00	4.00	2.00 CCCCCAACTTCTACAACAGC
RIGHT PRIMER	658	20	60.07	50.00	6.00	2.00 GACCCCAAGCTTCGTAATCA

15

	start	len	tm	gc%	any	3' seq
LEFT PRIMER	682	20	60.68	55.00	5.00	2.00 TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC
RIGHT PRIMER	883	20	60.13	50.00	3.00	0.00 CGAACCGAACAGGCTTATGT

16

	start	len	tm	gc%	any	3' seq
LEFT PRIMER	205	20	59.38	45.00	4.00	2.00 TTGGAATCAGAGCCTGCATA
RIGHT PRIMER	408	20	60.11	45.00	2.00	2.00 CCAAGAAACCTGCGACAAAT

17

	start	len	tm	gc%	any	3' seq
LEFT PRIMER	318	20	59.89	50.00	4.00	1.00 CCCGACTCAATTCCCTATGA
RIGHT PRIMER	517	20	60.32	55.00	4.00	2.00 GCTGCACGACCACCTAGTTT

18

OLIGO	start	len	tm	gc%	any	3' seq
LEFT PRIMER	142	20	59.86	50.00	3.00	2.00 CGAGGTAGATGTGACGCAAA
RIGHT PRIMER	339	20	59.98	55.00	4.00	2.00 GCCTTAATCGACAGCTCCAG

19

OLIGO	start	len	tm	gc%	any	3' seq
LEFT PRIMER	311	20	59.88	60.00	0.00	0.00 GAGGGAGAGAGGGAGAAGGA
RIGHT PRIMER	508	20	59.74	45.00	4.00	2.00 ACAAGAAACCTGCGTCGAAT

20

OLIGO	start	len	tm	gc%	any	3' seq
LEFT PRIMER	271	20	59.99	55.00	2.00	0.00 AGAGTGTGGGGCAAGAGAGA
RIGHT PRIMER	467	20	59.63	50.00	6.00	0.00 CTTCGGATCCTCATCACACA

21

OLIGO	start	len	tm	gc%	any	3' seq
LEFT PRIMER	213	20	60.12	50.00	4.00	0.00 GGTCGAGGCAAAAGTGATGT
RIGHT PRIMER	405	20	60.07	40.00	4.00	0.00 GCAACGAATTAGCCCAAAAA

22

OLIGO	start	len	tm	gc%	any	3' seq
LEFT PRIMER	825	20	60.69	55.00	7.00	2.00 GCAACTGGTCCAGAACCTTG
RIGHT PRIMER	1024	20	59.88	50.00	2.00	2.00 CTTTGTTTTAGGGCGACTGC

23

OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 244 20 59.95 55.00 4.00 2.00 CGAAGAGATCCTCCTGTTGC
RIGHT PRIMER 440 20 60.09 45.00 6.00 1.00 TTTGTCCGGTCATTCAGTCA
24
start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 191 20 60.82 50.00 3.00 0.00 AGGGAGTCAAAGGGATGGAA
RIGHT PRIMER 390 20 58.90 55.00 2.00 0.00 ATCCCACTCTCATCCCTCAC
PRODUCT SIZE: 200, PAIR ANY COMPL: 7.00, PAIR 3' COMPL: 3.00
25
OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 147 20 60.76 45.00 6.00 3.00 ATCCCACTCTCATCCCTCAC
RIGHT PRIMER 362 20 60.19 55.00 1.00 0.00 TCCTCTTCCACCTTCCTCCT
SEQUENCE SIZE: 396
26
LEFT PRIMER 265 20 60.11 50.00 5.00 2.00 TCGCCGAGCTTTAGGTAGAA
RIGHT PRIMER 475 20 60.01 55.00 2.00 0.00 TCATCACCTCCATCCTCCTC
PRODUCT SIZE: 211, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 2.00
27
LEFT PRIMER 957 20 59.29 50.00 2.00 0.00 GCCCGTGTCTCAAAATCTCT
RIGHT PRIMER 1162 20 59.87 45.00 4.00 2.00 GCGCATACGTTCTTGCATTA
PRODUCT SIZE: 206, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 1.00
28
OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 385 20 59.85 50.00 6.00 2.00 CAGTCCAACCGAAGCTTTTC
RIGHT PRIMER 584 20 60.08 45.00 4.00 2.00 AGAAGGATTGGCATGTTTGC
29
OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 387 20 59.85 50.00 6.00 2.00 CAGTCCAACCGAAGCTTTTC
RIGHT PRIMER 586 20 60.08 45.00 4.00 2.00 AGAAGGATTGGCATGTTTGC
30
OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 361 20 60.34 50.00 4.00 1.00 TCTCAAAATCCTGCGACTCC
RIGHT PRIMER 560 20 60.38 50.00 5.00 2.00 CCTGGCAGCAGAAAAGGTTA
31
OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 490 21 59.71 57.14 2.00 0.00 GAGAGAGAAAGGGAGCAGGAG

RIGHT PRIMER 684 20 60.69 55.00 3.00 0.00 GGTCCCAACCTCTTCCAATC
32
OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 359 20 60.06 50.00 4.00 2.00 AGCTGACTTGGCGAAACACT
RIGHT PRIMER 549 20 59.75 45.00 6.00 1.00 TTACGCTCCGGAACAAAAGT
33
LEFT PRIMER 155 20 59.25 40.00 5.00 3.00 AGGGCCAATCAATGAAACAT
RIGHT PRIMER 370 20 59.73 55.00 4.00 2.00 GGAAACAGCAACCCTAGTCG
PRODUCT SIZE: 216, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 0.00
34
OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 288 20 59.75 45.00 5.00 2.00 CGAGGGATGGAATGATTGTT
RIGHT PRIMER 480 20 59.80 50.00 3.00 1.00 TCTCACCAGAAGGAGGCATT
35
OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 224 20 59.35 45.00 2.00 0.00 CTCCCTTTCGCTGTGTTTTT
RIGHT PRIMER 423 20 60.11 45.00 6.00 2.00 CACTGCACGATGAAATTTGG
SEQUENCE SIZE: 748
36
OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 394 20 59.86 50.00 3.00 2.00 ATTCAACTTACCCCGTGTGC
RIGHT PRIMER 602 20 59.99 45.00 2.00 2.00 TAACACACGGACGGCAAATA
37
OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 724 20 60.68 55.00 5.00 2.00 TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC
RIGHT PRIMER 925 20 60.13 50.00 3.00 0.00 CGAACCGAACAGGCTTATGT
38
OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 150 20 59.19 50.00 4.00 1.00 GGTTGAAGGGGGTTTACCTT
RIGHT PRIMER 351 20 59.91 40.00 8.00 2.00 CCCACGAGAAAAATTTTGGA
39
OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 582 20 60.73 55.00 6.00 0.00 GATCGAAGCTTGGGGTCTCT
RIGHT PRIMER 782 20 60.68 55.00 5.00 2.00 GAGCTGCCAGGAAACAGCTA
40
OLIGO start len tm gc% any 3' seq

LEFT PRIMER 231 20 60.01 50.00 3.00 0.00 CGGAGACCTGTGTTTTTGGT
RIGHT PRIMER 431 20 59.41 45.00 5.00 0.00 TCGAACGACCTTCAACAAGA

41

OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 482 20 60.11 50.00 4.00 0.00 CATGCTTTGAGTTGGGAGGT
RIGHT PRIMER 689 20 60.33 45.00 3.00 2.00 ACCTGGACGGCAAATAATGA

42

OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 304 20 59.82 55.00 8.00 2.00 CGTGCACGTCTTACACACCT
RIGHT PRIMER 500 20 60.25 50.00 4.00 2.00 TTACAACTTTCGCCCTCGAC

43

LEFT PRIMER 313 20 59.94 45.00 3.00 1.00 TGGTTCCCTTTTCCACTTTG
RIGHT PRIMER 526 20 60.08 55.00 3.00 2.00 GACCGATGAGGAGTGACGAT
PRODUCT SIZE: 214, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 0.00

44.

LEFT PRIMER 659 20 59.40 45.00 7.00 3.00 GGTGATGGCATAACGTTGAA
RIGHT PRIMER 840 20 59.26 50.00 6.00 1.00 TAAGGGGAATCAGCTGGAAG
PRODUCT SIZE: 182, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 0.00

45

LEFT PRIMER 124 20 59.27 45.00 6.00 0.00 CCAAGCTTCGGATCATTTCT
RIGHT PRIMER 329 20 59.28 60.00 2.00 2.00 CCACCCCCTACACGACTATC
PRODUCT SIZE: 206, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 1.00

46

OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 904 20 60.77 50.00 8.00 3.00 TGTTGCAACGAACAGGTCAC
RIGHT PRIMER 1095 20 60.25 55.00 3.00 0.00 TGTCCTGGCTGGTTTAGAGG

47

OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 236 20 60.08 50.00 5.00 0.00 CCCTTCAAGAACTCCACCAA
RIGHT PRIMER 439 20 60.20 40.00 5.00 0.00 AATCCATGTGTGCGGATTTT

48

LEFT PRIMER 1022 20 61.03 50.00 3.00 1.00 CCGTGTCTCAAAATCCCTGA
RIGHT PRIMER 1224 20 59.51 45.00 4.00 0.00 GGCCATCGTTCTTTCATTTC
PRODUCT SIZE: 203, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 2.00

49

start len tm gc% any 3' seq

LEFT PRIMER 862 20 60.68 55.00 5.00 2.00 TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC
RIGHT PRIMER 1063 20 60.13 50.00 3.00 0.00 CGAACCGAACAGGCTTATGT
PRODUCT SIZE: 202, PAIR ANY COMPL: 5.00, PAIR 3' COMPL: 0.00
50
OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 235 20 60.08 50.00 5.00 0.00 CCCTTCAAGAACTCCACCAA
RIGHT PRIMER 438 20 60.20 40.00 5.00 0.00 AATCCATGTGTGCGGATTTT
51
OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 391 20 60.34 50.00 2.00 0.00 CTTGGGTTTGAGTGGGATTG
RIGHT PRIMER 596 20 60.11 50.00 2.00 2.00 AGACACCTTGCCCTCATTTG
52
OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 497 20 60.73 55.00 6.00 0.00 GATCGAAGCTTGGGGTCTCT
RIGHT PRIMER 708 20 60.03 55.00 2.00 0.00 GACACGAACCAGAGCAGACA
SEQUENCE SIZE: 760
53
LEFT PRIMER 188 20 59.58 50.00 4.00 0.00 AGGTGGAAGGCTCATGTGTT
RIGHT PRIMER 388 20 60.30 50.00 3.00 1.00 ACAGGTAGGCAGCGTTTTTG
PRODUCT SIZE: 201, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 0.00
54
LEFT PRIMER 188 20 59.58 50.00 4.00 0.00 AGGTGGAAGGCTCATGTGTT
RIGHT PRIMER 387 20 60.30 50.00 3.00 1.00 ACAGGTAGGCAGCGTTTTTG
PRODUCT SIZE: 200, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 0.00
55
OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 156 20 60.03 50.00 6.00 0.00 CTCATATGCAAGGGGGAGAA
RIGHT PRIMER 355 20 60.10 55.00 6.00 2.00 CCAAGCTTCGATCGTCTCTC
56
LEFT PRIMER 518 20 59.96 50.00 4.00 0.00 ATTTGGCGTCCAGGTGATAG
RIGHT PRIMER 727 20 59.81 50.00 4.00 0.00 ATCCGTTTCCACGGTATGAG
57
LEFT PRIMER 708 20 60.68 55.00 5.00 2.00 TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC
RIGHT PRIMER 910 20 60.13 50.00 3.00 2.00 ACGAACCGAACAGGCTTATG
58

OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 835 20 59.68 50.00 3.00 0.00 GCCGTTGTCTCAAAATCTCC
RIGHT PRIMER 1044 20 59.97 45.00 5.00 3.00 CGAAACCGAAACAGGGTTTA
59
OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 638 20 60.33 45.00 3.00 1.00 ATTATTTGCCGTCCAGGTGA
RIGHT PRIMER 837 20 60.06 50.00 2.00 2.00 TCGGCAAACATAGGGATAGC
60
OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 926 20 60.68 55.00 5.00 2.00 TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC
RIGHT PRIMER 1125 20 59.56 55.00 3.00 2.00 GACCGAACAGGCTTATGTCC
61
OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 848 20 60.40 60.00 6.00 1.00 CCTCTAGACCAGCCAGGACA
RIGHT PRIMER 1051 20 60.28 50.00 5.00 0.00 CCATTGGACCGTTACACACA
62
OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 568 20 60.21 50.00 6.00 0.00 ATTCGAAGCTTGGGGTCTCT
RIGHT PRIMER 772 20 60.07 50.00 5.00 1.00 CCCAGGGAAAACAGCTATGA
63
OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 212 20 60.26 55.00 3.00 2.00 GGTTGTTTGGGAGACACCAC
RIGHT PRIMER 408 20 60.03 50.00 6.00 0.00 CATCCCCATCAGCTCATTCT
64
OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 876 20 60.10 50.00 8.00 1.00 ATGGCCATAGCTGTTTCCTG
RIGHT PRIMER 1083 20 60.13 50.00 3.00 0.00 CGAACCGAACAGGCTTATGT
65
LEFT PRIMER 22 22 59.80 50.00 3.00 2.00 CTGATAGTGACCTGTTCGTTGC
RIGHT PRIMER 219 20 59.95 50.00 2.00 0.00 TCCTGCTCGTTCCAATCTCT
PRODUCT SIZE: 198, PAIR ANY COMPL: 3.00, PAIR 3' COMPL: 0.00
66
LEFT PRIMER 140 20 59.85 50.00 4.00 0.00 CATGGGGTGTTGTTTGAGTG
RIGHT PRIMER 349 20 59.72 50.00 2.00 2.00 CAAACTCACCTCGTCCACAA
67
LEFT PRIMER 361 20 59.77 50.00 5.00 1.00 TAGGGATTGCCCTCAGAAGA

RIGHT PRIMER 559 21 59.72 38.10 8.00 3.00 TCGTTGCAACAAATTGATGAG
68
OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 132 20 59.77 50.00 6.00 2.00 TTCGGATCCTCCTTCGTAGA
RIGHT PRIMER 335 20 60.02 50.00 3.00 0.00 CTCGCACAACAGAACTTGGA
69
OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 330 20 60.44 50.00 7.00 0.00 TGAGGCTCACAACTCCAACA
RIGHT PRIMER 523 20 60.03 55.00 3.00 0.00 CAAGGGTCGTAGTCGGTTGT
70
OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 176 20 59.54 55.00 5.00 3.00 CTACCAGATTCCACCGGAAG
RIGHT PRIMER 378 20 60.27 45.00 4.00 2.00 GATTTTGGGAGGGCAAGAAT
71
LEFT PRIMER 295 20 59.71 50.00 3.00 0.00 GTTTGCCCTCTTTGTTGGAG
RIGHT PRIMER 496 20 60.78 45.00 4.00 3.00 AACAAGAAGGATGCGTCGAA

72
LEFT PRIMER 259 21 59.74 47.62 4.00 1.00 GAAGGACTTGAAAAGGGCAGT
RIGHT PRIMER 462 20 60.19 50.00 2.00 2.00 GCCCCAAACAGACCCTAAAT
73
LEFT PRIMER 914 20 60.68 55.00 5.00 2.00 TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC
RIGHT PRIMER 1113 20 59.06 50.00 3.00 2.00 AACCGAACAGGCTTATGTCC
74
LEFT PRIMER 917 20 60.68 55.00 5.00 2.00 TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC
RIGHT PRIMER 1119 20 60.13 50.00 3.00 2.00 ACGAACCGAACAGGCTTATG
75
LEFT PRIMER 275 20 60.40 55.00 3.00 1.00 GCTGTAGGAGCCCAAACTGA
RIGHT PRIMER 479 20 60.22 45.00 6.00 0.00 TTTGGTTGAGCTCCCTTTTG
76
LEFT PRIMER 475 20 60.03 45.00 5.00 0.00 GAAAATGGGTCATTGGTTGG
RIGHT PRIMER 677 20 59.93 45.00 3.00 1.00 ATGTCCTTGGCTTCAAATGG
77
OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 915 20 60.68 55.00 5.00 2.00 TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC

RIGHT PRIMER 1114 20 59.56 55.00 3.00 2.00 GACCGAACAGGCTTATGTCC
78
LEFT PRIMER 332 20 60.15 50.00 5.00 1.00 AAGTTGGCCTCAACAACCAG
RIGHT PRIMER 542 20 60.10 50.00 2.00 0.00 CCCTCCACCTAAACAGCAAA
79
LEFT PRIMER 348 20 59.82 55.00 2.00 0.00 GAAGGAGGGTGGTGATGTGT
RIGHT PRIMER 548 20 59.36 45.00 2.00 2.00 AAAGCCAAAAGACCACAAGC
PRODUCT SIZE: 201, PAIR ANY COMPL: 5.00, PAIR 3' COMPL: 3.00
80
OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 141 20 60.01 50.00 5.00 0.00 GTGCCACCCTCTTTTGTTGT
RIGHT PRIMER 338 20 59.90 45.00 5.00 3.00 ATCCCACGCAGAATCATTTC
81
OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 914 20 60.68 55.00 5.00 2.00 TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC
RIGHT PRIMER 1115 20 60.13 50.00 3.00 0.00 CGAACCGAACAGGCTTATGT
82
LEFT PRIMER 194 20 60.06 55.00 6.00 2.00 ACCCGCTTAGCTAGCACGTA
RIGHT PRIMER 385 20 60.73 50.00 2.00 1.00 TGTTTCCCTCTATCCGCTCA
83
OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 838 20 60.68 55.00 5.00 2.00 TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC
RIGHT PRIMER 1039 20 60.13 50.00 3.00 0.00 CGAACCGAACAGGCTTATGT

84
OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 437 20 59.90 55.00 2.00 1.00 AGGGCGTGCTGTAGGAGTAA
RIGHT PRIMER 638 20 60.07 45.00 6.00 2.00 CCCAAGCTTCGAATACCAAA
SEQUENCE SIZE: 930
85
LEFT PRIMER 127 20 59.98 50.00 4.00 2.00 AGCTTCGGATCAAGGTGCTA
RIGHT PRIMER 333 20 59.31 55.00 3.00 0.00 CACGGTCTCCTTTGTGAGTG
86
OLIGO start len tm gc% any 3' seq
LEFT PRIMER 130 20 59.98 50.00 4.00 2.00 AGCTTCGGATCAAGGTGCTA
RIGHT PRIMER 337 20 60.31 55.00 3.00 1.00 GCACGGTCTCCTTTGTGAGT

87

OLIGO start len tm gc% any 3' seq

LEFT PRIMER 883 20 60.68 55.00 5.00 2.00 TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC

RIGHT PRIMER 1084 20 60.13 50.00 3.00 0.00 CGAACCGAACAGGCTTATGT

88

OLIGO start len tm gc% any 3' seq

LEFT PRIMER 438 20 59.90 55.00 2.00 1.00 AGGGCGTGCTGTAGGAGTAA

RIGHT PRIMER 639 20 60.07 45.00 6.00 2.00 CCCAAGCTTCGAATACCAAA

89

OLIGO start len tm gc% any 3' seq

LEFT PRIMER 847 20 60.69 55.00 7.00 2.00 GCAACTGGTCCAGAACCTTG

RIGHT PRIMER 1046 20 59.88 50.00 2.00 2.00 CTTTGTTTTAGGGCGACTGC

90

OLIGO start len tm gc% any 3' seq

LEFT PRIMER 136 20 60.03 50.00 7.00 0.00 TTCGAATCGAGAGAGGGAGA

RIGHT PRIMER 328 23 59.80 39.13 3.00 1.00 TTCGAATCGAGAGAGGGAGA

91

LEFT PRIMER 152 21 59.94 52.38 2.00 1.00 AGTGGGGGAGGAAGATAGTGA

RIGHT PRIMER 356 20 59.68 50.00 2.00 0.00 CTCTCCCTTTCCCGCTATTT

92

OLIGO start len tm gc% any 3' seq

LEFT PRIMER 220 20 58.20 55.00 2.00 2.00 GGGGGTGAGAGAAGTAGCAT

RIGHT PRIMER 423 20 59.82 50.00 7.00 2.00 GTCGGTGCCACCAAATAGAT

93

OLIGO start len tm gc% any 3' seq

LEFT PRIMER 809 20 60.68 55.00 5.00 2.00 TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC

RIGHT PRIMER 1010 20 60.13 50.00 3.00 0.00 CGAACCGAACAGGCTTATGT

94

LEFT PRIMER 198 20 60.39 55.00 4.00 3.00 TCGAACCGTAGACCTTCTCG

RIGHT PRIMER 419 20 60.17 50.00 6.00 2.00 CCAAGCTTCGGATCAGGATA

95

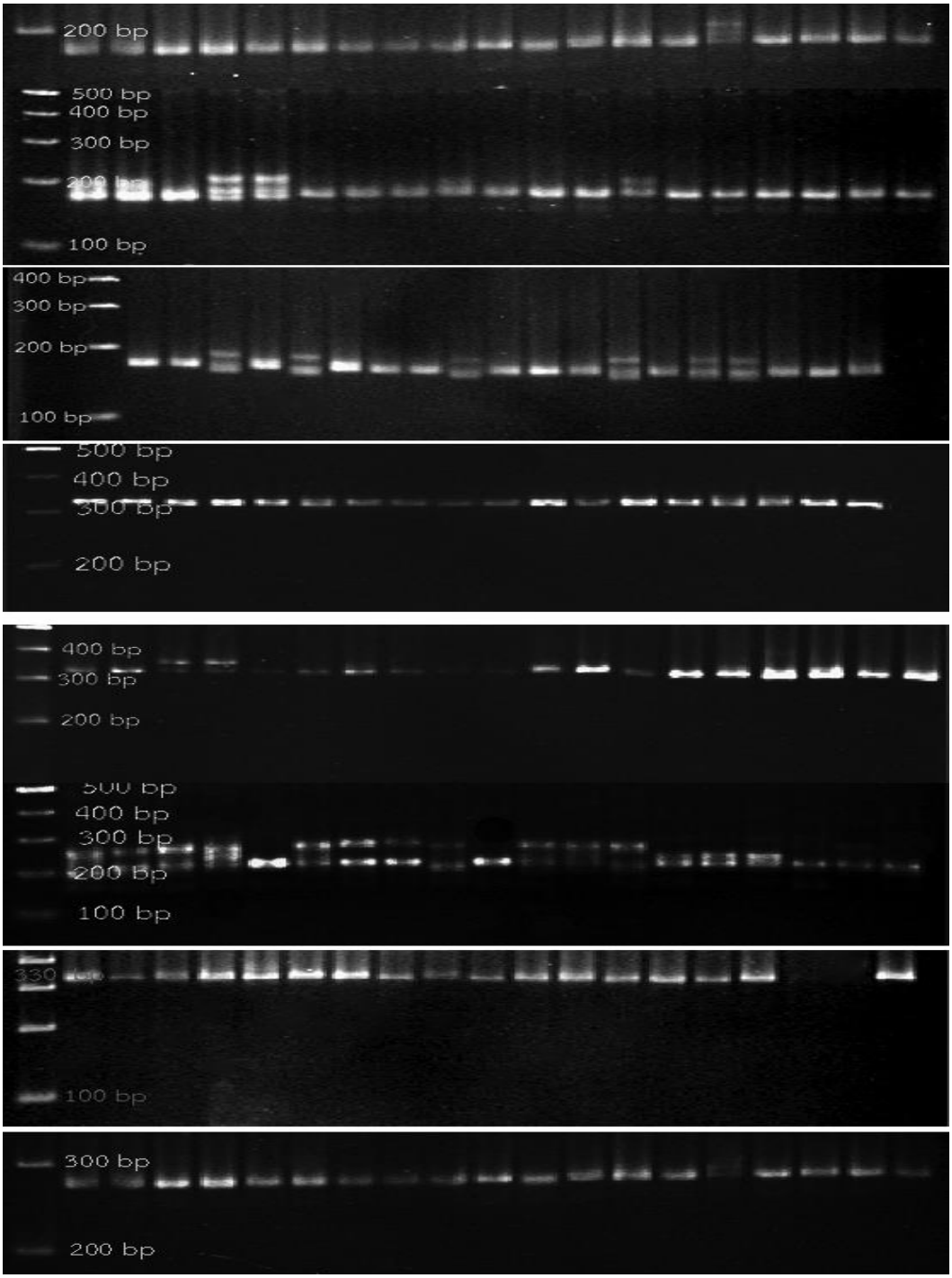
LEFT PRIMER 279 20 59.57 40.00 4.00 0.00 ATTTTGTTGCATTGGGCTCT

RIGHT PRIMER 471 20 60.50 45.00 5.00 3.00 AATGCCACCTTTGTCCAAGA

96

LEFT PRIMER 447 20 59.83 50.00 4.00 1.00 CTGCCCAGAATGAAGTGTGA
RIGHT PRIMER 649 20 59.14 45.00 6.00 1.00 CAGCTGGATGGCAAATAATG
97
LEFT PRIMER 697 20 60.13 55.00 4.00 1.00 GGCGCTTTCTCATAGCTCAC
RIGHT PRIMER 904 20 60.01 60.00 2.00 2.00 GCCTACATACCTCGCTCTGC
98
LEFT PRIMER 695 20 60.13 55.00 4.00 1.00 GGCGCTTTCTCATAGCTCAC
RIGHT PRIMER 902 20 60.01 60.00 2.00 2.00 GCCTACATACCTCGCTCTGC
99
LEFT PRIMER 380 20 60.77 50.00 8.00 3.00 TGTTGCAACGAACAGGTCAC
RIGHT PRIMER 589 20 60.40 50.00 4.00 0.00 CGAAGTCGAGGCATTTCTGT
100
LEFT PRIMER 218 20 59.52 50.00 4.00 0.00 TGGAGGTGCTGGTGATATTG
RIGHT PRIMER 415 20 59.58 55.00 2.00 0.00 ACACAGGCATCTCCACACAC
101
LEFT PRIMER 695 20 60.13 55.00 4.00 1.00 GGCGCTTTCTCATAGCTCAC
RIGHT PRIMER 902 20 60.01 60.00 2.00 2.00 GCCTACATACCTCGCTCTGC

การทดสอบไพรเมอร์ ทดสอบไพรเมอร์จำนวน 101 คู่กับกล้วยไม้สกุลแวนดาจำนวน 5 สายพันธุ์เพื่อตรวจสอบการเพิ่มปริมาณแถบดีเอ็นเอของ SSR motif



ภาพที่ 3 ผลการทดสอบการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์จำนวน 101 คู่ กับกล้วยไม้สกุลแวนดา จำนวน 5 สายพันธุ์ โดยการแยกแถบดีเอ็นเอด้วย เมตาพอร์ 3 % โดยการเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอด้วย **100 bp DNA ladder**

12. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์โดยใช้ magnetic beads ร่วมกับ biotin –lebelled prob สามารถคัดแยกดีเอ็นเอที่เป็น SSRs motif ได้ ในการทดลองนี้ได้พัฒนาไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลแวนดาได้ 42 ไพรเมอร์ จากทั้งหมด 101 ไพรเมอร์ที่ทำการทดสอบ ไพรเมอร์ที่ได้สามารถนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลแวนดาเพื่อการตรวจสอบจำแนกพันธุ์ต่อไป

13. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์:

1.ไพรเมอร์ที่พัฒนาได้สามารถนำไปตรวจสอบจำแนกและบ่งชี้พันธุ์กล้วยไม้ในสกุลแวนดาได้
2.นำไปผลิตเป็นการค้าเช่นเดียวกับไพรเมอร์ของพืชอื่นเช่น ข้าว ข้าวโพด ถั่วเหลืองได้
3.เป็นข้อมูลสำหรับภาครัฐและเอกชนนำไปใช้ในการคุ้มครองพันธุ์กล้วยไม้สกุลแวนดาได้
4. เทคนิคที่ใช้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้ในพืชอื่น ๆ ได้

14. คำขอบคุณ

ขอขอบคุณนักวิจัยและผู้ช่วยนักวิจัยในห้องปฏิบัติการทุกท่านที่มีส่วนช่วยในการทดลองจนสำเร็จ และขอบคุณสวนกล้วยไม้ในจังหวัดราชบุรีได้แก่ ลันดาออร์คิด สวนกล้วยไม้คุณโกศล ที่มอบต้นพันธุ์กล้วยไม้บางส่วนเพื่อการวิจัย

15. เอกสารอ้างอิง

Ahmad R, Ferguson L, Southwick SM (2003). Identification of Pistachio *(Pistachio vera* L.) Nuts with microsatellite markers. *Amer Soc Hort Sci*. 128: 898-903.

Edwards KJ, Barker JH, Daly A, Jones C, Karp A (1996). Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants. *Biotechniques.* 20: 758-760

Zhao W, Miao X, Jia S, Pan Y, Huang Y (2005). Isolation and characterization of microsatellite loci from the mulberry, *Morus* L. *Plant Sci.* 168: 519-525.

Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (2002). Strategies for microsatellite isolation: A Review. *Mol Ecol*. 11: 1-16.

16. ภาคผนวก (ถ้ามี)