การค้นหาชิ้นส่วนของสารพันธุกรรม ยีน ที่ควบคุมความหอม ของมะพร้าวน้ำหอมและมะพร้าวน้ำหอมกะทิ

Genetic of Aromatic Gene in Aromatic Coconut

วีรา คล้ายพุก[1/] ปริญดา หรูนหีม[2/] วิไลวรรณ ทวิชศรี[1/] ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล[3/] ทิพยา ไกรทอง[2/] และสมชาย วัฒนโยธิน[1/]

คำสำคัญ: 2-Acetyl-1-pyrroline กลิ่นมะพร้าวน้ำหอม Aromarker

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 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที จำนวน 35 รอบ Annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ และLong Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดย Aromarker มีความจำเพาะเจาะจงกับยีนในข้าวหอมมะลิ แต่ไม่จำเพาะเจาะจงกับมะพร้าวน้ำหอมและใบเตย

/1 สถาบันวิจัยพืชสวน

/2 ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร

/3 ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

Genetic of Aromatic Gene in Aromatic Coconut

Veera Klaipuk[1/] Parinda Hrunheem[2/] Wilaiwan Twishsri[1/] Suchirat Sakuanrungsirikul[3/]
Tippaya Kraitong[2/] and Somchai Watanayothin[1/]

Keywords: 2-Acetyl-1-pyrroline, coconut aroma, Aromarker

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; 2-Acetyl-1-pyrroline (2AP) in aromatic coconut, Fragrant pandan and fragrant rice were same. We found that the suitable Reaction mix for extract aromatic coconut DNA was $H_{๒}O$ 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 and DNA template ๓ µl. And the suitable condition PCR was Pre denaturation at 94°C, 5 min, 1 time. Denaturation at 94 °C, 40 sec, 35 times. Annealing at 50 °C, 1 min, 35 times. Extension at 72 °C, 1 min, 35 times. And Long Extension at 72 °C, 10 min. And Aromarker was specific in Fragrant Rice.

[1/] Horticulture Research Institute

[2/] Chumphon Horticultural Research Center

[3/] Khon Kaen Field Crops Research Center

คำนำ

มะพร้าวน้ำหอม (aromatic coconut) (*Cocos nucifera* Linn.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีมูลค่าส่งออกหลายร้อยล้านบาทต่อปี เป็นมะพร้าวพันธุ์พื้นเมืองที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย โดยกลายมาจากพันธุ์หมูสีเขียว พบครั้งแรกที่ อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม (จุลพันธุ์ และคณะ, 2550; วิไลวรรณ, 2558) สารประกอบสำคัญที่ทำให้เกิดกลิ่นในมะพร้าวน้ำหอม คือ 2-Acetyl-1-pyrroline หรือ 2AP ซึ่งเป็นสารประกอบตัวเดียวกันกับสารที่ทำให้เกิดกลิ่นในใบเตย และข้าวหอมมะลิ (นริศา, 2553; ศูนย์สื่อสารวิทยาศาสตร์ไทย, 2552) สาร 2AP ในข้าว พบว่าถูกควบคุมด้วยยีน *Badh๒* และสามารถตรวจสอบได้ด้วย Aromarker (ไวพจน์, 2556)

งานวิจัยนี้จึงได้นำ Aromarker มาทดสอบในการตรวจสอบยีนในมะพร้าวน้ำหอม โดยเปรียบเทียบกับข้าวหอมมะลิ และใบเตย เพื่อเป็นแนวทางในการค้นหาชิ้นส่วนของสารพันธุกรรม ที่ควบคุมความหอมในมะพร้าวน้ำหอม และมะพร้าวน้ำหอมกะทิต่อไป

วิธีดำเนินการและอุปกรณ์

อุปกรณ์

1. ใบจากต้นกล้าพันธุ์มะพร้าวน้ำหอม และพันธุ์ไทยต้นสูง จากศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร จังหวัดชุมพร ข้าวหอมมะลิ และใบเตย

   <u>ชื่อตัวอย่างมะพร้าวเรียงตามลำดับ</u>

   ๑. CP TT ๐๑
   ๒. CP TT ๐๒
   ๓. CP TT ๐๓
   ๔. CP TT ๐๕
   ๕. CP TT ๐๔

   } มะพร้าวพันธุ์ไทยต้นสูง

   ๖. CPNH ๐๓
   ๗. CPNH ๐๔
   ๘. CPNH ๐๕
   ๙. CPNH ๐๒
   ๑๐. CPNH ๐๑

   } มะพร้าวน้ำหอม

2. สารเคมี

   2.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

   - Doyle & Meili buffer (CTAB, Tris-HCl, EDTA, PVP-๔๐T, ๒-Mercaptone Ethanol และ NaCl)
   - 10 mg/ug Protenase K

- Rnase A
- 20% SDS
- 3.8% Sodium citrate
- 5 M NaCl
- dicholomethan : Isoamly (๒๔:๑)
- Chloroform : Isoamyl Alcohol (24:1)
- 3M Sodium Acetete
- 70% Ethanol
- Isopropanol
- absolute ethanol
- SE buffer
- ไนโตรเจนเหลว
- Mercaptonethanol

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการทำพีซีอาร์ (PCR)

- *Taq* DNA Polymerase
- dNTP (dATP dTTP cTP gTP)
- DNA Sample
- $MgCl_2$
- 0.5 x TE buffer
- buffer A (10X)
- buffer S (10X)
- buffer V2 (10X)
- Primer
  1. Aroma-F1: 5'-TGC TCC TTT GTC ATC ACA CC-3'
  2. Aroma-R1: 5'-TTT CCA CCA AGT TCC AGT GA-3'

2.3 สารเคมีที่ใช้ในการทำ Gel Electrophoresis

- agarose gel
- 6 X loading buffer
- ethidium bromide
- 0.5 X TBE buffer

3. 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)

2. **การสกัดดีเอ็นเอ** (DNA Extraction)

<u>ใบมะพร้าว</u>

การสกัดดีเอ็นเอดัดแปลงมาจาก Li, M และ Midmore (1999) นำใบมะพร้าว 0.1 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 3 ครั้ง จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง คว่ำหลอดบนกระดาษทิชชูและซับให้แห้งหรือปล่อยแห้งในอากาศเป็นเวลา 1 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 3 ครั้ง เทส่วนใสทิ้ง คว่ำหลอดบนกระดาษทิชชูและซับให้แห้งหรือปล่อยแห้งในอากาศ ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE ผสมกับ RNase ปริมาตร ๔๐-๕๐ ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 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) บดใน extractionbuffer 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 µl, 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) บดใน extractionbuffer 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 µl, ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว๑๒,๐๐๐ รอบ/นาที, ๑ นาที (ล้างตะกอนซ้ำ ๓ รอบ) ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง ก่อนละลายด้วย TE + RNase๔๐-๕๐ µl ตรวจคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธี Agarosegel electrophoresis

3. การตรวจคุณภาพของดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction)

นำดีเอ็นเอมาวัดหาปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ชนิด nano drop แล้วเจือจางดีเอ็นเอให้ได้ความเข้มข้น ๑๐๐ ng/µl สำหรับเปนสารตั้งต้นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งใช้ปริมาตรสุทธิของปริฏิริยาพีซีอาร์ ๑๕ µl,ประกอบด้วย H_2O ๗.๖ µl, ๑๐X buffer ๑.๕ µl, ๒.๕ mMdNTP mix ๑.๒ µl, ๒๕ mM $MgCl_2$ 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

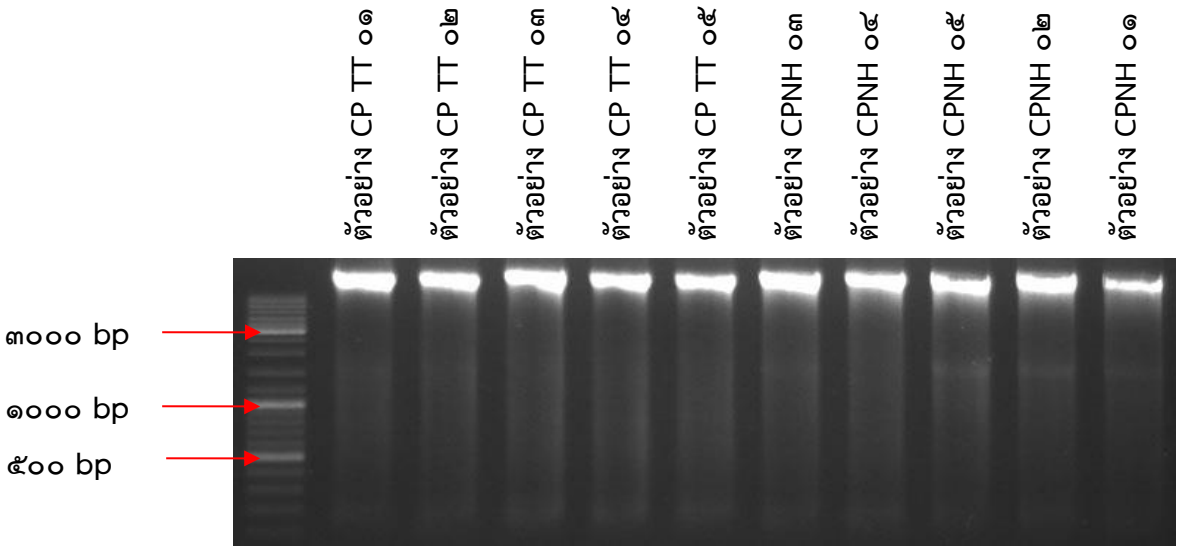
Pre denaturation	๙๔ °C	๕	นาที	
Denaturation	๙๔ °C	๔๐	วินาที	๓๕
Annealing	๔๕ °C	๑	นาที	๓๕
Extension	๗๒ °C	๑	นาที	๓๕
Long Extension	๗๒ °C	๑๐	นาที	
Hold	๒๕ °C∞			

ตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์วิธี Agarosegel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ Agarose gel ๑.๐%

ผลการวิจัย

1. ผลการสกัดดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบของมะพร้าวน้ำหอมและมะพร้าวพันธุ์ไทยต้นสูง โดยทำการสกัดดีเอ็นเอดัดแปลงจาก Li, M และ Midmore (1999) เมื่อนำมาตรวจวิเคราะห์พบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีคุณภาพดี แต่มีการปนเปื้อนของโปรตีนและอาร์เอ็นเอ (ภาพที่ 1)



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

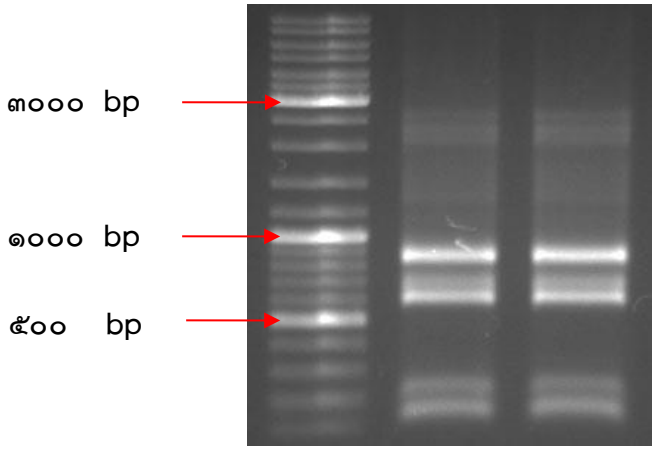
2. ผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยเทคนิค RAPD-PCR

นำดีเอ็นเอของตัวอย่างพันธุ์ CPNH ๐๑ มาเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ Aromarker เพื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR โดยทำปฏิกริยาในปริมาตร ๑๕ ไมโครลิตร ประกอบด้วย $H_๒O$ 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 และดีเอ็นเอต้นแบบ ๓ µl

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยมี PCR profile คือ

1. Pre denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ
2. Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที
3. Annealing ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
4. Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
   (ขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 35 รอบ)
5. Long Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
6. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้งาน

ทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ ตัวอย่างพันธุ์ CPNH ๐๑ โดยวิธี agarosegel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ Agarose gel ที่มีความเข้มข้น ๑% พบว่า แถบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ติดกันเป็นแพ (ภาพที่ 2)



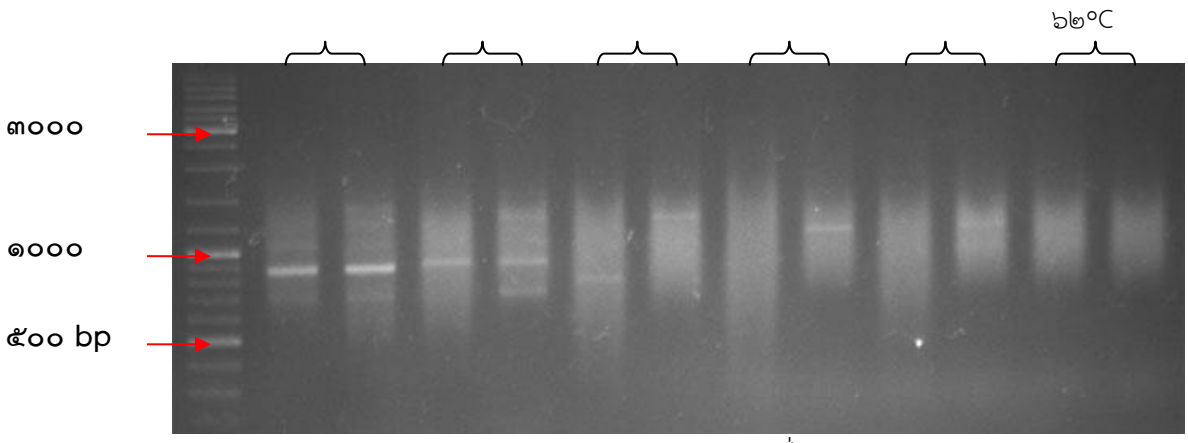
<u>รูปภาพ ๒</u> PCR products ตัวอย่างพันธุ์ CPNH ๐๑ของมะพร้าวที่ได้แล้วตรวจดูด้วยวิธี Agarosegel electrophoresis

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

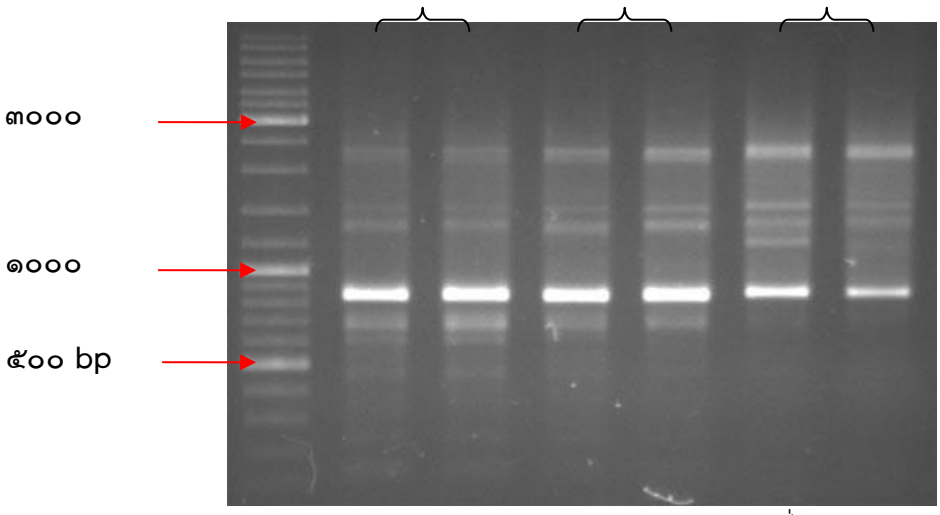
เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยกำหนด PCR profile เหมือนในการทดลองที่ 2 แต่ทดสอบ Annealing ที่อุณหภูมิ ๕๒, ๕๔, ๕๖, ๕๘, ๖๐ และ ๖๒ องศาเซลเซียส

ทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ ตัวอย่างพันธุ์ CPNH ๐๑ โดยวิธี agarosegel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้นของ Agarose gel ที่มีความเข้มข้น ๑% พบว่า อุณหภูมิ Annealing ที่เหมาะสม คือ ๕๒ องศาเซลเซียส (ภาพที่ 3)



<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

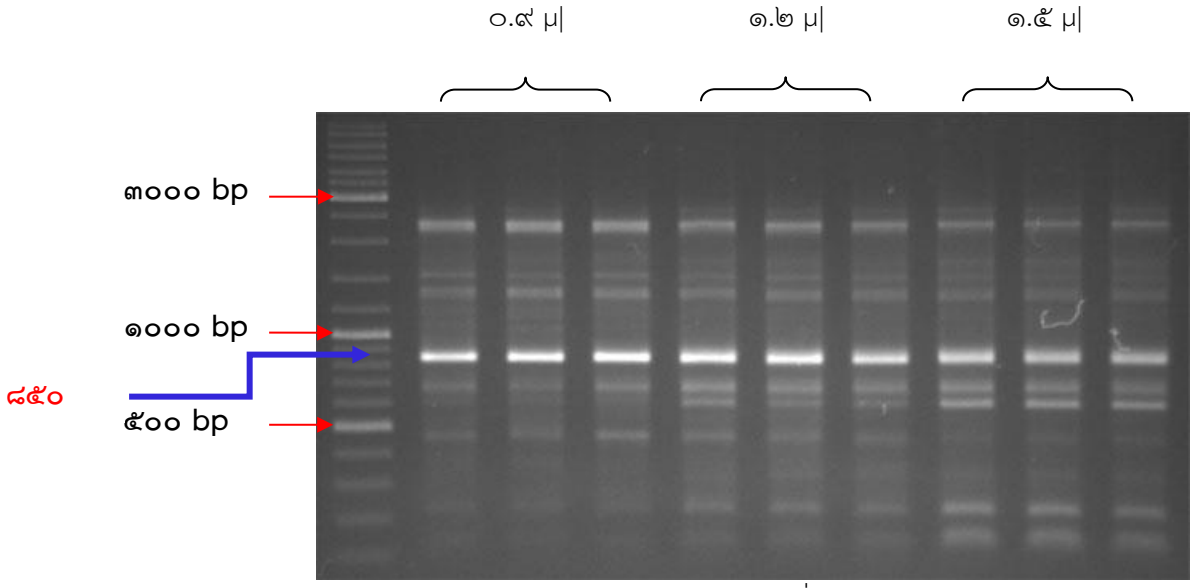
$H_{๒}O$	๗.๖	µl	
๑๐X buffer	๑.๕	µl	
๒.๕ mMdNTP mix	๑.๒	µl	
๒๕ mM $MgCl_{๒}$		๐.๙	µ
	๑.๒	µl	
	๑.๕	µl	
๑๐ µM F๑ Primer	๐.๓	µl	
๑๐ µM R๑ Primer		๐.๓	µl
Taq polymerase ๕U/µl	๐.๒	µl	
DNA template	๓	µl	
Mineral Oil			

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยมี PCR profile คือ

๑. Pre denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ
2. Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที
3. Annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

4. Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที
   (ขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 35 รอบ)
5. Long Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
6. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 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

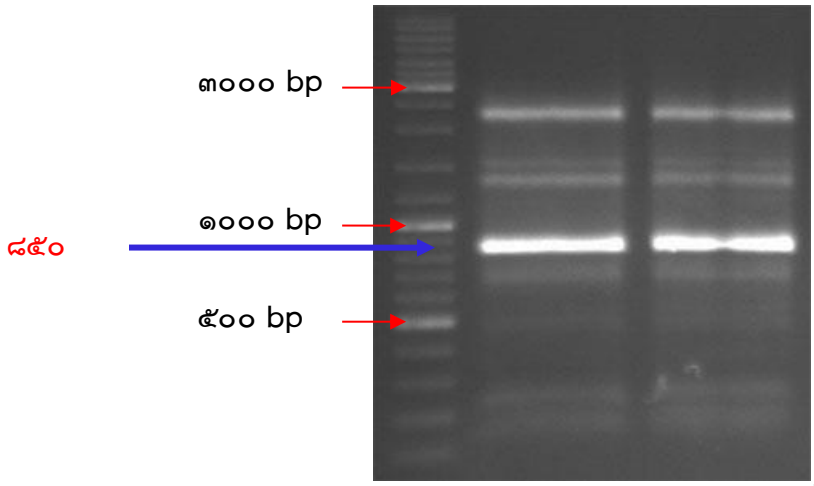
Reaction mix ๑๕ µl

$H_๒O$	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) จากนั้นทำให้หลอดแห้ง โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว๑๒,๐๐๐ 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 พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ดังกล่าวนี้ไม่ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนความหอมจึงอาจเป็นได้ว่าไพรเมอร์คู่นี้อาจจะไม่ใช่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีนน้ำหอมของมะพร้าวน้ำหอม หรืออีกประการหนึ่งเนื่องจากยังไม่มีรายงานหรือลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนน้ำหอมในมะพร้าวน้ำหอม ยีนนี้ก็อาจจะเกี่ยวข้องกับยีนความหอมก็ได้ซึ่งทั้งหมดก็ต้องทำการทดลองต่อไป

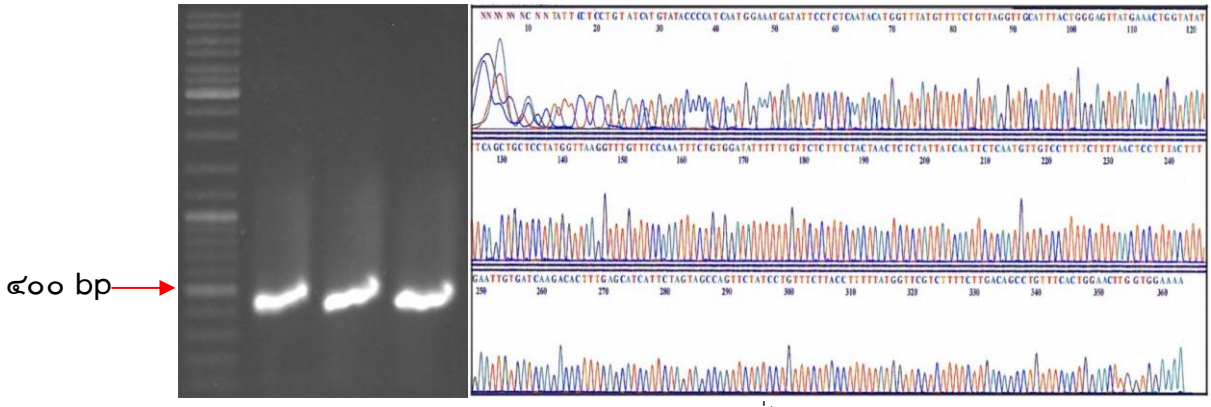
๖. ผลการเพิ่มปริมาณยีนและตรวจลำดับเบสยีนสร้างสาร ๒AP ในข้าวหอมมะลิ

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)



รูปภาพ ๗ 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

```
JQ308427    AGCCGGTGCTCCTTTGTCATCACACCCTGGTGTAGACAAGGTACAGCTATTCCTCCTGTA
2100rice    ------TGCTCCTTTGTCATCACACCCTGGTGTAGACAAGGTACAGCTATTCCTCCTGTA    54
            ************************************************************
JQ308427    ATCATGTATACCCCATCAATGGAAATGATATTCCTCTCAATACATGGTTTATGTTTTCTG
2160rice    ATCATGTATACCCCATCAATGGAAATGATATTCCTCTCAATACATGGTTTATGTTTTCTG    114
            ************************************************************
JQ308427    TTAGGTTGCATTTACTGGGAGTTATGAAACTGGTATATATTTCAGCTGCTCCTATGGTTA
2220rice    TTAGGTTGCATTTACTGGGAGTTATGAAACTGGTATATATTTCAGCTGCTCCTATGGTTA    174
            ************************************************************
JQ308427    AGGTTTGTTTCCAAATTTCTGTGGATATTTTTTGTTCTCTTTCTACTAACTCTCTATTAT
2280rice    AGGTTTGTTTCCAAATTTCTGTGGATATTTTTTGTTCTCTTTCTACTAACTCTCTATTAT    234
            ************************************************************
JQ308427    CAATTCTCAATGTTGTCCTTTTCTTTTAACTCCTTTACTTTTTAGAATTGTGATCAAGAC
2340rice    CAATTCTCAATGTTGTCCTTTTCTTTTAACTCCTTTACTTTTTAGAATTGTGATCAAGAC    294
            ************************************************************
JQ308427    ACTTTGAGCATCATTCTAGTAGCCAGTTCTATCCTGTTTCTTACCTTTTTATGGTTCGTC
2400rice    ACTTTGAGCATCATTCTAGTAGCCAGTTCTATCCTGTTTCTTACCTTTTTATGGTTCGTC    354
            ************************************************************
JQ308427    TTTTCTTGACAGCCTGTTTCACTGGAACTTGGTGGAAAAAGTCCTATAGTGGTGTTTGAT
2460rice    TTTTCTTGACAGCCTGTTTCACTGGAACTTGGTGG------------------------    389
            ************************************************************
```

รูปภาพ ๘ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างข้าวหอมมะลิและยีน Badh๒ (JQ๓๐๘๔๒๗)

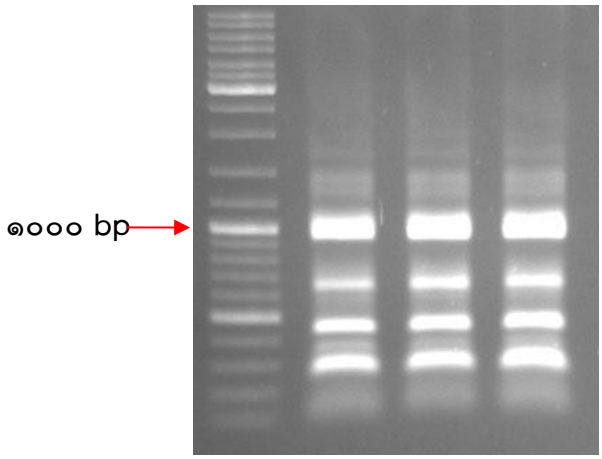
๗. ผลการเพิ่มปริมาณยีนและตรวจลำดับเบสยีนสร้างสาร ๒AP ในใบเตย

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 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที จำนวน 35 รอบ Annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ และLong Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยไพเมอร์ Aromarker มีความจำเพาะเจาะจงกับยีนในข้าวหอมมะลิ แต่ไม่จำเพาะเจาะจงกับมะพร้าวน้ำหอมและใบเตย

เอกสารอ้างอิง

จุลพันธุ์ เพ็ชรพิรุณ จิตสำเริง พยัคพงศ์ อานุภาพ ธีระกุล และ คะนอง คลอดเพ็ง (2550) การปรับปรุงพันธุ์มะพร้าวน้ำหอมโดยการคัดเลือกพันธุ์และผสมพันธุ์. ในรายงานผลงานวิจัยประจำปี 2548-2550 ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร. หน้า11-31

นริศา เหละดุหวิ, ณัฏฐา เลาหกุลจิตต์, อรพิน เกิดชูชื่น และโศรดา วัลภา. 2553. การเพอร์แวบเพอเรชันสารหอมระเหยของสารสกัดใบเตย. ว. วิทย์. กษ. 41(3/1) (พิเศษ): 653-656

วิไลวรรณ ทวิชศรี. 2558. พันธุ์มะพร้าวในประเทศไทย. สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร. 32 หน้า

ไวพจน์ กันจู, สุกัญญา เรืองขำ, สุมน ห้อยมาลา, อนุชา พลับพลา, อภิชาติ วรรณวิจิตร และธีรยุทธ ตู้จินดา. 2556. การตรวจสอบความหอมในเชื้อพันธุกรรมข้าวไร่ไทยโดยใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อยีน Os2AP และการวิเคราะห์คุณภาพหุงต้มและความหนาแน่นของธาตุเหล็กในเมล็ด. Thai J. Genet. 6(1): 11-24).

ศูนย์สื่อสารวิทยาศาสตร์ไทย. 2552. ข้าวขาวดอกมะลิและสิทธิบัตรเทคโนโลยีการใช้ยีนควบคุมความหอมในข้าว. ใน เอกสารประกอบการเสวนา เรื่อง “อนาคตข้าวไทย...ก้าวย่างสำคัญหลังจากจดสิทธิบัตรเทคโนโลยีการใช้ยีนควบคุมความหอมในข้าว” ศูนย์สื่อสารวิทยาศาสตร์ไทย สวทช. วันที่ 13 สิงหาคม 2552 อาคาร สวทช. ถนนพระรามที่หก.