

ประสิทธิภาพของไพรมเมอร์สำหรับยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไก  
INDUCED SYSTEMIC RESISTANCE ในข้าวขาวดอกมะลิ 105

PRIMER EFFICIENCY FOR GENES INVOLVED IN  
INDUCED SYSTEMIC RESISTANCE IN RICE CULTIVAR  
KHAO DAWK MALI 105



ชนกันท์ รุ่งทอง  
ณัฐวรรณ บุญเพ็ญ  
ปัญญ์วลัญช์ วิสารทพจน์

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ปีการศึกษา 2561  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PRIMER EFFICIENCY FOR GENES INVOLVED IN  
INDUCED SYSTEMIC RESISTANCE IN RICE CULTIVAR  
KHAO DAWK MALI 105



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIREMENT FOR  
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)  
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ACADEMIC YEAR 2018

หัวข้อโครงการพิเศษ ประสิทธิภาพของไพรมเมอร์สำหรับยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไก Induced Systemic Resistance ในข้าวขาวดอกมะลิ 105  
Primer Efficiency for Genes Involved in Induced Systemic Resistance in Rice Cultivar Khao Dawk Mali 105

ชื่อนักศึกษา นายชนกนันท์ รุ่งทอง รหัสนักศึกษา 58050731  
นางสาวณัฐวรรณ บุญเพ็ง รหัสนักศึกษา 58050757  
นางสาวปัญญวดีวิญช์ วิสารทพจน์ รหัสนักศึกษา 58050778

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)  
ภาควิชา ชีววิทยา  
ปีการศึกษา 2561  
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้ ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2561

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.วรกฤต วรรณัทกิจ ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล กรรมการ	
ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้สิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์ มีอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งขอสงวนสิทธิ์ในชื่อของคณะและอาจารย์ผู้เกี่ยวข้องในเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงการพิเศษ	ประสิทธิภาพของไพโรเมอร์สำหรับยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไก Induced Systemic Resistance ในข้าวชาวดอกมะลิ 105	
ชื่อนักศึกษา	นายชนกนันท์ รุ่งทอง	รหัสนักศึกษา 58050731
	นางสาวณัฐวรรณ บุญเพ็ง	รหัสนักศึกษา 58050757
	นางสาวปัญญาวัลย์ วิสารทพจน์	รหัสนักศึกษา 58050778
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	
ภาควิชา	ชีววิทยา	
คณะ	วิทยาศาสตร์	
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)	
ปีการศึกษา	2561	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา	

### บทคัดย่อ

ข้าวเป็นพืชที่นิยมปลูกในประเทศไทยตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน การปลูกข้าวมักประสบปัญหาเกี่ยวกับปริมาณผลผลิต ซึ่งสาเหตุส่วนหนึ่งเกิดจากผลกระทบของการก่อโรคโดยเชื้อจุลินทรีย์ การแก้ปัญหาด้วยวิธีควบคุมโรคทางชีวภาพซึ่งเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพและไม่ก่อให้เกิดผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมและผู้บริโภคจึงถูกเลือกมาใช้ โดยการนำ PGPR ที่เป็นเชื้อจุลินทรีย์ไปปรับกับเชื้อก่อโรคมาช่วยเพิ่มและกระตุ้นการตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบ induced systemic resistance (ISR) และก่อให้เกิดการป้องกันในรูปแบบต่างๆ ในพืช การตรวจสอบการทำงานเหล่านี้สามารถทำได้โดยทดสอบการแสดงออกยีนที่ทำงานหรือถูกกระตุ้นมากขึ้นเมื่อได้รับ PGPR โครงการพิเศษนี้ศึกษาเกี่ยวกับการออกแบบและตรวจสอบประสิทธิภาพของไพโรเมอร์สำหรับยีน *NPR1* *PAL* *POX* และ *WRKY45* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองแบบ ISR ในข้าว โดยออกแบบและตรวจสอบคุณสมบัติที่เหมาะสมของไพโรเมอร์ ก่อนจะนำมาทดสอบความจำเพาะเจาะจงด้วยวิธี PCR และ gel electrophoresis และคำนวณค่าประสิทธิภาพของไพโรเมอร์จากผลการทำ quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) ผลการทดสอบพบว่าไพโรเมอร์ qPAL ไม่มีความจำเพาะเจาะจงต่างจากไพโรเมอร์ qNPR1 qPOX และ qWRKY45 ที่มีความจำเพาะจงกับยีนในข้าว อย่างไรก็ตามหลังจากคำนวณค่าประสิทธิภาพ พบว่ามีเพียงไพโรเมอร์ qNPR1 ที่มีประสิทธิภาพอยู่ในช่วงที่ยอมรับ นั่นคือ 97.5 เปอร์เซ็นต์ โดยกราฟจากสมการถดถอยมีค่าความชันเท่ากับ -3.3944 และ  $R^2$  เท่ากับ 0.9949 ดังนั้นไพโรเมอร์ qNPR1 ที่ออกแบบในงานวิจัยนี้มีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *NPR1* ในข้าวสำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวกับการตอบสนองของการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบ ISR

**คำสำคัญ :** ข้าว ไพโรเมอร์ Induced Systemic Resistance *NPR1* *PAL* *POX* *WRKY45*

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<b>Title</b>	Primer Efficiency for Genes Involved in Induced Systemic Resistance in Rice Cultivar Khao Dawk Mali 105	
<b>Students</b>	Mr. Chanoknun Rungthong	Student ID 58050731
	Miss Nattawan Boonpheng	Student ID 58050757
	Miss Panvarun Wisarntapoj	Student ID 58050778
<b>Degree</b>	Bachelor of Science (Biotechnology)	
<b>Department</b>	Biology	
<b>Faculty</b>	Science	
<b>University</b>	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)	
<b>Academic Year</b>	2018	
<b>Advisor</b>	Asst.Prof.Dr.Chokchai Kittiwongwattana	

### Abstract

Rice is commonly grown in Thailand from the past to the present. Rice cultivation often faces a problem about amount of production which is partly caused by the effects of pathogen. Biological control method that is effective solution and no negative effect to environments and consumers is chosen by using PGPR that is microbial antagonism against pathogen increases and induces resistance, commonly referred to as induced systemic resistance (ISR) and causes various forms of protection in plant. Determination of these actions is tested by gene expression assay of the genes that were active or more triggered when plant was treated with PGPR. This special project studied about design and efficiency of primers for *NPR1* *PAL* *POX* and *WRKY45* that involve with ISR response. We design and verify appropriate properties of the primer before test specificity by PCR and gel electrophoresis method. Finally, we apply data from quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) method to calculate the efficiency of primers. qPAL primers were not specific, unlike qNPR1 qPOX and qWRKY45 primers that were specific to rice genes. However, after calculating efficient value, only a qNPR1 primer was in the acceptable range with 97.5% from the regression analysis. The slope was -3.3944, and  $R^2$  value was 0.9949. Therefore, the qNPR1 primer designed in this special project is appropriate to be used to examine the expression of *NPR1* gene in rice for research related to ISR immune response.

Keywords : Induced Systemic Resistance, *NPR1*, *PAL*, *POX*, Primers, Rice, *WRKY45*



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องมาจากความกรุณาและความร่วมมือของทุกท่าน ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา ที่คอยให้คำปรึกษาดูแลอย่างใกล้ชิดและให้ความช่วยเหลือในการปรับปรุงข้อบกพร่อง ตลอดจนแนะนำการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือในการทำปัญหาพิเศษ และขอขอบพระคุณกรรมการสอบปัญหาพิเศษ คือ ดร.สุทธิจิต ศรีวัชรกุล และ ผศ.ดร.วรกฤต วรรณทกิจ ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการทำปัญหาพิเศษให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการชีววิทยา และเจ้าหน้าที่ห้องธุรการ ภาควิชาชีววิทยา ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวก รวมทั้งให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือ

ขอขอบพระคุณ บิดา-มารดา ที่ให้ได้รับการศึกษา ตลอดจนคอยเลี้ยงดู อบรมสั่งสอน และเป็นกำลังใจเป็นแรงผลักดันในการทำปัญหาพิเศษให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี รวมถึงเพื่อนๆ และบุคคลอื่นๆ ที่ไม่ได้กล่าวมา ผู้จัดทำโครงการขอขอบคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ชนกันท์ รุ่งทอง  
ณัฐวรรณ บุญเพ็ง  
ปัญญวัลย์ชัช วิสารทพจน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ง
สารบัญ.....	จ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ซ
คำย่อ/สัญลักษณ์.....	ณ
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>3</b>
2.1 ยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในข้าว.....	3
2.1.1 Phenylalanine ammonia lyase (PAL).....	3
2.1.2 Peroxidase (POX).....	3
2.1.3 WRKY45.....	4
2.1.4 NPR1.....	4
2.2 Polymerase Chain Reaction (PCR).....	4
2.2.1 ปฏิกริยาพีซีอาร์.....	5
2.2.2 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR machine).....	6
2.2.3 การวิเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกริยาพีซีอาร์.....	6
2.2.4 ข้อควรระวังในการทำพีซีอาร์.....	6
2.2.5 ข้อจำกัดทางด้านเทคนิคพีซีอาร์.....	7
2.3 Real-Time Polymerase Chain Reaction หรือ Quantitative PCR.....	7
2.3.1 ลักษณะการใช้งาน Real-Time PCR.....	8
2.4 ความแตกต่างระหว่าง PCR และ Real-Time PCR.....	10
2.5 การคำนวณประสิทธิภาพของไพรเมอร์.....	10
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	13
3.1 การออกแบบไพรเมอร์ qNPR1, qPAL, qPOX และ qWRKY45 และตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้น.....	13
3.2 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ qNPR1, qPAL, qPOX และ qWRKY45 ด้วยวิธี PCR และ Gel electrophoresis.....	13
3.3 การตรวจสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ด้วยวิธี qRT-PCR.....	14
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล.....	15
4.1 การออกแบบไพรเมอร์ qNPR1, qPAL, qPOX และ qWRKY45 และตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้น.....	15
4.2 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ qNPR1, qPAL, qPOX และ qWRKY45 ด้วยวิธี PCR และ Gel electrophoresis.....	20
4.3 การตรวจสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ด้วยวิธี qRT-PCR.....	21
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	25
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	25
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	25
เอกสารอ้างอิง.....	26
ภาคผนวก.....	29
ภาคผนวก ก ฐานข้อมูลและโปรแกรมที่ใช้ออกแบบไพรเมอร์.....	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง.....	13



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 การเกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์.....	5
2.2 การวัดปริมาณ fluorescence จาก standard ใน real-time PCR.....	8
2.3 การวัด fluorescence จาก PCR products.....	9
4.1 ลำดับเบสของยีน <i>NPR1</i> .....	16
4.2 ลำดับเบสของยีน <i>PAL</i> .....	17
4.3 ลำดับเบสของยีน <i>POX</i> .....	18
4.4 ลำดับเบสของยีน <i>WRKY45</i> .....	19
4.5 PCR products จากการทำ PCR.....	20
4.6 กราฟแสดงสัญญาณเรืองแสงต่อจำนวนรอบในปฏิกิริยา PCR.....	22
4.7 ผลการวิเคราะห์ Melting curve ของ PCR products.....	23
4.8 กราฟมาตรฐาน.....	24



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
ApE	A plasmid editor
bp	base pair
cDNA	complementary DNA
C <sub>q</sub>	quantitation cycle
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate
ISR	induced systemic resistance
PCR	polymerase chain reaction
PGPR	plant growth promoting rhizobacteria
qNPR1-F	ไพรเมอร์สาย Forward ของยีน <i>NPR1</i>
qNPR1-R	ไพรเมอร์สาย Reverse ของยีน <i>NPR1</i>
qPOX-F	ไพรเมอร์สาย Forward ของยีน <i>POX</i>
qPOX-R	ไพรเมอร์สาย Reverse ของยีน <i>POX</i>
qRT-PCR	quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
qWRKY45-F	ไพรเมอร์สาย Forward ของยีน <i>WRKY45</i>
qWRKY45-R	ไพรเมอร์สาย Reverse ของยีน <i>WRKY45</i>
T <sub>m</sub>	Melting temperature
3'UTR	3' untranslated region
5'UTR	5' untranslated region

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ข้าว (*Oryzae sativa*) เป็นพืชที่พบมากในการทำเกษตรกรรมของประเทศไทย การปลูกข้าวเพื่อให้ได้ผลผลิตจำนวนมากจำเป็นต้องควบคุมทั้งปัจจัยทางกายภาพและชีวภาพ ปัจจัยทางกายภาพ ยกตัวอย่างเช่น ปริมาณน้ำ ปริมาณแสง อุณหภูมิ และอื่นๆ สำหรับปัจจัยทางชีวภาพจะเกี่ยวเนื่องกับข้าวบางสายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรค ซึ่งโรคในข้าวที่เกิดขึ้นมีสาเหตุส่วนใหญ่มาจากเชื้อจุลินทรีย์จำพวกแบคทีเรียและเชื้อรา เช่น โรคขอบใบแห้งที่เกิดจากเชื้อ *Xanthomonas oryzae* โรคไหม้ที่เกิดจากเชื้อ *Pyricularia oryzae* ดังนั้นการควบคุมปัจจัยทางชีวภาพจึงเป็นวิธีการลดปัญหาเรื่องผลผลิตที่ลดลงวิธีหนึ่ง

การเลือกใช้วิธีการควบคุมโรคในพืชมีผลต่อมนุษย์ ปัจจุบันการควบคุมโรคทางการเกษตรของประเทศไทยมีการใช้สารเคมีกันอย่างแพร่หลายเนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและควบคุมโรคได้อย่างรวดเร็ว แต่มีผลเสียต่อผู้บริโภคและก่อให้เกิดการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมอย่างมาก อีกทั้งการควบคุมสภาวะแวดล้อมทางกายภาพที่ไม่ก่อให้เกิดโรคแม้จะเป็นวิธีที่มีความปลอดภัยสูง แต่มีข้อจำกัดสูง ดังนั้นการควบคุมทางชีวภาพจึงถูกนำมาศึกษาเพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการลดโรคในพืช การควบคุมโรคในพืชโดยใช้ plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) หรือ แบคทีเรียส่งเสริมการเจริญที่อยู่บริเวณราก ซึ่งเป็นแบคทีเรียปรปักษ์หรือเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อโรคที่เจริญอยู่รอบๆ รากพืช เมื่อแบคทีเรียนี้เจริญและเพิ่มจำนวนขึ้นจะสามารถเพิ่มการป้องกันของพืชต่อเชื้อที่ก่อโรคในส่วนต่างๆ ของพืชด้วยวิธีการกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในพืชแบบ Induced systemic resistance (ISR) PGPR จะกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกัน เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณเพื่อตอบสนองต่อเชื้อก่อโรค ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ และยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนต้านทานโรค เป็นต้น

การตรวจสอบผลของกลไกการต้านทานของพืชสามารถทำได้หลายวิธีการหนึ่งเป็นการตอบสนองแบบ ISR ส่งผลให้พืชมีการเปลี่ยนแปลงทั้งภายนอกและภายใน เช่น ลักษณะของโรคที่เกิดขึ้นภายนอก ปริมาณเอนไซม์ที่พืชสร้างขึ้น และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกัน เป็นต้น การตรวจสอบการแสดงออกของยีนจำเป็นต้องใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะและมีประสิทธิภาพเพื่อให้ได้ผลการแสดงออกของยีนมีลักษณะที่ชัดเจน ไม่มีการแสดงออกของยีนอื่นที่ไม่ได้ศึกษา โครงการพิเศษนี้จึงศึกษาการออกแบบการตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้น และการทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์สำหรับยีน *NPR1 PAL POX* และ *WRKY45* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของพืชแบบ ISR เพื่อสนับสนุนและเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการเลือกใช้ไพรเมอร์ของงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบ ISR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อศึกษาการออกแบบไพรเมอร์ที่เหมาะสมกับยีนในข้าวขาวดอกมะลิ 105
- 2) เพื่อทดสอบความจำเพาะเจาะจงของการจับกันของไพรเมอร์ที่ออกแบบกับยีนในข้าวขาวดอกมะลิ 105
- 3) เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์สำหรับยีน *NPR1* *PAL* *POX* และ *WRKY45* ในข้าวขาวดอกมะลิ 105

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1) การออกแบบไพรเมอร์สำหรับยีน *NPR1* *PAL* *POX* และ *WRKY45* และตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้นโดยใช้ฐานข้อมูลจาก Rice Genome Browser และโปรแกรม OligoCalc ตามลำดับ
- 2) ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์กับ cDNA ของข้าวโดยการทำ Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) และ gel electrophoresis
- 3) คำนวณประสิทธิภาพของไพรเมอร์โดยการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จาก qRT-PCR และคำนวณค่าประสิทธิภาพของไพรเมอร์

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) สามารถออกแบบไพรเมอร์ที่มีลักษณะเหมาะสมและจำเพาะเจาะจงกับยีนเป้าหมาย
- 2) ไพรเมอร์ที่ออกแบบมีประสิทธิภาพและสามารถนำไปใช้งานได้จริง
- 3) งานวิจัยนี้สามารถเป็นส่วนสนับสนุนหรือทางเลือกสำหรับงานวิจัยอื่นๆ ของผู้ที่ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันแบบ ISR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 ยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในข้าว

#### 2.1.1 Phenylalanine ammonia lyase (PAL)

พืชมีการพัฒนาการป้องกันที่หลากหลายเพื่อรับมือกับสภาพแวดล้อมไม่พึงประสงค์และการโจมตีของเชื้อก่อโรค (Jones and Dangl, 2006) หนึ่งในนั้นมีการควบคุมระดับของสารทุติยภูมิ เช่น phenylpropanoids เพื่อตอบสนองต่อการขึ้นนำทางสิ่งแวดล้อม (Dixon and Paiva, 1995; Payyavula et al., 2012) โดยสารประกอบ phenylpropanoid มีบทบาทสำคัญในการป้องกันพืชต่อเชื้อก่อโรคโดยขึ้นกับความสัมพันธ์ระหว่างอัตราของการสะสม phenylpropanoid และการแสดงออกของการต้านทานในต้นพืช (Dixon and Paiva, 1995; La Camera et al., 2004) โดยเอนไซม์ PAL เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาขั้นแรกของ phenylpropanoid pathway และการสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่หลากหลายตามโครงสร้าง phenylpropane เช่น hydroxycinnamic acid, stilbenes และ flavonoids ซึ่งช่วยเติมเต็มบทบาทที่สำคัญในพืชชั้นสูง (MacDonald and D’Cunha, 2007) รวมถึงงานวิจัยของ Mishra et al. (2006) ที่ศึกษาการสะสมของสารประกอบ phenolic ซึ่งเป็นตัวเหนี่ยวนำการต้านทานในข้าว โดยวิเคราะห์สารจากต้นข้าวที่เลี้ยงร่วมกับ rhizobacteria และถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื่อ ผลการศึกษาพบว่า rhizobacteria เหนี่ยวนำให้ข้าวเกิดการสะสม cinnamic acid ที่สังเคราะห์ได้จาก phenylpropanoid pathway อย่างมาก ดังนั้นจึงส่งผลให้ยีน PAL ถูกกระตุ้นและแสดงออกมากขึ้น เนื่องจากเอนไซม์ PAL เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาดังกล่าว

#### 2.1.2 Peroxidase (POX)

เมื่อพืชอยู่ในสภาวะเครียด ระบบเมแทบอลิซึมในพืชจะเป็นสิ่งแรกที่มีการเปลี่ยนแปลงเพื่อตอบสนองต่อภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม การเปลี่ยนแปลงอาจเกิดขึ้นในระดับชีวเคมีหรือกระบวนการเมแทบอลิซึมหรือสร้างสารต้านอนุมูลอิสระในรูปเอนไซม์ เช่น POX สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้มีกลไกที่จำเพาะในการลดความเครียด เช่น superoxide dismutase, catalase, ascorbate peroxidase, glutathione reductase เป็นต้น (ธนากร, 2557)

มีการศึกษาจำนวนมากแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของ POX ในการป้องกันการติดเชื่อจากโรค โดยบทบาทของ POX ในการป้องกันมีดังนี้ 1. การเสริมความแข็งแรงของผนังเซลล์ประกอบด้วย lignin, suberin, feruloylated polysaccharides และ hydroxyproline-rich glycoproteins 2. กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของ reactive oxygen species เป็นตัวสื่อสัญญาณและตัวต่อต้านจุลชีพ 3. กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของ Phytoalexin (Hiraka et al., 2001)

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Rais et al. (2017) ที่ศึกษาศักยภาพของ *Bacillus spp.*

KFP-5 KFP-7 และ KFP-17 ในการกระตุ้นเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระต่อการต้านทานเชื้อ *Pyricularia oryzae* ในข้าว พบว่าข้าวที่ใส่เชื้อ *Bacillus spp.* KFP-5, KFP-7 และ KFP-17

ร่วมกับเชื้อ *Pyricularia oryzae* ชักนำให้เกิดกิจกรรมของ Peroxidase มากถึง 2.4 - 3.2, 2.1 - 2.9 และ 3.5 - 4.1 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับตัวควบคุม

### 2.1.3 WRKY45

WRKY เป็นยีนที่มีความสำคัญกับระบบการป้องกันต่อโรคในพืชชนิดหนึ่ง มีด้วยกันหลายประเภท ทำหน้าที่หลักในการเป็นตัวส่งสัญญาณระหว่างเชื้อโรกับโฮสต์เมื่อตรวจพบการบุกรุกจากความเครียดจากสิ่งมีชีวิตหรือไม่มีชีวิต WRKY มีทั้งการแสดงออกทั้งทางบวกและทางลบ บางตัวแสดงออกทั้งทั้งบวกและลบในตัวเดียวกันแล้วแต่ชนิด (Tao et al., 2009) โดย WRKY45 หรือหนึ่งในยีนกลุ่มนี้ทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณในการกระตุ้นการป้องกันและเพิ่มความแข็งแรงของผนังเซลล์เพื่อต้านทานต่อเชื้อก่อโรคในข้าว (Shimono et al., 2011) นอกจากนี้งานวิจัยของ Tao. et al. (2009) ศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับยีน WRKY45 ในข้าว พบว่าคู่อัลลีลของยีนนี้ ซึ่งคือ WRKY45-1 และ WRKY45-2 มีบทบาทในการปฏิสัมพันธ์ของข้าวและเชื้อก่อโรค โดยแต่ละอัลลีลมีความสามารถในการป้องกันต่อเชื้อก่อโรค *Xanthomonas oryzae* ที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามทั้งคู่มีการควบคุมการต้านทานในเชิงบวก สำหรับเชื้อ *Magnaporthe grisea* ซึ่งการทำงานของอัลลีลเหล่านี้จะขึ้นอยู่กับการกระตุ้นกลไกการส่งสัญญาณการป้องกันที่ต่างกัน ระหว่าง salicylic acid หรือ jasmonic acid signaling pathway

### 2.1.4 NPR1

ยีน *NPR1* ถูกพบครั้งแรกใน *Arabidopsis* ที่กลายพันธุ์จากการบุกรุกของเชื้อโรคโดยการป้องกันในพืชคือการกระตุ้นการทำงานของ salicylic acid (SA) ผ่านตัวส่งสัญญาณ (*NPR1*) เพื่อกระตุ้นระบบการต้านทานต่อเชื้อโรค systemic acquired resistance (SAR) โดยในข้าวมีการทดลองโดยใช้เชื้อ *Xanthomonas oryzae pathovar oryza* พบว่า *NPR1* ทำหน้าที่กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันทำให้การบุกรุกลดลง (Withers and Dong, 2016) ในการป้องกันแบบ ISR ซึ่ง *NPR1* จะไปกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันในข้าวโดยทำหน้าที่ในการส่งสัญญาณให้ jasmonic (JA) และ ethylene (ET) ออกมาป้องกัน และกระตุ้นการป้องกันโรคจากแหล่งและ necrotrophic pathogens (Yuan et al., 2007)

## 2.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

เทคนิค PCR เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากดีเอ็นเอต้นแบบที่ใช้ระยะเวลาไม่นานโดยเป็นการทำในหลอดทดลอง และได้ดีเอ็นเอสายใหม่เป็นจำนวนมาก จะต้องอาศัยองค์ประกอบต่างๆ คือ template DNA, thermostable DNA polymerase, deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs), oligonucleotide primers, buffer (ชินขจรู และคณะ, 2557)

เทคนิคพีซีอาร์ได้รับการพัฒนาต่อมาในหลายด้าน จนเป็นที่ยอมรับว่าเป็นเทคโนโลยีที่มีความสำคัญต่องานทางด้านอณูชีวโมเลกุล สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ทั้งทางด้านชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) การสร้างดีเอ็นเอติดตาม (DNA Probe) เป็นต้น (รัฐธำนิ และคณะ, 2554) ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

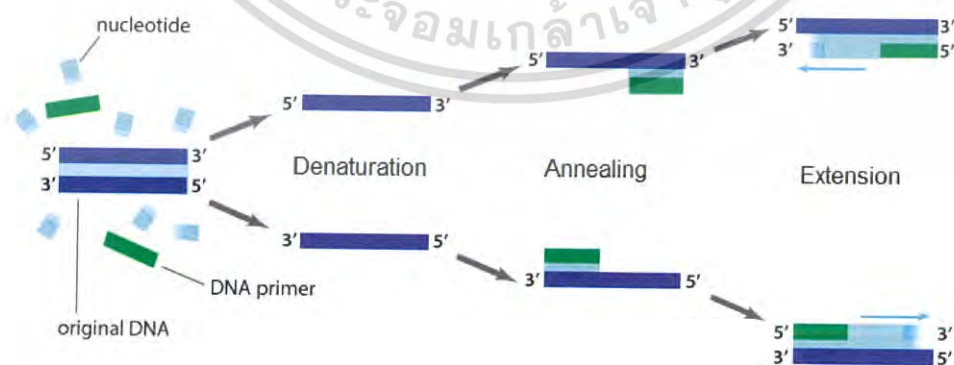
## 2.2.1 ปฏิกริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก คือ (ฐิรฎฎฎฎฎฎ และคณษะ, 2554)

1. Denaturation เป็นการแยกสายดีเอ็นเอออกเป็นสายเดี่ยว ใช้อุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียส
2. Annealing ลดอุณหภูมิลง และทำให้ลำดับเบสที่เป็นดีเอ็นเอคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบจับคู่กัน ใช้อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส
3. Primer extension เป็นขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ เรียงจาก 5' ไป 3' อุณหภูมิ 72-75 องศาเซลเซียส

สารเคมีที่เกี่ยวข้องในปฏิกริยาพีซีอาร์ (ฐิรฎฎฎฎฎฎ และคณษะ, 2554)

ในการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่จำเป็นต้องเติมสารเคมีเพื่อเป็นสารตั้งต้นในการทำปฏิกริยา สารเคมีที่ต้องใช้ ดังนี้

1. Deoxynucleotide (dNTPs) คือ นิวคลีโอไทด์ ที่เป็นหน่วยย่อยสำหรับนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ที่จะสร้าง
2. DNA polymerase คือ เอนไซม์ที่ใช้สำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอให้ช่วยเร่งปฏิกริยาเชื่อมต่อ นิวคลีโอไทด์ใหม่เข้ากับไพรเมอร์
3. Primer คือ ดีเอ็นเอเริ่มต้นสายสั้นๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ PCR
4. PCR buffer คือ สารละลายที่ควบคุมสภาวะในการทำปฏิกริยาให้เหมาะสม เช่น ค่า pH และเกลือ แล้วยังต้องมีอนุมูลแมกนีเซียม  $Mg^{2+}$  อยู่ด้วย
5. Template คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ หรือยีนส่วนที่ต้องการเพิ่มปริมาณ
6. Double-distilled water คือ สารเคมีที่เป็นส่วนผสมของปฏิกริยา PCR จะผสมกันไว้ในหลอดทดลองเล็กปริมาณสาร 20-100 ไมโครลิตร



รูปที่ 2.1 การเกิดปฏิกริยาพีซีอาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ที่มา : BJS BIOTECHNOLOGIES LTD. (2017)  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.2.2 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR machine) (ฐิรฎฎกนค้ด และคณะ, 2554)

เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ หรือ PCR machine เป็นเครื่องที่จำเป็นในการทำ PCR สามารถปรับเปลี่ยนอุณหภูมิได้เป็นขั้นตอนตามที่ตั้งไว้ และทำงานหมุนเวียนกันหลายๆ รอบได้ ตั้งโปรแกรมการทำงานได้ และการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในแต่ละขั้นตอนใช้ระยะเวลาไม่นานนัก ระยะเวลาที่ใช้แต่ละขั้น คือ denaturing, annealing และ extension อยู่ในช่วง 15 วินาที ถึง 10 นาที ดังนั้นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR 25-40 รอบ จะใช้เวลาประมาณ 1.5-5 ชั่วโมง

### 2.2.3 การวิเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ (ฐิรฎฎกนค้ด และคณะ, 2554)

ผลของดีเอ็นเอที่เกิดจากการทำปฏิกิริยา PCR จะไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า จำเป็นต้องใช้เทคนิคที่เรียกว่า agarose gel electrophoresis ที่ทำบนแผ่นเจล (agarose gel) เป็นการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นเจล โดยระยะทางที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ไปขึ้นอยู่กับขนาด รูปร่าง เฟอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของเจล บัฟเฟอร์ และกระแสไฟฟ้าที่ใช้แยก ดีเอ็นเอที่แยกโดยวิธีนี้สามารถมองเห็นได้เมื่อย้อมสีพิเศษ ที่จะเรืองแสงเมื่อเจอกับแสงอัลตราไวโอเล็ต ซึ่งจะเห็นเป็นแถบดีเอ็นเอเรืองแสงบนแผ่นเจล

### 2.2.4 ข้อควรระวังในการทำพีซีอาร์ (ธนพร และคณะ, 2554)

การปนเปื้อน (contamination) เทคนิคพีซีอาร์นี้เป็นเทคนิคที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เพิ่มมากขึ้นหลายเท่าตัว แต่ก็ยังสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนเพียงเล็กน้อยได้เช่นกัน ทำให้ได้ค่าที่ผิดพลาด การปนเปื้อนนี้เกิดได้จากปัจจัยหลายอย่าง เช่น ขณะที่เปิด-ปิดฝาหลอดขณะเตรียมการทดลอง การปนเปื้อนของผลผลิตพีซีอาร์ครั้งก่อน (carry over contamination) การปนเปื้อนจากอุปกรณ์ในการทดลองและในห้องทดลอง รวมถึงผิวหนัง เส้นผม และมือของผู้ทำการทดลองด้วย ควรมีการป้องกันการปนเปื้อนทุกสาเหตุ และระวังการปนเปื้อนชนิด carry over contamination เป็นอย่างมาก วิธีการป้องกันการปนเปื้อน เช่น

1. แบ่งพื้นที่ในส่วนการทดลองอย่างเป็นสัดส่วนทั้งก่อนและหลังการทำพีซีอาร์
2. แบ่งสารเคมีหรือน้ำยาลงในหลอดเล็กๆ (aliquot) เพื่อลดโอกาสการปนเปื้อนในการนำมาใช้
3. ใช้อุปกรณ์ที่มีความเหมาะสมกับงานด้านพีซีอาร์ เพราะจะส่วนประกอบที่ลดโอกาสการปนเปื้อน
4. มีตัวควบคุมเหมาะสมในการทำพีซีอาร์ โดยตัวควบคุมมีทั้งหมด 3 แบบ คือ แบบแรก ตัวควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอ (no template) เพื่อเป็นการควบคุมการปนเปื้อนจากสารที่ใช้ (negative control) แบบที่สองเป็นตัวควบคุมที่มีดีเอ็นเอชนิดที่ไม่มีลำดับเบสเป้าหมายอยู่ (negative control) และแบบที่สามที่เป็นตัวควบคุมที่มีดีเอ็นเอต้นแบบที่ถูกต้อง (positive control)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่วางไว้สำหรับครูโรงเรียนเพื่อตรวจสอบและปรับปรุงเนื้อหาให้ตรงกับหลักสูตรการศึกษา  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น รมิตระวังมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. ลดขั้นตอนการย้ายถ่ายสารละลายด้วยการทำ master mix เมื่อต้องทำหลายๆ ตัวอย่าง

### 2.2.5 ข้อจำกัดทางด้านเทคนิคพีซีอาร์ (ธนพร และคณะ, 2554)

พีซีอาร์เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูง แต่ยังมีข้อจำกัดบางอย่างเช่น

1. ข้อผิดพลาดในการทำงานของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase นำเบสที่ไม่ใช่คู่สมมาต่อกับดีเอ็นเอที่กำลังสร้างขึ้น
2. ความยาวของขนาดพีซีอาร์จะได้ผลดีที่สุดเมื่อขนาดของพีซีอาร์ไม่เกิน 2 kb เพราะถ้าหากยาวกว่านี้ จะมีความผิดพลาดจากไพรเมอร์และ *Taq* DNA polymerase จะทำงานไม่สมบูรณ์ โดยจะมีการจับ dNTPs ที่ไม่ถูกต้องมาจับเข้าสายดีเอ็นเอมากขึ้น

### 2.3 Real-Time Polymerase Chain Reaction หรือ Quantitative PCR (qPCR)

qPCR เป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำและความไวต่อการตรวจวัดสูง ถูกพัฒนามาจากการทำพีซีอาร์แบบธรรมดา โดยการใช้สารเรืองแสงประเภท fluorochrome ร่วมกับเครื่อง real time thermal cycler ที่มีแหล่งกำเนิดแสงที่ทำให้เกิดการเรืองแสงของ PCR Product ทำให้ตรวจสอบผลได้ในทันที (ปิยวดี และคณะ, 2556)

Real-time PCR เป็นการทำให้เราสามารถติดตามผลในขณะที่กำลังเกิดขึ้นจริงๆได้ ทำให้เกิดความแม่นยำ และนำไปวัดปริมาณได้ โดยมีสมการ ดังนี้ (อโณทัย, 2549)

$$X_n = X_0(1 + E)^n$$

โดย  $X_n$  คือ ปริมาณ PCR product ที่ cycle ที่ n

$X_0$  คือ ปริมาณเริ่มต้นของ template

E คือ Amplification efficiency

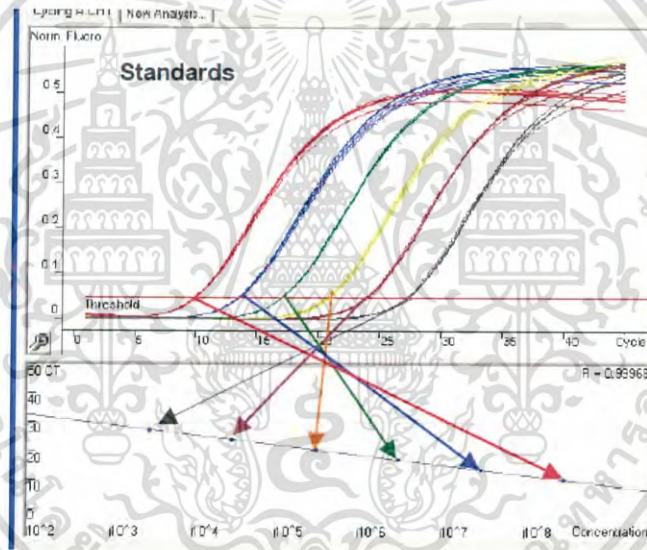
n คือ cycle number

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.3.1 ลักษณะการใช้งาน Real-time PCR (อโณทัย, 2549)

แบ่งออกได้เป็น 2 ลักษณะใหญ่ๆคือ

การใช้งานในเชิงวิเคราะห์ปริมาณ (Quantification analysis) มีพื้นฐานที่การวัด fluorescence ของตัวเปล่งแสง (fluorophore) ในปฏิกิริยาในเชิงปริมาณ เราจะสามารถมองเห็นการเพิ่มของ product ได้ในขณะที่มีการเพิ่มจำนวนในทุกรอบระหว่าง PCR (รูป S shape ของสัญญาณจะค่อยๆปรากฏเพิ่มขึ้นตามจำนวนรอบที่ทำ) และการวิเคราะห์การวัด fluorescence ในแต่ละรอบในช่วงเวลาหนึ่งๆทำโดยใช้คอมพิวเตอร์ทั้งหมด สัญญาณในช่วง exponential phase จะสัมพันธ์กับปริมาณตั้งต้นของ target template ดังตัวอย่างของ standard 5 ความเข้มข้นในรูปที่ 2.2 ซึ่งเมื่อนำมา plot กราฟ จะได้เป็นเส้นตรงที่ทำให้เราสามารถเทียบค่าหาความเข้มข้นของ unknown ซึ่ง amplify โดยใช้สภาวะเดียวกันได้ (อโณทัย, 2549)

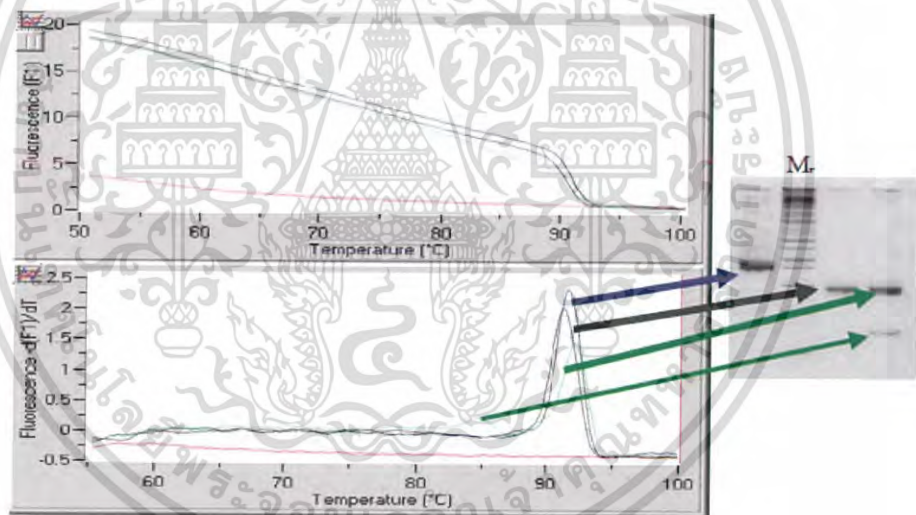


รูปที่ 2.2 แสดงการวัดปริมาณ fluorescence จาก standard ใน real time PCR และกราฟเส้นตรงที่ได้ ซึ่งแสดงจำนวนรอบและความเข้มข้นของ standard ณ ตำแหน่งใน exponential phase ของปฏิกิริยา

ที่มา : อโณทัย (2549)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ Melting curve analysis เป็นการใช้เพื่อวิเคราะห์ PCR product ที่เกิดขึ้น โดยมักจะทำทันทีหลังจากจบการ PCR โดย set ให้มีการเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเรื่อยๆ จนถึง 95°C และวัดสัญญาณ fluorescence ตลอดเวลา จะพบว่าสัญญาณจะค่อยๆ ลดลงดังแสดงใน กรอบบนของรูปที่ 2.3 เนื่องจาก PCR product ที่เป็นสายคู่แยกตัวออกจากกัน ซึ่ง DNA จาก product แต่ละชนิด จะมี melting temperature เฉพาะตัว คือจุดที่คู่ base pair ของ nucleotide จะแยกออกจากกันประมาณครึ่งหนึ่งของขนาดทั้งหมด ทำให้เกิดการลดลงของ สัญญาณอย่างฉับพลัน ณ จุดนั้น โดยอุณหภูมินี้จะขึ้นกับความยาวและปริมาณ G และ C ที่มีใน DNA แต่ละชนิด ดังนั้นจึงสามารถใช้เพื่อแยก PCR product ออกจาก product ที่ปนเปื้อนได้ ดังตัวอย่างที่แสดงในรูปที่ 2.3 เมื่อ software นำสัญญาณ fluorescence ที่วัดได้ที่แต่ละ อุณหภูมิมาเปลี่ยนให้เป็นกราฟระหว่าง  $dF/dT$  กับอุณหภูมิดังในกรอบล่างของรูป 2.3 จะได้เป็น รูป peak สำหรับ product แต่ละตัว PCR product ที่ถูกต้องมักจะแสดง peak เดียวที่อุณหภูมิ สูง (โดยทั่วไปจะสูงกว่า 80°C) ในขณะที่ non-specific product หรือ primer-dimer จะให้ peak ที่มีขนาดกว้างที่อุณหภูมิต่ำกว่า ดังนั้น melting curve analysis ของ PCR product จึง มักใช้เพื่อยืนยันว่าเป็น product ที่ต้องการ ทำให้ไม่ต้องมีการ run gel electrophoresis หลังจากการ PCR (อโณทัย, 2549)



รูปที่ 2.3 แสดงการวัด fluorescence จาก PCR product เมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเรื่อยๆ ในกรอบบน และเมื่อเปลี่ยน scale ให้เป็น  $dF/dT$  จะได้กราฟดังรูปในกรอบล่าง ซึ่งแสดงอุณหภูมิ ที่เป็น melting temperature ของ PCR product แต่ละตัว โดยเทียบกับขนาดเมื่อ run gel electrophoresis ตามที่ลูกศรชี้

ที่มา : อโณทัย (2549)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.4 ความแตกต่างระหว่าง PCR และ Real-time PCR (อโณทัย, 2549)

### ข้อดีของ Real-time PCR

1. สามารถติดตามผลได้ในขณะทำปฏิกิริยา
2. ไม่ต้อง run gel electrophoresis ลดโอกาสการเกิดการปนเปื้อน
3. การทำงานมักเร็วกว่าแบบธรรมดา
4. วัดได้มากขึ้นจนถึง  $10^{10}$  เท่า
5. สามารถวัดความแตกต่างได้ถึงชั้นที่ต่างกันเพียง 1 เท่า
6. สามารถตรวจยืนยัน product ที่ได้โดยการวิเคราะห์ melting point

### ข้อด้อยของ Real-time PCR

1. การเริ่มต้นต้องการความชำนาญและการสนับสนุนดูแล (มากกว่าวิธีธรรมดาเล็กน้อย)
2. เครื่องมีราคาสูง
3. มี intra- และ inter- variation สูงเพราะวัดได้ละเอียด

## 2.5 การคำนวณประสิทธิภาพของไพรเมอร์ (Lee et al., 2006)

ข้อมูลที่ได้จากการทำ qPCR มาสร้าง Standard curve จากค่าความเข้มข้น cDNA ของตัวอย่าง ในรูป Logarithmic กับค่า quantitation cycle (Cq) แล้วนำค่าความชันไปคำนวณค่าประสิทธิภาพของไพรเมอร์ จากสูตร

$$\text{ประสิทธิภาพของไพรเมอร์} = -1 + 10^{(-1/\text{slope})}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พริยะ และณัญญา (2559) ได้ศึกษาการผลิตพลังงานชีวภาพยุคใหม่โดยใช้กระบวนการ Consolidated bioprocessing (CBP) แบบ one-step เพื่อลดต้นทุนการผลิตโดยการปรับปรุงพันธุ์ ยีสต์ชนิดเดียวให้มีคุณสมบัติทั้งการย่อยสับสเตรทที่มีองค์ประกอบเป็นแป้งหรือเซลลูโลสให้เป็น น้ำตาลและการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลให้รวมอยู่ด้วยกันโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ทางพันธุวิศวกรรม จึงจะต้องออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะยีนแอลฟาอะไมเลสจากเชื้อรา *Aspergillus fumigates* สายพันธุ์ M06 โดยออกแบบเป็นสองกลุ่ม คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์หมายเลข Gi70989216 และ Gi70996257 พบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถนำไปสังเคราะห์ cDNA ได้ โดยให้ผลผลิตมีขนาด 758 คู่เบส และ 1,585 คู่เบส ตามลำดับ

รัตนา และคณะ (2558) ได้ศึกษาความสามารถของไพรเมอร์ W-11 จากมะละกอสายพันธุ์ Tai-Nung no. 2 ที่ใช้ในการระบุเพศของมะละกอพันธุ์ฮอลแลนด์โดยเทคนิค PCR เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการนำมาแยกเพศในมะละกอ โดยตรวจสอบปริมาณและประสิทธิภาพของดีเอ็นเอของ มะละกอพันธุ์ฮอลแลนด์ที่ทราบเพศและไม่ทราบเพศ โดยนำไปวัดความเข้มของแสง (spectrophotometer) และ แยกทางไฟฟ้าด้วยเจล (gel electrophoresis) ทดสอบประสิทธิภาพ ไพรเมอร์ W-11 ที่ได้มาจากมะละกอสายพันธุ์ Tai-Nung no. 2 ในปฏิกิริยา PCR และ อิเล็กโตร โพรซิซิสในอะกาโรสเจล (agarose gel electrophoresis) พบว่าไพรเมอร์ W-11 สามารถใช้เป็น เครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อจำแนกเพศเมียออกจากมะละกอพันธุ์ฮอลแลนด์เพศผู้และกะเทยได้ เนื่องจาก ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 831 bp ในมะละกอที่เป็นเพศผู้และเป็นกะเทยเท่านั้น แต่ไม่ปรากฏใน เพศเมีย แต่ยังไม่สามารถแยกเพศผู้ออกจากกะเทยได้ต้องทำการทดสอบกับไพรเมอร์อื่นต่อไป

มีณญา (2555) ได้ศึกษาการพิสูจน์ดีเอ็นเอของไก่ โดยการนำตัวอย่างเลือดสดของไก่พันธุ์เนื้อ ที่เลี้ยงไว้เพื่อจำหน่าย จำนวน 45 ตัวอย่าง ตัวอย่างเลือดสดของมนุษย์ ปลา และเป็ด จำนวนชนิดละ 25 ตัวอย่าง และตัวอย่างเส้นขนของหมู และวัว จำนวนชนิดละ 25 ตัวอย่าง มาสกัดดีเอ็นเอ ด้วยวิธี Chelex และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR รวมถึงทำการตรวจสอบผลด้วยการแยก แถบดีเอ็นเอโดยผ่าน กระแสไฟฟ้าบนเจลอะกาโรส (agarose gel electrophoresis) โดยการใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงต่อยีนไซโตโครม บี ด้วยการออกแบบและเลือกใช้ ไพรเมอร์สาย forward (5'-GCCCCATCCAACATCTCTGC-3') และไพรเมอร์สาย reverse (5'-GGAGATTCCGGATGAGTCAG-3') พบว่า PCR products จากตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเลือด สดของไก่จำนวน 45 ตัวอย่าง ปรากฏแถบดีเอ็นเอชัดเจนและถูกต้องตรงตามขนาดที่ 181 bp แต่ผล ของตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดสด หรือเส้นขนของสัตว์อื่นๆ ไม่มีการปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด ดังกล่าวเลย จึงสรุปได้ว่าวิธีการและไพรเมอร์ที่ใช้สามารถนำไปพิสูจน์ดีเอ็นเอของไก่ ได้อย่างมี ประสิทธิภาพ

รวีวรรณ (2555) ได้ศึกษาอินทรีย์ผลต่อความหวานของอ้อย เพื่อรักษาคุณภาพความหวานไว้ ให้นานที่สุด โดยทำการศึกษาในอ้อยป่า เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่ออกดอกทุกปี เก็บตัวอย่างจากยอด อ้อย 4 ระยะ คือ ระยะหน่ออายุ 2 สัปดาห์ ต้นอ่อนอายุ 5 สัปดาห์ ระยะก่อนออกดอก 2 เดือน และ ระยะออกดอก นำมาสกัดอาร์เอ็นเอรวม แล้วสังเคราะห์เป็น cDNA ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้

ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะกับยีน *LFY* ได้แถบของ cDNA ที่มีหลายขนาดจึงเลือกแถบดีเอ็นเอ ขนาด 337 คู่เบส ที่ได้จากอาร์เอ็นเอในระยะต้นอ่อน และในระยะออกดอกที่มีขนาด 222 คู่เบส และ 577 คู่เบส นำไปวิเคราะห์ลำดับเบสและตรวจสอบกับยีน *LFY* ในพีชชนิดอื่นที่มีในฐานข้อมูล ปรากฏว่าลำดับเบสนี้ไม่ตรงกับยีน *LFY* แต่พบว่าเหมือนกับ Trehalose-6-Phosphate Synthase (TPS) โดยมีค่าความเหมือน 93 เปอร์เซ็นต์ จึงคาดว่า cDNA ที่โคลนได้เป็นส่วนหนึ่งของยีน TPS

Bustin and Hugett (2017) ศึกษาการออกแบบไพรเมอร์ที่ดีในการทำ PCR เนื่องจากคุณสมบัติของไพรเมอร์จะสามารถควบคุมความจำเพาะและความไวในการจับยีนเป้าหมายได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยงานวิจัยนี้กล่าวถึงความสำคัญและข้อควรพิจารณาในการออกแบบไพรเมอร์และการทำ qPCR เริ่มตั้งแต่คุณสมบัติของไพรเมอร์ ช่วงอุณหภูมิที่ใช้ในการทำงาน รวมถึงการคำนึงถึงค่าต่างๆ ที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการทำ qPCR ซึ่งปริมาณ DNA ที่ถูกเพิ่มขึ้นในการทำ PCR ถือเป็นความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างปริมาณ DNA ต้นแบบเริ่มต้นในรูป logarithm และ ค่า  $C_q$  ที่ได้ระหว่างการเพิ่มปริมาณ ดังนั้นความสัมพันธ์นี้จึงถูกใช้คำนวณค่าประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณ โดยจุดเด่นในการทดสอบ qPCR ที่ดี ต้องมีค่าประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณที่สูงถึง 95-105 เปอร์เซ็นต์ ค่า  $R^2$  ของกราฟเส้นตรงที่มากกว่า 0.980 ความแม่นยำที่สูงระหว่างการทดลอง ความสอดคล้องในการทำซ้ำ การไม่มี dimers ของไพรเมอร์ และมีช่วง dynamic ที่กว้าง

Chandler *et al.* (2015) ศึกษาศักยภาพของ *Bacillus subtilis* BBG111 ในการกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบ ISR ในข้าว เพื่อต้านทานต่อเชื้อก่อโรค โดยในงานวิจัยนี้เริ่มจากการทดลองเลี้ยงข้าวร่วมกับ *B. subtilis* BBG111 ซึ่งเป็นแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญที่อยู่บริเวณราก และเหนี่ยวนำการติดเชื้อมีเชื้อราก่อโรค เมื่อตรวจสอบลักษณะภายนอกของข้าว พบว่าเมื่อเลี้ยงข้าวร่วมกับ *B. subtilis* BBG111 ต้นข้าวมีเปอร์เซ็นต์การลดลงของรอยแผลที่เกิดจากเชื้อก่อโรคอย่างมาก หลังจากนั้นเขาทดสอบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบ ISR โดยการสกัด RNA ของสารแขวนลอยข้าวที่เลี้ยงร่วมกับสารเมทาบอลิต์ของ *B. subtilis* BBG111 และเติมเชื้อก่อโรค จากนั้นทดสอบด้วยวิธี qRT-PCR พบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับฮอร์โมน jasmonic acid และ ethylene เช่น *JiOsPR10* และ *ACS1* รวมถึงยีน *NPR1* ที่เป็นยีนส่งสัญญาณให้เกิดการต้านทานในข้าวเมื่อมีเชื้อก่อโรคบุกรุก มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น ดังนั้น *B. subtilis* BBG111 จึงมีความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในข้าวให้เกิดการป้องกันต่อเชื้อก่อโรค

Chuang *et al.* (2013) ศึกษาการออกแบบไพรเมอร์เพื่อให้มีความจำเพาะเจาะจงสำหรับการทำ PCR เนื่องจากการออกแบบไพรเมอร์มีผลกระทบต่อความสำเร็จในการทำ PCR ในส่วนของความจำเพาะต่อ DNA เป้าหมายและปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้ อีกทั้งคุณสมบัติของไพรเมอร์ยังสามารถประเมินผลลัพธ์เบื้องต้นในการทำ PCR ได้ โดยการออกแบบไพรเมอร์จะต้องคำนึงถึงค่าต่างๆ เช่น ความยาวของไพรเมอร์ควรมีความยาว 16-18 นิวคลีโอไทด์ และความยาวของไพรเมอร์สาย forward และ reverse ต่างกันไม่เกิน 3 นิวคลีโอไทด์ ค่า G+C content ควรอยู่ในช่วง 40-60 เปอร์เซ็นต์ รวมถึงในส่วนปลาย 3' ของไพรเมอร์ควรออกแบบให้มีเบส G หรือ C เนื่องจากมีความเสถียรต่ออุณหภูมิมากกว่าเบส A หรือ T ซึ่งค่า G+C content ที่อยู่ในสายจะส่งผลถึงค่า  $T_m$  อีกด้วย และควรเลือกให้ค่า  $T_m$  อยู่ระหว่างช่วง 50-62 องศาเซลเซียส ทั้งนี้รวมถึงการไม่มีการโครงสร้างทุติยภูมิ หรือการจับกันเองภายในสายและระหว่างสายของไพรเมอร์ forward และ reverse

ไม่ที่ออกแบบทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 การออกแบบไพรเมอร์ qNPR1, qPAL, qPOX และ qWRKY45 และตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้น

หาข้อมูลลำดับเบสของยีน *NPR1*, *PAL*, *POX* และ *WRKY45* จากฐานข้อมูล Rice Genome Browser แล้วออกแบบไพรเมอร์จากข้อมูลใน Gene Structure ของยีนนั้นๆ จากนั้นใช้โปรแกรม A plasmid editor (ApE) ในการกลับลำดับเบสของไพรเมอร์สาย Reverse และนำไพรเมอร์ไปตรวจสอบคุณสมบัติต่างๆ ด้วยโปรแกรม Oligocalc

#### 3.2 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ qNPR1, qPAL, qPOX และ qWRKY45 ด้วยวิธี PCR และ Gel electrophoresis

นำสารละลาย cDNA ความเข้มข้น 0.5 เท่าของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ปริมาตร 1  $\mu$ l และไพรเมอร์สาย Forward และ Reverse ความเข้มข้น 5  $\mu$ M ปริมาตรอย่างละ 0.5  $\mu$ l ใส่ลงในหลอดขนาด 0.2 ml และเติม Master mix ปริมาตร 8  $\mu$ l ( $H_2O$  5.75  $\mu$ l, 10XBuffer 1  $\mu$ l, 2mMdNTP 1  $\mu$ l, 25mMMgCl<sub>2</sub> 0.2  $\mu$ l และ *Taq* DNA polymerase 0.05  $\mu$ l) ผสมให้เข้ากันโดยนำไปปั่นเหวี่ยงตามลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้แสดง ดังตารางที่ 3.1 จากนั้นนำไปทำ PCR โดยรอบแรกที่ 95 °C เป็นเวลา 3 นาที และ 40 รอบที่ 95 °C เป็นเวลา 30 วินาที 55 °C เป็นเวลา 30 วินาที 72 °C เป็นเวลา 30 วินาที อีก 1 รอบที่ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปตรวจสอบด้วยวิธี Gel electrophoresis บน Agarose gel ความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนักตัวปริมาตร โดยเปรียบเทียบขนาดของ DNA ที่ได้กับ DNA ladder

#### ตารางที่ 3.1 ลำดับเบสของไพรเมอร์สาย Forward และ Reverse ที่ใช้ในการทดลอง

ลำดับของไพรเมอร์	Forward (-F)	Reverse (-R)
qNPR1	5'-ACGGCACTCTCCAAAACAGTG-3'	5'-GTGTCTCTTCCGAGGGAAAC-3'
qPAL	5'-CCAAGTTGAGCTGCTCAGGC-3'	5'-GCAGCGAGTTGCCATCGGAG-3'
qPOX	5'-CAGGGACAGCGTCGCCATCC-3'	5'-GTTTGTCCGCTGAGGCTCG-3'
qWRKY45	5'-AACTCCAAGCACCCAAAGGC-3'	5'-TAGGTGACCCTGTAGCTCGC-3'

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.3 การตรวจสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ด้วยวิธี qRT-PCR

นำสารละลาย cDNA ของข้าวขาวดอกมะลิที่มีความเข้มข้น 1X, 0.1X, 0.01X และ 0.001X ปริมาตร 2  $\mu\text{l}$  ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 ml และเติม Master mix ปริมาตร 18  $\mu\text{l}$  ที่ประกอบด้วย  $\text{H}_2\text{O}$  7  $\mu\text{l}$ , 2XBuffer 10  $\mu\text{l}$  และไพรเมอร์สาย Forward และ Reverse ที่ความเข้มข้น 10  $\mu\text{M}$  ปริมาตรอย่างละ 0.5  $\mu\text{l}$  แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ทดลองทำสองซ้ำต่อความเข้มข้นของ cDNA แต่ละระดับ ตามลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้แสดง ดังตารางที่ 3.1 จากนั้นนำไปตรวจสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ด้วยวิธี qRT-PCR โดยรอบแรกที่ 95 °C เป็นเวลา 2 นาที และ 40 รอบที่ 95 °C เป็นเวลา 5 วินาที 60 °C เป็นเวลา 15 วินาที อีก 1 รอบที่ 95 °C เป็นเวลา 10 วินาที จากนั้นลดอุณหภูมิให้เป็น 65 °C ทิ้งไว้ 5 วินาที และค่อยๆ เพิ่มอุณหภูมิทีละ 5 °C จนถึง 95 °C

หลังจากนั้นนำข้อมูลที่ได้จากการทำ qRT-PCR มาสร้างกราฟมาตรฐาน จากค่าความเข้มข้น cDNA ของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในรูป Logarithm กับค่า quantitation cycle (Cq) แล้วนำค่าความชันของกราฟ (Slope) ไปคำนวณค่าประสิทธิภาพของไพรเมอร์ จากสูตร

$$\text{ประสิทธิภาพของไพรเมอร์} = -1 + 10^{(-1/\text{slope})}$$



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

#### 4.1 การออกแบบไพรเมอร์ qNPR1, qPAL, qPOX และ qWRKY45 และตรวจสอบคุณสมบัติเบื้องต้น

การออกแบบไพรเมอร์ให้มีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการทำ PCR เริ่มจากการใช้ข้อมูลลำดับเบสของข้าวจากฐานข้อมูล Rice Genome Browser โดยการออกแบบสาย Forward และ Reverse จะเลือกลำดับเบสเฉพาะในส่วนของ Exon ที่ล้อม Intron ซึ่งปลาย Exon ที่เลือกไม่มีเบสเป็นตัวเดียวกับ Intron ที่ล้อม และเบสสามตัวสุดท้ายต้องเป็น G หรือ C ให้มีความยาว 20-24 bp ส่วนสาย Reverse เลือกลำดับเบสส่วนที่เป็น Exon และเบสสามตัวแรกต้องเป็น G หรือ C ให้มีความยาว 20-24 bp ในส่วนของสาย Reverse ที่ออกแบบจะถูกกลับสายให้เป็น Reverse complement โดยใช้โปรแกรม A plasmid editor (ApE) และนำทั้งสาย Forward และ Reverse ไปตรวจสอบค่า  $T_m$ , G+C content และการจับกันภายในสายด้วยโปรแกรม OligoCalc

การออกแบบไพรเมอร์ของยีน *NPR1* ใช้ข้อมูลลำดับเบสยีน Os01t0194300-01 มีจำนวนลำดับเบสทั้งหมด 4,605 bp ได้ถูกนำมาออกแบบความยาวของ PCR products จำนวน 113 bp โดย qNPR1-F (5'-ACGGCACTCTCCAAAACAGTG-3') มีลำดับเบสอยู่ตำแหน่งที่ 3,509-3,518 และ 4,091-4,092 ซึ่งมีจำนวน 21 bp และ qNPR1-R (5'-GTGTCTCTCCGAGGAAAC-3') มีลำดับเบสอยู่ตำแหน่งที่ 4,165-4,184 ซึ่งมีจำนวน 20 bp (รูปที่ 4.1) เมื่อนำ qNPR1-F กับ qNPR1-R ไปตรวจค่า G+C content พบว่ามีค่า 52% และ 55% ตามลำดับ และมีค่า  $T_m$  เท่ากับ 61.2 °C และ 60.5 °C ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

```

1 GAGGCCTCCT CCTCGCCTCG CCTCGCCACG CCGCGCCGCG ACGCAGCCGG CCGTGGTCAG CTGGTCGCCG GTGCGGGTGC
81 GGGTGCAGAA TGGAGCCGCC GACCAGCCAC GTCACCAACG CGTTCTCCGA CTCGGACAGC GCGTCCGTGG AGGAGGGGGG
161 CGCCGACCGG GACGCCGACG TGGAGCCGCT CCGCCGCCCT TCCGACAACC TCGCCCGGCC GTTCCGCTCG CCCGAGGACT
241 TCGCGTTCCT CGCCGACGCG CGCATCGCCG TCCCGGGCGG CCGCGGCGGC GCGCGGCGCC TGCTGGTGA CCGCTGCCTG
321 CTCTCCGCGC GGAGCCCTTT CCTGCGCGGC GTCTTCGCGC GCCGCGCCGC CGCCGCCGCA GCGCGCGCGG CCGAGGATGG
401 CGGCGAGAGG CTGGAGCTCC GGGAACTCCT CGGCGGCGGC GCGGAGGAGG TGGAGGTCGG GTACGAGGCG CTGCGGCTGG
481 TGCTCGACTA CCTCTACAGC GGC CGCGCTCG GCGACCTGCC CAAGGCGGCG TGCCTCTGCG TCGACGAGGA CTGCGGCCAC
561 GTCGGGTGCC ACCCGGCCGT CGCGTTCATG GCGCAGGTCC TCTTCGCCCG CTCACCTTC CAGGTCGCGG AGCTCACCAG
641 CCTCTCCAGG GTCGCGCTCT TCGCAGCTGC CTCTCCTTTT CCCCTTCCAT TCGCGATGCT CATGTCATGC CAGTTCATCT
721 CTCCCTGTG CTGCTTGGGA TGCATATTGC TCATAGAAGT GGGGGTTTAA AGATGCATTT TTTTAGTTGC GCGCGTGGAG
801 CTTTGCTTTA GCGCGCAAAA TGAACTACTT CTGAAGGAGA GGGGAGATGG TCTGAACCTGA ATCACTCCTA ATCAGTTAA
881 TCATTGCAAT TTGGATTACT GCAATTGGAG GCCTGTGATA ATTGCATTGT GATTAACCTG CTGTCAATTT GCGCATGAAC
961 AGTATTCAGG TTTAGTTGTT TGCGATTTTG GGGATTTCAG TGTGCTTGGT GCTGTATGCA TTGCAGAGAA AAACAAAAGC
1041 TTACAGTTGT ATGAACGTGT GATGCGACT CCCTGCTTCA ATTAGAAATC GTCCAAAAG CTAGTACATC TTAAGCCATT
1121 AATCAACTCA GATCATGCAC GTTACATCG GTTATGTTTG ATCCAATCCT CTAATCTAGT TTATCTAAT GTCTGAATCG
1201 AACTGCCTGG CTAACGTGCC TTATCTAACA TGTGCTGTCT TACTGATCCT GGGGGTGTCT GCCGTTCTCG TGTATTATTA
1281 TCGGATTCTT CTGGTTCATG TTGACGCGAA AATGGAAGTT AACTGTGTTT GATATCCAGC AAGAGTGGTG CTGATATAGT
1361 AAAGGTGTTT CTTAACCTTT TCTTTTCTTG CAAAAGGCGA TCTCCTTATT GAAGTATCCT CAGATAAGGC GATTGGACTG
1441 TGCACCATCC TATTCTAGGC TGCTTCAAGT ACACATGTTT CACTCAATTG TACCATGATA GGGACATACT CACATACCGC
1521 ACATTATCCT TCCAAATTTG TCAATGCTGC ATTAATGTGA CAGTGATATT TATGCACAGA AAGCACAATC ATATGTTTTT
1601 CACTTAAACT TCGATGTATC TCAGTGTTTT TAAATGTAAA TGTCACACAT ATTCGAAGCA ATAATAAACG AACAAACAAA
1681 AAAATATGCA TGTATCTTAT GGTAAAAATTT GCCTTTGGTA TATTACAGGG GGAATAATGAG TGGTACACT CCAATCACAG
1761 CATGTTTATC CAAGAACACA AAAGGAAATT TCAAATTTT AAATGTAAAA GCCTAAGGTC ACTAATGTTT ATATATATAT
1841 CAACTTTTAT TCTCTTTACA GTCTTTGGAA GTTGTTTTAA GGAGTTATGG GGGTGTTTT TCAGTAATTC TGTCTCAAAA
1921 TTATATTGCT TGCGTGGCTG GCCCATAGGT GCCAATCTGA CAAGAACCAG ACATGATGT ACTAATTGTA TATATAGCCT
2001 AGCTTCCTTT GGTCCAATTG ATGGCCCTCA GCCTTGTATT TATATTTATA AATCTTCTGG CGTTAACATT ACTCTACATT
2081 GAACCTGCTA TTTCAAGTAT TATGTTGGTG TTTGGCTTGT AATATTTTGG TTTCTAAAAA GAATTAACAC CAGGAACTTT
2161 CCTTTTCTAA TAAAAATGG GCCTTGTATG TACTTGTCTT TGTTCACCTT TGTTTTAGAA CGTGGTACTG TTTTTTTCAG
2241 ATAAGGCTGT TCCATACTGA ATCCATTAAT TATTGCTAGC CCAATGCATG TCAGTCCGTT ATCGTTTGTG ATGTTTCACT
2321 ATTTTAAGAA GCCAGAACCA AAGCAATGAT ATATCTTCTT TTTTCATGCA GGGCGTCTC CTGTATGTC TTGATAAGGT
2401 TGAGGTAGAT AACCTTCTAT TGATCTTATC TGTGTCACAC TTATGCAACA AATCTTGCAT GAACTGCTT GAAAGATGCC
2481 TTGATATGCT AGTCCGCTCA AACCTTGACA TGATTAATTC TGAGAAGTCA TTGCGCTCCAG ACTTATCAA GCAGATTAAT
2561 GATGCACGCG TAAGCCTCGG ATTAATTTCA CCAGAAACA AGGGATTTC TAACAAACAT GTGAGGAGGA TACACAGAGC
2641 CCTTGACTCT GACGATGTAG AGCTAGTCA GATGCTGCTC ACTGAAGGAC AGACAATCT TGATGATGCG TTTGACACTGC
2721 ACTACGCCGT CGAACATTGT GACTCCAAAA TTACAACCGA GCTTTTGGAT CTGCGATTTG CAGATGTATA TCATGAACAC
2801 CCAAGAGGTT ATACTGTTCT TCACATGCTC GCGAGGCGAA GAGAGCCTAA AATCATTGTC TCCCTTTTAA CCAAGGGGGC
2881 TCGGCCAGCA GATGTTACAT TCGATCGGAG AAAAGCGGTT CAAATCTCAA AAAGACTAAC AAAACAAGGG GATTACTTTG
2961 GGGTTACCGA AGAAGGAAA CCTTCTCCAA AAGATAGGTT ATGTATTGAA ATACTGGAGC AAGCTGAAAG AAGGGACCCA
3041 CAACCTCGGAG AAGCATCAGT TTCTCTTGA ATGGCAGGTG AGAGTCTAGC AGGAAGGTTG CTGTATCTTG AAAACCGAGG
3121 TAACCTTAC ATATATCATA ATGGGTTTCA AATGCTGTTT TCTTTGGAAT TAACTGTTTT TGCTCTTGGC AACAAAAGGA
3201 AGGTTACATT TGAGTTTAGT GTGTTTTCATG CAGAGTGCAG TTTCAAGAGT TTCCAGTGC CCATTTTTTA GAACCTTCCAT
3281 TTTGTTATGA AGTTGTATCT TGATATATA GTTTTTGTAC GATGTAGTTG CTTTGGCGAG GATATGTTT CCGATGGAGG
3361 CAAGAGTAGC AATGGATATT GCTCAAGTGG ATGGAACFTT GGAATTTAAC CTGGGTTCTG GTGCAAAATCC ACCTCCTGAA
3441 AGACAACCGA CAACGTTTGA TCTAAATGAA AGTCCCTTCA TAATGAAAGA AGAACAATTA GCTCGGATG GGGAACTT
3521 AATAAGGT AATACAGGC ACTCTGTTA TTCACACTGC CTCCAAGCGA TGTATATTTT GAATCTAATG CTACAACTT
3601 GTGTGGCACA CTGCTACACA TGCAAAATAT TTTGATTTT CATATTTTCT GATGGAAGCT AAAACTATAG ATGCTCCCAT
3681 TTTGACTGAT AGGTTCACTG TTGAATACCC TGAGAGGTTT ATGCAATGTT GCATATCTTT TAGCTCTAAC ACTGTCAATG
3761 TGAACCATGG ACAATTTTGC TCTTTTTTGT TCATTAGAA TGATAGTTCA TACTACCTGA AGATTAATA ATTGACAAAG
3841 ATATGTACAC TTTACTETGG TAATTTCTAA TTTTAACTCG GTCTTGAATA GGTAGCCTAG TTAATCTTTC TTGGGGTGCA
3921 TGTGTTGCT ATAGACTTTT GTGGTTGAAA AATCTTTGTA CATCAAGAGC ACAGAATATA CTTAGGTATA TCTATAGGAA
4001 CAACTGCTTG AGATTATCA CAGAAGTTC AAAGACATTA CATTCTCTA ATTGGACATA GACTAATGC AAGCTGAATG
4081 TGTATACCAG GAGCTCGG GAAACGCTTT TTCCCGCAT GTTCSAACGT GCTCGACAAG ATCATGGATG ATGAACTGA
4161 TCCC GAGCTCGG GTCCGC GGAGAAGAGG AAGAGGTTTC ATGACCTGCA GGATGTTCTT CAGAAGGCAT
4241 TCCACGAGGA CAAGGAGGAT AATGACAGGT CCGGGCTCTC GTCGCTGCTG TCATCGACAT CGATCGGGGC CATTTCGACCA
4321 AGGAGATGAA CACCATGCT CCCAAATAGT TGCCATATTT ATAGCTAATC GTCCTCTGTT AGCTACTCAC CTGATGGTTG
4401 CCTTCTGCTA ATTGCCCCCT AATATATTC TCAATGTTT AGGCTTGFAC AGTATTAGT CTTACAGCTA TTGCCCGGTC
4481 AATTGTGAAA CGCAGAAGT TCACTAGTGC TTGTAATGCA GGTGTAATAC AAGTCTTGA ATTTGAGTT GACTTTGAAA
4561 TTTCCAGTGG TTTGCTCGTA AAAATGAGAT GATTTCTTGG CTCCC

```

รูปที่ 4.1 ลำดับเบสของยีน *NPR1* รหัส Os01t0194300-01 ในฐานข้อมูล Rice Genome Browse โดยมีการออกแบบไพรเมอร์ qNPR1-F (สีฟ้า) และ qNPR1-R (สีเขียว)

หมายเหตุ : 5'UTR=สีเทา, Exon=สีเหลือง, Intron=ไม่มีสี, 3'UTR=สีชมพู

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การออกแบบไพรเมอร์ของยีน *PAL* ใช้ข้อมูลลำดับเบสยีน Os04t0518100-01 มีจำนวนลำดับเบสทั้งหมด 3,182 bp ได้ถูกนำมาออกแบบความยาวของ PCR products จำนวน 68 bp โดย qPAL-F (5'-CCAAGTTGAGCTGCTCAGGC-3') มีลำดับเบสอยู่ตำแหน่งที่ 451-468 และ 1,142-1,143 ซึ่งมีจำนวน 20 bp และ qPAL-R (5'-GCAGCGAGTTGCCATCGGAG-3') มีลำดับเบสอยู่ตำแหน่งที่ 1,172-1,191 ซึ่งมีจำนวน 20 bp (รูปที่ 4.2) เมื่อนำ qPAL-F กับ qPAL-R ไปตรวจค่า G+C content พบว่ามีค่า 60% และ 65% ตามลำดับ และมีค่า  $T_m$  เท่ากับ 62.5 °C และ 64.6 °C ตามลำดับ

```

1 AGCAGCCTCT CTATAGTCTC AGCTCTTCTT CCACCACCAC CCAGCTCCTC CTCCTCCTCC TCGTCGTTGT TCGCCACCAC
81 CGCTCGGAGA GATGGCGAGC CAGACCGCCG ACGCCACGGG GTTCGTGCGG AGCGACCCCG TGTCGTGGGG CAAGGCGGGC
161 CTGGAGATGA CCGGGAGCCA CCTGGACGAG GTGAAGCGCA TGGTGGCGCA GTCACGGGAG GCCGTGGTGA AGATCGAGGG
241 GTCCAGCCTC CGCGTCGGCC AGGTGGCCGC CGTCTCCGCG GCCAAGGACG CCTCCGGCGT GGTGGTCGAG CTGGACGAGG
321 AGGCCCGCCC CCGCGTCAAG CCCAGCAGCG AGTGGATCCT CAACTGCATC GCCCACGGCG GCGACATCTA CCGCGTCACC
401 ACCGCTTCG CCGGCACCTC CCACCCGCGC ACCAAGGAGC GCCAGGCCCT CCAAGTTGAG CTGCTCAAGT ACAGTAAAAA
481 AAAATCACTA ATCAAAGAGC CATTTTACTG TACGTACGAG TCGTTTTGTT GCTTCCGATG ATAATGCCAT CATGTGCAAC
561 CTCGTGCGGT CGGTGAACGG CCAGTTGTTG CAGTTATCTT GGTGTGCACG TACTACCTCT CGGTCTGATG CAGAGCTGCA
641 GATTTTAGAA CTGGCTGCCA CTGTGTTTTA GCTGCTGTAC TACACTACTA CTGCCATGTT AGGTAGTACC ACAACAGAGG
721 ACATGAATGT TGAAGCAAAA CGAAAGATCT CGAATAGTTA GTTAGTCCCA AAATACAAGT ATTtactttg accaacaata
801 tctataaaaag taagatgttt taaataaaga gagtggcata ttatgatagc tcgcttaatg ataataatag taacatcaaa
881 tttcatatgat taatcttttt aattttattg ctattaatgg ttaaaattta aaaagtttga cttcgcactg ttctaaaaat
961 acctatattt tagggcggat GGAGTAGTAG TAGTAACCTA TTAACCTCAA TCATGACAGG ACAAACAGGT TAATTTTCAG
1041 TAGATATTGT TGAACGATAA TTAGTACATA GTCTTCTTTC ACCCAGAGTA TACTGAGAGG TTGCAAAGCT GAAAGAATTG
1121 CTCTGTTTCA CGGCCCTGCA GATATCTCAA TCCCGGAATC TTCGGCAACG GTCAGGCTAC TCGGGCATCC GCTTCGAGAT CCTCGAGGGG
1201 TGTCGCGTGC GCGGATGCTT GTGCGCATCA ACACCTGTCT CCAGGGCTAC TCGGGCATCC GCTTCGAGAT CCTCGAGGGG
1281 ATCACCACGC TGATCAACAC CCGGGTCAGC CCATGCCTGC CGCTCCGAGG CACCATCAGC GCCTCCGGCG ACCTCGTGCC
1361 GCTGTCCCTAC ATTGCGGGCC TCATCACCAG GCGGCCAAC CCGCAGGCGG TGACCGTCCA TGGCAAGAAG GTGGACCGCG
1441 CCGAGGCGTT CAAGATCGCC GGCATCCAGG CCGGCTTCTT CAGGCTGGAG CCCAAGGAAG GTCTCCGCAT CGTGAACGGC
1521 ACCTCCGTTG GCTCGGCCCT CGCTGCCATG GTGCTCTACG ACGCGAACCT CCTCGCCGTC CTGTCCGAGG TGCTGTCCCG
1601 CGTGTCTGTC GAGGTGATGA ACGGCAAGCC CGAGTACACC GACCACCTGA GGCACAGCT GAAGCACCAC CCGGGCTCGA
1681 TCGAGGCGCC CGCCATCATG GAGCACATCC TCGCCGCGAG CCGGTTCAAT CCGCACGCGC AGAAGGTGAA CGAGGTGGAC
1761 CCGCTGCTGA AGCCGAGGA GACAGGTAC GCGCTCCGCA CGTCGCGGCA GTGGCTGGGA CCCAGATGC AGGTATCCCG
1841 CCGCGCCACC AAGTCGATCG AGCGCGAGGT CAACTCGGTG AACGACAACC CCGTCACTGA CGTCCACCGC GGCAAGGCCC
1921 TGCACGCGCG CAACTTCCAG GGCACGCCCA TCGGCGTGTG CATGGACAAC ACCCGCCTCG CCATCGGCAA CATCGGCAAG
2001 CTCATGTTGG CCGAGTTCFC CGAGCTGCTC AACGAGTTC ACAACAACGG GCTCAGCTCA AACCTGGCCG GCAGCCGCCA
2081 CCGAGGCTTG GACTACGGCT TCAAGGGCAC CGAGATCGCC ATGGCCCTCT ACTGCTCGGA GCTCCAGTTC CTCGCCAAC
2161 CGGTCAACAA CCACGTCCAG AGCGCGGAGC AGCACAAGCA GGAGCTCAAC TCCCTCGGCC TGCTCTCGC CAGGAAGACC
2241 CCGGAGGCGG TGGACATCCT CAAGCTCATG TCCTCCACCT ACCTGGTTGC GCTCTGCCAG GCGGTGACC TCGCCACCT
2321 GGAGGAGAAC CTCGAAGAGC CGTCAAGAA CTGCGTACG ACCTGAGGCA AGAAGGTGCT CACCACGGGC CCGCGCGGCG
2401 GCCTCCACAG CCGCGCTTC AGCGAGAAG CCGTGCAC CGCCATCGAC CCGCAGGCGG TGTACAGCTA CGCCGACGAC
2481 CCGTGCAGCG CCAACTACCC GGTGATGACC AAGATCCGCG CCTGCTCTGT CGAGCACGCC CTGCGCAACG GCCCGCCGA
2561 GAAGGACGAC GGCTCCTCCG TGTTCTGCAA GATCACCGC TTEGAGGAG AGCTCCGCGA GCGGTGCC CCAGGTGTT
2641 AGCGCGCGCG CGTGGCGTTC GAGACCGCA CCGCGCGGAT CACCACAGG ATCAAGGAGA GCAGGTGTT CCCGCTGTAC
2721 CGTTCGTCO CCGAGGAGCT CCGCTGCTG TACCTCACCG GAGAGAAGCT CAAGTCCCC GCGGAGGAGT GCACAAAGGT
2801 GTTCTGGCC ATCAGCGAGC GCAAGCTCAT CGACCCGATG CTCGAGTGCC TCAAGGAGTG GAACGGCGAG CCCCTGCCCA
2881 TCTGCTGATC GAACGAGTCC ACCCGCGAAC GGCACAAGAT CCAGGAAGAG ACGATACGTC CACCGAATA AGAAGGGGAG
2961 GAATTCAGGA TCCTGAAGC TTCTGTAAG CTCATCAGCA GATTACGTTG TTTCTCCGTC CGTGTTTTTT TTTTCTTTT
3041 TGAGCTTGCT GTATTTATCC GTGTTGTAAT CCGTGTGAGT TGCTGCTGCA ATGCCGTGCG GCCTGACGCG TTCATGGCCT
3121 TGGCTGGCAG CTTTCTGAT CCGTTGTTGT ATTTGCAAG TGAATATAC TAATATAGCG CT

```

รูปที่ 4.2 ลำดับเบสของยีน *PAL* (Phenylalanine ammonia-lyase) รหัส Os04t0518100-01 ในฐานข้อมูล Rice Genome Browse โดยมีการออกแบบไพรเมอร์ qPAL-F (สีฟ้า) และ qPAL-R (สีเขียว)

หมายเหตุ : 5'UTR=สีเทา, Exon=สีเหลือง, Intron=ไม่มีสี, 3'UTR=สีชมพู

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



```

1 GCTGCTTTGA GCTCCATCAC CAGCTGAGCT GCGAGGAAGA GAGAGTGCGA GAGTGCCGCG CAGCGGCAGT GTAGTGTCTAG
81 TCACTGGGTG TGCCTTGCT TGCTTGGAtt gaggatgacg tcatcgatgt cgcgcggcgc ggcgcggcgcg tacgcgcagg
161 tgatggagga catggagaag ggggaaggagc ttggcggcga gctgcAGGGG CTCTCCCGG ACTCGCCGA GCCCGCCG
241 TTCGTGACAG AGATTCTCCA CACCTTCTCC CGggcgatgc gggcgctcga caagcgcgcg gtctccgccc cgggaggaga
321 agggctcggg gtgcagaGCG AGGTCACCTG CGGGGCGCGG GCCAGCGCCG CCGGGAAGAG GAAAGCCCCC GCCCGCCGACC
401 GGAAGGCCAA CTGCCCGAGG AGGTGAGAAC GAAGGCCAGA GCATAGCTCA TCACAAGCA TAGCATCATC TGTGTGTAAT
481 TAGctcgttt ctttcaggga agataggggg gattgtccct cgttttccg gcgcacgctt ttcaaactac tatacgggtg
561 gtttttcgta taaatcttct atagggaaagt tgccttataaa aatcatatta atccattttt gaagtttcaa aatcataaaa
641 tcatgcgcta atggttcacc tcgttttgcg tatattccca atcttctcta tttccttct ctcaaacaca gccTGGGAGT
721 gtttgagaag gggattgagg agattgggaa gatacgtaaa acgaggtgag ccattagctc atgattaatt gagtattaac
801 tattttaaat tttaaaaata gattaatatg attttttaaa gcaactttcc tatagaattt ttttgcaaaa aacgtaccgt
881 ttaaatagttt gaaaagcgtg cgcgcggaaa acgagagcca atctccccta tcacccttaa acgaaacGATA CCTTCCCTAT
961 CACCCCTAAA CGAACGATAC CTTAATGTAC TAAGATTTGT GTGTACGTAT TGCAGGACGC AGCAATCGTC CGGGAATTTC
1041 TGGGTCTGCA AGAACCTCGA CGACGGCCAG GCATGGCGCA AGTACGGCA GAAGGAGATC CAAAGTCTCA AAGCAGGAA
1121 GTGAGTAGAC TTGTCCCGAC AAAAAACAA GTGTTCGAGA CTGTACAGTT GGTATGCGTTG CGCGCTGACG AGGAGTTGTT
1201 TGGGGTATGC TACGTGTACA gtttctactt cgggtgacg cacaaagtacg acagctgtg cagcgcgcaag cggcaggtgc
1281 agcgcgtgca cgcagcaccg ggggggggggg cgcgcggcgcg catcggcgag cacacctgcc gggaccggcg caccgcccc
1361 atcatcgcg cgcacgtcat ccaccaggtc gccgcggcgcg acaacacgca cggtgcggc ggcctccAAG CGGGTCCCG
1441 CCTCATCAGC TTGCTCGCCG CGcggcggc gccagtagac gctgcccggc cgcgcagcag cagcagcagc acccaggtca
1521 ccgcgcggcg ccgcgtgctg cagccgctca aggtggaggg cggcgtcggc tcgtccgacc agggaggagt gctgagcagc
1601 ctcaagcccg gcagctccg GGCgcgcgc GGCgcgcgc GCGCGGAGT CCGGGTCC TCGGGCCG ACCAGGGCGA
1681 TGTCACGTC TCCCTGCAT GGAGTACGA CGCGTCCG GGCATGGAGT TCTTCAAGAA CGACGAGGT GTCTTCGATC
1761 TGGACGACAT TATGGGTTG AGCTTTTGAT CACCGAAGAA TCATGGATGG ACACGGGCCG GGTAAAACGA TCGAAGAAG
1841 ATGGATTCCA CGCGTGTGTA CAGAAATAT TAGCGGCAGC GCGGATCTTA ATTTGGAAT TGCAAGATA CTCCTAATTA
1921 GCCTGGCTAG ATTAGTTTGT AAATTCTTG TTGATGTGTC GTCTCAGCTT TAAGCTGCAG ACATGCTAGC AAGTAAAC
2001 ACGATTAGTA CGTAGTAATG TGTTCTTGA TTATGAGCTG GGGTCTTAA CCTTTTTTGT GTGACAAGCA AGAGAAGAGG
2081 ATTTGGGTAC

```

รูปที่ 4.4 ลำดับเบสของยีน *WRKY45* รหัส Os05t0322900-01 ในฐานข้อมูล Rice Genome Browse โดยมีการออกแบบไพรเมอร์ qWRKY45-F (สีฟ้า) และ qWRKY45-R (สีเขียว)

หมายเหตุ : 5'UTR=สีเทา, Exon=สีเหลือง, Intron=ไม่มีสี, 3'UTR=สีชมพู

มาตรฐานการออกแบบไพรเมอร์จำเป็นต้องพิจารณาหลายพารามิเตอร์ พารามิเตอร์ที่มีผลต่อการทำ PCR ได้แก่ ความยาวของไพรเมอร์ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 16-28 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งสาย Forward และ Reverse ไม่ควรต่างกันเกิน 3 นิวคลีโอไทด์ ค่า G+C content ในไพรเมอร์แต่ละสายมีค่าที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 40-60 % รวมถึงในการออกแบบให้มีเบส GC อยู่บริเวณปลาย 3' ของไพรเมอร์ เนื่องจากเบส GC จับกันโดยใช้พันธะไฮโดรเจน 3 พันธะ แต่เบส AT ใช้พันธะไฮโดรเจนเพียง 2 พันธะ ดังนั้นไพรเมอร์ที่บริเวณปลาย 3' มีเบส GC จะสามารถจับกับเบสคู่สมบนดีเอ็นเอต้นแบบได้แข็งแรงกว่าไพรเมอร์ที่มีเบส AT และค่า  $T_m$  ของไพรเมอร์ซึ่งเป็นค่าที่สำคัญที่สุดในการทำ PCR ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 50-62 °C (Chuang et al., 2013) ทั้งนี้ค่า  $T_m$  ของคู่ไพรเมอร์ไม่ควรแตกต่างกันเกิน 2-3 °C หากต่างกันมากกว่าจะส่งผลให้การเพิ่มปริมาณมีประสิทธิภาพน้อยหรือไพรเมอร์นั้นไม่ทำงาน (Apte and Daniel, 2009) ซึ่งสอดคล้องกับการออกแบบไพรเมอร์ของยีน *NPR1* ที่มีทั้งค่าความยาวไพรเมอร์ ค่า G+C content และค่า  $T_m$  อยู่ในช่วงดังกล่าว แต่สำหรับไพรเมอร์ของยีน *WRKY45* มีเพียงค่า  $T_m$  ที่ไม่สอดคล้อง โดยมีค่ามากกว่าในช่วงที่เหมาะสมอยู่ 0.5 °C แตกต่างจากไพรเมอร์ของยีน *PAL* และ *POX* ที่มีแค่ความยาวไพรเมอร์ที่อยู่ในช่วงที่เหมาะสมเท่านั้น แต่มีค่า G+C content ที่สูงและเป็นผลทำให้ค่า  $T_m$  สูงตามไปด้วย อย่างไรก็ตามไพรเมอร์แต่ละคู่มีปลาย 3' ลงท้ายด้วยเบส G หรือ C และมีค่า  $T_m$  ต่างกันไม่เกิน 3 °C ทำให้ไพรเมอร์แต่ละคู่สามารถทำงานและจับกับ DNA เป้าหมายได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.2 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ qNPR1, qPAL, qPOX และ qWRKY45 ด้วยวิธี PCR และ Gel electrophoresis

เมื่อนำไพรเมอร์ qNPR1, qPAL, qPOX และ qWRKY45 ไปทดสอบความจำเพาะเจาะจงกับ cDNA ของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ด้วยวิธี PCR และ Gel electrophoresis พบว่าแถบ DNA ของไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่มีขนาดของ PCR products ต่ำกว่า 250 bp เมื่อเทียบกับ DNA Ladder ซึ่งเป็นช่วงที่ใกล้เคียงกับจำนวน PCR products ที่ได้ออกแบบ แต่ไพรเมอร์ qPAL มีแถบ DNA ขึ้นสองชั้น ซึ่งแตกต่างจากไพรเมอร์ qPOX, qWRKY45 และ qNPR1 ที่มีแถบ DNA ขึ้นชั้นเดียว (รูปที่ 4.5) แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ qPAL ไม่มีความจำเพาะเจาะจง เนื่องจากไพรเมอร์ qPAL ที่ออกแบบในโครงการพิเศษนี้มาจากยีน Os04t0518100-01 ซึ่งอาจมีลำดับเบสที่ซ้ำหรือคล้ายคลึงกับยีนอื่นๆ ในกลุ่มเดียวกัน เช่น ยีน LOC\_Os04g43760.1 ซึ่งเป็นยีนที่คาดว่าจะสร้าง Phenylalanine ammonia-lyase ในฐานข้อมูล Rice Genome browser ทำให้ไพรเมอร์ที่ออกแบบอาจจะจับทั้งยีนที่ออกแบบและยีนที่มีลำดับเบสซ้ำกันนี้ ทำให้เกิดแถบ DNA ขึ้นมากกว่า 1 ชั้น



รูปที่ 4.5 PCR products จากการทำ PCR กับ cDNA ข้าวขาวดอกมะลิ 105 ด้วยไพรเมอร์ qPAL (1), qPOX (2), qWRKY45 (3) และ qNPR1 (4) เทียบกับ DNA Ladder (M)

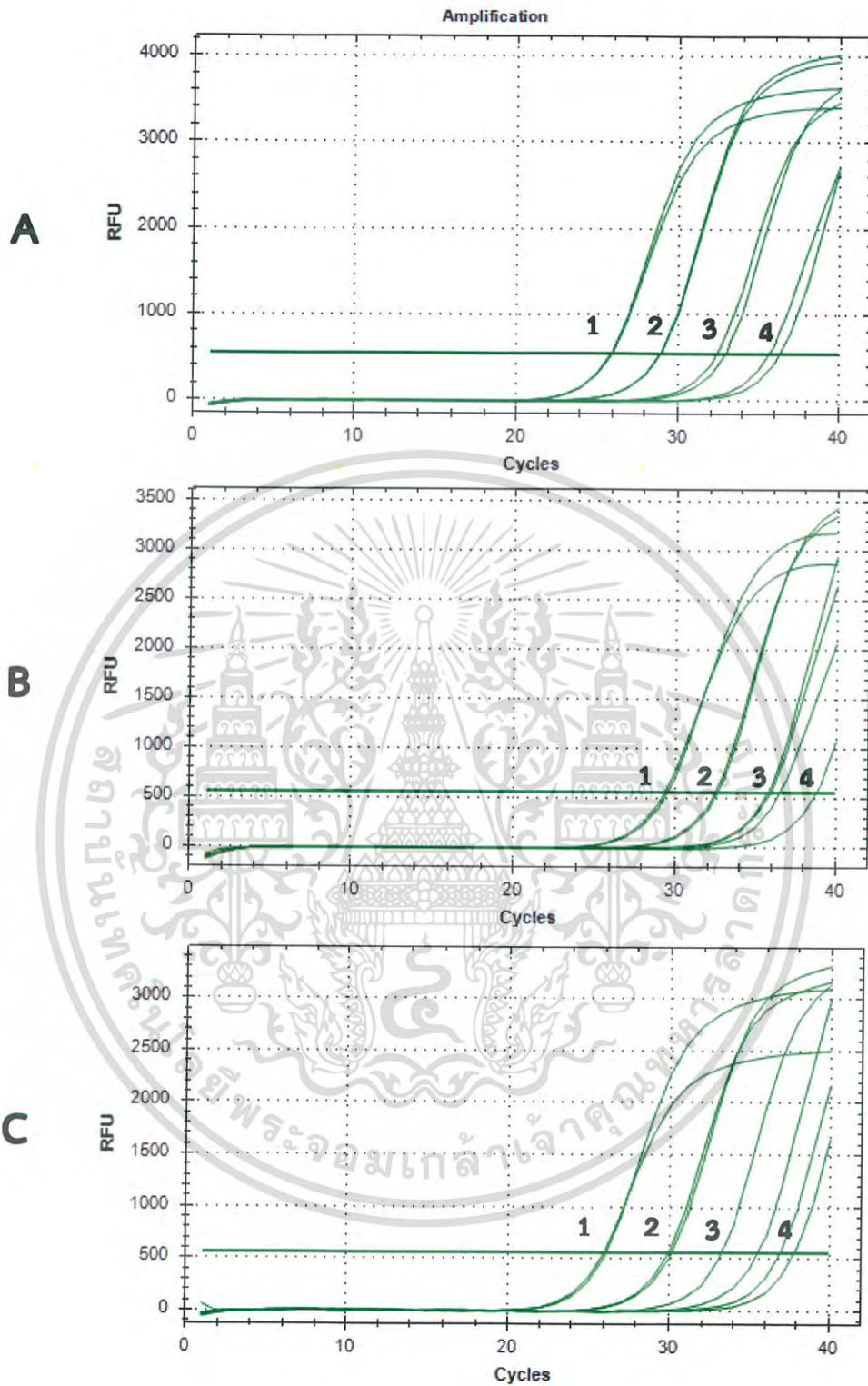
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 4.3 การตรวจสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ด้วยวิธี qRT-PCR

การตรวจสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ด้วยวิธี qRT-PCR เกิดขึ้นโดยขณะที่ทำปฏิกิริยาเครื่อง real time PCR จะตรวจจับ SYBR green fluorescence ที่แทรกเข้าไปในสาย DNA ที่มีการเพิ่มปริมาณผลผลิต PCR ในแต่ละรอบ โดยเครื่องจะติดตามการเพิ่มปริมาณ DNA ที่เกิดขึ้นจริง ณ เวลานั้น และแสดงผลเป็นกราฟเส้นโค้ง (semilog curve) ของ SYBR green fluorescence ที่สะสมในแต่ละรอบของปฏิกิริยา (ณ ฏฐิติมา และคณะ, 2560) จากกราฟแสดงสัญญาณเรืองแสงต่อจำนวนรอบของการเพิ่มปริมาณ cDNA ของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่  $1x$ ,  $10^{-1}x$ ,  $10^{-2}x$ , และ  $10^{-3}x$  จะได้ค่า cycle quantification หรือ  $C_q$  ซึ่งเป็นค่าจำนวนรอบ PCR ณ เส้นโค้งของระดับปริมาณสัญญาณเรืองแสงที่ตัดกับเส้น threshold (รูปที่ 4.6) เมื่อความเข้มข้นของ cDNA มีปริมาณน้อยลง ค่า  $C_q$  จะมากขึ้น เนื่องจากต้องใช้จำนวนรอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบที่มากขึ้นเพื่อให้ระดับสัญญาณเรืองแสงสูงถึงเส้น threshold นอกจากนี้ยังสามารถวิเคราะห์ค่า  $T_m$  ของ PCR product ที่เกิดขึ้นเพื่อยืนยันว่าเป็น product ที่ต้องการ โดยสังเกตจาก melting curve ซึ่ง PCR product แต่ละตัวจะมีลักษณะ peak สูงสุดของค่า  $T_m$  เฉพาะตัวที่แตกต่างกัน (รูปที่ 4.7) จากกราฟพบว่าไพรเมอร์ qNPR1 และ qWRKY45 มียอด peak ของค่า  $T_m$  เพียงยอดเดียวซึ่งมีค่าเท่ากับ  $83.5^\circ\text{C}$  และ  $89^\circ\text{C}$  ตามลำดับ แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงของคู่ไพรเมอร์ที่จับและเพิ่มปริมาณเฉพาะยีนเป้าหมาย แตกต่างจากไพรเมอร์ qPOX ที่มียอด peak ของค่า  $T_m$  หลายยอดซึ่งอยู่ในอุณหภูมิช่วง  $87-88.5^\circ\text{C}$  โดยอาจมีผลมาจากการมี product ที่ไม่ต้องการเกิดขึ้นในการทำ qRT-PCR

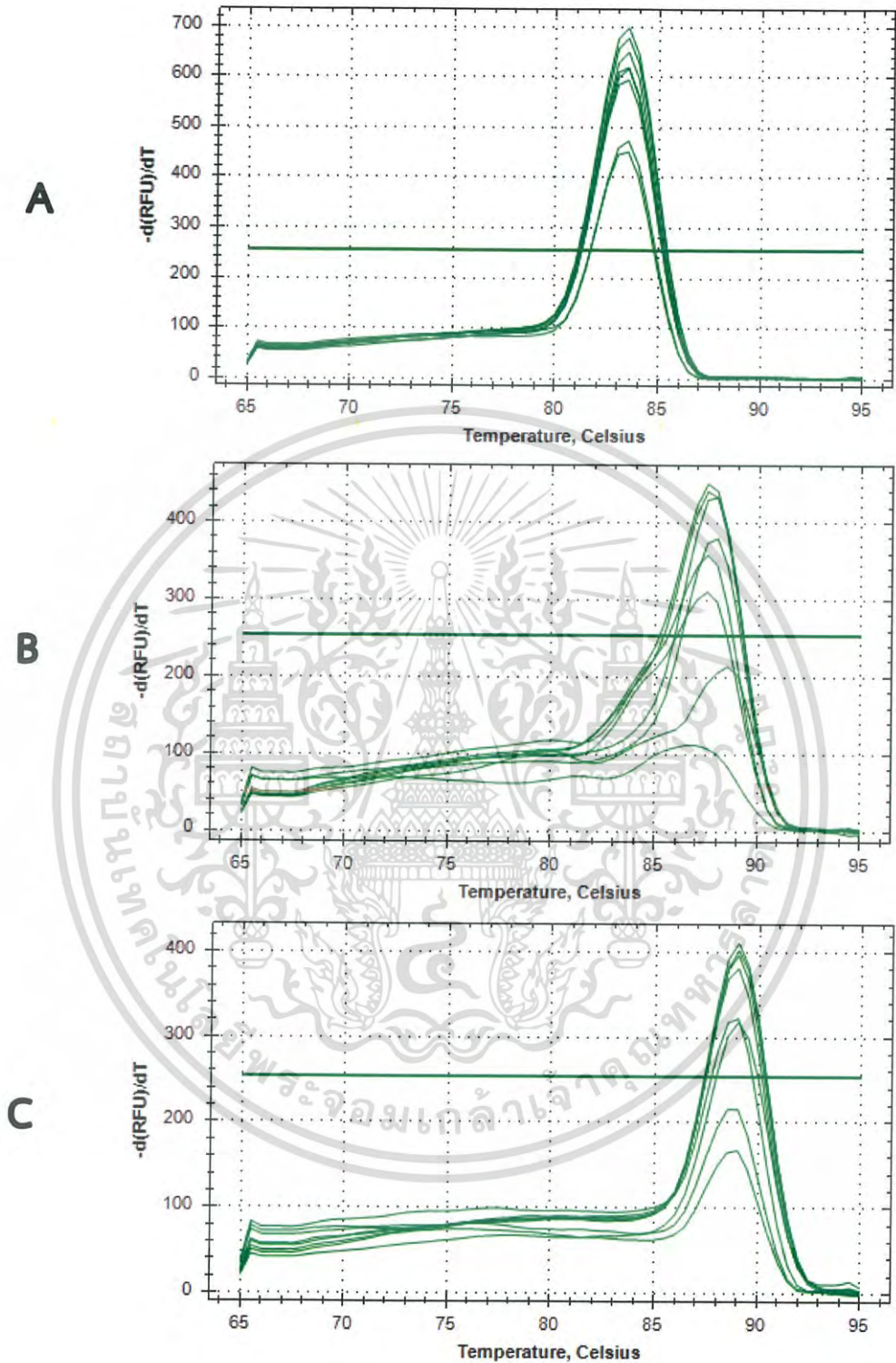
จากการสร้างกราฟเส้นตรงที่มีค่า  $C_q$  ของไพรเมอร์แต่ละตัวเป็นแกน y และค่าความเข้มข้น cDNA ในรูป logarithm เป็นแกน x เพื่อวิเคราะห์สมการถดถอยเชิงเส้นของไพรเมอร์ qNPR1, qPOX และ qWRKY45 พบว่ามีค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.9949, 0.9538 และ 0.9748 และค่าความชันของกราฟ (Slope) เท่ากับ -3.3944, -2.7991 และ -3.8239 ตามลำดับ (รูปที่ 4.8) จากนั้นนำค่าความชันไปคำนวณหาค่าประสิทธิภาพของไพรเมอร์ดังสมการที่กล่าวไว้ในข้างต้น พบว่าค่าประสิทธิภาพของไพรเมอร์ qNPR1, qPOX และ qWRKY45 มีค่าเท่ากับ 97.1%, 127.6% และ 82.6% ตามลำดับ จากงานวิจัยของ Bustin and Huggett (2017) พบว่าการออกแบบไพรเมอร์ที่ดีในการทำ qPCR เกี่ยวข้องกับค่า  $R^2$  ที่แสดงถึงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างค่า  $C_q$  และปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบเริ่มต้นในรูป logarithm และความน่าเชื่อถือของชุดข้อมูล ซึ่งค่า  $R^2$  ที่มากกว่า 0.98 เป็นค่าความน่าเชื่อถือที่ยอมรับ รวมถึงค่าประสิทธิภาพที่ดีควรอยู่ในช่วง 95% ถึง 105% ซึ่งมีเพียง qNPR1 ที่สอดคล้อง เนื่องจากมีค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.9949 และค่าประสิทธิภาพเท่ากับ 97.1%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



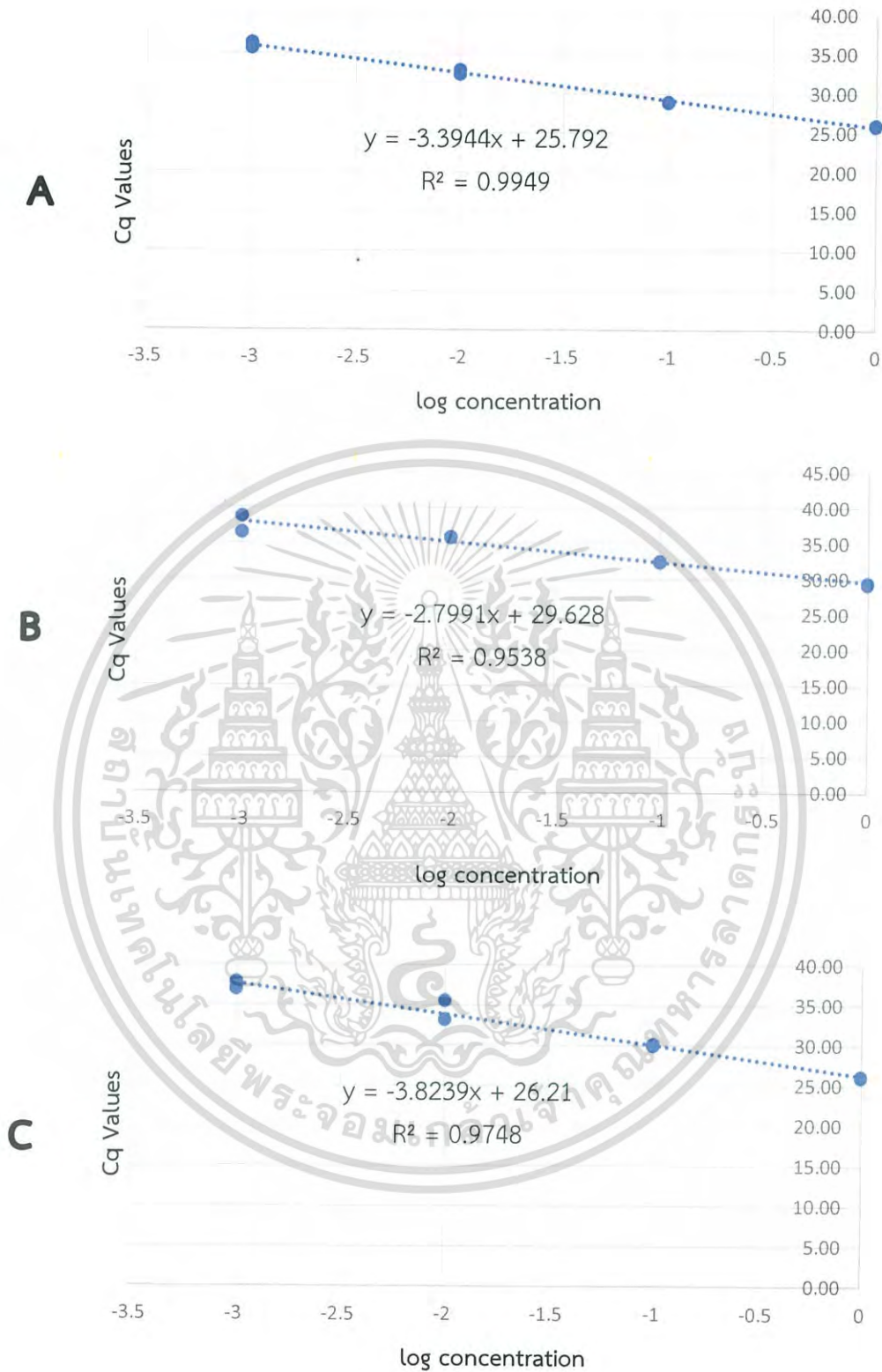
รูปที่ 4.6 กราฟแสดงสัญญาณเรืองแสงต่อจำนวนรอบในปฏิกิริยา PCR กับไพรเมอร์ qNPR1 (A), qPOX (B) และ qWRKY45 (C) กับสารละลาย cDNA ของข้าวขาวดอกมะลิที่มีความเข้มข้น 1X (1), 0.1X (2), 0.01X (3) และ 0.001X (4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์ melting curve ของ PCR products จากไพรเมอร์ qNPR1 (A), qPOX (B) และ qWRKY45 (C)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 กราฟมาตรฐานจากค่าความเข้มข้น cDNA ของข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในรูป Logarithm กับค่า quantitation cycle ( $C_q$ ) ของไพรเมอร์ qNPR1 (A), qPOX (B) และ qWRKY45 (C)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

### 5.1 สรุปผลการวิจัย

การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์สำหรับยีน *NPR1* *PAL* *POX* และ *WRKY45* ในข้าวขาวดอกมะลิ 105 เริ่มตั้งแต่การออกแบบและตรวจสอบคุณสมบัติที่เหมาะสมสำหรับไพรเมอร์ ในการทำ PCR ซึ่งไพรเมอร์ที่มีทั้งค่าความยาวไพรเมอร์ ค่า G+C content และค่า  $T_m$  อยู่ในช่วงที่เหมาะสม คือ qNPR1 เมื่อนำคู่ไพรเมอร์แต่ละคู่ไปทดสอบความจำเพาะเจาะจง พบว่าไพรเมอร์ qNPR1, qPOX และ qWRKY45 มีการจับและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างจำเพาะ แต่ทว่าหลังจากการคำนวณประสิทธิภาพของไพรเมอร์กลับมีเพียงไพรเมอร์ qNPR1 ที่มีค่าประสิทธิภาพอยู่ในช่วงที่ยอมรับ ซึ่งเท่ากับ 97.5 เปอร์เซ็นต์ และมีกราฟเส้นตรงที่ให้ค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.9949 ซึ่งเป็นช่วงความน่าเชื่อถือที่สูง ดังนั้นไพรเมอร์ qNPR1 ที่ออกแบบในโครงการพิเศษนี้แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงและค่าประสิทธิภาพของไพรเมอร์ ซึ่งมีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ตรวจสอบการแสดงออกของยีน *NPR1* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบ ISR ในข้าว สำหรับงานวิจัยอื่นๆ ในอนาคต

### 5.2 ข้อเสนอแนะ

- 5.2.1 ในขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์ควรออกแบบให้มีคุณสมบัติตรงตามแหล่งอ้างอิง เพื่อให้มีความจำเพาะต่อยีนเป้าหมายและประสิทธิภาพในการทำงานที่ดี
- 5.2.2 การเลือกยีนควรเลือกยีนที่มีลำดับเบสไม่ซ้ำหรือคล้ายคลึงน้อยที่สุดกับยีนอื่นๆ ในชุดข้อมูลนั้น เพื่อป้องกันไม่ให้ไพรเมอร์จับและเพิ่มปริมาณยีนที่ไม่ใช่ยีนเป้าหมาย ซึ่งจะส่งผลให้ไพรเมอร์นั้นไม่มีความจำเพาะเจาะจง
- 5.2.3 การทำ qRT-PCR ควรคำนึงถึงปริมาณสารละลาย cDNA และ master mix ที่เท่ากันในแต่ละซ้ำและระวังการปนเปื้อนในระหว่างทำการทดลอง เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่แม่นยำต่อการนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



- รัตน์ นาคสิงห์, กวี สุจิตฺติ, เนริสา คุณประทุม และรัชชคณิต จงจิตวิมล. 2558. “ไพรเมอร์ W-11 เพื่อการระบุเพศของมะละกอพันธุ์ฮอลแลนด์.” หน้า 141-146. ใน การประชุมสัมมนาวิชาการนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติและนานาชาติ (Proceedings) เครือข่ายบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏวชิราวุฒินครศรีธรรมราช ครั้งที่ 15. นครสวรรค์ : มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์.
- อโณทัย โภคาธิกรณ์. 2549. “Basic Real-time PCR.” หน้า 1-16. ใน การประชุมเชิงปฏิบัติการเรื่อง Introduction to Real time-PCR and its Applications คณะแพทยศาสตร์. สงขลา : มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- Apte, A. and Daniel, S. 2009. “PCR Primer Design.” *Cold Spring Harbor Protocols*. 4(3) : 1-10. doi:10.1101/pdb.ip65
- BJS BIOTECHNOLOGIES LTD. 2017. Diagram to Show the 3 Steps of a PCR Cycle. [Online] Available : <https://www.xpresspcr.com/all-news/polymerase-chain-reaction-the-past-present-and-future/>.
- Bustin, S. and Huggett, J. 2017. “qPCR Primer Design Revisited.” *Biomolecular Detection and Quantification*. 14 : 19-28.
- Chandler, S. Van Hese, N. Coutte, F. Jacques, P. Höfte, M. and De Vleeschauwer, D. 2015. “Role of Cyclic Lipopeptides Produced by *Bacillus subtilis* in Mounting Induced Immunity in Rice (*Oryza sativa* L.)” *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 91 : 20-30.
- Chuang, L.Y. Cheng, Y.H. Yang, C.H. 2013. “Specific Primer Design for the Polymerase Chain Reaction.” *Biotechnology Letters*. 35 : 1541-1549.
- Dixon, R.A. and Paiva, N. 1995. “Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism.” *Plant Cell*. 7 : 1085-1097.
- Hiraka, S. Sasaki, K. Ito, H. Ohashi, Y. and Matsui, H. 2001. “A Large Family of Class III Plant Peroxidase.” *Plant Cell Physiol*. 42(5) : 462 – 468.
- Jones, J.D. and Dangl, J.L. 2006. “The Plant Immune System.” *Nature*. 444 : 323-329.
- La Camera, S. Gouzerh, G. Dhondt, S. Hoffmann, L. Fritig, B. Legrand, M. and Heitz, T. 2004. “Metabolic Reprogramming in Plant Innate Immunity: the Contributions of Phenylpropanoid and Oxylinin Pathways.” *Immunological Reviews*. 198 : 267-284.
- Lee, C. Kim, J. Shin, S.G. and Hwang, S. 2006. “Absolute and Relative QPCR Quantification of Plasmid Copy Number in *Escherichia coli*.” *Journal of Biotechnology*. 123(3) : 273-280.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- MacDonald, M.J. and D’Cunha, G.B. 2007. “A Modern View of Phenylalanine Ammonia Lyase.” *Biochemistry and Cell Biology*. 85(3) : 273-282.
- Minami, E. Ozeki, Y. Matsuoka, M. Koizuka, N. and Tanaka, Y. 1989. “Structure and some Characterization of the Gene for Phenylalanine Ammonia-lyase from Rice Plants.” *European Journal of Biochemistry*. 185(1) : 19-25.
- Payyavula, R.S. Navarre, D.A. Kuhl, J.C. Pantoja, A. and Pillai, S.S. 2012. “Differential Effects of Environment on Potato Phenylpropanoid and Carotenoid Expression.” *BMC Plant Biology*. 12 : 39.
- Mishra, R.P. Singh, R.K. Jaiswal, H.K. Kumar, V. and Maurya, S. 2006. “Rhizobium-Mediated Induction of Phenolics and Plant Growth Promotion in Rice (*Oryza sativa* L.)” *Current Microbiology*. 52(5) : 383-389.
- Rais, A. Jabeen, Z. Shair, F. Hafeez, F.Y. and Hassan, M.N. 2017. “*Bacillus* spp., a Bio-Control Agent Enhances the Activity of Antioxidant Defense Enzymes in Rice Against *Pyricularia oryzae*.” *PLOS ONE*. 12(11) : e0187412. doi:10.1371/journal.pone.0187412.
- Shimono, M. Koga, H. Akagi, A. Hayashi, N. Goto, S. Sawada, M. Kuruhara, T. Matsushita, A. Sugano, S. Jiang C. Kaku, H. Inoue, h. and Takatsuji, H. “Rice *WRKY45* Plays Important Roles in Fungal and Bacterial Disease Resistance.” *Molecular Plant Pathology*. 13(1) : 83-94.
- Tao, Z. Liu, h. Qiu, D. Zhou, Y. Li, X. Xu, c. and Wang, S. 2009. “A Pair of Allelic *WRKY* Genes Play Opposite Roles in Rice-Bacteria Interactions.” *Plant Physiology*. 9(151) : 936-948.
- Withers, J. and Dong, X. 2016. “Posttranslational Modifications of *NPR1*: A Single Protein Playing Multiple Roles in Plant Immunity and Physiology.” *PLOS Pathogens* doi:10.1371/journal.ppat.1005707.
- Yuan, Y. Zhong, S. Li, Q. Zhu, Z. Lou, Y. Wang, L. Wang, J. Wang, W. Li, Q. Yang, D. and He, Z. 2009. “Functional Analysis of Rice *NPR1*-like Genes Reveals that *OsNPR1/NH1* is the Rice Orthologue Conferring Disease Resistance with Enhanced Herbivore Susceptibility.” *Plant Biotechnology Journal*. 5(2) : 313-324.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### ฐานข้อมูลและโปรแกรมที่ใช้ออกแบบไพรเมอร์

#### 1. ฐานข้อมูล Rice Genome Browser

[\[Back to the Rice Genome Annotation Project Website\]](#)

**Rice Genome Browser**  
Funded by the NSF

Rice Genome Annotation Project - MSU Rice Genome Annotation (Osa1) Release 7  
Showing 60 kbp from Chr1, positions 1 to 60,000

**Instructions**  
Searching: Search using a sequence name, gene name, locus, or other landmark. The wildcard character '\*' is allowed.  
Navigation: Click one of the rulers to center on a location, or click and drag to select a region. Use the Scroll/Zoom buttons to change magnification and position.  
Examples: Chr1.1..20000, Chr5.1464000..1480000, LOC\_Os08g10150, LOC\_Os02g06840.2

[Bookmark this] [Upload your own data] [Hide banner] [Share these tracks] [Link to image] [Help] [Logout]

**Search**  
Landmark or Region:  Search

**Reports & Analysis**  
Download Decorated FASTA File    
Scroll/Zoom: <<< << Show 60 kbp >> >>>

**Data Source**  
Rice Genome Annotation Project Rice Genome Browser - Release 7

**Overview**

**Region**

**Gene Overview**

LOC\_0s01g01010 LOC\_0s01g01019 LOC\_0s01g01050 LOC\_0s01g01070 LOC\_0s01g01090 LOC\_0s01g01090 LOC\_0s01g01090 LOC\_0s01g01100 LOC\_0s01g01100

#### 2. โปรแกรม Oligocalc

**Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator**

Enter Oligonucleotide Sequence Below  
*OD calculations are for single-stranded DNA or RNA*

**Nucleotide base codes**

Reverse Complement Strand (5' to 3') is:

5' modification (if any)  3' modification (if any)  Select molecule

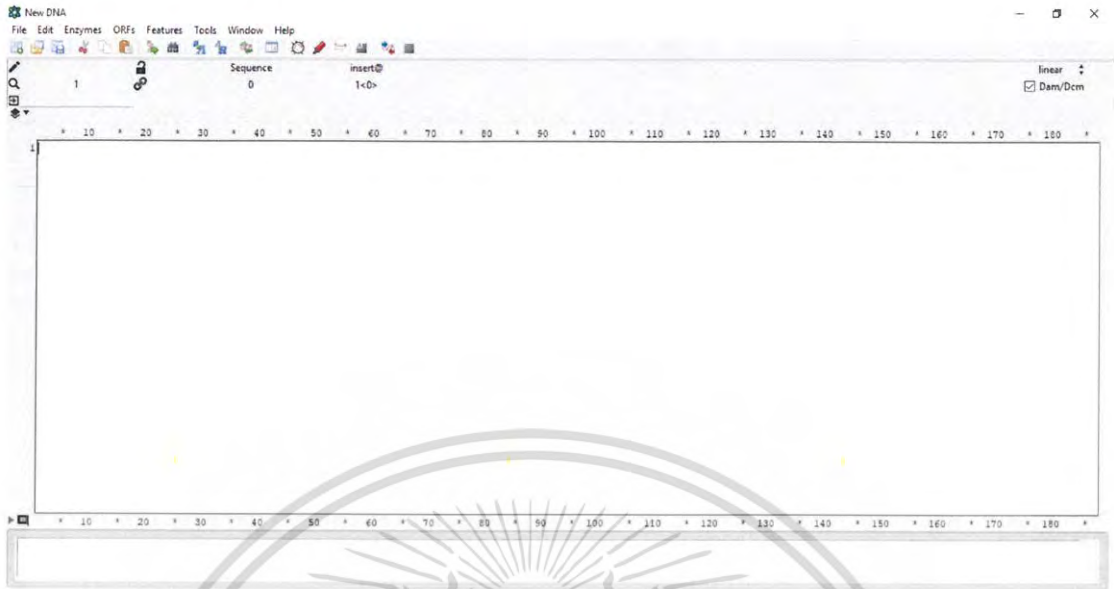
nM Primer  Measured Absorbance at 260 nanometers

mM Salt (Na<sup>+</sup>)

Physical Constants			Melting Temperature (T <sub>M</sub> ) Calculations		
Length:	<input type="text" value="0"/>	Molecular Weight:	<input type="text" value="4"/>	GC content:	<input type="text" value=""/>
1 ml of a sol'n with an Absorbance of <input type="text" value="1"/> at 260 nm			1 <input type="text" value=""/>		
is <input type="text" value=""/> microMolar and contains <input type="text" value=""/> micrograms.			2 <input type="text" value=""/>		
			3 <input type="text" value=""/>		
Thermodynamic Constants Conditions: 1 M NaCl at 25°C at pH 7.					
Rink	<input type="text" value=""/>	cal/(°K <sup>2</sup> mol)	deltaH	<input type="text" value=""/>	Kcal/mol
deltaG	<input type="text" value=""/>	Kcal/mol	deltaS	<input type="text" value=""/>	cal/(°K <sup>2</sup> mol)
<b>Deprecated Hairpin/self dimerization calculations</b>					
5 (Minimum base pairs required for single primer self-dimerization)			<input type="button" value="Check Self-Complementarity"/>		
4 (Minimum base pairs required for a hairpin)					

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3. โปรแกรม A plasmid editor



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้