การพัฒนาเทคนิคเชิงสีที่ง่ายและรวดเร็วในการตรวจวิเคราะห์ร่วมกับเทคนิคการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอ

DEVELOPMENT OF CERTAINLY AND RAPID COLOR TECHNIQUES IN COMBIATION WITH DNA AMPLIFICATION TECHNIQUES

นวพร แก้วพันธ์

นริศรา นาคำโฮม

อาสาฬหา จันทร์แก้วแร่

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีอุตสาหกรรม)
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

การพัฒนาเทคนิคเชิงสีที่ง่ายและรวดเร็วในการตรวจวิเคราะห์ร่วมกับเทคนิคการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอ

DEVELOPMENT OF CERTAINLY AND RAPID COLOR TECHNIQUES IN COMBIATION WITH DNA AMPLIFICATION TECHNIQUES

นวพร แก้วพันธ์
นริศรา นาคำโฮม
อาสาฬดา จันทร์แก้วแร่

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีอุตสาหกรรม)
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DEVELOPMENT OF CERTAINLY AND RAPID COLOR TECHNIQUES IN COMBIATION WITH DNA AMPLIFICATION TECHNIQUES

NAWAPORN KAEWPAN
NARISSARA NAKUMHOM
ASARADA JANKAEWRAE

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (INDUSTRIAL CHEMISTRY)
DEPARTMENT OF CHEMISTRY FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การพัฒนาเทคนิคเชิงสีที่ง่ายและรวดเร็วในการตรวจวิเคราะห์ร่วมกับเทคนิคการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอ		
ชื่อนักศึกษา	นางสาว นวพร	แก้วพันธ์	รหัสนักศึกษา 56050515
	นางสาว นริศรา	นาคำโฮม	รหัสนักศึกษา 56050513
	นางสาวอาสาฬดา	จันทร์แก้วแร่	รหัสนักศึกษา 56050658
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีอุตสาหกรรม)		
ภาควิชา	เคมี		
ปีการศึกษา	2559		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์		

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2559

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.ณัฐวุฒิ เชิงชั้น ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.วิบูลย์ ประดิษฐ์เวียงคำ กรรมการ	
ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
T 149572

หัวข้อโครงงานพิเศษ การพัฒนาเทคนิคเชิงสีที่ง่ายและรวดเร็วในการตรวจวิเคราะห์ร่วมกับเทคนิคการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอ

ชื่อนักศึกษา นางสาว นวพร แก้วพันธ์ รหัสนักศึกษา 56050515
นางสาว นริศรา นาคำโฮม รหัสนักศึกษา 56050513
นางสาวอาสาฬดา จันทร์แก้วแร่ รหัสนักศึกษา 56050658

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีอุตสาหกรรม)

ภาควิชา เคมี

ปีการศึกษา 2559

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ ได้ทำการพัฒนาเทคนิคเชิงสีให้ง่ายและรวดเร็วในการตรวจวิเคราะห์ร่วมกับเทคนิคการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอ โดยใช้สาร intercalating dye 2 ชนิด คือ Hydroxy naphthol blue (HNB) และ Leuco Crystal Violet (LCV) จากการศึกษาโดยใช้สารละลาย HNB วิเคราะห์เชิงสีพบว่า การเปลี่ยนแปลงของสีมีความใกล้เคียงกันและสีไม่ชัดเจน จึงเลือกใช้ สารละลาย LCV มาทำการศึกษาต่อ พบว่า เมื่อสารละลาย LCV ทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอมาตรฐาน จะเปลี่ยนจากใสไม่มีสีเป็นสีม่วง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของสีมีความชัดเจน เมื่อนำมาวิเคราะห์สีด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-Vis Spectrophotometer) และ วิเคราะห์ความเข้มสีด้วยอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษโดยใช้โปรแกรม Image J ซึ่งจะใช้มาตรฐานสี RGB และพบว่ากราฟมาตรฐานให้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9997 และ 0.9931 ตามลำดับ ในงานวิจัยนี้ได้ประยุกต์การวิเคราะห์เทคนิคเชิงสีร่วมกับเทคนิคพีซีอาร์ เพื่อตรวจสอบยีน Badh2 ที่ควบคุมลักษณะความหอมอยู่ในข้าว ซึ่งจะนำมาแยกชนิดของข้าวหอมและข้าวไม่หอม จากการวิเคราะห์เชิงสี พบว่า ข้าวหอมไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของสี คือใสไม่มีสี เมื่อเทียบกับ blank และเมื่อวิเคราะห์ความเข้มสีด้วยโปรแกรม พบว่าได้ค่า RGB เท่ากับ 232.21 แต่ข้าวไม่หอมเกิดการเปลี่ยนแปลงจากใสไม่มีสีไปเป็นสีม่วงแกมน้ำเงิน และได้ค่า RGB เท่ากับ 222.34 ซึ่งได้ผลที่ต่างจาก blank จากผลการทดลองสรุปได้ว่า จะสามารถแยกดีเอ็นเอของข้าวหอมและข้าวไม่หอมด้วยสารละลาย LCV ควบคู่กับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเชิงสีได้

คำสำคัญ : เทคนิคเชิงสี , อุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษ , ข้าวหอม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Development of Certainly and Rapid Color Techniques in Combination with DNA Amplification Techniques		
Students	Miss. Nawaporn	Kaewpan	Student ID 56050515
	Miss. Narissara	Nakumhom	Student ID 56050513
	Miss. Asarada	Jankaewrae	Student ID 56050658
Degree	Bachelor of Science (Industrial Chemistry)		
Department	Chemistry		
Faculty	Science		
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)		
Academic Year	2016		
Advisor	Dr. Tipachai Vatanavicharn		

Abstract

This work presents a development of rapid and certainly color techniques in combination with DNA amplification techniques by using intercalating dye which are Hydroxy naphthol blue (HNB) and Leuco Crystal Violet (LCV). The results of this study by using HNB solution found that the change of color is similar and it is not clear. Thus, we use LCV solution to study and the results showed that when LCV solution reacted with standard DNA, the color has changed from colorless to violet-blue clearly. When analyze the color by using UV-Vis Spectrophotometer and analyzing intensity of color by using paper-based analytical device with Image J program and use RGB color model. Then take the results made a standard curve. It found that coefficient of determination (R^2) are 0.9997 and 0.9931 respectively. This study applies color techniques and PCR techniques for checking Badh2 gene that control the fragrance in rice to separate the fragrance rice and non-fragrance rice. From analyze by using color techniques, it is found that the fragrance rice did not change color. This mean it is clear and colorless like before. When compare with blank and measure RGB, it showed 232.21. However, the color of non-fragrance rice changed from no color to violet-blue and RGB was 222.34 that different from blank. In conclusion, it was used to discriminate between fragrance rice and non-fragrance rice by LCV solution combine color techniques.

Keywords: Color techniques, Paper-based analytical device, Fragrance rice

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้เกิดขึ้นและสามารถดำเนินการจนสำเร็จลงได้ด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับความอนุเคราะห์อย่างสูงจาก ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาของกลุ่มงานวิจัยนี้ที่ให้คำปรึกษา ช่วยเสนอแนะเพิ่มเติมทำให้งานวิจัยฉบับนี้มีความถูกต้องสมบูรณ์ จึงขอกราบ ขอบพระคุณท่านอาจารย์เป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. ณัฐวุฒิ เชิงชั้น และ ผศ.ดร.วิบูลย์ ประดิษฐ์เวียงคำ กรรมการสอบที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าในการเป็นกรรมการพิจารณางานวิจัย พร้อมกับให้ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะตลอดจนการช่วยตรวจรายละเอียดต่าง ๆ ในงานวิจัยฉบับนี้จนถูกต้องและสมบูรณ์

ขอขอบคุณ คุณวัชรายา มาศแจ้ง และ คุณวิสันต์ เชื้อวงศ์ ที่ให้คำปรึกษาช่วยเหลือในการทำงานวิจัยฉบับนี้

ขอบพระคุณ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และหน่วยวิจัยเคมีวิเคราะห์เชิงประยุกต์ ที่อำนวยความสะดวกการใช้เครื่องมือในการวิเคราะห์ รวมถึงให้ความอนุเคราะห์ในเรื่องสารเคมี ตลอดจนสถานที่สำหรับการวิจัย คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากงานวิจัยฉบับนี้ กลุ่มผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

นวพร แก้วพันธ์
นริศรา นาคำโฮม
อาสาฬดา จันทร์แก้วแร่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญรูป ..... ซ
คำย่อ/สัญลักษณ์ ..... ญ

บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 1
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 การวิเคราะห์เชิงสีด้วย Hydroxy naphthol blue (HNB) 3
2.2 การวิเคราะห์เชิงสีด้วย Leuco crystal violet (LCV) 3
2.3 หลักการของเครื่อง UV-Vis spectrophotometer 4
2.4 มาตรฐานของสี 5
2.5 อุปกรณ์การวิเคราะห์บนกระดาษ (Paper-based Analytical Device) 6
2.6 ข้าวหอมมะลิและความสำคัญ 7
2.7 การตรวจลักษณะพันธุ์ข้าวหอมมะลิ 7
2.8 สารให้ความหอมในข้าว 8
2.9 ยีนความหอม 8
2.10 ข้าวหอมมะลิพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 (KDML105) 9
2.11 ข้าวพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่ (Rice berry) 10
2.12 ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) 11
2.13 เจลอิเล็กโตรโฟรีซีส (Gel Electrophoresis) 14
2.14 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 14

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 17
3.1 สารเคมีและอุปกรณ์ 17
3.1.1 สารเคมี 17
3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องตรวจวัด 17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 การศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นของแมกนีเซียมบนเส้นสเปกตรัม .....
ของปฏิกิริยาของ Hydroxy naphthol blue (HNB)..... 18
3.2.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของการตรวจวัดแมกนิเซียม..... 19
3.3 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย LCV เมื่อทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอ ... 19
3.3.1 การหาความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ (Na_2SO_3) ที่ทำปฏิกิริยา
กับสารละลาย CV มาเกินพอ 19
3.3.2 การศึกษาความแตกต่างสีของสาร Leuco crystal violet (LCV) เมื่อทำ....
ปฏิกิริยากับดีเอ็นเอมาตรฐาน 19
3.4 การศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นของดีเอ็นเอบนเส้นสเปกตรัมเมื่อทำ .....
ปฏิกิริยากับสารละลายลิวโคคริสตัลไวโอเลต (LCV)..... 20
3.5 การประยุกต์วิธีการวิเคราะห์เทคนิคเชิงสีร่วมกับการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส .
(Polymerase Chain Reaction) เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย..... 21
3.5.1 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) .....
สำหรับผลิต PCR Product ของดีเอ็นเอ.. 21
3.5.2 การวิเคราะห์ผล PCR Product ด้วยเทคนิค Agarose gel .....
electrophoresis..... 22
3.6 การวิเคราะห์เทคนิคเชิงสีร่วมกับการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส .....
(Polymerase Chain Reaction)..... 23

บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล..... 24
4.1 การศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นของ Mg^{2+} บนเส้นสเปกตรัมของ.....
ปฏิกิริยาของ Hydroxy naphthol blue (HNB)..... 24
4.2 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายแ LCV เมื่อทำปฏิกิริยากัยดีเอ็นเอ . 26
4.2.1 การหาความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ (Na_2SO_3) ที่ทำปฏิกิริยา.
กับสารละลายคริสตัลไวโอเลต (CV) มากเกินพอ 26
4.2.2 การศึกษาความแตกต่างสีของสาร Leuco crystal violet (LCV) เมื่อทำ....
ปฏิกิริยากับดีเอ็นเอมาตรฐาน 28
4.3 การศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นดีเอ็นเอบนเส้นสเปกตรัมเมื่อทำปฏิกิริยา .....
กับสารละลายผสมลิวโคคริสตัลไวโอเลต (LCV)..... 29
4.4 การประยุกต์การวิเคราะห์เทคนิคเชิงสีร่วมกับการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส .....
(PCR) สำหรับผลิต PCR Product ของดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบยีน Badh2..... 33
4.5 การประยุกต์ใช้การวิเคราะห์เทคนิคเชิงสีร่วมกับการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส..
(PCR) เพื่อตรวจสอบยีน Badh2 ของข้าว 2 ชนิดพันธุ์..... 34

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ..... 37
5.1 สรุปผลการดำเนินงานวิจัย 37
5.2 ข้อเสนอแนะ 38
เอกสารอ้างอิง..... 39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก..... 41
ภาคผนวก ก การเตรียม Stock Solution ที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์..... 42
ภาคผนวก ข ขั้นตอนการเตรียมเจล 44
ภาคผนวก ค การเตรียม Competent E. Coli สายพันธุ์ XL1-Blue โดยวิธี $CaCl_2$ 45
ภาคผนวก ง การนำพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่ E. coli สายพันธุ์ XL1-Blue โดย Heat .....
Shock Method 46
ภาคผนวก จ การสกัดสารพันธุกรรม (DNA) โดยใช้ชุด Kit (Favorgen, Biotech Corp) 47
ภาคผนวก ฉ การวิเคราะห์ความเข้มของสีด้วยโปรแกรม Image J 48
ภาคผนวก ช การใช้เครื่อง UV-Visible Spectrophotometer รุ่น Hitachi.....
Spectrophotometer Model U-2900 Double Beam Spectrophotometer..... 49
ภาคผนวก ซ ค่าสเปกตรัมของการตรวจวัดด้วยวิธี Spectroscopy..... 50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

3.1 แสดงความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐาน ชนิด KDML 105 และ RB_5 ที่ช่วงความเข้มข้น..... 0-100 ng/µL..... 20

3.2 ตารางแสดงสารผสมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเราสำหรับผลิต PCR Product 21

4.1 แสดงผลการทดลองของสารละลาย HNB ที่ช่วงความเข้มข้นของแมกนีเซียม 0-14 mM..... เมื่อทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 650 nm..... 25

4.2 แสดงผลการทดลองการทำกราฟมาตรฐานของสารละลาย LCV ในช่างความเข้มข้น ..... ของดีเอ็นเอมาตรฐาน 0-100 ng/µL ตรวจวัดที่คาวมยาวคลื่น 582 nm 31

4.3 แสดงผลการทดลองการทำกราฟมาตรฐานของค่าเฉลี่ย RGB กับความเข้มสีของสารละลาย LCV ที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐาน 0-100 ng/µL 32

4.4 แสดงค่าเฉลี่ย RGB ที่มาจากสีแดง สีเขียว และสีน้ำเงิน เมื่อสารละลาย LCV ที่ทำปฏิกิริยา กับ PCR Products ทั้ง 2 ชนิด 36

ภาคผนวก ซ 1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงและค่าความยาวคลื่นช่วง 350 – 750 nm..... ของสารละลาย HNB ที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมช่วง 0-14 mM..... 50

ภาคผนวก ซ 2 แสดงค่าการดูดกลืนแสงและค่าความยาวคลื่นช่วง 400 – 750 nm..... ของสารละลาย LCV ที่ความเข้มข้นของโซเดียมฟซัลไฟต์ช่วง 20-80 mM..... 51

ภาคผนวก ซ 3 แสดงค่าการดูดกลืนแสงกับความยาวคลื่นของ CV LCV และ LCV ..... เมื่อทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 300 – 700 nm..... 52

ภาคผนวก ซ 4 แสดงค่าการดูดกลืนแสงกับความยาวคลื่นของ CV LCV และ LCV ..... ที่ความยาวคลื่น400-700 nm เมื่อทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอมาตรฐานความเข้มข้น 0-100 ng/µL 52

ภาคผนวก ซ 5 แสดงค่าการดูดกลืนแสงกับความยาวคลื่นช่วง 300- 700 nm ของสารละลาย.. LCV เมื่อทำปฏิกิริยากับ KDML 105 RB_5 และ Blank (PCR Products)..... 53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 แสดงการเกิดปฏิกิริยาของการตรวจวัด dsDNA ด้วยสีย้อม LCV 4
2.2 หลักการของเครื่อง spectrophotometer 5
2.3 ระบบสี RGB 6
2.4 แสดงโครงสร้างของสาร 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) 8
2.5 แสดงโครงสร้างและตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีน Badh2 9
2.6 การเกิดกระบวนการเกิดสาร 2AP ในข้าวหอม 9
2.7 ข้าวหอมพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 10
2.8 ข้าวพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่ (Rice Berry) 11
2.9 แสดงการจำลองตัวของสายดีเอ็นเอ (DNA Replication) 12
2.10 แสดงการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส 13
2.11 การตรวจผลโดย Gel Electrophoresis 14
3.1 แสดงอุณหภูมิช่วงต่าง ๆ ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสสำหรับผลิต PCR Products .. 22
3.2 แสดงภาพขั้นตอนของกระบวนการ Gel Electrophoresis 23
4.1 แสดงสีของสารละลาย Hydroxy naphthol blue (HNB) เมื่อทำปฏิกิริยากับแมกนีเซียม .. ที่มีความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 14 mM ตามลำดับ 24
4.2 แสดงสเปกตรัมระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย HNB ที่มีความเข้มข้นของ ..... แมกนีเซียม 0-14 mM ช่วงความยาวคลื่นช่วง 400-750 nm 25
4.3 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย HNB กับ ..... แมกนีเซียมที่ความเข้มข้น 0-14 mM 26
4.4 แสดงแสดงการเกิดปฏิกิริยาของสารละลาย CV กับสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ 27
4.5 แสดงสีของสารละลาย LCV ที่ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ที่ 20-80 mM..... 27
4.6 แสดงสเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย LCV ที่ความเข้มข้นของสารละลาย ..... โซเดียมไฟซัลต์ความเข้มข้น 20-80 mM ที่ช่วงความยาวคลื่น 350-750 nm 27
4.6 แสดงผลการทดลองในการเปรียบเทียบสีของสารละลาย CV LCV และ LCV เมื่อ..... ทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอมาตรฐาน 27
4.7 แสดงการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย LCV กับดีเอ็นเอ 28
4.8 แสดงผลการทดลองในการเปรียบเทียบสีของสารละลาย CV LCV และ LCV เมื่อทำปฏิกิริยา กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 28
4.9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความยาวคลื่นของ CV LCV และ ..... LCV เมื่อทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอมาตรฐาน 29
4.10 แสดงผลการทดลองปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย LCV กับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ความเข้มข้น เป็น 0-100 ng/µL 30
4.11 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความยาวคลื่นของปฏิกิริยาระหว่าง ..... สารละลาย LCV กับดีเอ็นเอมาตรฐาน ที่ความเข้มข้นเป็น 0-100 ng/µL 30
4.12 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงสารละลาย LCV .. ที่ความยาวคลื่น 582 nm กับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ความเข้มข้นเป็น 0-100 ng/µL 31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

4.13 แสดงผลการทดลองจากการวิเคราะห์ความเข้มสีแบบกระดาษ ที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐานเป็น 0-100 ng/µL 32
4.14 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ย RGB กับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ..... มาตรฐาน 0-100 ng/µL 33
4.15 แสดงผลการวิเคราะห์ PCR Product โดยใช้ Gel Electrophoresis สำหรับตรวจสอบ.... ยีนความหอมของข้าวแบบปกติ โดยเรียงตามลำดับ 1) คือ Blank , 2) KDML 105 , ... 3) คือ RB_5 และ S คือ DNA Ladder 34
4.16 แสดงผลการทดลองเปรียบเทียบสีของสารละลาย LCV เมื่อทำปฏิกิริยากับ KDML 105 ... และ RB_5 34
4.17 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความยาวคลื่นของสารละลาย LCV..... เมื่อทำปฏิกิริยากับ KDML 105 และ RB_5 35
4.18 แสดงผลการทดลองจากการวิเคราะห์ความเข้มสีแบบกระดาษของสารละลาย LCV ..... เมื่อทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอชนิด RB_5 KDML 105 และ Blank..... 35
4.19 กราฟแผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ย RGB จากสมการ (R+G+B)/3 กับ... PCR Products 36
ภาคผนวก ฉ 1 แสดงภาพขั้นตอนการวิเคราะห์สีด้วยโปรแกรม Image J 48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อและสัญลักษณ์

คำย่อ	ความหมาย
DNA Template	ดีเอ็นเอต้นแบบ
dNTP	เป็นนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นหน่วยย่อยสำหรับนำไป สังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่
dsDNA	ดีเอ็นเอสายคู่
ไพรเมอร์	ดีเอ็นเอสายสั้นๆที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบซึ่งจะเข้าคู่กับด้าน 3´ ของจุดเริ่มต้นในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่
PCR Product	ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส
KDML 105	ข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105
Rice Berry	ข้าวพันธุ์ไรซ์เบอรี่
SD	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
RSD	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์
R^2	สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ
S	ดีเอ็นเอมาตรฐาน
µL	ไมโครลิตร
µM	ไมโครโมลาร์
mL	มิลลิลิตร
mM	มิลลิโมลาร์
M	โมลาร์
ng	นาโนกรัม
bp	base pair
nm	นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันข้าวหอมมีความนิยมและเป็นที่ต้องการมากของผู้บริโภคทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ อีกทั้งข้าวหอมมะลิยังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญมากของประเทศไทย โดยสารที่ให้กลิ่นหอม มีชื่อว่า 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) ในสาร 2AP นั้นจะมียีน ที่ชื่อว่า “Badh2” ซึ่งในยีนข้าวที่มีความหอม จะเกิดความผิดปกติของยีน ในส่วนข้าวไม่หอมจะเกิดความผิดปกติของยีน และด้วยคุณลักษณะพิเศษของข้าวหอมมะลิจึงก่อเกิดปัญหาการปลอมปนในข้าวหอมมะลิ การปลอมปนของข้าวทำให้คุณภาพของข้าวหอมมะลิลดลง ไม่เหนียวนุ่มเหมือนข้าวหอมมะลิพันธุ์แท้ เพื่อเป็นการรักษาคุณภาพข้าวหอมมะลิไทย จะต้องมีการตรวจสอบควบคุมการปลอมปนของข้าวไม่หอม

ปัจจุบันวิธีการตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมมีหลากหลายวิธี ซึ่งงานวิจัยนี้ได้นำเทคนิคการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR) มาใช้ในการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอ นับได้ว่าเทคนิค PCR เป็นเทคนิคสำคัญมากในงานอณูชีวโมเลกุลทั้งที่เป็นงานพื้นฐานในห้องปฏิบัติการไปจนถึงการประยุกต์ใช้ทางการแพทย์และการเกษตรสามารถใช้ในการวินิจฉัยโรคต่าง ๆ ซึ่งเทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่ทำได้ง่ายแต่เครื่องมือมีราคาค่อนข้างสูง จึงนำการวิเคราะห์ผลผลิตของ PCR มาใช้ร่วมกับเทคนิคการวิเคราะห์เชิงสีเพื่อให้ง่าย สะดวกต่อการวิเคราะห์

สำหรับงานวิจัยนี้จะนำสารที่เป็น intercalating dye 2 ชนิด คือ Hydroxy naphthol blue (HNB) และ Leuco Crystal Violet (LCV) ซึ่งสารทั้ง 2 ชนิดจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของสี เพื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบความเข้มของสี ในการเกิดปฏิกิริยาของสารละลาย HNB ซึ่งเป็นการวิเคราะห์แบบ by Product จะเกิดสารละลายสีม่วงเปลี่ยนเป็นสารละลายสีน้ำเงิน และในการเกิดปฏิกิริยาของสารละลาย LCV จะเปลี่ยนจากสารละลายใสไม่มีสีเป็นสารละลายสีม่วง จึงเลือกใช้สารละลาย LCV ในการวิเคราะห์และพัฒนาเทคนิคเชิงสี เนื่องจากว่า สารละลาย LCV เกิดปฏิกิริยากับดีเอ็นเอได้โดยตรง และเกิดการเปลี่ยนแปลงสีที่เห็นได้ชัดเจนกว่า สารละลาย HNB และนำการวิเคราะห์เชิงสีโดยใช้อุปกรณ์แบบกระดาษวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Image J มาประยุกต์ใช้ เพื่อความสะดวก รวดเร็ว ง่ายดายและประหยัดงบประมาณในการในการวิเคราะห์

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงสีของสาร intercalating dyes ทั้ง 2 ชนิด
2. วิเคราะห์การตรวจวัดเชิงสี ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์
3. วิเคราะห์การตรวจวัดเชิงสีแบบกระดาษร่วมกับสแกนภาพวิเคราะห์ผลสีของสารละลายด้วยโปรแกรม Image J
4. ประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์เทคนิคเชิงสีร่วมกับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยการวิเคราะห์ความเข้มของสีด้วยโปรแกรม Image J

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ในการทดลองการพัฒนาเทคนิคเชิงสีที่ง่ายและรวดเร็วในการตรวจวิเคราะห์ร่วมกับเทคนิคการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอจะมีวิธีการดำเนินงานวิจัยเป็น 3 ขั้นตอนโดยในขั้นตอนแรกจะทำการศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นของ Mg^{2+} บนเส้นสเปกตรัมของปฏิกิริยาของสารละลาย HNB ที่ความยาวคลื่นช่วง 400 -750 nm เพื่อเปรียบเทียบสีของสารละลาย HNB เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายแมกนีเซียมซัลเฟตที่ช่วงความเข้มข้น 0-14 mM ตามสมมติฐานคาดว่า สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีม่วง และในขั้นตอนที่ 2 จะทำการศึกษาปฏิกิริยาของสารละลาย LCV เมื่อทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อสังเกตความแตกต่างสีของสารละลาย แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นช่วง 350-700 nm ทำการศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นของดีเอ็นเอบนเส้นสเปกตรัมของ LCV นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นช่วง 350-700 nm และนำสารละลายที่ได้มาทำการตรวจวิเคราะห์แบบกระดาษ เพื่อทำการวิเคราะห์ผลกระทบของความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่มีผลต่อความเข้มสีของสารละลาย ด้วยโปรแกรม Image J และในขั้นตอนสุดท้าย จะประยุกต์การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) ร่วมกับการตรวจวัดเชิงสี โดยจะนำดีเอ็นเอของข้าว 2 สายพันธุ์ คือ ข้าวหอมพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 (KDML 105) และข้าวไรซ์เบอรี่ (RB_5) แล้วจะทำการวิเคราะห์ผล PCR Products ด้วยเทคนิค Agarose Gel Electrophoresis สมมติฐานคาดว่า ถ้าตัวอย่างเป็นข้าวหอมจะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แต่ถ้าหากตัวอย่างเป็นข้าวไม่หอมจะปรากฏแถบดีเอ็นเอ จากนั้นนำ PCR Products ทั้ง 2 ชนิด ทำปฏิกิริยากับสาร LCV เพื่อสังเกตความแตกต่างสีของสารละลาย สมมติฐานคาดว่า ถ้าตัวอย่างเป็นข้าวหอมสีของสารละลาย LCV จะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง แต่ถ้าหากตัวอย่างเป็นข้าวไม่หอมสีของสารละลาย LCV จะเปลี่ยนจากใสไม่สีเป็นสีม่วง ความเข้มสีของสารละลายขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่มียีนข้าวหอมอยู่มาหรือน้อยเพียงใด แล้วนำสารละลาย มาทำการตรวจวิเคราะห์แบบกระดาษ เพื่อนำไปวิเคราะห์ความเข้มสีระหว่างดีเอ็นเอที่มียีนข้าวหอมและไม่มียีนขาวหอม ด้วยโปรแกรม Image J ซึ่งในการทดลองข้างต้นที่กล่าวมานั้นจะคำนึงถึงวัตถุประสงค์งานวิจัยเพื่อความสะดวกรวดเร็วในการตรวจสอบดีเอ็นเอของข้าวหอมมะลิในภาคสนาม ประหยัดงบประมาณ และสามารถนำไปพัฒนาใช้ในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องได้ และนำไปสู่ขอบเขตของงานวิจัยดังนี้

1. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR)
2. การตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) โดยใช้ Intercalating dyes 2 ชนิดคือ HNB และ LCV
3. ผลที่ได้ของ Intercalating dyes นำมาวิเคราะห์ผลด้วยวิธีการดังนี้ วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์
4. วิเคราะห์สีของสารแบบกระดาษ ร่วมกับการสแกนด้วยเครื่องสแกนและตรวจวัดค่า RGB ด้วยโปรแกรม Image J

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถสร้างชุดตรวจสอบข้าวหอมได้ด้วยอุปกรณ์การวิเคราะห์บนกระดาษได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การวิเคราะห์เชิงสีด้วย Hydroxy naphthol blue (HNB) [1]

เนื่องจากการเพิ่มขยายยีนนั้น ทำให้มีสารไพโรฟอสเฟต (Pyrophosphate) เป็นการวิเคราะห์แบบ by product เกิดขึ้น สารดังกล่าวสามารถทำปฏิกิริยากับแมกนีเซียม (Magnesium) จะเกิดผลิตภัณฑ์ คือ สารแมกนีเซียมไพโรฟอสเฟต (Magnesiumpyrophosphate) ซึ่งจะตกตะกอนได้ตะกอนเป็นสีขาวสามารถเห็นได้ด้วยตาเปล่า จะมีปริมาณมากหรือน้อยขึ้นกับปริมาณการเพิ่มขยายยีนนั้น ๆ จากปฏิกิริยาแมกนีเซียมไพโรฟอสเฟตที่เกิดขึ้น วิธีการตรวจวัดการเพิ่มขยายยีนนอกจากดูการตกตะกอนแล้ว เราสามารถทำการวิเคราะห์เชิงสีได้โดยใช้สารละลาย HNB

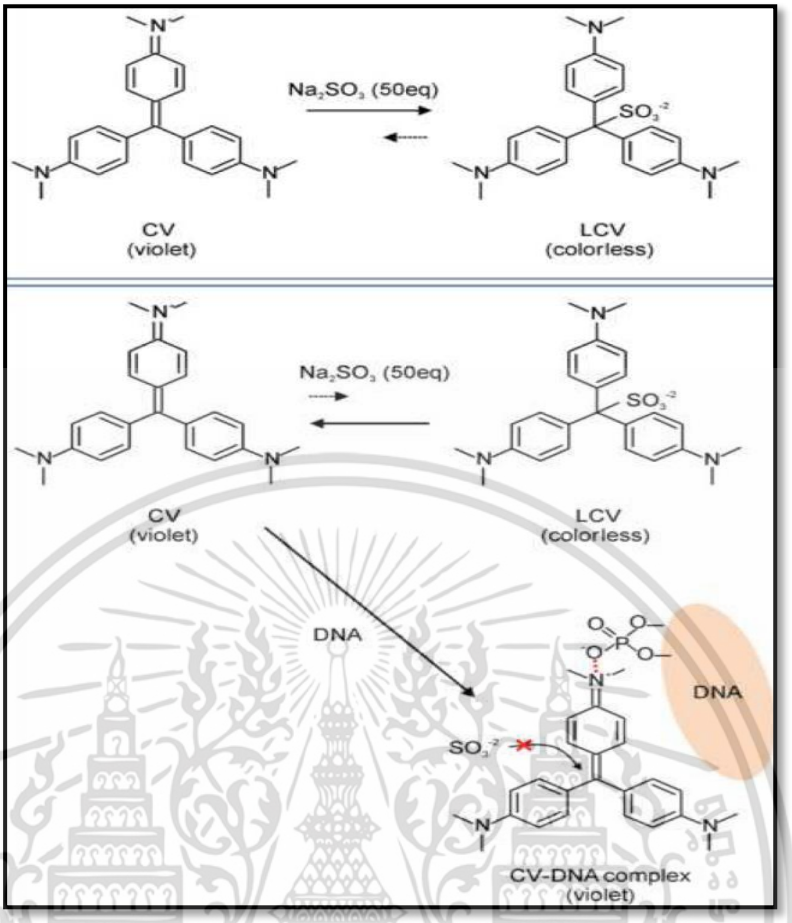
สารละลาย HNB เป็นสารประกอบที่สามารถเกิดปฏิกิริยาเชิงสีกับธาตุที่เป็นโลหะได้ เช่น แมกนีเซียม แคลเซียม เป็นต้น มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{11}S_3$ เป็นสารละลายสีฟ้า ก่อนการเพิ่มขยายยีน HNB จะทำจับกับแมกนีเซียมซึ่งจะเกิดเป็นสีม่วง เมื่อผ่านกระบวนการเพิ่มขยายยีน ผลผลิตที่เกิดขึ้นคือ สาร HNB จะถูกแทนที่ด้วยไพโรฟอสเฟต ซึ่งจะเข้าทำปฏิกิริยากับแมกนีเซียม ผลที่ได้สารละลายจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีฟ้า ดังนั้นในการสร้างกราฟมาตรฐานของ HNB กับแมกนีเซียมจะทำโดยการปรับเปลี่ยนอัตราส่วนความเข้มข้นของแมกนีเซียม และทำการตรวจวัดสีของสารละลายที่ความยาวคลื่น 650 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer

2.2 การวิเคราะห์เชิงสด้วย Leuco crystal violet (LCV) [2]

Leuco crystal violet (LCV) มีสูตรมวลโมเลกุล คือ $CH[C_6H_4N(CH_3)_2]_3$ ซึ่งเป็นสารละลายใสไม่มีสี LCV เป็นสารประกอบซึ่งสามารถเตรียมได้จากสาร 3 ชนิด ประกอบด้วย Crystal violet (CV) Tris-HCL (pH 8.8) และโซเดียมซัลไฟต์ (Na_2SO_3) สำหรับปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น เริ่มแรกสาร CV สามารถเปลี่ยนเป็น LCV ที่สมดุลได้ ทำโดยการเติมสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ที่มีจำนวนมากเกินพอ ซึ่งจะทำปฏิกริยากับสาร CV และเกิดการขจัดสี (Decoloration) เปลี่ยนจากสารละลายสีม่วงเป็นใสไม่มีสี

ในการวิเคราะห์เชิงสี สาร LCV เกิดปฏิกิริยาโดยตรงกับดีเอ็นเอซึ่งหมู่ฟอสเฟตของดีเอ็นเอจะเข้าทำปฏิกิริยากับไนโตรเจนของสารละลาย LCV และเปลี่ยนรูปเป็นสารประกอบเชิงซ้อน CV-dsDNA โดยสารประกอบเชิงซ้อนนี้จะคงที่ได้ด้วยปฏิกิริยาไฟฟ้าสถิต โดยเกิดจากประจุลบของหมู่ Phosphate ใน dsDNA และประจุบวกของวงอะโรมาติกในสาร CV สำหรับโมเลกุลของสาร CV ในสารสารประกอบเชิงซ้อน dsDNA นี้มีความต้านทานสูงต่อการแทนที่ด้วยนิวคลีโอไฟล์ของไอออนโซเดียมซัลไฟต์ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงสีของสาร CV เป็นสาร LCV จะถูกขัดขวางถ้ามีดีเอ็นเอที่ทำให้สารละลายที่เกิดขึ้นจะย้อนเปลี่ยนเป็นสีม่วงจากใสไม่มีสี และผลที่ได้จะเปลี่ยนจากใสไม่มีสีเป็นสีม่วงที่ความยาวคลื่น 582 nm โดยแสดงกลไกการเกิดปฏิกิริยา ดังรูป 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 แสดงการเกิดปฏิกิริยาของการตรวจวัดdsDNAด้วยสีย้อมLCV [2]

2.3 หลักการของเครื่อง UV-Vis spectrophotometer [3]

UV-VIS Spectrophotometer เป็นเครื่องมือที่ใช้ในวิเคราะห์สารโดยอาศัยหลักการดูดกลืนรังสีของสารที่อยู่ในช่วง Ultra violet (UV) และ Visible (VIS) ความยาวคลื่นประมาณ 190-1000 nm โดยที่ความยาวคลื่นแสงจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณและชนิดของสารที่อยู่ในตัวอย่าง เมื่อทำการวัดปริมาณของแสงที่ผ่านหรือสะท้อนมาจากตัวอย่างเทียบกับแสงจากแหล่งกำเนิดที่ความยาวคลื่นค่าต่าง ๆ ตามกฎของ Beer-Lambert ค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ของสารจะแปรผันกับจำนวนโมเลกุลที่มีการดูดกลืนแสง ดังนั้นจึงสามารถใช้เทคนิคนี้ในระบุชนิดและปริมาณของสารต่าง ๆ ที่มีอยู่ในตัวอย่างได้ ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้จะแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) และค่าความยาวคลื่น (Wavelength) ซึ่งเรียกว่า สเปกตรัม (Spectrum) สำหรับการประยุกต์ใช้งานส่วนใหญ่จะใช้วิเคราะห์สารอินทรีย์ สารประกอบเชิงซ้อน ทั้งที่มีสีและไม่มีสี สารแต่ละชนิดจะดูดกลืนรังสีในช่วงความยาวคลื่นที่แตกต่างกันและปริมาณการดูดกลืนรังสีก็ขึ้นอยู่กับความเข้มของสารนั้น การดูดกลืนแสงของสารต่าง ๆ เป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสาร จึงสามารถวิเคราะห์ได้ในเชิงคุณภาพและปริมาณ เป็นเทคนิคที่ให้สภาพไวที่ดี และใช้กันอย่างแพร่หลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

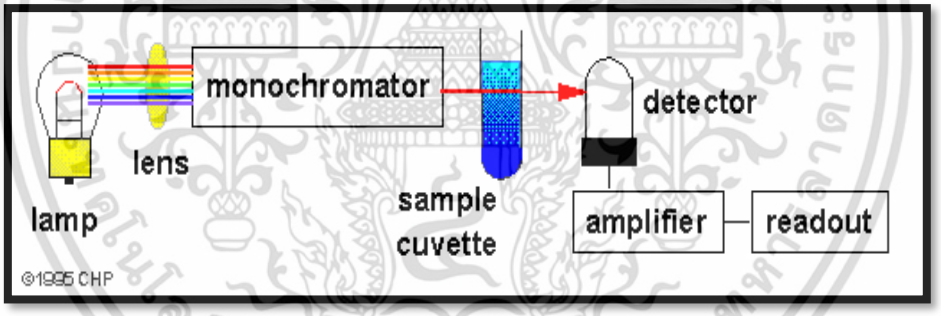
ส่วนประกอบของเครื่อง UV-VIS Spectrophotometer

1. แหล่งกำเนิดแสง ในเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์จะต้องให้รังสีในช่วงความยาวคลื่นที่ต้องการอย่างต่อเนื่องและคงที่ตลอดเวลารวมทั้งมีความเข้มแสงที่มากพอด้วย หลอดกำเนิดแสงมีหลายชนิดตามความยาวคลื่นแสงที่เปล่งออกมา ซึ่งต้องเลือกใช้ให้ถูกต้องเหมาะสมกับของเหลวที่นำมาวัดค่าดูดกลืนแสง

2. Monochromator ส่วนประกอบนี้เป็นส่วนที่ใช้ควบคุมแสงโดยจะทำให้แสงที่ออกมาจากต้นกำเนิดแสง ซึ่งเป็นพอลิโครเมติกให้เป็นแสงโมโนโครเมติก (Monochromatic) ซึ่งเป็นแถบแสงที่มีความยาวคลื่นเดียวใช้ฟิลเตอร์ (กระจกสี) ปริซึม (Prism) หรือ เกรตติ้ง (Grating)

3. เซลล์ที่ใช้บรรจุสารละลายตัวอย่าง เซลล์ที่ใส่สารตัวอย่าง (Cell Sample) บางครั้งอาจเรียกว่า คิวเวทท์ (Cuvettes) รูปแบบที่ใช้กันทั่วไปได้แก่เซลล์ที่ทำด้วยแก้วธรรมดาจะใช้ได้เฉพาะช่วงความยาวคลื่นวิสิเบิล (Visible) เนื่องจากเนื้อแก้วธรรมดาถูกดูดกลืนแสงในช่วงยูวีได้ และเซลล์ที่ทำด้วยซิลิกา (Silica) และควอร์ตซ์ (Quartz) ใช้ได้ทั้งช่วงความยาวคลื่นยูวี และวิสิเบิล

4. Detector ทำหน้าที่ในการวัดความเข้มของรังสีที่ถูกดูดกลืนโดยการแปลงพลังงานคลื่นรังสีเป็นพลังงานไฟฟ้าเครื่องตรวจจับสัญญาณที่ดีต้องมีสภาพไวสูง แม้ปริมาณแสงจะเปลี่ยนไปเล็กน้อยก็สามารถตรวจจับสัญญาณความแตกต่างได้ เครื่องวัดแสงที่ยังนิยมกันอยู่ในปัจจุบัน คือ หลอดโฟโตมัลติพลายเออร์ (Photomultiplier tube, PMT) และเครื่องวัดแสงชนิดซิลิกอนไดโอด (Silicon Diode Detector)



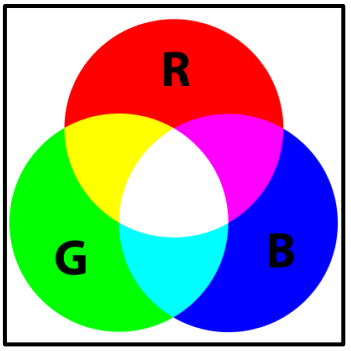
รูปที่ 2.2 หลักการของเครื่อง spectrophotometer [3]

2.4 มาตรฐานของสี [4]

มาตรฐานของสีที่ใช้อยู่ในปัจจุบันมีอยู่หลายระบบด้วยกันทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับการนำไปใช้แต่โดยทั่วไปแล้วทุกมาตรฐานจะมีแนวคิดเดียวกันคือการแทนจุดสีด้วยจุดที่อยู่ภายในสเปส 3 มิติ โดยจะมีแกนอ้างอิงสำหรับจุดสีนั้นในสเปสซึ่งแต่ละแกนจะมีความเป็นอิสระต่อกัน ตัวอย่างเช่นในระบบ RGB จะมีแกนสี คือ แกน สีแดง เขียว และน้ำเงิน เป็นต้น [4]

ระบบสีแบบ RGB เป็นระบบสีที่ประกอบด้วยแม่สี 3 สีคือ แดง (Red) เขียว (Green) และน้ำเงิน (Blue) เมื่อนำมาผสมกันทำให้เกิดสีต่าง ๆ บนจอคอมพิวเตอร์ได้มากถึง 16.7 ล้านสี ซึ่งใกล้เคียงกับสีที่ตาเรามองเห็นได้โดยปกติ และจุดที่สีทั้งสามสีรวมกันจะกลายเป็นสีขาว นิยมเรียกการผสมสีแบบนี้ว่าแบบ “Additive” หรือการผสมสีแบบบวก ดังรูป 2.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 ระบบสี RGB [5]

2.5 อุปกรณ์การวิเคราะห์แบบกระดาษ (Paper-based Analytical Device) [6]

อุปกรณ์การวิเคราะห์แบบกระดาษเป็นอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์รูปแบบใหม่ที่ได้รับความนิยมโดยทำการสร้างช่องไหลของสารลงบนกระดาษ กระดาษเป็นวัสดุที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) เมื่อหยดน้ำลงบนกระดาษ น้ำจะซึมผ่านไปตามช่องขนส่งที่ได้สร้างไว้ซึ่งควบคุมทิศทางการซึมของน้ำหรือของไหลได้ สารที่ต้องการวิเคราะห์สามารถไหลไปยังบริเวณทดสอบบนกระดาษได้ โดยคุณสมบัติของกระดาษ คือ ประกอบด้วยเส้นใยเซลลูโลส สามารถดูดซับน้ำได้ดีอีกทั้งยังสามารถปรับเปลี่ยนพื้นผิวของกระดาษได้ตามความต้องการในการใช้งานอีกด้วย ซึ่งกระดาษที่ใช้ในการสร้างอุปกรณ์การตรวจวัดก็มีหลากหลาย เช่น กระดาษเซลลูโลสยี่ห้อ Whatman กระดาษกรองเบอร์สี่ยี่ห้อ Whatman เป็นต้น

หลักการพื้นฐานของการสร้างช่องไหลแบบจุลภาคบนกระดาษประกอบด้วยสองส่วน คือส่วนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) โดยจะสร้างช่องขนาดระดับไมครอนบนกระดาษในปัจจุบันเทคนิคที่ใช้ในการเตรียมอุปกรณ์วิเคราะห์บนกระดาษด้วยระบบของไหลจุลภาคมีหลายเทคนิคด้วยกัน เช่น การพิมพ์ด้วยขี้ผึ้ง (Wax printing) การพิมพ์สกรีน (Screen printing) การพิมพ์ด้วยแสง (Photolithography) เป็นต้น สำหรับวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารสามารถใช้เทคนิคต่าง ๆ เข้าร่วมในการวิเคราะห์ผลได้ เช่น การตรวจหาโดยการเทียบสี (Colorimetric Detection) วิธีนี้ถูกนำไปใช้อย่างกว้างขวางเพราะเป็นวิธีที่ง่าย และสามารถมองเห็นการเปลี่ยนแปลงของสีได้ด้วยตาเปล่าและทำการตรวจวัดการเปรียบเทียบสี หรือการใช้กล้องถ่ายรูปหรือเครื่องแสกนเนอร์ จากนั้นรูปจะถูกส่งไปยังคอมพิวเตอร์เพื่อวิเคราะห์ความเข้มของสี โดยใช้โปรแกรมในการวิเคราะห์ เช่น Photoshop® และ โปรแกรมอิมเมจเจ (Image J) ซึ่งสามารถบอกถึงค่าสีในระบบต่าง ๆ ของภาพที่ได้จากสแกนเนอร์ได้ด้วย และง่ายในการแปลผลข้อมูลจากการทดลอง ดังนั้นการพัฒนาอุปกรณ์ตรวจวัดบนกระดาษจึงเทคนิคที่น่าสนใจในการลดต้นทุนการตรวจวิเคราะห์ง่าย และรวดเร็ว จะทำให้อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษเป็นอีกทางเลือกที่น่าสนใจ

ข้อดีในการพัฒนา

1. เป็นอุปกรณ์ที่สามารถผลิตได้ง่าย เพราะ ต้นทุนในการผลิตต่ำ เนื่องจากวัสดุที่ใช้เป็นกระดาษซึ่งเป็นวัสดุที่หาซื้อง่าย

2. อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษสามารถพกพาได้สะดวก และสามารถทิ้งได้หลังจากการทำการวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อจำกัดในการพัฒนา

1. การรักษาสภาพตัวอย่างภายในช่องไหล เนื่องจากที่สารตังอย่างกำลังไหลภายในช่องไหล สารตัวอย่างมีโอกาสที่จะระเหยได้ทำให้ตัวอย่างสารที่ไหลถึงบริเวณตรวจวัดมีค่าน้อยกว่าปริมาณตอนที่หยดตอนเริ่มต้น

2. ขีดจำกัดในการตรวจวัด LOD ค่อนข้างสูง สำหรับการเปรียบเทียบสีของสารละลายได้ด้วยตาเปล่าจึงทำให้ไม่สามารถทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างที่มีความเข้มข้นต่ำ ๆ ได้

2.6 ข้าวหอมมะลิและความสำคัญ [7]

ข้าวจัดเป็นอาหารหลักที่มีความสำคัญต่อประชากรโลก มีผู้คนกว่าครึ่งโลกที่บริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก สำหรับประเทศไทยเรานั้นมีการบริโภคข้าวเป็นอาหารหลักนานมาแล้ว ซึ่งปัจจุบันข้าวหอมมีความนิยมและเป็นที่ต้องการมากของผู้บริโภคทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ ส่งผลให้ราคาข้าวหอมนั้นมีมูลค่ามากกว่าข้าวที่ไม่หอม โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้าวหอมมะลิ [7]

ข้าวหอมมะลิ (Thai jasmine rice) เป็นชื่อเรียกทางการค้าไม่ใช่ชื่อสายพันธุ์ข้าวที่ใช้ปลูก พันธุ์ข้าวที่สามารถเรียกได้ว่าเป็นข้าวหอมมะลิมีสองพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ พันธุ์ กข 15 ตามมาตรฐานสินค้าข้าวหอมมะลิไทย พ.ศ. 2559 ซึ่งกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ประกาศรับรองให้ข้าวทั้งสองพันธุ์เป็นข้าวหอมมะลิไทย ลักษณะจำเพาะของกลิ่นหอมของข้าวหอมมะลิเกิดจากสารระเหยชื่อ 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) ซึ่งเป็นสารที่ระเหยหายไปได้ [8]

ข้าวหอมและข้าวหอมมะลินั้นมีความแตกต่างกัน “ข้าวหอม” หมายถึงข้าวขาวทั่วไปที่ไม่ใช่ข้าวหอมมะลิ แต่มีกลิ่นหอมที่ใกล้เคียงกับข้าวหอมมะลิ ส่วนใหญ่หมายถึง ข้าวพันธุ์หอมปทุม หรือข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 นั่นเอง ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พัฒนาให้มีความหอมอร่อยใกล้เคียงกับข้าวหอมมะลิ แต่ที่สำคัญคือ ข้าวหอมเป็นข้าวที่ปลูกได้ตลอดทั้งปี การหันมาปลูกข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 จึงเป็นที่นิยมมากขึ้นในระยะหลังและจากการที่ประเทศไทยมีความหลากหลายทางสายพันธุ์ข้าว ประกอบกับข้าวหอมมะลิของไทยมีมูลค่าสูงแต่มีผลผลิตต่ำจึงเป็นเหตุจูงใจให้ผู้ประกอบการนำข้าวพันธุ์อื่นที่มีลักษณะทางกายภาพหรือสมบัติทางเคมีกายภาพที่คล้ายกับข้าวหอมมะลิมาผสมกับข้าวหอมมะลิ ทำให้คุณภาพการหุงต้ม รับประทาน และการแปรรูปของข้าวหอมมะลิมีคุณภาพลดลง [9]

2.7 การตรวจลักษณะพันธุ์ข้าวหอมมะลิ [12]

การตรวจสอบการปลอมปนข้าวหอมมะลิตามมาตรฐานของไทยที่สามารถยืนยันว่าเป็นข้าวหอมมะลิแท้หรือไม่นั้น ใช้วิธีการตรวจทางกายภาพและการตรวจทางเคมี ดังนี้

วิธีการตรวจทางกายภาพ คือ ตรวจลักษณะเมล็ดข้าวเปลือกหอม โดยพิจารณาจากลักษณะสีของเปลือก ขนาดรูปทรงของเมล็ดข้าวเปลือก ลักษณะพิเศษที่มีเอกลักษณ์เฉพาะที่บ่งชี้ว่าเป็นข้าวหอมอะไร ซึ่งต้องอาศัยความชำนาญ เช่น ข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีจุกหางแยกออกชัดเจนกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ เป็นต้น และวิธีตรวจลักษณะเมล็ดข้าวสารหอมที่ผ่านการกะเทาะเอาเปลือกและรำออกแล้ว โดยพิจารณาจากลักษณะรูปทรงของเมล็ดข้าว ขนาดความยาวของเมล็ดข้าวและความยาวเฉลี่ยต่อความกว้างของเมล็ด และวิธีตรวจสอบเมล็ดข้าวสุกที่ต้มในน้ำเดือด

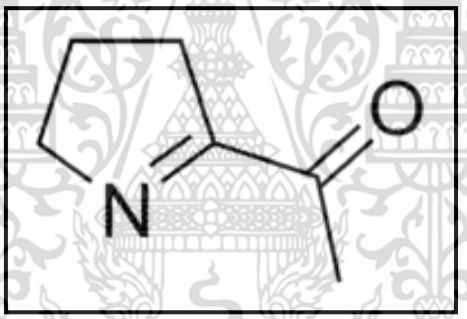
วิธีการตรวจทางเคมี คือ การทดสอบปริมาณอะไมโลสโดยใช้เทคนิคต่าง ๆ เช่น เทคนิคสเปกโทรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้ [10] การใช้ชุดตรวจสอบ (Test kit) [11] เป็นต้น การทดสอบหาปริมาณข้าวพันธุ์อื่นที่ไม่ใช่ข้าวหอมมะลิที่ปนอยู่ด้วยกัน โดยการหาค่าการสลายเมล็ดข้าวในด่าง [12]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การนำมาหุงและทดสอบชิม [13] และการทดสอบความสดของข้าว แต่อย่างไรก็ตามวิธีการที่แม่นยำ คือ การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคดีเอ็นเอ ซึ่งมีหลายเทคนิคในการตรวจสอบทางพันธุกรรม เช่น เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) หรือ เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นต้น

2.8 สารให้ความหอมของข้าว [14]

ความหอม หรือ กลิ่นหอมของข้าว เกิดจากความสามารถพิเศษในการผลิตสารหอมชนิดหนึ่งที่เรียกว่า Popcorn-like scent แล้วเก็บสะสมไว้ในส่วนต่าง ๆ ของต้น โดยเฉพาะเมล็ด สารที่ทำให้เกิดกลิ่นหอมในข้าวหอมมีชื่อว่า 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) สารเคมีนี้ถูกค้นพบในข้าวหอมครั้งแรกเมื่อปี 1983 [14] เป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวน (heterocyclic) เป็นสารอยู่ในกลุ่ม pyrrole มีลักษณะทางเคมีเป็นวงห้าเหลี่ยมที่มีไนโตรเจนเกาะอยู่กลางวง มีพันธะระหว่างคาร์บอนกับไนโตรเจนเป็นพันธะคู่หนึ่งพันธะ และมีหมู่ acetyl เกาะอยู่กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของวง (รูปที่ 2.4) สาร 2AP มีชื่อเรียกอีกอย่างว่า 5-acetyl-3,4-dihydro-2H-pyrroline มีสูตรโมเลกุล คือ C_6H_9NO มีกลิ่นหอมคล้ายใบเตย หรือกลิ่นข้าวโพดคั่ว โดยข้าวหอมจะสร้างสาร 2AP ขึ้นมาเมื่ออยู่ในสภาวะที่เครียด ซึ่งจะถูกพบได้ในทุกส่วนของพันธุ์ข้าวหอม ยกเว้น ราก ส่วนในข้าวที่ไม่ใช่พันธุ์ข้าวหอมจะไม่พบสารดังกล่าวหรือพบในปริมาณน้อยมาก



รูปที่ 2.4 แสดงโครงสร้างของสาร 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) [15]

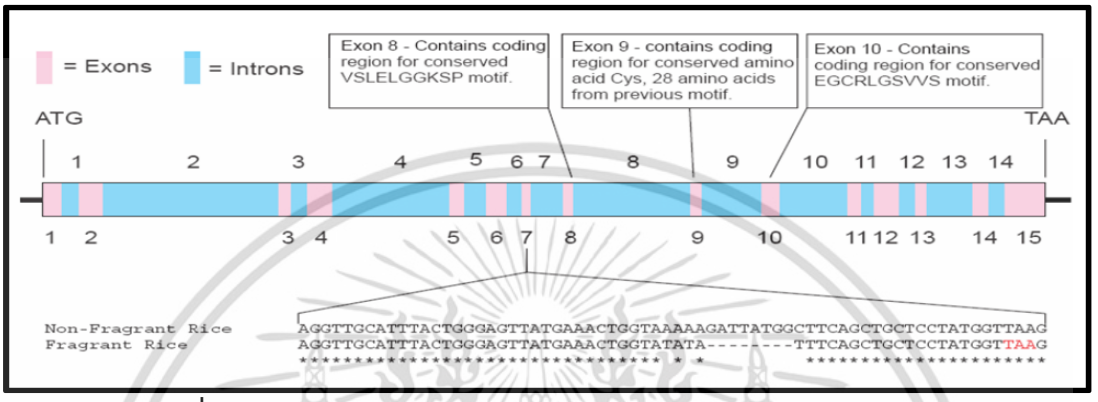
2.9 ยีนความหอม [16]

ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับยีนที่ควบคุมลักษณะความหอมในข้าวอย่างแพร่หลายนับตั้งแต่มีรายงานการวางตำแหน่งยีนควบคุมลักษณะความหอมของข้าวเป็นครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2535 พบว่าลักษณะความหอมถูกควบคุมด้วยยีนด้อย (Recessive gene) มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 8 ใกล้ชิดกับเครื่องหมายโมเลกุล RFLP clone RG28 [16] ต่อมามีการรายงานการวางตำแหน่งยีนควบคุมลักษณะความหอมในข้าวหอมอีกครั้ง โดยส่วนใหญ่รายงานว่า ลักษณะความหอมถูกควบคุมด้วยยีนด้อย Badh และมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 8 [17]

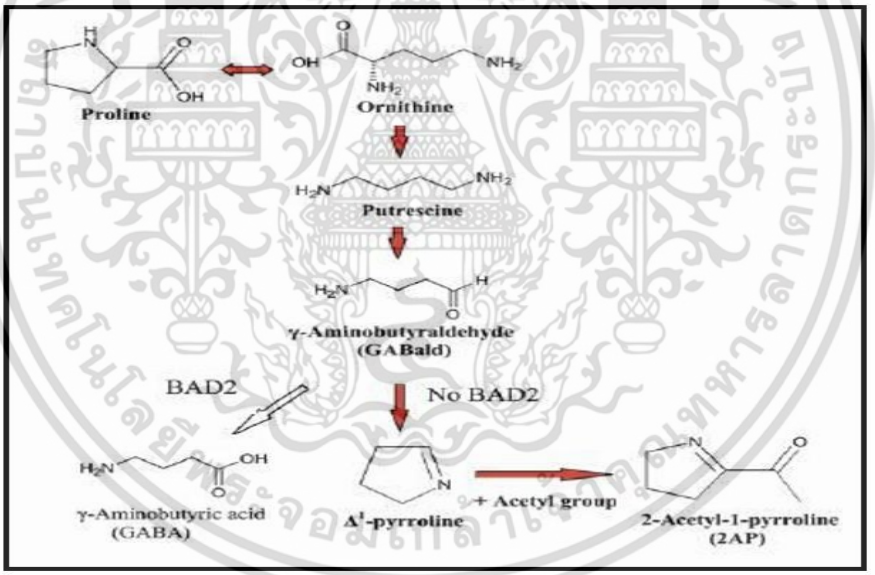
โครงสร้างและหน้าที่ของ Badh ยีนควบคุมลักษณะความหอมมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 4 และ 8 โดยยีน Badh1 มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 4 และยีน Badh2 มีตำแหน่งอยู่ที่โครโมโซมคู่ที่ 8 ซึ่งมีโครงสร้างและหน้าที่คล้ายกัน แต่ยีน Badh2 มีการแสดงออกของยีนมากกว่ายีน Badh1 ซึ่งยีน Badh มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 5,800 คู่เบส ประกอบด้วย 15 exons และ 14 intron สร้างกรดอะมิโนจำนวน 503 ตัว ซึ่งยีน Badh นั้นไม่มีกลิ่นหอม [15] แต่ยีน Badh ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ Betaine Aldehyde Dehydrogenate (BADH) ซึ่งมีหน้าที่เปลี่ยนสาร GAbald

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นสาร GABA ส่งผลให้ข้าวที่มียีนเด่น Badh (Dominant gene) ไม่มีกลิ่นหอม แต่ถ้ามีการกลายพันธุ์ของยีน Badh จะทำให้ยีนดังกล่าวเป็นยีนด้อย Badh (Recessive gene) ส่งผลให้ข้าวมีกลิ่นหอม เช่น การขาดหายของลำดับเบสจำนวนแปดเบส (8 bp deletion) บริเวณ exon 7 ของยีน Badh2 (รูปที่ 2.6) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส เป็นตำแหน่งหยุดก่อนกำหนด (premature stop codon) และการสังเคราะห์กรดอะมิโนได้เพียง 251 ตัว ส่งผลให้สังเคราะห์เอนไซม์ได้ไม่สมบูรณ์ และไม่สามารถเปลี่ยนสาร GAbald เป็นสาร GABA ได้จึงทำให้ข้าวมีกลิ่นหอม



รูปที่ 2.5 แสดงโครงสร้างและตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีน Badh2 [18]

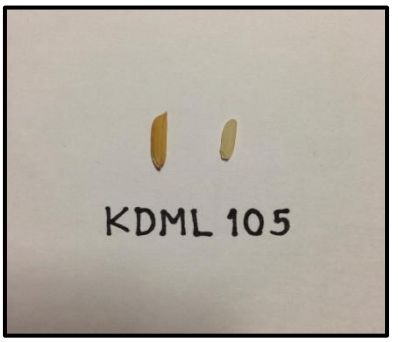


รูปที่ 2.6 การเกิดกระบวนการเกิดสาร 2AP ในข้าวหอม [15]

2.10 ข้าวหอมพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 (KDML105) [24]

ข้าวหอมมะลิเป็นสายพันธุ์ข้าวที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย เป็นข้าวที่มีคุณภาพดีที่สุดและราคาแพงที่สุดของประเทศไทย เป็นที่นิยมบริโภคทั้งในประเทศและต่างประเทศ [19] ซึ่งพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 เป็นพันธุ์ข้าวหอมที่มีชื่อเสียงมากที่สุดในประเทศไทย [20]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



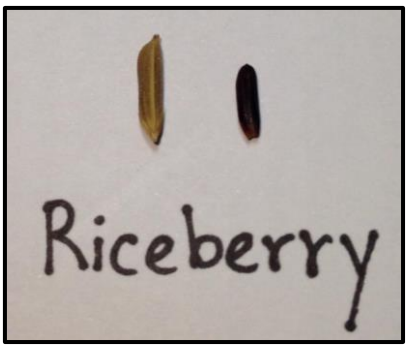
รูปที่ 2.7 ข้าวหอมพันธุ์ขาวดอกมะลิ105 (Khao Dawk Mali 105; KDML105) [21]

ในปัจจุบันพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (รูปที่ 2.8) มักถูกเรียกว่า ข้าวหอมมะลิ พันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 นี้เป็นข้าวนาปีสามารถปลูกได้เพียงปีละครั้งเนื่องจากมีลักษณะไวต่อช่วงแสง (Photoperiod sensitive) คือ ออกดอกในวันที่กลางคืนยาวกว่ากลางวันเท่านั้น ซึ่งอยู่ในช่วงของฤดูหนาวซึ่งอยู่ในช่วงเดือนกันยายน-มกราคม [22] ความสูงของต้นเมื่องอกเต็มที่และปลูกในพื้นที่ที่อุดมสมบูรณ์จะมีความสูง 1.40-1.50 เมตร ข้าวพันธุ์นี้มีการแตกกออยู่ในเกณฑ์ดี มีต้นและใบค่อนข้างเล็กใบยาว สีเขียวอ่อน มีรวงขนาดปานกลางเมล็ดไม่ถี่และไม่ห่าง ลักษณะที่สำคัญของข้าวขาวดอกมะลิ คือ เมล็ดข้าวที่ยาวสีขาวเลื่อมมัน เป็นข้าวที่เต็มเมล็ดที่ไม่มีส่วนใดหัก มีปริมาณแป้งอะไมโลสต่ำ ข้าวขาวดอกมะลิเป็นข้าวที่มีความต้านทานโรคใบแห้งได้ปานกลาง และไม่สามารถต้านทานโรคใบไหม้ โรคใบจุดสีน้ำตาล โรคใบไหม้สีเหลือง คุณภาพในการหุงต้มดี เมื่อหุงข้าวจะได้ข้าวที่นุ่มมากกว่าข้าวทั่วไปและมีกลิ่นหอมคล้ายใบเตยเนื่องจาก ข้าวขาวดอกมะลิมีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างจากข้าวสายพันธุ์อื่น ๆ ทำให้ข้าวน่ารับประทานซึ่งในทางโภชนาการกลิ่นหอมของข้าวช่วยทำให้เพิ่มความอยากรับประทานอาหารมากขึ้น โดยสารที่ให้ความหอมนั้นเกิดจากสารหอมระเหยที่ชื่อว่า 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) เป็นสารที่พบได้ในพันธุ์ข้าวที่มีกลิ่นหอม (Fragrant rice) [23] ข้าวหอมจะสร้าง 2AP ขึ้นมาเมื่อปลูกในสภาวะที่ไม่เหมาะสมเท่านั้น โดยจะเก็บสะสมไว้ในทุกส่วนของข้าว ยกเว้นรากและลักษณะความหอมของข้าวถูกควบคุมการสร้างด้วยยีน Badh ความหอมของข้าวเป็นปัจจัยหนึ่งที่กำหนดคุณภาพและราคาของข้าว ส่งผลให้ข้าวหอมถูกจัดอยู่ในกลุ่มข้าวที่มีคุณภาพสูง จึงทำให้เป็นที่ชื่นชอบของผู้บริโภคโดยทั่วไป เนื่องจากคุณสมบัติของข้าวขาวดอกมะลิที่โดดเด่นเหนือกว่าพันธุ์ข้าวอื่น ๆ ทั้งในแง่ความหอม นุ่ม และรสชาติ ตลาดสำคัญของข้าวหอมมะลิ คือ จีน สหรัฐอเมริกา ฮ่องกง สิงคโปร์ รวมทั้งประเทศในแอฟริกาบางประเทศ ตัวเลขการส่งออกข้าวหอมมะลิเพิ่มขึ้นเป็นลำดับโดยคิดเป็นสัดส่วนการส่งออกประมาณร้อยละ 20–25 ของยอดการส่งออกข้าวไทยทั้งหมด [24]

2.11 ข้าวพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่ (Rice Berry) [25]

ข้าวไรซ์เบอร์รี่ (Rice Berry) (รูปที่ 2.9) ได้มาจากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างข้าวเจ้าหอมนิลกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 จากการพัฒนาพันธุ์ข้าวพิเศษจึงได้ข้าวกล้องที่มีความหอมนุ่มสูง ซึ่งคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติและศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าวฯ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ได้ปรับปรุงสายพันธุ์ข้าวไรซ์เบอร์รี่ เพื่อให้ได้เมล็ดพันธุ์ที่มีคุณภาพดีและให้ประโยชน์สูงสุดแก่ผู้บริโภค [25]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



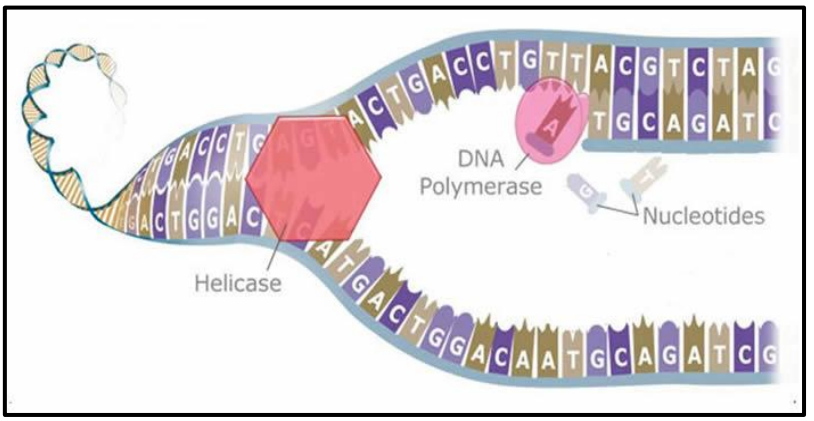
รูปที่ 2.8 ข้าวพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่ (Rice Berry) [21]

ข้าวไรซ์เบอร์รี่จะมีลักษณะทางกายภาพเป็นข้าวเจ้าเมล็ดเป็นสีม่วงเข้ม รูปร่างเมล็ดเรียวยาว ข้าวกล้องมีความนุ่มนวลมาก สามารถปลูกได้ตลอดทั้งปี ให้ผลผลิตต่อไร่สูง ต้านทานต่อโรคไหม้ได้อย่างดี [26] ลักษณะประจำพันธุ์ข้าวไรซ์เบอรี่ลำต้นมีความสูง 105-110 เซนติเมตร อายุการเก็บเกี่ยว 130 วัน ผลผลิตที่ได้คือ 300-500 กิโลกรัมต่อไร่ ความยาวของเมล็ดข้าวเปลือก 11 มิลลิเมตร เมล็ดข้าวกล้อง 7.5 มิลลิเมตรและเมล็ดข้าวขัดสีแล้ว 7.0 มิลลิเมตรคุณสมบัติเด่นทางด้านโภชนาการของข้าวไรซ์เบอร์รี่ คือมีสารต้านอนุมูลอิสระสูง ได้แก่ เบต้าแคโรทีน แกมมาโอไรซานอล วิตามินอี แทนนิน สังกะสี โฟเลตสูง มีดัชนีน้ำตาลต่ำ-ปานกลาง สารอาหารเหล่านี้นอกจากจะใช้รับประทานเพื่อเสริมสร้างสุขภาพที่ดี ลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็ง ทางการแพทย์ยังนำไปใช้ทำผลิตภัณฑ์อาหารโภชนบำบัดอีกด้วย ข้อจำกัดในการดูแลข้าวไรซ์เบอร์รี่นั้นจะต้องดูแลเป็นพิเศษ โดยปลูกแบบเกษตรอินทรีย์ เหมาะสำหรับสภาพอากาศเย็น เพื่อช่วยในการสร้างเม็ดสี

2.12 ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction: PCR) [30]

เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย (DNA target) ภายในระยะเวลาอันรวดเร็ว โดยอาศัยหลักการจำลองตัวของสายดีเอ็นเอ (DNA Replication) (รูปที่ 2.10) เทคนิคพีซีอาร์ถูกพัฒนาขึ้นโดย Kary Mullis ในปี 1983 ส่วนมากจะใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการเพิ่มปริมาณของสารพันธุกรรม หรือ ดีเอ็นเอ (DNA) โดยใช้เครื่อง PCR machine หรือ Thermal cycler เป็นตัวช่วยให้เกิดปฏิกิริยา โดยสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เป็นล้าน ๆ เท่า ข้อดีของเทคนิคนี้ คือ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างเฉพาะเจาะจง โดยมีขั้นตอนการทำงานน้อย และใช้เวลาไม่นาน [27] พีซีอาร์เป็นเทคโนโลยีที่สำคัญมาก สามารถนำไปใช้ได้กับงานวิจัยทางชีวโมเลกุล และพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (Gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (Gene sequencing) การสร้าง DNA probe และการวิจัยประยุกต์ เช่น การสร้างยีนกลายพันธุ์ (PCR based mutagenesis) การศึกษาการแสดงออกของยีนจาก mRNA การตรวจหาดีเอ็นเอของไวรัสซึ่งเป็นสาเหตุของโรค เป็นต้น [28]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.9 แสดงการจำลองตัวของสายดีเอ็นเอ (DNA Replication) [29]

หลักการพื้นฐานของเทคนิคพีซีอาร์

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) จะทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ในปริมาณที่น้อยมาก แล้วอาศัยการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซ้ำกันหลายๆ รอบเป็นลูกโซ่ เพื่อให้เกิดการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอเป็นทวีคูณ (Exponential)

หลักการทำงานของเทคนิคพีซีอาร์

เทคนิคนี้ใช้หลักการพื้นฐานในการเพิ่มดีเอ็นเอ ด้วยการจำลองดีเอ็นเอสายใหม่จากสายดีเอ็นเอ ที่เป็นต้นแบบหนึ่งสายด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) โดยใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นหรือ ไพรเมอร์ (Primer) 1 คู่ ทำให้สังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกัน

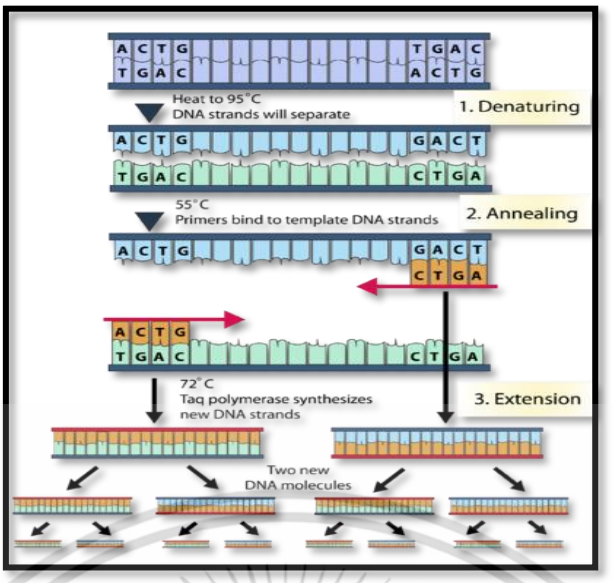
หลักการทำงานประกอบด้วยปฏิกิริยาสำคัญ 3 ขั้นตอน และหมุนเวียนต่อเนื่องกันไป ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน (รูปที่ 2.11)

1. Denaturation เป็นขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอสายคู่ (Double strand DNA) ให้เป็นดีเอ็นเอเดี่ยว (Single stranded DNA) โดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิสูง 90-95 ˚c

2. Primer Annealing เป็นขั้นตอนการลดอุณหภูมิลงมาอยู่ที่ประมาณ 55-60˚c ทำให้ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ ขั้นตอนนี้ต้องควบคุมอุณหภูมิให้ลดต่ำลงในระดับที่ใกล้เคียงกับ Melting Temperature (Tm) ของไพรเมอร์ (โดยทั่วไปจะต่ำกว่า Tm 1–2 ˚c) เพื่อให้ไพรเมอร์สามารถจับกันกับดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยวตรงบริเวณที่มีลำดับเบสคู่สมกับไพรเมอร์

3. Primer Extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากส่วนปลาย 5' ของไพรเมอร์ไป 3’ ตามดีเอ็นเอต้นแบบแต่ละสาย โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ผลจากปฏิกิริยาการสังเคราะห์จะทำให้ได้ดีเอ็นเอสายใหม่ ซึ่งมีไพรเมอร์ ประกอบอยู่ด้วย ขั้นตอนนี้ใช้อุณหภูมิประมาณ 72-75 ˚c เพราะเป็นช่วงอุณหภูมิที่เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุด [27]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.10 แสดงการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส [30]

ข้อดีของเทคนิค พีซีอาร์

1. ใช้ DNA template หรือ ดีเอ็นเอต้นแบบที่ต้องการศึกษาในปริมาณน้อยระดับไมโครลิตร ไม่จำเป็นต้องมีความบริสุทธิ์มาก สามารถใช้ดีเอ็นเอจากเส้นผม อสุจิ หรือเซลล์ ขนาดเล็ก ๆ มาเป็นดีเอ็นเอ ต้นแบบได้

2. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้รวดเร็ว ประมาณ 1,000,000 เท่า ภายในเวลา 1 ชั่วโมง และสามารถนำดีเอ็นเอที่ได้ไปศึกษาต่อได้โดยตรง

3. สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ที่มีขนาดยาวได้ถึง 2,000 คู่เบส

4. ปฏิกิริยาเกิดขึ้นในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ จึงไม่ต้องมีการเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียให้ยุ่งยาก

ข้อจำกัดทางด้านเทคนิคของวิธีพีซีอาร์

1. ต้องทราบลำดับเบสของยีนที่ต้องการศึกษา

2. ต้องมีการสังเคราะห์ไพรเมอร์ขึ้น

3. อาจเกิดผลบวกปลอม (False-positive) เนื่องมาจากการปนเปื้อน

4. ความยาวของขนาดพีซีอาร์แม้ว่าพีซีอาร์จะสามารถทำให้ได้ผลผลิตที่มีขนาดยาว 10 kb ได้ แต่ส่วนใหญ่จะได้ผลดีที่สุดเมื่อขนาดของพีซีอาร์ไม่มากกว่า 2 kb เพราะถ้ายาวกว่านี้ความผิดพลาดจะมากขึ้น เนื่องจากไพรเมอร์ และ *Taq* DNA polymerase ทำงานไม่สมบูรณ์ โดยจะมีการจับ dNTPs ที่ไม่ถูกต้องมาต่อเข้าภายในสายดีเอ็นเอมากขึ้น

ข้อควรระวังในการทำพีซีอาร์

การปนเปื้อน (Contamination) ถึงแม้ว่าเทคนิคพีซีอาร์นี้จะเป็นวิธีที่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้มากหลายล้านเท่า แต่ก็สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนเพียงเล็กน้อยได้มากเช่นกัน ทำให้เกิดผลบวกปลอมได้ การปนเปื้อนอาจเกิดได้จาก

1. การปนเปื้อนขณะทำการสกัดแยกดีเอ็นเอหรือระหว่างทำการตรวจตัวอย่าง คือ Cross contamination

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การปนเปื้อนแบบ Carry over contamination เป็นการปนเปื้อนของผลผลิตพีซีอาร์ครั้งก่อน ซึ่งมักจะอยู่ในรูปละอองลอย (Aerosol) ที่มักเกิดขณะการเปิด-ปิดฝาหลอด และการปั่นตกตะกอน ละอองลอยนี้สามารถปนเปื้อนกับสิ่งต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการทั้งอุปกรณ์เครื่องมือและวัสดุต่าง ๆ รวมทั้งผิวหนัง ผม และมือผู้ปฏิบัติการได้ ดังนั้นจึงควรมีการระวังการปนเปื้อนให้มาก โดยเฉพาะการปนเปื้อนชนิด Carry-over contamination

2.13 เจลอิเล็กโตรโฟไรซีส (Gel Electrophoresis) [31]

เจลอิเล็กโตรโฟไรซีส (Gel Electrophoresis) คือ การวิเคราะห์ผลผลิตของพีซีอาร์ จากการย้อมดีเอ็นเอด้วย เอทิเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) หลังจากการผ่านกระบวนการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของ PCR ด้วย Electrophoresis แล้ววิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วที่สุดเหมาะสำหรับการตรวจสอบหาผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทราบขนาดแน่นอน และได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เพียงชนิดเดียว หรือจำนวนน้อยชนิดที่สามารถเห็นความแตกต่างของขนาดได้ชัดเจน หากเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดยาวกว่า 500 คู่เบส นิยมใช้อะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเจลในการตรวจหา แต่หากเป็นดีเอ็นเอที่สั้นกว่า 500 คู่เบส มักใช้อะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟไรซีส (Agarose gel electrophoresis) ดีเอ็นเอที่เกิดจากเทคนิคนี้ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ดังนั้นเพื่อตรวจหาผลิตภัณฑ์ของพีซีอาร์ ต้องนำตัวอย่างที่ทำพีซีอาร์มาทำการแยกหาดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่าอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟไรซีส ซึ่งเป็นการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้น (Agarose gel) โดยระยะทางที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ไปได้ขึ้นกับขนาดของดีเอ็นเอ และกระแสไฟฟ้าที่ใช้ดีเอ็นเอที่แยกโดยวิธีนี้มองเห็นได้เมื่อย้อมด้วยสีพิเศษซึ่งเรืองแสงภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต

รูปที่ 2.11 การตรวจผลโดย Gel Electrophoresis [32]

2.14 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Motoki และคณะ [33] ได้ทำการศึกษางานวิจัยเรื่องการใช้ Hydroxy naphthol blue หรือ HNB เป็นอินดิเคเตอร์ในการตรวจวัดเชิงสีร่วมกันกับเทคนิคการเพิ่มขยายปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (Lamp) ซึ่งส่งผลให้การตรวจวัดเชิงสีสามารถใช้ตาเปล่าในการบอกความแตกต่างของการตรวจวัดดีเอ็นเอได้ ซึ่งสังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น โดยทำการละลาย HNB ในน้ำให้มีความเข้มข้น 20 mM และละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 10 mM จากการศึกษาพบว่า HNB ที่นำมาเป็นอินดิเคเตอร์ที่ในการตรวจวัดเชิงสีสำหรับวัดความเข้มข้นของ Mg^{2+} เหมาะสมที่ pH 10.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลายที่ประกอบไปด้วยไอออนของ Mg^{2+} ที่มีความเข้มข้น 8 mM และไม่มีการเติมดีเอ็นเอ พบว่าสีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีม่วงแดงเข้มที่ pH 8.6-9.0 และเกิดเป็นสีม่วงที่ pH 8.4 แต่เมื่อหลังจากการเติมดีเอ็นเอที่ความเข้มข้น 1.4 mM ลงไปในสารละลายสีของ HNB จะเปลี่ยนจากสีม่วงแดงเข้มไปเป็นสีม่วง โดยไม่คำนึงถึงค่า pH สีที่เปลี่ยนไปเกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างไอออนของ Mg^{2+}และดีเอ็นเอ ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงเมื่อ Mg^{2+} ทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอ ความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่สุดในการวัดคือ 650 nm ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของ Mg^{2+} เพิ่มขึ้น

Shigehiko และคณะ [34] ได้ทำการศึกษาการใช้ Leuco crystal violet (LCV) เป็นอินดิเคเตอร์ในการตรวจวัดเชิงสีร่วมกันกับเทคนิคการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (Lamp) โดย LCV เกิดจากการทำปฏิกิริยาของ Crystal violet (CV) กับสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ (Na_2SO_3) ซึ่งการใช้ LCV เป็นเทคนิคการตรวจวัดเชิงสีแบบใหม่ จากการศึกษาพบว่า LCV สามารถเปลี่ยนกลับไปเป็น CV ได้โดยการเติม dsDNA ดังนั้นจึงสามารถวัดค่า Positive และ Negative ได้ สีที่วัดได้จะเปลี่ยนจากไม่มีสีกลายไปเป็นสีม่วง การตรวจวัดเชิงสีนี้มีความว่องไวเมื่อเทียบกับปฏิกิริยา Lamp ค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้ของ dsDNA คือ 7.1 ng/µl และการตรวจจับ dsDNA ยังมีประสิทธิภาพสูง ไม่มีการรบกวนของ Single strand DNA และ dNTP ซึ่ง LCV สะดวกกับการตรวจวัดด้วยเทคนิคเชิงสีมาก เนื่องจากสามารถตรวจวัด DNA ได้โดยตรงไม่ต้องเปลี่ยนให้เป็น by-product ก่อน วิธีการตรวจวัดเชิงสีควบคู่กับ เทคนิค Lamp โดยใช้ LCV เป็นอินดิเคเตอร์มีประโยชน์สำหรับการตรวจสอบเฉพาะจุดของลักษณะทางพันธุกรรมซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วขึ้นในการตรวจวัด

Jinzhao และคณะ [35] ได้ทำการศึกษาการตรวจวัดหา Zika virus เนื่องจากเกิดการแพร่ระบาดอย่างรวดเร็วของ Zika virus โดยงานวิจัยนี้ได้เพิ่มขยายปริมาณของดีเอ็นเอ แล้วนำมาตรวจวัดโดยใช้ Leuco crystal violet (LCV) เป็นอินดิเคเตอร์ในการตรวจวัดเชิงสี การศึกษาพบว่าผลของกการตรวจวัดสามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าโดยดูจากสีที่เปลี่ยนไป โดยไม่ต้องใช้อุปกรณ์ที่แพง ความเข้มข้นของ LCV เป็น 0.5 mM ซึ่งการตรวจสอบจากตัวอย่างน้ำลาย โดย Zika virus มีความเข้มเข้มข้นที่แตกต่างกัน ในตอนสุดท้ายLCV จะรวมกับสารผสมในปฏิกิริยา ผลที่ได้คือ LCV เปลี่ยนจากใสไม่มีสีเป็นสีม่วง เมื่อทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอ

ขนิษฐา และคณะ [36] ได้ทำการศึกษาการพัฒนาเทคนิค Real-time PCR ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของถั่วเหลือง GM และผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูปได้ทดลองเปรียบเทียบวิธีการสกัด DNA ที่เหมาะสมกับกากของถั่วเหลือง 4 ตัวอย่าง สำหรับผลิตภัณฑ์แปรรูป ใช้ตัวอย่างจำนวน 14 ตัวอย่าง ใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอ 4 แบบที่แตกต่างกัน หลังจากนั้นแบ่งดีเอ็นเอออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ไม่ต้องทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ และกลุ่มที่ 2 ทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์โดยใช้ Wizard®Miniprep DNA Purification Kit เป็นวิธีที่ดีที่สุด เปรียบเทียบกับวิธี Gene Scan extraction และผ่านการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์เช่นเดียวกัน สำหรับผลิตภัณฑ์แปรรูปผลการทดลองพบว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์แปรรูปและขบวนการแปรรูปที่แตกต่างกัน การพัฒนาเทคนิคการตรวจวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนถั่วเหลือง GM ด้วยวิธี Real-time PCR โดยเริ่มจากการออกแบบและคัดเลือก Primers และ Probe จำนวน 2 ชุด นำมาศึกษาในการเพิ่มปริมาณยีน Roundup Ready และ Lectin ด้วยวิธี Real-time PCR พบว่าคู่ Primers sttmf3a/sttm2a และ Probe Sttmpa สามารถเพิ่มปริมาณยีน Roundup Ready ส่วน CP4 EPSPS ขนาด 145 bp และคู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Primers sltm1/sltm2 และ Probe Sltmp เพิ่มปริมาณยีน Lectin ขนาด 81 bp ได้เป็นสัดส่วนโดยตรงกับค่า log ของความเข้มข้นของ DNA และสามารถตรวจหาปริมาณการปนเปื้อนของถั่วเหลือง GM ได้ในปริมาณต่ำสุดถึง 0.1%

J.C.Jokerst และคณะ [37] ได้ทำการศึกษาการใช้กระดาษเป็นเครื่องมือในการตรวจวัดเชื้อแบคทีเรียอย่างง่ายด้วยเทคนิคการวัดเชิงสีเนื่องจากในอาหารมีเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค โดยวิธีการตรวจวัดนี้จะแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีชีวิตกับเชื้อแบคทีเรียที่ตายแล้วออกจากกัน ซึ่งในการตรวจวัดของอุปกรณ์นี้จะตรวจวัดเชื้อแบคทีเรียที่มีชีวิตอยู่เท่านั้น โดยงานวิจัยนี้ได้ตัดกระดาษกรอง Whatman#1 ขนาด 7 mm เป็นวงกลม แล้วนำไปพิมพ์เคลือบแวกซ์ในเครื่องปริ้น เครื่องปริ้นจะละลายแวกซ์ในที่ของน้ำหมึกโดยจะสร้างเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำลงบนกระดาษกรอง โดยจะใช้อุณหภูมิ 150 องศา เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้แวกซ์ที่เคลือบไว้ละลายหมด ซึ่งการประดิษฐ์นี้ต้องตรวจดูรอยรั่วและสามารถควบคุมการไหลของของเหลวได้ด้วย หลังจากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสสำหรับการตรวจวัดเชื้อแบคทีเรีย รีเอเจ้นท์ สารละลายบัฟเฟอร์ และสารละลายตัวอย่างจะปิเปตลงในหลุมกระดาษที่เตรียมไว้ในที่ที่มีการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เกิดขึ้น ปริมาตรสารที่ใช้ทั้งหมดเป็น 30 µl เมื่อปฏิกริยาเกิดขึ้นสมบูรณ์แล้วหลุมที่หยดสารก็จะแห้ง หลังจากนั้นก็ถ่ายภาพแล้วเข้าเครื่องสแกน ผลของการตรวจวัดเชิงสีดูจากความเข้มของสีเทาจากการถ่ายภาพโดยถ้ามีเอแบคทีเรียสีก็จะเริ่มเป็นสีเทาถ้าเชื้อโรคมีปริมาณมากความเข้มของสีเทาก็จะเพิ่มขึ้นหลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์สีโดยการใช้โปรแกรม Image J

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์

3.1.1 สารเคมี

1. ตัวอย่างดีเอ็นเอของข้าว 2 สายพันธุ์ คือ ข้าวขาวหอมมะลิ 105 (KDML 105) และข้าวไรซ์เบอรี่ (RB_5), สกัดเอง
2. Calcium chloride ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), ACS-For analysis- CARLO ERBA Thailand
3. Magnesium chloride ($MgCl_2$), ACS-For analysis- CARLO ERBA Thailand
4. Luria Bertani broth (LB Broth), Sigma-Aldrich Co. LLC Thailand
5. Luria Bertani Kanar (LB Kanar), Sigma-Aldrich Co. LLC Thailand
6. ชุด Kit สำหรับทำ PCR, RBC *Taq* DNA Polymerase Thailand
7. Tris-HCl Buffer pH 8.8, NP Chem Supply Thailand
8. เชื้อแบคทีเรีย E. coli สายพันธุ์ XL-1-Blue, Sigma-Aldrich Co. LLC Thailand
9. DI Water
10. Tris-Borate Buffer (TBE EDTA), Sigma-Aldrich Co. LLC Thailand
11. Agarose Gel, Gammaco Thailand
12. Sodium sulphite (Na_2SO_3), ACS-For analysis- CARLO ERBA Thailand
13. Magnesium sulfate ($MgSO_4$), ACS-For analysis- CARLO ERBA Thailand
14. Crystal Violet (CV),), Sigma-Aldrich Co. LLC Thailand
15. Hydroxy naphthol blue (HNB), Sigma-Aldrich Co. LLC Thailand
16. น้ำกลั่น
17. Ethanol 70% (C_6H_6O), ACS-For analysis- CARLO ERBA Thailand
18. Forward Primer 2 ชนิด คือ F10 และ F20, NP Chem Supply Thailand
19. Reverser Primer คือ R20, NP Chem Supply Thailand
20. Taq DNA Polymerase, RBC *Taq* DNA Polymerase Thailand
21. dNTP, ACS-For analysis- CARLO ERBA Thailand
22. Loading Dye คือ Bromophenol Blue, ACS-For analysis- CARLO ERBA Thailand
23. ดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA Ladder), ACS-For analysis- CARLO ERBA Thailand

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือตรวจวัด

1. ไมโครปิเปต (Micro pipet), Nichipet EX Japan
2. หัวทิป ปิเปต (Pipet Tips), Central Ave Union city Califonai USA
3. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (Microcentrifuge Tubes), Central Ave Union city Califonai USA
4. บีกเกอร์ (Beaker)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. จานเพาะเชื้อ (Petri Dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 x 60 mm, BIO-RAD California 94547 USA

6. เครื่อง Thermal Cycier T100, BIO-RAD California 94547 USA

7. เครื่องปั่นเหวี่ยง StripSpin 12 Mini Centrifuge, Becthai Bangkok Equipment and Chemical Co., Ltd Thailand

8. ห่วงเขี่ยเชื้อ (inoculating loop), BIO-RAD California 94547 USA

9. ช้อนตักสารเคมี (Dispensing spoons)

10. ตะแกรง 4 ทาง (4-way microtube)

11. ขวดน้ำกลั่น (Washing Bottle)

12. แท่งแก้วคนสาร (Glass stirring rod)

13. แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ (Spreader glass)

14. ถุงมือไนไตรกันสาร สีฟ้า (Nitrile gloves)

15. เครื่องชั่งน้ำหนักดิจิตอล ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical Balance), BIO-RAD California 94547 USA

16. ตะเกียงแอลกอฮอล์

17. เครื่องรันเจล (Electrophoresis System) , BIO-RAD California 94547 USA

18. ตู้บ่มเชื้อ (Climate incubator) ,LAB MICRO Co.,Ltd. Thailand 10940

19. เครื่อง UV/vis spectrophotometer รุ่น Hitachi Spectrophotometer Model U-2900 Double Beam Spectrophotometer Thailand

20. ไมโครคิวเวต (Micro cuvette), Starna Scientific Ltd United kingdom

21. กระดาษกรอง (Filter Paper Whatman), Starlab Scientific Co.,Ltd Thailand

22. เครื่องสแกนรุ่น Scanner Brother ADS-1600W, Brother Co.,Ltd. Thailand

23. โปรแกรม Image J

3.2 การศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นของ Mg^{2+} บนเส้นสเปกตรัมของปฏิกิริยาของ Hydroxy Naphthol Blue

3.2.1 การสร้างกราฟมาตรฐานการตรวจวัดแมกนีเซียม

1. เตรียมสารละลายแมกนีเซียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 14 mM โดยใช้ไมโครปิเปต ดูดสารละลายแมกนีเซียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 50 mM มาปริมาตร 0, 4, 8, 12, 16, 20 และ 28 µL ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 mL ปรับปริมาตรจนเป็น 100 µL ด้วยน้ำปราศจากไอออน จะได้สารละลายแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 14 mM

2. ปิเปตสารละลายแมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 14 mM มา 80 µL ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 mL ตามลำดับ เติมสารละลาย Tris-HCl Buffer pH 8.8 ความเข้มข้น 20 mM ลงไป 10 µL จากนั้นเติมสารละลาย HNB ความเข้มข้น 0.12 mM 10 µL

3. สังเกตสีของสารละลาย บันทึกภาพและ ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสง 400 -750 nm สร้างกราฟแสดงสเปกตรัมระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับค่าความยาวคลื่นของสารละลาย HNB

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 nm 3 ซ้ำ นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย HNB กับค่าความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่ความเข้มข้น 0-14 mM

3.3 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย LCV เมื่อทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอ

3.3.1 การหาความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ (Na_2SO_3) ที่ทำปฏิกิริยากับสารละลาย CV มากเกินพอ

1. เตรียมสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ (Na_2SO_3) ที่ความเข้มข้น 20, 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 mM โดยใช้ไมโครปิเปต ดูดสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 100 mM มาปริมาตร 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 µL ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 ml ปรับปริมาตรจนเป็น 10 µL ด้วยน้ำปราศจากไอออน จะได้สารละลายโซเดียมซัลไฟต์ความเข้มข้น 20, 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 mM

2. ปิเปตสารละลาย CV ที่ความเข้มข้น 5 mM ลงในสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ความเข้มข้น 20, 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 mM ปริมาตรหลอดละ 0.5 µL

3. ปิเปต Tris-HCl pH 8.8 ที่ความเข้มข้น 200 mM ลงในสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ทั้ง 8 หลอด ปริมาตรหลอดละ 10 µL

3. สังเกตสีของสารละลาย บันทึกภาพ และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 350-750 nm บันทึกผลการทดลอง

4. นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟแสดงสเปกตรัมระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับค่าความยาวของสารละลาย LCV ที่ช่วงความยาวคลื่น 350- 750 nm เพื่อดูค่าการดูดกลืนแสงที่ต่ำที่สุดมาใช้ในขั้นตอนการทดลองขั้นตอนต่อไป

3.3.2 การศึกษาความแตกต่างสีของสาร Leuco Crystal Violet (LCV) เมื่อทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอมาตรฐาน

1. เตรียมสารละลาย LCV โดยเตรียมจากสารละลายผสม 100 µLประกอบด้วย [200] mM Tris-HCl pH 8.8 20 µL [5] mM CV 1.0 µL และ [80] mM โซเดียมซัลไฟต์ 20 µL ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนปริมาตร 100 µL

2. นำดีเอ็นเอมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 100 ng/µL ปิเปตใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 mL ปริมาตร 5 µL ปรับปริมาตรโดยน้ำปราศจากไอออน จนปริมาตรเป็น 50 µL

3. ปิเปตสารละลาย LCV ที่เตรียมได้จากข้อที่ 3.3.2.1 ปริมาตร 50 µL ลงในหลอด dsDNA นำ Stock Solution ของ CV ที่ความเข้มข้น 5 mM ดูดสารละลายปริมาตร 6.25 µL ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนเป็น 50 µL ได้ CV ที่ความเข้มข้น 62.5 µM

4. สังเกตสีของสารละลายทั้ง 3 สาร บันทึกภาพ และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400-700 nm บันทึกผลการทดลอง

5. นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟแสดงสเปกตรัมระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับค่าความยาวที่ช่วงความยาวคลื่น 400- 750 nm ของสารละลายทั้ง 3 สาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 การศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นของดีเอ็นเอ บนเส้นสเปกตรัม เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายลิวโคคริสตัล ไวโอเลต (LCV)

1. นำดีเอ็นเอมาตรฐานที่ความเข้มข้น 150 ng/µL ที่ มาทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ng/µL โดยใช้ไมโครปิเปตดูดสารปริมาตร ดังตารางที่ 3.1 ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออน จนได้ปริมาตร 100 µL

ตารางที่ 3.1 ตารางแสดงความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐาน ชนิด KDML 105 และ RB_5 ที่ช่วงความเข้มข้น 0-100 ng/µL

ความเข้มข้นของ dsDNA (ng/mL)	ปริมาตรของดีเอ็นเอมาตรฐาน (µL)
0	0.00
20	6.67
40	13.34
60	20.00
80	26.67
100	33.32

2. นำดีเอ็นเอมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ng/µL ปิเปตลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 mL ปริมาตร 5 µL ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนเป็น 50 µL

3. ปิเปตสารละลาย LCV ปริมาตร 50 µL ลงในสารละลายทั้ง 6 หลอด

4. สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย บันทึกภาพ และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นช่วง 350-700 nm

5. นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟแสดงสเปกตรัมระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับค่าความยาวคลื่นของสารละลาย LCV ที่ช่วงความยาวคลื่น 350-700 nm

6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 582 nm 3 ซ้ำ นำมาสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐานช่วง 0-100 ng/µL กับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย LCV ที่ความยาวคลื่น 582 nm เพื่อหาค่าเฉลี่ย ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

7. ปิเปตสารละลาย LCV ที่มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐาน 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ng/µL ที่ได้จากการทดลองข้างต้น ความเข้มข้นละ 5 µL ลงบนกระดาษกรอง ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำผลที่ได้ สแกนด้วยเครื่องสแกน Scanner Brother ADS-1600W

8. นำรูปที่ได้จากการสแกนมาทำการวิเคราะห์ความเข้มของสีด้วยโปรแกรม Image J เพื่อหาค่า RGB บันทึกผลการทดลอง

9. นำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์จากโปรแกรม Image J มาสร้างกราฟมาตรฐานแสดงค่าเฉลี่ย RGB (ความเข้มสีของสารละลาย LCV) กับค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐานที่ 0-100 ng/µL เพื่อหาค่าเฉลี่ย ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การประยุกต์วิธีการวิเคราะห์เทคนิคเชิงสีร่วมกับการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย

3.5.1 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) สำหรับผลิต PCR Product ของดีเอ็นเอ

1. การทำ PCR เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างรวดเร็วและจำเพาะเจาะจง ทำโดยการเตรียมสาร Master Mixture สำหรับการทำ PCR เพื่อการผลิต PCR Products ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาในปริมาตร 72 µL โดยมีส่วนประกอบดังตารางที่ 3.2 (ส่วนผสมสำหรับทำ PCR 6 ชุด)

ตารางที่ 3.2 ตารางแสดงสารผสมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสสำหรับผลิต PCR Product

สาร	ปริมาตร(µL)
10X Reaction Buffer	7.5
10mM dNTP Mix	1.5
Primer F20	1.5
Primer R10	1.5
RBC *Taq* DNA Polymerase	0.6
H_2O Clave	59.4
ปริมาตรรวมทั้งหมด	72

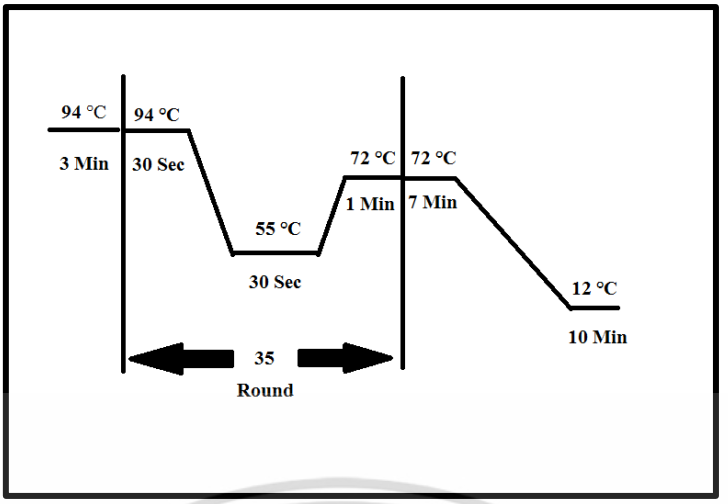
2. การผสมสาร Master Mixture นั้น จะผสมลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 0.2 mL ในแต่ละหลอด โดย มี Blank (สารละลายที่ไม่มีดีเอ็นเอตัวอย่าง) และ มี DNA Template จากข้าว 2 สายพันธุ์ คือ ข้าวหอมมะลิ (KDML 105) และ ข้าวไรซ์เบอรี่ (RB5) ที่มีความเข้มข้น 100 ng/µL โดยปิเปต DNA Template ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ขนาด 0.2 mL ปริมาตร 1 µL ชนิดละ 2 หลอด

3. ปิเปตสาร Master Mixture ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ แต่ละหลอดปริมาตร 11.5 µL แล้วปิดฝา

4. ผสมสารด้วยเครื่อง Quick Spin ก่อนนำเข้าเครื่อง Thermal Cycle โดยตั้งอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ดังรูปที่ 3.1

5. จากที่นำสารออกจากเครื่อง Thermal Cycle ควรเก็บสารไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อรักษาสภาพของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.1 แสดงอุณหภูมิช่วงต่าง ๆ ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสสำหรับผลิต PCR Products

3.5.2 การวิเคราะห์ผล PCR Products ด้วยเทคนิค Agarose Gel Electrophoresis

1. การวิเคราะห์ผลจะต้องเตรียมเจลโดย ชั่ง Agarose จำนวนที่ต้องการลงในขวดรูปชมพู่ แล้วจึงเติมสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-borate-EDTA (TBE) นำไปละลายในไมโครเวฟและทิ้งให้เย็นลง

2. เท Agarose Gel ที่ได้ลงใน Gel chamber ที่วาง comb ไว้แล้ว ปล่อยให้เซ็ตตัวอย่างน้อย 15 นาที แล้วจึงนำถาดเจลไปวางในเครื่อง Electrophoresis

3. เทบัฟเฟอร์ TBE ลงไปจนท่วมเจลขึ้นมาประมาณ 1-2 mm

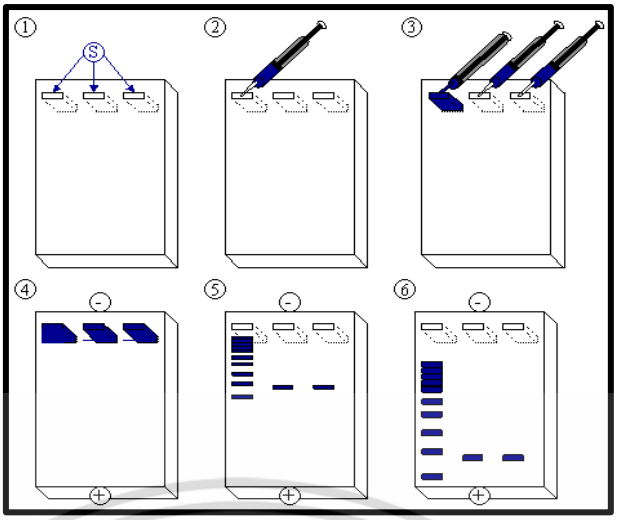
4. ทำการปิเปต loading dye 1 µL ผสมลงใน PCR Product แล้วผสมสารด้วยเครื่อง Quick Spin 2- 4 วินาที

5. ทำการปิเปต PCR Products ลงในหลุมเจล 5 µL ทุกครั้งต้องมีดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดแน่นอนเป็นตัวเปรียบเทียบ

6. ทำการต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่อง Electrophoresis ให้ด้านที่มีตัวอย่างดีเอ็นเออยู่ทางขั้วลบจากนั้นตั้งกระแสไฟฟ้าให้มีความต่างศักย์ที่ 100 Volt ใช้เวลาประมาณ 20-30 นาที จะพบว่าแถบสีน้ำเงินของ loading dye วิ่งไปอยู่ด้านล่าง

7. หยุดกระแสไฟฟ้าและนำเจลออกจากถาด จากนั้นนำมาตรวจดู แถบดีเอ็นเอโดยดูการเรืองแสงภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต และบันทึกผลโดยการถ่ายภาพ แสดงดังรูปที่ 3.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.2 แสดงภาพขั้นตอนของกระบวนการ Gel Electrophoresis [38]

3.6 การวิเคราะห์เทคนิคเชิงสีร่วมกับการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR)

1. ปิเปต PCR Products ทั้ง 2 ชนิด มาชนิดละ 5 µL ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 mL ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนเป็น 50 µL

2. ปิเปตสารละลาย LCV ลงในแต่ละหลอด ปริมาตรหลอดละ 50 µL

3. ผสมสารด้วยเครื่อง Quick Spin ประมาณ 4-6 วินาที วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

4. สังเกตสีของ KDML 105 และ RB_5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วง 350-700 nm โดย Blank คือสารละลายที่ปราศจากดีเอ็นเอที่ผ่านกระบวนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

5. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างกราฟแสดงสเปกตรัมระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับค่าความยาวคลื่นของสารละลาย LCV ที่มีดีเอ็นเอต่างชนิดกัน

6. ปิเปต PCR Products ทั้ง 2 ชนิด มาชนิดละปริมาตร 5 µL ลงบนกระดาษกรอง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

7. ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำผลไปสแกนด้วยเครื่องสแกน Scanner Brother ADS-1600W

8. นำรูปที่ได้จากการสแกนมาทำการวิเคราะห์ความเข้มของสีด้วยโปรแกรม Image J เพื่อหาค่าเฉลี่ย RGB (ความเข้มสีของสารละลาย LCV) บันทึกผลการทดลอง

9. นำค่าที่ได้จากการตรวจวัดความเข้มของสี มาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย RGB ของดีเอ็นเอที่มียีน Badh2 กับยีนที่ไม่มี Badh2 โดยการสร้างแผนภูมิแท่ง บันทึกภาพ และผลการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 การศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นของ Mg^{2+} บนเส้นสเปกตรัมของปฏิกิริยาของ Hydroxy Naphthol Blue (HNB)

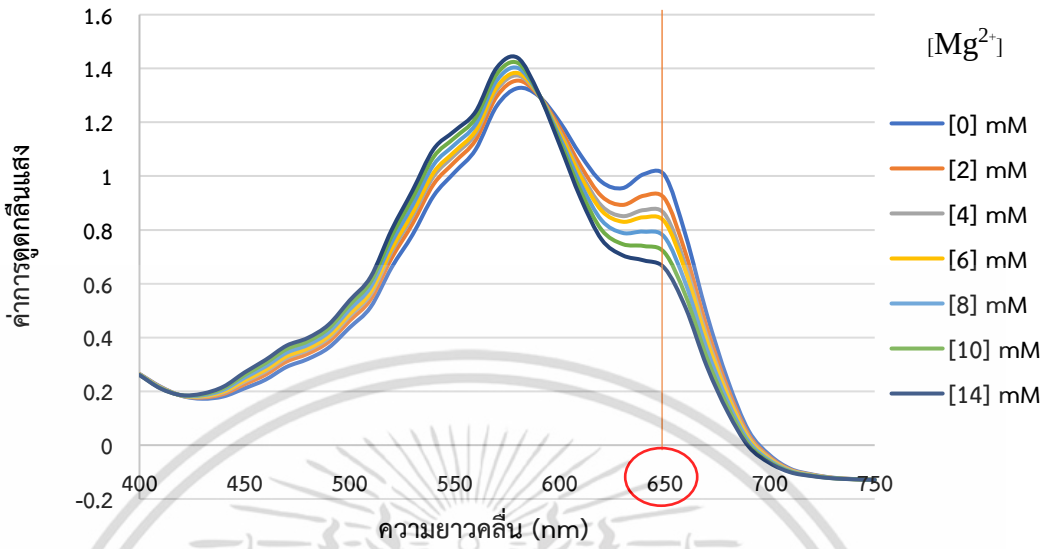
จากการทดลองศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นของ Mg^{2+} บนเส้นสเปกตรัมของปฏิกิริยาของ HNB พบว่าสีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีม่วงเพิ่มขึ้น ตามความเข้มข้นของแมกนีเซียม เนื่องจากปฏิกิริยาของสารละลาย HNB เป็นการวิเคราะห์แบบ By Product ซึ่งก่อนการเพิ่มขยายยีน แมกนีเซียมจะจับกับสารละลาย HNB เกิดเป็นสารละลายสีม่วง โดยปกติแล้ว dNTP จะเป็นอิสระ แต่หลังจากการเพิ่มขยายยีนหมู่ฟอสเฟตจาก dNTP จะเข้ามาแทนที่ HNB แล้วทำปฏิกิริยากับแมกนีเซียม และการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอ สารละลายเปลี่ยนไปเป็นสีน้ำเงินมากยิ่งขึ้น จากการทดลอง เมื่อความเข้มข้นของแมกนีเซียมเพิ่มมากขึ้นสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีม่วงเข้มมากขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.1

รูปที่ 4.1 แสดงสีของสารละลาย HNBเมื่อทำปฏิกิริยากับแมกนีเซียมที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 14 mM ตามลำดับ

เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายมีความใกล้เคียงกันแยกด้วยตาเปล่าได้ยาก จึงนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 400 – 750 nm พบว่าได้ผลของสเปกตรัมเพื่อดูความแตกต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมต่างกันได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กราฟแสดงสเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงและค่าความยาวคลื่นช่วง 400- 750 nm ของสารละลาย HNB ที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียม 0-14 mM



รูปที่ 4.2 แสดงสเปกตรัมระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย HNB ที่มีความเข้มข้นของแมกนีเซียม 0-14 mM ช่วงความยาวคลื่นช่วง 400-750 nm

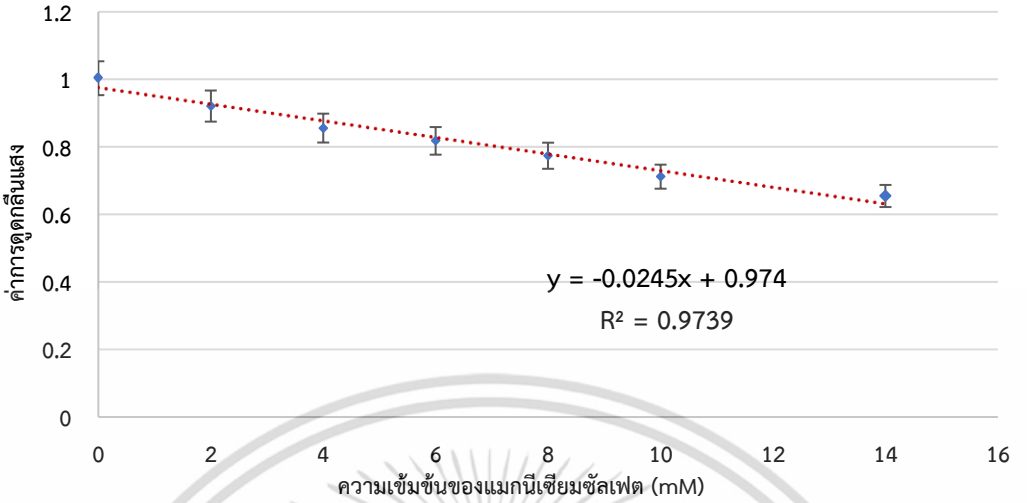
จากสเปกตรัมในรูปที่ 4.2 จะสังเกตเห็นได้ว่าที่ความยาวคลื่นสูงสุดประมาณ 580 nm เมื่อความเข้มข้นของแมกนีเซียมเพิ่มขึ้นค่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มขึ้น แต่เกิดการแยกของพีคที่ไม่ดี จึงนำค่าความยาวคลื่นที่ 650 ซึ่งมีการแยกของพีคที่ชัดเจนกว่ามาตรวจวัดซ้ำ เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานดูผลกระทบความเข้มข้นที่แมกนีเซียมต่อค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย HNB

ตารางที่ 4.1 ผลการทดลองของสารละลาย HNB โดยทำการทดสอบในช่วงความเข้มข้นของแมกนีเซียม 0-14 mM เมื่อทำปฏิริยาที่อุณหภูมิห้อง ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 650 nm ปริมาตรที่ใช้วิเคราะห์ คือ 50 µL

ความเข้มข้น Mg^{2+}(mM)	ความยาวคลื่นที่ 650 nm			$\bar{x}$	SD	%RSD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3			
0	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.03
2	0.93	0.92	0.92	0.92	0.01	0.55
4	0.86	0.85	0.86	0.85	0.01	0.81
6	0.80	0.83	0.82	0.81	0.01	1.80
8	0.77	0.77	0.77	0.77	0.00	0.11
10	0.71	0.71	0.71	0.71	0.00	0.35
14	0.61	0.60	0.65	0.65	0.00	0.49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 nm กับความเข้มข้นของแมกนีเซียมที่ความเข้มข้น 0-14 mM



รูปที่ 4.3 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย HNB กับแมกนีเซียมที่ความเข้มข้น 0-14 mM

จากกราฟมาตรฐานในรูปที่ 4.3 จะเห็นได้ว่าเมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 nm มาสร้างกราฟมาตรฐานค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย HNB จะแปรผกผันกับความเข้มข้นของแมกนีเซียม คือ เมื่อความเข้มข้นของแมกนีเซียมเพิ่มขึ้นค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย HNB จะลดลง และช่วงความเป็นเส้นตรงของสารละลายแมกนีเซียมที่ความเข้มข้นในช่วง 0-14 mM ได้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of Determination) เท่ากับ 0.9739

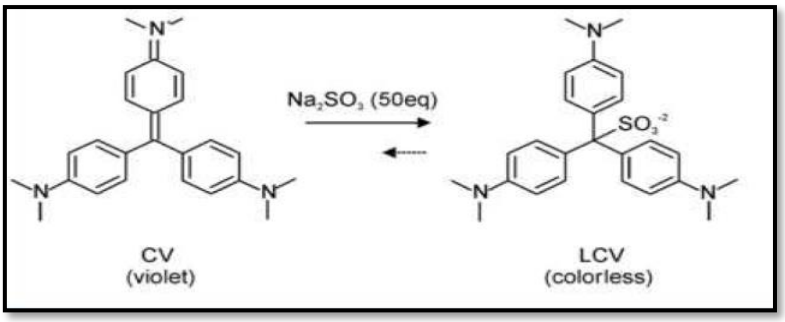
จากการทดลองพบว่า การเปลี่ยนแปลงของสีของสารละลายไม่ชัดเจน ทำให้แยกสีของสารละลายได้ยาก ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายที่ได้ไม่ชัดเจน จึงไม่นำสารละลาย HNB ศึกษาต่อในขั้นตอนต่อไป และศึกษา Intercalating dye สารอื่นมาศึกษาต่อไป คือ สารละลาย LCV

4.2 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย LCV เมื่อทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอ

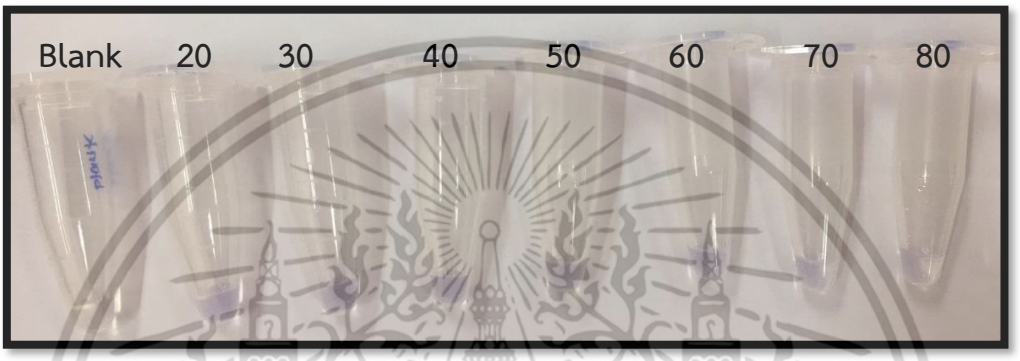
4.2.1 การหาความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ (Na_2SO_3) ที่ทำปฏิกิริยากับสารละลาย CV มากเกินพอ

จากการทดลองหาความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย CV พอดี พบว่า เมื่อความเข้มข้นของโซเดียมซัลไฟต์เพิ่มขึ้นสีของสารละลาย LCV จะเปลี่ยนจากสารละลายสีม่วงเป็นใสไม่มีสี และที่ความเข้มข้น 80 mM เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าจะเห็นว่าสีของสารละลายจะค่อนข้างใสกว่าที่ความเข้มข้นอื่น ๆ เนื่องจากหมู่ซัลไฟต์ของสารละลายโซเดียมซัลไฟต์จะเข้าจับสารละลาย CV ทำให้พันธะคู่ของสาร CV สลาย และสีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีใส ดังรูปที่ 4.4 และจะสังเกตสีของสารละลายจากการทดลอง ดังแสดงในรูป 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

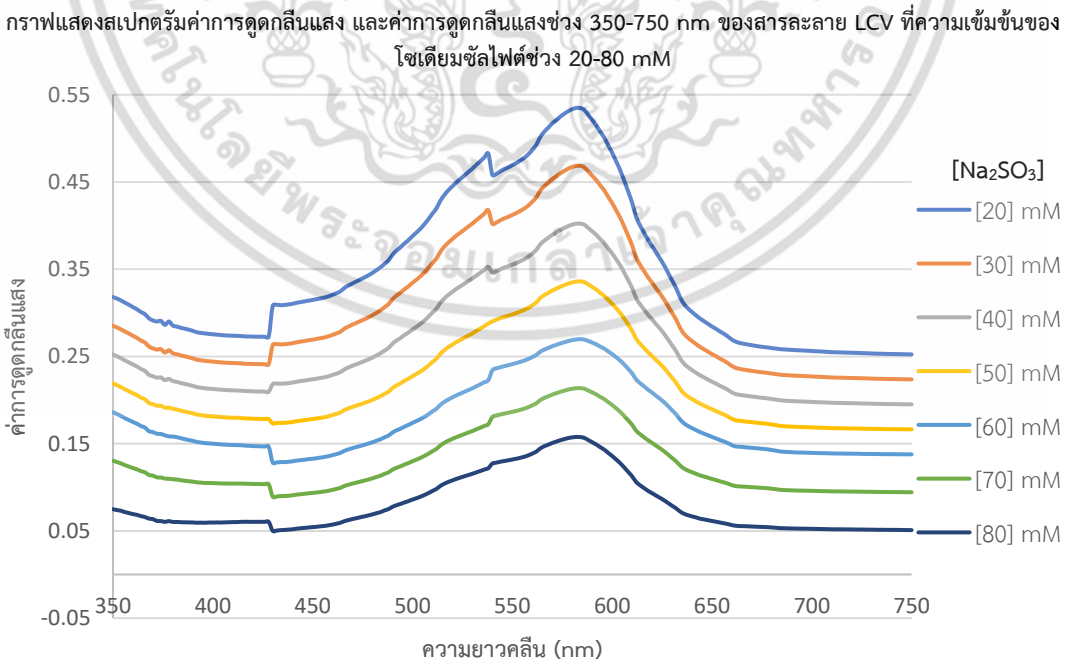


รูปที่ 4.4 แสดงการเกิดปฏิกิริยาของสารละลาย CV กับสารละลายโซเดียมซัลไฟต์



รูปที่ 4.5 แสดงสีของสารละลาย LCV ที่ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ที่ 20-80 mM

เนื่องจากสารละลายมีความเข้มสีใกล้เคียงกัน สังเกตได้ด้วยตาเปล่าได้ยาก จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 350 – 750 nm พบว่าได้ผลของสเปกตรัม ดังแสดงในรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 แสดงสเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย LCV ที่ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ความเข้มข้น 20-80 mM ที่ช่วงความยาวคลื่น 350-750 nm

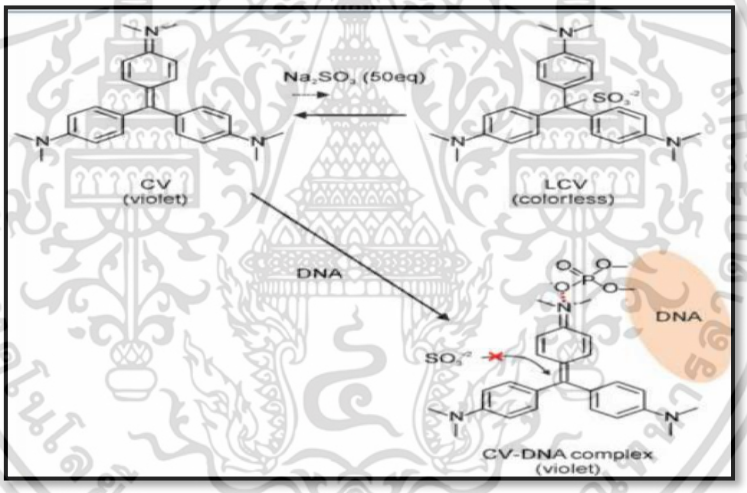
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 4.6 ค่าการดูดกลืนแสง พบว่าที่สารละลายโซเดียมซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 80 mM มีค่าการดูดกลืนแสงที่เข้าใกล้ 0 มากที่สุด แสดงว่าสารละลายสีของสารละลายที่ใกล้เคียง Blank ซึ่งคือน้ำกลั่น จึงนำสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 80 mM มาใช้ในการทดลองในขั้นตอนต่อไป

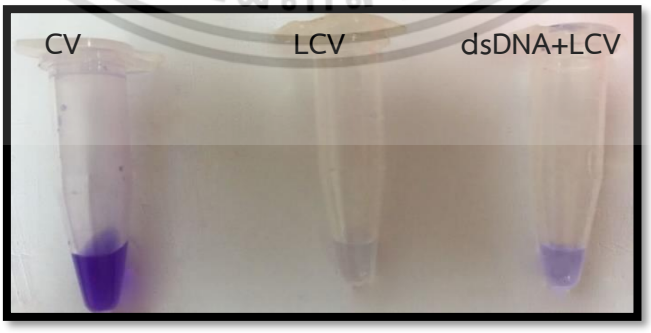
การหาความเข้มข้นของโซเดียมซัลไฟต์ที่นำมาใช้ในการเตรียม LCV จะต้องใช้ความเข้มข้นที่มากเกินพอที่จะทำให้สารละลาย CV ที่มีสีม่วงเปลี่ยนเป็นสารละลาย LCV ซึ่งเป็นสารละลายใสไม่มีสีได้ และสามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงของสีได้อย่างชัดเจน

4.2.2. การศึกษาความแตกต่างสีของสาร Leuco Crystal Violet (LCV) เมื่อทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอมาตรฐาน

จากการทดลองศึกษาความแตกต่างสีของสารละลาย LCV เมื่อทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอมาตรฐาน เพื่อนำมาเปรียบเทียบสีกับสารละลาย CV และสารละลาย LCV พบว่าเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า สีของสารละลาย CV LCV และ LCV เมื่อทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอมาตรฐาน มีความเข้มสีที่ลดลงตามลำดับ เนื่องจากหมู่ซัลไฟต์ของโซเดียมซัลไฟต์จะถูกแทนที่ด้วยหมู่ฟอสเฟตของดีเอ็นเอทำให้สารละลายเปลี่ยนมาเป็นสีม่วง ดังแสดงในรูปที่ 4.7 และจากการทดลองจะเห็นการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย ดังแสดงในรูปที่ 4.8



รูปที่ 4.7 แสดงการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย LCV กับดีเอ็นเอ

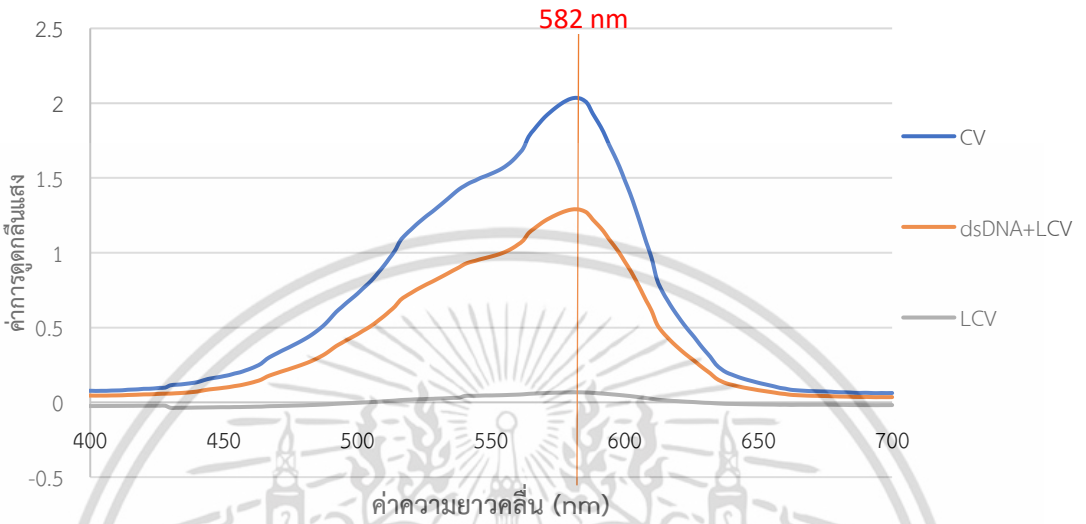


รูปที่ 4.8 แสดงผลการทดลองในการเปรียบเทียบสีของสารละลาย CV LCV และ LCV เมื่อทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 400 – 700 nm พบว่าได้ผลของสเปกตรัมของ CV LCV และ LCV เมื่อทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอมาตรฐาน ดังแสดงในรูปที่ 4.9

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความยาวคลื่นของ CV LCV และ LCV เมื่อทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอมาตรฐาน



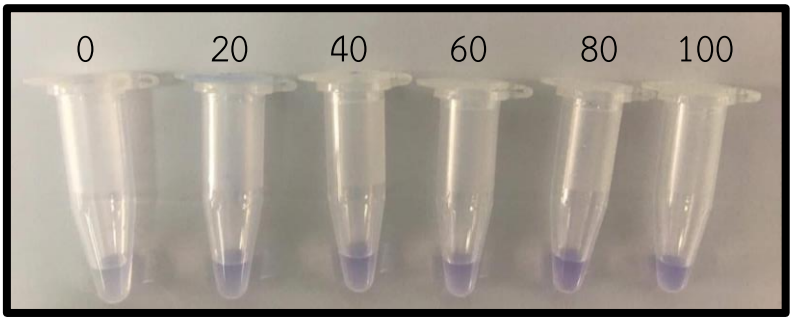
รูปที่ 4.9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความยาวคลื่นของ CV LCV และ LCV เมื่อทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอมาตรฐาน

จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 582 nm พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของ CV LCV และ LCV เมื่อทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอมาตรฐาน เป็น 2.03569 1.29061 และ 0.06725 ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปตามความเข้มสีของสารละลาย คือ เมื่อสีของสารละลายจางลง ค่าการดูดกลืนแสงจะลดลงตามลำดับ และมีค่าการดูดกลืนแสงที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน

4.3 การศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นของดีเอ็นเอ บนเส้นสเปกตรัมเมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายผสมลิวโคคริสตัล ไวโอเลต (LCV)

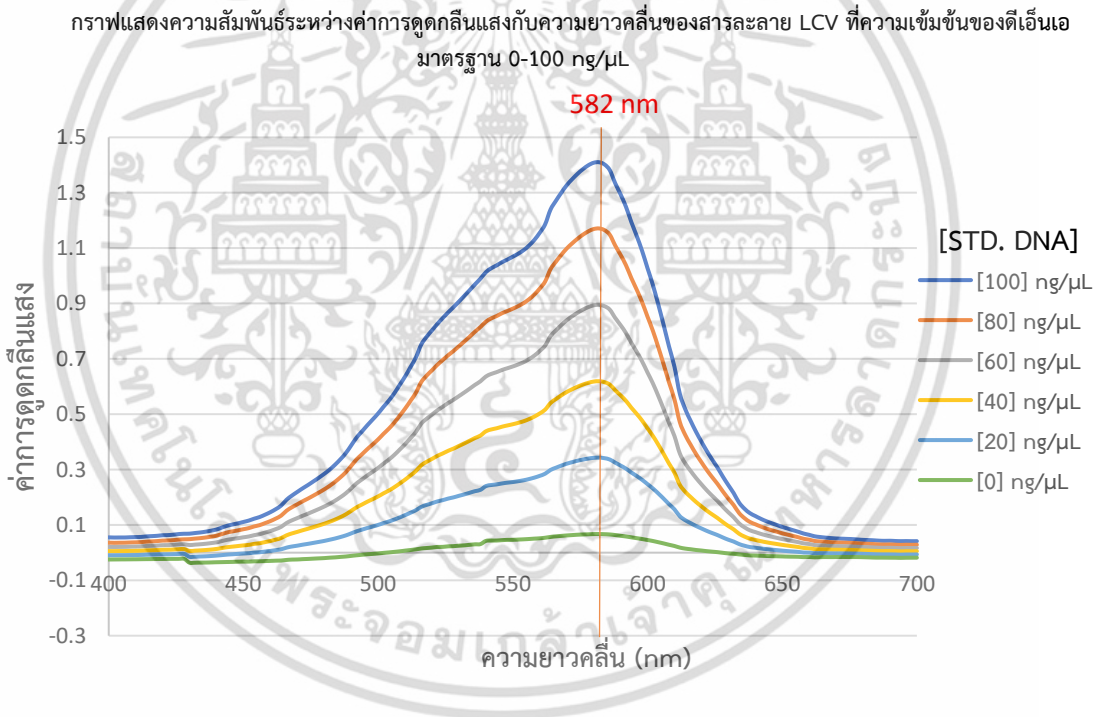
จากทดลองศึกษาปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย LCV กับดีเอ็นเอมาตรฐาน ที่ความเข้มข้นเป็น 0-100 ng/µL พบว่าเมื่อความเข้มข้นของดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น จะสังเกตเห็นได้ว่าสีของสารละลาย LCV จะเข้มขึ้นตามลำดับ ดังแสดงในรูป 4.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 แสดงผลการทดลองปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย LCV กับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ความเข้มข้นเป็น 0-100 ng/µL

เนื่องด้วยสีของสารละลายมีความใกล้เคียงกัน สังเกตด้วยตาเปล่าได้ยาก จึงนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 400 – 700 nm พบว่าได้ผลของสเปกตรัมของปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย LCV กับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ความเข้มข้นเป็น 0-100 ng/µL ดังแสดงในรูป 4.11



รูปที่ 4.11 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความยาวคลื่นของปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย LCV กับดีเอ็นเอมาตรฐาน ที่ความเข้มข้นเป็น 0-100 ng/µL

จากสเปกตรัมจะสังเกตเห็นได้ว่าที่ความยาวคลื่นสูงสุดประมาณ 582 nm เมื่อความเข้มข้นของดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นค่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มขึ้นตามลำดับ และนำค่าความยาวคลื่นที่ 582 ซึ่งมีการแยกของพีคได้ดีที่สุด มาตรวจวัดซ้ำ เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานดูผลกระทบความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐานต่อค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย LCV

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลการทดลองการทำกราฟมาตรฐานของสารละลาย LCV โดยทำการทดสอบในช่วงความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐาน 0-100 ng/µL เมื่อทำปฏิริยาที่อุณหภูมิห้อง ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 582 nm ปริมาตรที่ใช้วิเคราะห์ คือ 50 µL

ความเข้มข้นดีเอ็นเอ (ng/µL)	ความยาวคลื่นที่ 582 nm			$\bar{x}$	SD	%RSD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3			
100	1.41	1.42	1.42	1.42	0.01	0.37
80	1.17	1.17	1.17	1.17	0.00	0.05
60	0.90	0.89	0.89	0.89	0.00	0.23
40	0.62	0.61	0.62	0.62	0.00	0.41
20	0.34	0.34	0.35	0.34	0.00	1.10
0	0.07	0.07	0.07	0.07	0.00	0.77

กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงสารละลาย LCV ที่ความยาวคลื่น 582 nm กับดีเอ็นเอมาตรฐาน ที่ความเข้มข้นเป็น 0-100 ng/µL

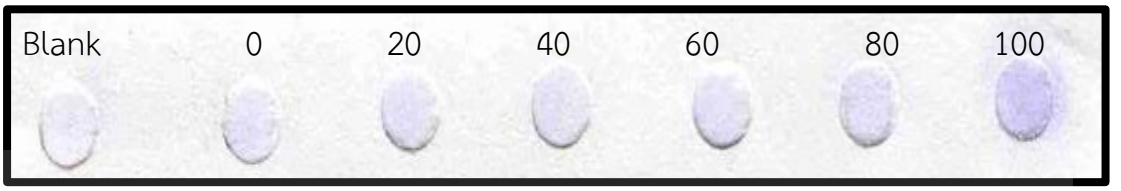
รูปที่ 4.12 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงสารละลาย LCV ที่ความยาวคลื่น 582 nm กับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ความเข้มข้นเป็น 0-100 ng/µL

จากกราฟมาตรฐานในรูปที่ 4.12 จะเห็นได้ว่า เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 582 nm มาสร้างกราฟมาตรฐานค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย LCV จะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐาน คือ เมื่อความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐานเพิ่มขึ้นค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย LCV จะเพิ่มขึ้นตามลำดับ และช่วงความเป็นเส้นตรงของสารละลาย LCV ได้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of Determination) เท่ากับ 0.9997

สีที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย LCV กับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ความเข้มข้นแตกต่างกันจะมีการเปลี่ยนแปลงที่มีความชัดเจน สามารถสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย LCV ได้ด้วยตาเปล่า และเป็นการตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยตรง ด้วย Intercalating dye ชนิด LCV

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากทดลองศึกษาปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย LCV กับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ความเข้มข้นเป็น 0-100 ng/µL เมื่อนำมาทำการวิเคราะห์ความเข้มสีแบบกระดาษ สแกนภาพด้วยเครื่องสแกน ได้ผลการทดลอง สาเหตุที่ไม่ใช้การถ่ายภาพด้วยกล้อง เนื่องจากว่าต้องควบคุมสภาวะในหลายๆ ด้าน จึงเลือกใช้การสแกนที่มีความแม่นยำและควบคุมสภาวะได้ง่ายกว่า ดังแสดงในรูปที่ 4.13



รูปที่ 4.13 แสดงผลการทดลองจากการวิเคราะห์ความเข้มสีแบบกระดาษ ที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐานเป็น 0-100 ng/µL

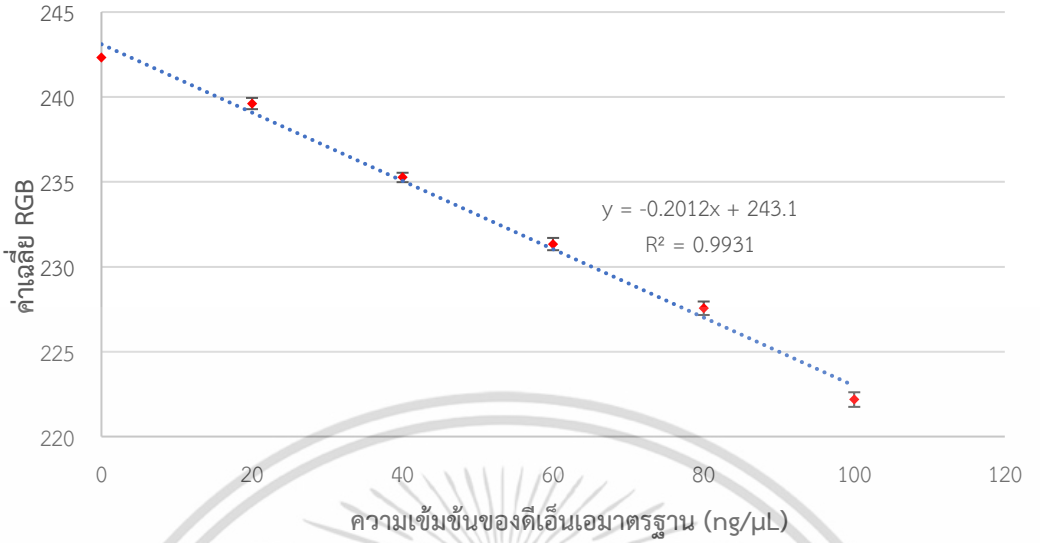
จากรูปที่ 4.13 เมื่อนำสารละลายมาวิเคราะห์สีของสารละลายด้วยกระดาษกรอง เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า จะสังเกตเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐานเพิ่มมากขึ้น ความเข้มสีบนกระดาษก็จะเข้มขึ้นตามลำดับ แต่เพื่อความถูกต้องและแม่นยำ จึงนำภาพที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Image J ระบบการตรวจวัดสี RGB เพื่อวิเคราะห์ความเข้มของสีที่ดีเอ็นเอความเข้มข้นแตกต่างกัน นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าเฉลี่ย RGB กับ ความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐาน 0-100 ng/µL เพื่อดูความสัมพันธ์ของการวิเคราะห์ของการวิเคราะห์แบบใช้เครื่อง UV-Vis Spectrophotometer กับการวิเคราะห์แบบกระดาษ โดยใช้โปรแกรม Image J

ตารางที่ 4.3 ผลการทดลองการทำกราฟมาตรฐานของค่าเฉลี่ย RGB กับความเข้มสีของสารละลาย LCV ที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐาน 0-100 ng/µL

ความเข้มข้นดีเอ็นเอ (ng/µL)	ค่าเฉลี่ย RGB			$\bar{x}$	SD	%RSD
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3			
100	222.35	221.45	222.74	222.18	0.66	0.30
80	227.57	227.12	227.98	227.56	0.43	0.19
60	231.78	231.22	231.01	231.34	0.40	0.17
40	235.12	234.99	235.67	235.26	0.36	0.15
20	239.65	239.32	239.87	239.61	0.28	0.12
0	242.69	242.25	242.04	242.33	0.33	0.14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า RGB กับ ความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐาน 0-100 ng/µL



รูปที่ 4.14 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ย RGB กับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0-100 ng/µL

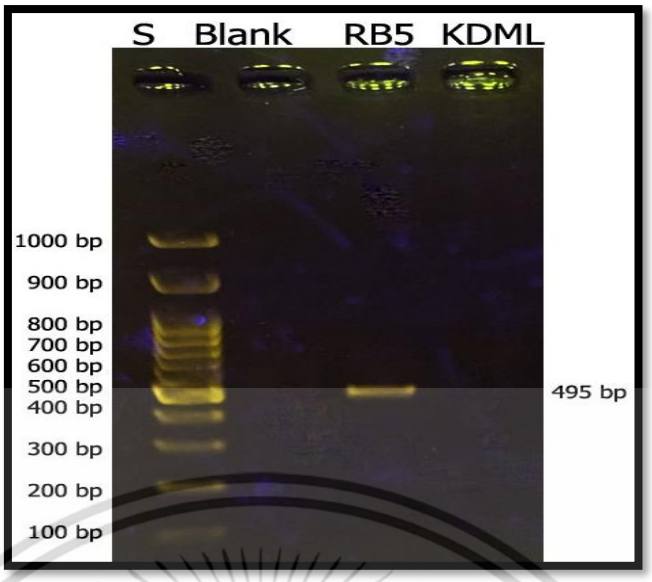
จากกราฟมาตรฐานในรูปที่ 4.14 จะเห็นได้ว่าเมื่อทำการวิเคราะห์ความเข้มสีของสารละลาย LCV ด้วยโปรแกรม Image J จากรูปที่ 4.13 ด้วยวิธีการสแกนภาพ มาสร้างกราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ย RGB กับความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐาน 0-100 ng/µL พบว่าค่าเฉลี่ย RGB ที่ได้จากสีแดง สีเขียว และสีน้ำเงินนั้น ซึ่งจะตรวจวัดค่าความเข้มสีของสารละลาย LCV ที่อยู่บนกระดาษ จะแปรผกผันกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐานตามลำดับ และช่วงความเป็นเส้นตรงของค่าเฉลี่ย RGB ได้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of Determination) เท่ากับ 0.9931

ซึ่งผลการวิเคราะห์เชิงสีทั้งแบบใช้เครื่อง UV-Vis Spectrophotometer และแบบกระดาษผลการทดลองมีแนวโน้มไปในทางเดียวกัน

4.4 การประยุกต์วิธีการวิเคราะห์เทคนิคเชิงสีร่วมกับการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) สำหรับผลิต PCR Product ของดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบยีน Badh2

จากการปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส เมื่อทำการวิเคราะห์ผล PCR Products ด้วยเทคนิค Agarose Gel Electrophoresis พบว่า ถ้าตัวอย่างเป็นข้าวที่มีกลิ่นหอมจะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แต่ถ้าหากตัวอย่างเป็นข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอมจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 495 bp เนื่องจากมีการออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะเจาะจงกับยีน Badh2 ที่สมบูรณ์ ซึ่งพบได้ในข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอมเท่านั้น ดังนั้น จะเห็นได้ว่าข้าว KDML 105 ซึ่งเป็นข้าวที่มีกลิ่นหอมจะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ RB_5 ซึ่งเป็นข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอมจะปรากฏแถบดีเอ็นเอ ดังแสดงในรูปที่ 4.15

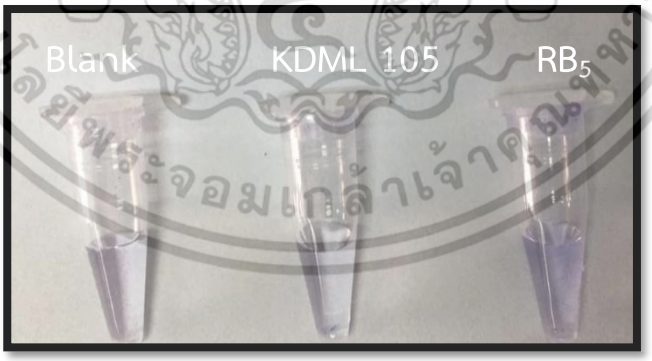
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.15 แสดงผลการวิเคราะห์ PCR Product โดยใช้ Gel Electrophoresis สำหรับตรวจสอบยีนความหอมของข้าวแบบปกติ โดยเรียงตามลำดับ 1) คือ Blank , 2) KDML 105 , 3) คือ RB_5 และ S คือ DNA Ladder

4.5 การประยุกต์ใช้การวิเคราะห์เทคนิคเชิงสีร่วมกับการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) เพื่อตรวจสอบยีน Badh2 ของข้าว 2 ชนิดพันธุ์

จากการศึกษาวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส พบว่า ถ้าตัวอย่างข้าวที่มียีน Badh2 (KDML 105) เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย LCV จะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย แต่ถ้าตัวอย่างข้าวที่ไม่มียีน Badh2 (RB_5) นั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายจากใสไม่มีสีเป็นสี ดังแสดงในรูปที่ 4.16

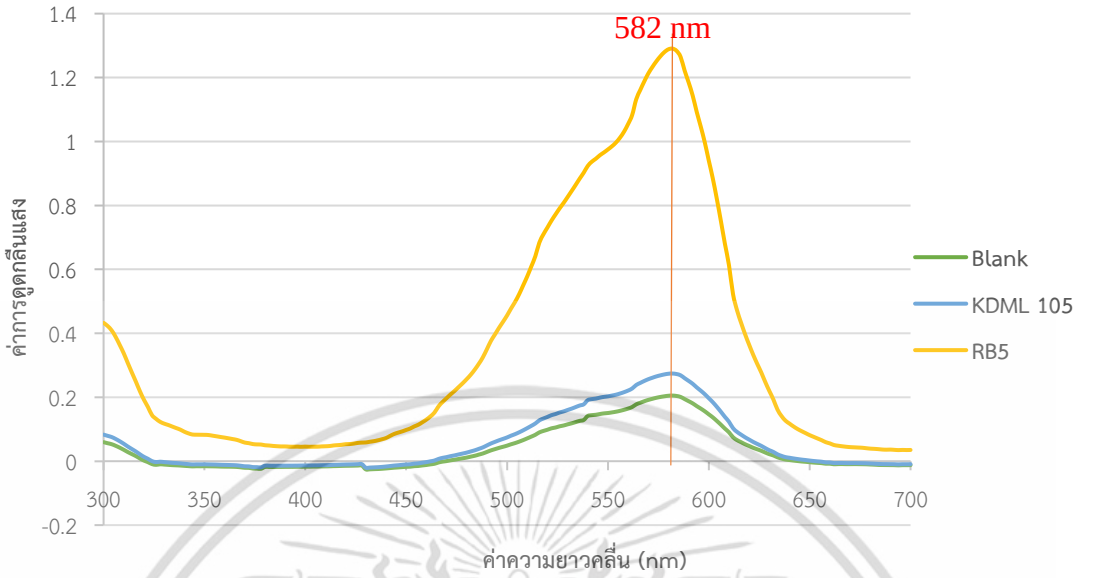


รูปที่ 4.16 แสดงผลการทดลองเปรียบเทียบสีของสารละลาย LCV เมื่อทำปฏิกิริยากับ KDML 105 และ RB_5

เมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 350 – 700 nm พบว่าได้ผลของสเปกตรัมของปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย LCV กับ KDML 105 และ RB_5 ดังแสดงในรูปที่ 4.17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

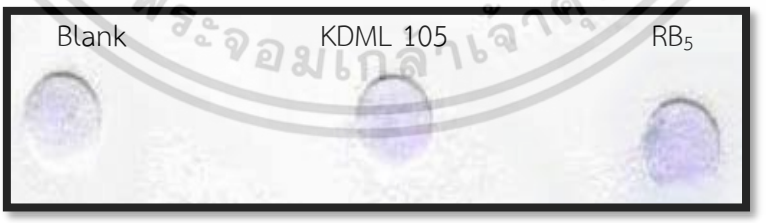
กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง กับความยาวคลื่นของสารละลาย LCV เมื่อทำปฏิกิริยากับ KDML 105 และ RB_5



รูปที่ 4.17 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง กับความยาวคลื่นของสารละลาย LCV เมื่อทำปฏิกิริยากับ KDML 105 และ RB_5

จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 582 nm พบว่าค่าการดูดกลืนแสงของของดีเอ็นเอชนิด RB_5 KDML 105 และ Blank เท่ากับ 1.29061 0.20522 และ 0.27421 ตามลำดับ ผลที่ได้เป็นไปตามที่คาดหวัง จากการวัดสเปกตรัม เกิดพีคของแต่ละสารที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน

จากทดลองศึกษาปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย LCV กับ PCR Products ทั้ง 2 ชนิด เมื่อนำมาทำการวิเคราะห์ความเข้มสีด้วยกระดาษกรอง ด้วยวิธีการสแกนภาพ ได้ผลการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 4.18



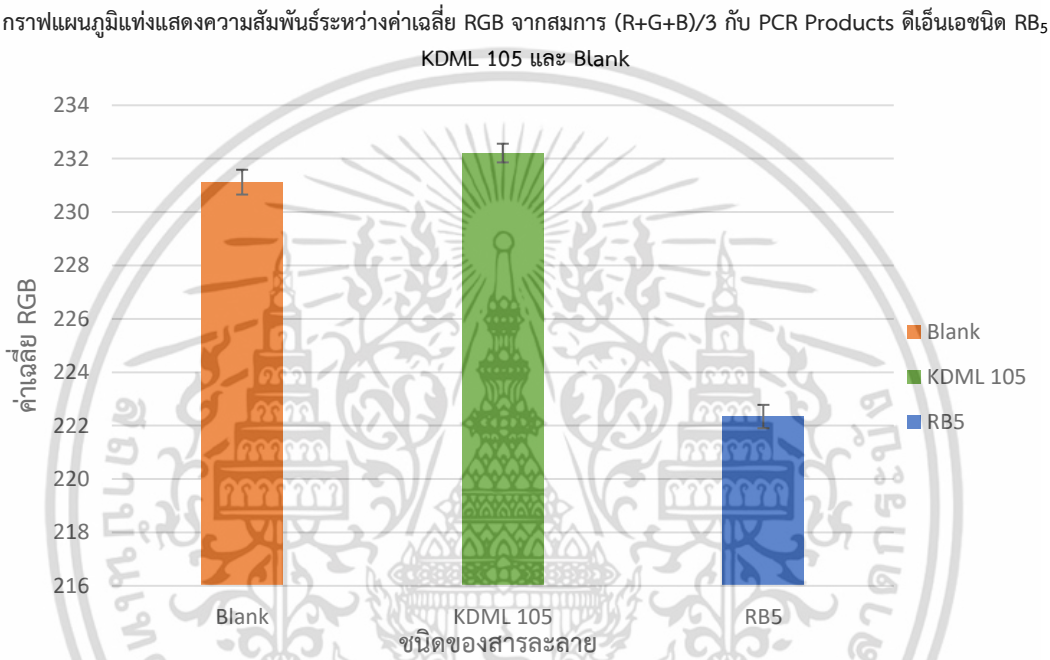
รูปที่ 4.18 แสดงผลการทดลองจากการวิเคราะห์ความเข้มสีแบบกระดาษของสารละลาย LCV เมื่อทำปฏิกิริยากับ ดีเอ็นเอชนิด RB_5 KDML 105 และ Blank

จากรูปที่ 4.18 ทำการวิเคราะห์ความเข้มของสีด้วยโปรแกรม Image J ด้วยวิธีการสแกนภาพ พบว่าค่าเฉลี่ยที่มาจากสีแดง สีเขียว และสีน้ำเงิน ของสารละลาย LCV ที่ทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอชนิด RB_5 KDML 105 และ Blank ดังตารางที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าเฉลี่ย RGB ที่มาจากสีแดง สีเขียว และสีน้ำเงิน เมื่อสารละลาย LCV ที่ทำปฏิกิริยากับ PCR Products ทั้ง 2 ชนิด

ดีเอ็นเอตัวอย่าง (ng/µL)	พื้นที่วิเคราะห์	ครั้งที่			$\bar{x}$	SD	%RSD
		1	2	3			
Blank	420	231.59	230.66	231.12	231.12	0.4650	0.2011
KDML 105	420	232.23	232.56	231.86	232.21	0.3501	0.1508
RB_5	420	222.55	222.64	221.84	222.34	0.4382	0.1970



รูปที่ 4.19 กราฟแผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ย RGB จากสมการ (R+G+B)/3 กับ PCR Products

จากกราฟแผนภูมิแท่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ย RGB กับ PCR Products จะเห็นว่า KDML มีค่า RGB สูงกว่า RB_5 เนื่องจากค่า RGB จะแปรผกผันกับความเข้มสีของสารละลาย

ความเข้มสีของสารละลาย LCV ที่ทำปฏิกิริยากับ PCR Products ทั้ง 2 ชนิดที่ความเข้มข้น 100 ng/µL พบว่า สารละลาย LCV ที่ทำปฏิกิริยากับ KDML 105 มีค่า RGB ใกล้เคียงกับ Blank แต่สารละลาย LCV ที่ทำปฏิกิริยากับ RB_5 มี RGB ที่ต่ำ ซึ่งแปรผันตรงกับผลการวิเคราะห์ PCR Products โดยใช้ Gel Electrophoresis สำหรับตรวจสอบยืนความหอมของข้าวแบบปกติ ซึ่งจะต้องไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาเทคนิคเชิงสีให้ง่ายและรวดเร็วในการตรวจวิเคราะห์ร่วมกับเทคนิคการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอ โดยจะใช้สาร Intercalating dyes 2 ชนิด คือ HNB และ LCV จากการศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นของ Mg^{2+} ช่วง 0-14 mM บนเส้นสเปกตรัมของปฏิกิริยาของ HNB โดยการสร้างกราฟมาตรฐานค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 nm ได้สมการเชิงเส้น $y = -0.0245X + 0.974$ และค่าสัมประสิทธ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9739 จากการวิเคราะห์เชิงสีพบว่า เมื่อความเข้มข้นของแมกนีเซียมเพิ่มขึ้น จะเกิดการเปลี่ยนแปลงจากสีน้ำเงินไปเป็นสีม่วง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของสีมีความใกล้เคียงกัน ทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงด้วยตาเปล่าไม่ชัดเจน จึงเปลี่ยนสาร intercalating dye เป็นสารละลาย LCV ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอมาตรฐาน และศึกษาความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐานช่วง 0-100 ng/µL พบว่าเมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 582 nm และนำไปสร้างกราฟมาตรฐานค่าการดูดกลืนแสง ได้สมการเชิงเส้น $y = 0.0136X + 0.073$ และค่าสัมประสิทธ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9997 จากการวิเคราะห์เชิงสีพบว่าเมื่อความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐานเพิ่มขึ้น จะเกิดการเปลี่ยนแปลงจากใสไม่มีสีไปเป็นสีม่วงแกมน้ำเงิน จากการวิเคราะห์สีด้วยอุปกรณ์การตรวจวัดแบบกระดาษ วิเคราะห์สีโดยใช้โปรแกรม Image J แล้วนำมาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่า RGB กับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0-100 ng/µL ได้สมการเชิงเส้น $y = -0.2012X + 243.1$ และค่าสัมประสิทธ์การตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9931 และจากการวิเคราะห์ผล PCR Products ของข้าว 2 สายพันธุ์คือ KDML 105 และ RB_5 ด้วยเทคนิค Agarose Gel Electrophoresis พบว่า ถ้าตัวอย่างเป็นข้าวที่มีกลิ่นหอมจะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แต่ถ้าหากตัวอย่างเป็นข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอมจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 495 bp เนื่องจากมีการออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะเจาะจงกับยีน Badh2 ที่สมบูรณ์ เมื่อนำสาร LCV ทำปฏิกิริยากับตัวอย่างข้าวหอม (KDML 105) พบว่า ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงคือ ใสไม่มีสี เมื่อเทียบกับ blank แต่เมื่อทำปฏิกิริยากับ ตัวอย่างข้าวไม่หอม (RB_5) จะเกิดการเปลี่ยนแปลงจากใสไม่มีสีเป็นสีม่วง เมื่อนำมาประยุกต์ใช้กับอุปกรณ์วิเคราะห์บนกระดาษ แล้วนำไปวิเคราะห์ความเข้มสีด้วยโปรแกรม Image J พบว่า ความเข้มสีของตัวอย่างข้าวหอม (KDML 105) ได้ค่าเฉลี่ย RGB เท่ากับ 232.21 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ Blank ที่มีค่าเท่ากับ 231.12 ในขณะเดียวกันข้าวไม่หอม (RB_5) มีค่าเฉลี่ย RGB เท่ากับ 222.34 ซึ่งค่อนข้างจะแตกต่างจาก Blank จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า มีแนวโน้มไปในทางเดียวกับผลการวิเคราะห์ด้วย เทคนิค Agarose Gel Electrophoresis และการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย

จากการทดลองดังกล่าว เราสามารถเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงสี ของสารทั้ง 2 ชนิด ได้โดยเลือกใช้ สาร LCV และสามารถวิเคราะห์การตรวจวัดเชิงสี ด้วยวิธีการ Spectroscopy และ Paper Base แล้วสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์เทคนิคเชิงสีร่วมกับเทคนิค PCR ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. การหาความเข้มข้นของโซเดียมซัลไฟต์ ควรเตรียมความเข้มข้นที่มากเกินพอที่ทำให้สารละลาย LCV เปลี่ยนเป็นสารใสไม่มีสีได้อย่างชัดเจน

2. ในการกำหนดความเข้มข้นในช่วงต่าง ๆ ควรทำอย่างน้อย 3 ซ้ำในแต่ละการทดลอง เพื่อให้ผลที่แม่นยำ

3. สามารถพัฒนาปรับเปลี่ยนพื้นผิวของกระดาษได้ เนื่องจากการดาษที่ใช้สร้างอุปกรณ์การตรวจวัดมีหลากหลายชนิด

4. ในการทำอุปกรณ์การวิเคราะห์บนกระดาษ ควรทำอย่างน้อย 3 แผ่นซ้ำกัน ในแต่ละการทดลองเพื่อนความแม่นยำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

[1] อมรรัตน์ ร่มพฤกษ์. 2554. บทความพิเศษ **เทคนิค Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP).**

[2] Shigenhiko, M., Sotaro, S., Koji, T. Takaaki, S. 2014. **Method for colorimetric detection of double-stranded nucleic acid using leuco triphenylmethane dyes.** Analytical Biochemistry.

[3] หลักการของเครื่อง UV-Vis spectrophotometer. 2017. **Ultraviolet and Absorption Spectroscopy UV-VIs**. [Online].
Avialable: http://glasswarechemical.com/scientific-instrument.

[4] ณัฐวุฒิ เชิงชั้น. 2558. **การพัฒนาวิธีวิเคราะห์หาปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะโดยใช้ชุดทดสอบภาคสนามร่วมกับการตรวจวัดด้วยแอพพลิเคชั่นในโทรศัพท์มือถือ.** คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

[5] ระบบสี RGB. 2017. **RGB model.** [Online].
Avialable: https://en.wikipedia.org/wiki/RGB_color_model.

[6] ปวิณา เดือนฉาย และ วิจิตรา เดือนฉาย. **อุปกรณ์วิเคราะห์บนกระดาษ**. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

[7] ปาริฉัตร รัตนผล และ ธานี ศรีวงศ์ชัย. 2554. **การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เฉพาะกับ การทำหน้าที่ของยีนความหอมในข้าว.**

[8] Buttery , Ling LC and Juliano BO. 1982. **2-Acetyl-1-pyrroline: an important aroma component of cooked rice.** Chem Ind (Lond) 12: 958–959.

[9] ธนาธิป ทาปลัด. 2555. **การตลาดและปัญหาการปลอมปนของข้าวหอมมะลิ.** คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี.

[10] อารีรัตน์ อิ่มศิลป์ ปิยะรัตน์ สิริธัญกิจ และ รจนา ประสิทธิ์. 2555. **การจำแนกข้าวหอมมะลิออกจากข้าวพันธุ์อื่นด้วยเทคนิคสเปกโตรสโคปีอินฟราเรดย่านใกล้.**

[11] จรรยา แสงเขียว และ คงศักดิ์ ศรีแก้ว. 2555. **ชุดตรวจสอบการปลอมปนข้าวหอมมะลิ.**

[12] กระทรวงพาณิชย์. 2549. **ประกาศกระทรวงพาณิชย์ เรื่อง กำหนดให้ข้าวหอมมะลิไทยเป็นค้ามาตรฐานและมาตรฐานสินค้าข้าวหอมมะลิ.**

[13] งามชื่น คงเสรี. 2547. **คุณภาพและการตรวจสอบข้าวหอมมะลิไทย.** กรมวิชาการเกษตร. สำนักงานเศษฐกิจ อุตสาหกรรม : 41-61.

[14] Butter, Ling, L.C., Juliano, B.O. and Turnbaugh, J.G. 1983. **Cooked rice aroma and 2-acetyl-1-pyrroline. Agric.** Food Chem Journal.31, 823-826.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[15] Bradbury, L.M.T., Gillies, S.A., Brushett, D.J., Waters, D.L.E. and Henry, R.J. 2008. **Inactivation of an amino aldehyde dehydrogenase is responsible for fragrance in rice.** Plant Molecular Biology 68**,** 439–449.

[16] Ahn, S.N., Bollisch, C.N. and Tanksley, S.D. 1992. **RFLP tagging of a gene for aroma in rice. Theoretical and Applied Genetics 84**, 825–828.

[17] Bradbury, L.M.T., Fitzgerald, T.L., Henry, R.J., Jin, Q.S. and Waters, D.L.E. 2005. **The gene for fragrance in rice**. Plant Biotechnology Journal 3(3), 363-370.

[18] Bradbury, L.M.T. 2009**. Identification of the gene responsible for fragrance in rice and characterization of the enzyme transcribed from this gene and its homologs. Doctor of Philosophy dissertation.** Southern Cross University, Australia.

[19] Banphoe farmer. 2557. **จุดกำเนิดข้าวหอมมะลิไทย.** [Online].
Avialable: www.banphoefarmer.com/articles/42179212/จุดกำเนิดข้าวหอมมะลิไทย.html

[20] วรวิทย์ พาณิชพัฒน์. 2530. **ข้าวหอมขาวดอกมะลิ105 บัสมาติและอื่น ๆ.**

[21] ภัทรพร สืบสะอาด สุชาดา เอียจะบก และสุนารี ชังอินทร์. **การพัฒนาเทคนิคพีซีอาร์ในการตรวจสอบยีนความหอมในข้าว.** คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

[22] ศูนย์วิทยาศาสตร์ไทย สวทช. 2552. **ข้าวขาวดอกมะลิและสิทธิบัตรเทคโนโลยีการใช้ยีนควบคุมความหอมในข้าว.** เอกสารประกอบการเสวนา เรื่องอนาคตข้าวไทย. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.

[23] วาสนา วรมิศร์. 2538. **การปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมของไทย.** ศูนย์วิจัยข้าวพิษนุโลก สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรละสหกรณ์.

[24] วิฑูรย์ เลี่ยนจำรูญ และ นิรมล ยุวนบุณย์. 2546. **หอมกลิ่นข้าวมะลิหอม.**

[25] สิรินทิพย์ไรซ์เบอรี่. 2559. **ที่มาของข้าวไรซ์เบอรี่**. [Online].
Avialable: http://sirintipriceberry.com.

[26] อภิชาติ วรรณวิจิตร. 2552. **ข้าวไรซ์เบอร์รี่.** ศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

[27] มาลินี อัศวดิษฐเลิศ**.** 2551. **เทคนิคพีซีอาร์เทคนิคเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างรวดเร็ว**. บทความวิชาการ. หน่วยบริหารจัดการความรู้ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค).

[28] หน่วยปฏิบัติการนิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่า. 2554. **เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Polymerase Chain Reaction; PCR).** บทความสาระน่ารู้. กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช**.**

[29] การจำลองตัวของสายดีเอ็นเอ (DNA Replication). 2017. **Plant life**. [Online].
Avialable: http://lifeofplant.blogspot.com/2011/04/dna-replication.html.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[30] แสดงการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส. 2017. **Science info world**. [Online]. Avialable: http://scienceinfoworld.blogspot.com/2012/11/polymerase-chain-reaction-pcr.html.

[31] สุสดี รังคะกนก. 2553. **การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง8271-8873ของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอของชายไทยและชายพม่า**. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยศิลปากร พ.ศ.2553.

[32] การตรวจผลโดย Gel Electrophoresis. 2017. **3D Printing Saves Lab Hundreds of Dollars.** [Online].
Avialable: http://www.progressth.org/2016/02/3d-printing-saves-lab-hundreds of.html

[33] Motoki Goto, Eiichi Honda, Atsuo Ogura, Akio Momoto& Ken Ichi Hanaki. **Colorimetric detection of loop mediated isothermal amplification reaction by using hydroxyl naphthol blue**. Short technical reports. (2009):167-172

[34] Shigehiko Miuamoto, Sotaro Sano, Koji Takahashi& Takaaki Jukihara. **Method for colorimetric detection of double stranded nucleic acid using leucotriphenymethane dyes. Analyticl** biochemistry. (2014): 1-20

[35] Jinzhao Song, Michael G. Mauk, Brent A. Hackett, Sara Cherry, Haim H. Bau & Changchun Liu. **Instrument free point of care molecular detection of Zika virus**. ACS Publication. (2016) : 1-5

[36] ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ พยุงศักดิ์ รวยอารี ประเสริฐ และ วงศ์วัฒนารัตน์ ประสาน สืบสุข.2547. การพัฒนาเทคนิค Real-time PCR ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของถั่วเหลือง GM และผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูป.

[37] J.C.Jokerst, J.A. Adkins, B. Bisha, M. Mentele, L.D. Goodridge& C.S. Henry**. A paper based analytical device for the colorimetric detection of foodborne pathogenic bacteria**. 15thInternational conference on miniaturized systems for chemistry and life sciences. (2011): 2116-2118

[38] กระบวนการ Gel Electrophoresis. 2017. **Poremerase chain reaction (PCR)**. [Online]. Avialable: http://ku-scmicro36bkk.tripod.com/PCR.html.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียม Stock Solution ที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์

1. การเตรียมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.1 M

ละลายสารแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2.H_2O$) 0.011 g ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนเป็น 100 mL

2. การเตรียมสารละลายแมกนีเซียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.1 M

ละลายสารแมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO4) 0.0120 g ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนเป็น 100 mL

3. การเตรียมสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 1 M

ละลายสารโซเดียมซัลไฟต์ (Na_3SO_4) 0.018 g ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนเป็น 100 mL

4. การเตรียมสารละลายคริสตัลไวโอเลต (Crystal Violet) ที่ความเข้มข้น 0.05 M

ละลายสารคริสตัลไวโอเลต ($C_{25}H_{30}ClN_3$) 0.020 g ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรด้วยน้ำปราศจากไอออนจนเป็น 100 mL

5. การเตรียมสารละลาย 5X TBE 1000 mL

เตรียมโดยการชั่ง Tris base 54 g และ EDTA 3.72 g นำมาละลายในน้ำกลั่น 800 mL แล้วจึงเติม Boric acid 27.5 g แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1000 mL

6. การเตรียมสารละลาย 0.5X TBE 1000 mL

เตรียมโดยการตวง 5X TBE มาปริมาตร 100 mL และเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 1000 ml

7. การเตรียม 6X Loading Dye

เตรียมโดยชั่งสาร EDTA 4.54 g และสาร NaOH 0.75 g แล้วจึงละลายด้วยน้ำ 30 mL จากนั้นคนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วจึงเติมน้ำจนปริมาตรครบ 100 mL เติมสาร Tris – base ปริมาตร 4.5 mL จากนั้นจึงเติม Bromophenol blue 0.075 g และ Xylene cyanole FF 0.075 g คนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วจึงนำไปกรองลดความดัน ผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 2 นำสารละลายที่กรองได้มาเติม Glycerol จนมีปริมาตรครบ 250 mL เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°c

8. Ethidium bromide 10 mg/mL ปริมาตร 100 mL

เตรียมโดยการชั่ง Ethidium bromide 1 g แล้วจึงเติมน้ำกลั่น 100 mL ผสมสารให้เข้ากันและเก็บรักษาในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง และนำไปใช้โดยการผสมกับน้ำกลั่น

*** Ethidium bromide เป็นสารก่อมะเร็ง ขณะใช้ควรระมัดระวัง และสวมถุงมือทุกครั้ง***

9. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 1 M EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid

เตรียมโดยการชั่ง EDTA 29.2 mg ละลายในน้ำ 1000 µL ในหลอดไมโครเซนตรีฟิวจ์ 1.5 mL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 2 M Tris-HCl (pH 8.8)

เตรียมโดยชั่ง Tris-HCl มา 2.422 g ละลายในน้ำ 10 mL ปรับค่า pH ด้วยสาร HCl และ NaOH จนมีค่า pH = 8.8 แล้วจึงปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 25 mL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ขั้นตอนการเตรียมเจล

1. เตรียมพิมพ์สำหรับเท Agarose โดยการต่อชิ้นส่วนต่าง ๆ ของอุปกรณ์ โดยการวาง comb ลงใน gel chamber

2. ชั่ง Agarose จำนวนที่ต้องการลงในขวดรูปชมพู่ จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-borate-EDTA (TBE)

** ถ้าต้องการเตรียม 1.2% Agarose ปริมาตร 40 mL ให้ชั่ง Agarose 0.6 g ละลายใน 0.5X TBE 40 mL**

** ถ้าต้องการเตรียม 1.2% Agarose ปริมาตร 20 mL ให้ชั่ง Agarose 0.3 g ละลายใน 0.5X TBE 20 mL **

3. นำไปให้ความร้อนให้ละลายจนหมด ทิ้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 60 ˚c

4. เท Agarose gel ลงใน gel chamber ที่วาง comb เพื่อให้เกิดช่อง (well) แล้วปล่อยให้แข็งอย่างน้อย 30 นาที

5. หลังจากเจลแข็งตัวให้ดึง comb ออก แล้วนำถาดเจลไปวางในเครื่อง Electrophoresis เทบัฟเฟอร์ TBE ลง ไปจนท่วมเจลขึ้นมาประมาฯ 1-2 มิลลิเมตร

6. ผสมตัวอย่างดีเอ็นเอกับ loading dye แล้วปิเปตตัวอย่างลงใน well ซึ่งในการ Gel Electrophoresis ทุกครั้งต้องมีดีเอ็นเอมาตรฐานที่รู้ขนาดแน่นอนเป็นตัวเปรียบเทียบ ซึ่งมักจะโหลดดีเอ็นเอมาตรฐานนี้ลงในหลุมซ้ายมือสุด

7. ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่อง Electrophoresis ให้ด้านที่มีตัวอย่างดีเอ็นเออยู่ทางขั้วลบ จากนั้นตั้งกระแสไฟฟ้าให้มีความต่างศักย์ที่ต้องการ (อย่าตั้งกระแสไฟฟ้าความต่างศักย์สูงเกินไปจะทำให้เกิดความร้อนสูง ซึ่งจะทำลายดีเอ็นเอความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ต่ำโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีขนาดใหญ่ขึ้น) เมื่อพบว่าสีน้ำเงินของ loading dye วิ่งไปอยู่ด้านล่างตรงกันข้าม จากนั้นให้หยุดกระแสไฟฟ้า

8. นำเจลออกจากถาดแช่ในสารละลายเอทิเดียมโบรไมด์ 1 นาที แล้วล้างน้ำกลั่น

** เอทิเดียมโบรไมด์เป็นสารก่อมะเร็ง ควรสวมถุงมือทุกครั้งในขณะที่ทำการทดลอง **

9. ตรวจดูแถบสีดีเอ็นเอโดยการดูการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโลเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การเตรียม Competent E. Coli สายพันธุ์ XL1-Blue โดยวิธี $CaCl_2$

1. เขี่ยเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวของเซลล์ XL1-Blue ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB 5 ml เลี้ยงเชื้อโดยเขย่าที่ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

2. เติมเชื้อที่เลี้ยง 0.4 ml ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB 40 ml (1:100) เลี้ยงเชื้อโดยเขย่าที่ 37 °C จนถึง log phase (A600 ประมาณ 0.4-0.6) ประมาณ 2-3 ชั่วโมง (1 A600 ประมาณ 108 cell/ml)

3. เก็บเชื้อโดยปั่นที่ 500-1 โดยปั่นที่ 500-5,000 , 4°C เป็นเวลา 10 นาที

4. แยกส่วนใส (supernate) ออก แล้วละลายตะกอนเชื้อโดยใช้ 8 ml $MgCl_2$ (1:5 ปริมาตรเริ่มต้น) แช่น้ำแข็ง 15 นาที

5. ปั่นแยกเซลล์ที่ 500-5,000 x g ที่ 4°C เป็นเวลา 10 นาที

6. แยกส่วนใสออก แล้วละลายตะกอนเชื้อโดยเติม 0.8 ml $CaCl_2$ (1:50 ปริมาตรเริ่มต้น) แช่น้ำแข็ง 30-60 นาที เซลล์ที่ได้จะเรียกว่า competent cells ซึ่งพร้อมที่จะรับดีเอ็นเออื่น ๆ เข้าสู่เซลล์ (ถ้าเก็บส่วนนี้ไว้ที่น้ำแข็ง4°C เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมงจะทำให้ประสิทธิภาพในการ transform สูงขึ้นถึง 4-6 เท่า)

** เซลล์และสารละลายของบัฟเฟอร์ที่นำมาใช้ในข้อ 3-6 ต้องแช่เย็นในระหว่างทำการทดลอง**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

การนำพลาสมิดดีเอ็นเอเข้าสู่ E. coli สายพันธุ์ XL1-Blue โดย Heat Shock Method

1. เติมดีเอ็นเอ 2 ชนิดคือ KDML 121.5 ng/ml และ RB5 264 ng/ml ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (Micro centrifuge Tubes) ขนาด 1.5 ml

2. เติม competent cells ที่เตรียมไว้ 100 µL แช่น้ำแข็ง 15-20 นาที แช่เซลล์ที่ 42 °C เป็นเวลา 45-60 นาที

3. เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB 1,000 µL ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ทั้ง 2 หลอด เขย่าเซลล์ที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4. แบ่งเชื้อ 100 µL (ไม่ควรเกิน 200 ul ต่อ Plate ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 mm) มากระจายบน LB agar แล้วใส่ LB Kanar 100 µg/ml

5. บ่มเชื้อที่ 37 °C เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

การสกัดสารพันธุกรรม (DNA) โดยใช้ชุด Kit (Favorgen, Biotech Corp)

1. Tissue Dissociation: ฆ่าเชื้อโกร่งด้วยเอทานอลเล็กน้อยแล้วจุดไฟเผา ทิ้งให้เย็นแล้วจึงบดจมูกข้าวทั้ง 4 สายพันธุ์ คือ KDML 105 PTT 1 RD 31 และ Rice Berry มาบดจนเป็นผงละเอียด ใส่ตัวอย่างที่บดแล้วลงใน Micro centrifuge tube

2. Lysis : เติม 400 µL FAPG 1 Buffer และ RNase A 8 µL ลงในทุกตัวอย่าง และผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าสาร โดยห้ามผสม FAPG1 และ RNase A ก่อนใช้งาน แล้วจึงนำไปบ่มที่ 65 ˚c เป็นเวลา 10 นาที โดยพลิกคว่ำหงายไปมา ทุก ๆ 5 นาที และขณะเดียวกัน ให้บ่ม Elute Buffer (200 µL/ตัวอย่าง) ที่ 65 ˚c ไปด้วยจนกว่าจะนำมาใช้ เมื่อครบ 10 นาทีจึงเติม FAPG 2 Buffer ปริมาตร 130 µLลงในหลอดสาร และผสมโดยใช้เครื่องเขย่าสารเสร็จแล้วจึงบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำ Filter Column ใส่ลงในหลอด Collection tube ขนาด 2 mL แล้วจึงนำสารผสมที่เตรียมไว้ ใส่ลงใน Filter Column ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 13000 rpm เป็นเวลา 3 นาที แล้วจึงทิ้ง Filter Column แล้วนำส่วนใสใส่ลงในหลอด Micro centrifuge tube

3. DNA Binding: เติม 1.5 Volume ของ FAPG 3 Buffer ลงในหลอดที่ได้จากตอนที่ 2 แล้วผสมด้วยเครื่องเขย่าสารเป็นเวลา 5 วินาที (เช่น เติม 750 µL FAPG 3 ใน 500 µL Lysate) และเตรียม FAPG Column ใส่ใน 2 mL Collection tube แล้วจึงนำสารที่ผสมไว้(รวมทั้งตะกอน) 750 µL ใส่ใน FAPG Column แล้วทำการปั่นเหวี่ยง 13000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ทิ้งสารที่อยู่ในหลอด แล้วเติมสารผสมที่เหลืออยู่ผ่าน FAPG Column และปั่นเหวี่ยง 13000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ทิ้งสารที่เหลืออยู่ในหลอด

4. Wash: เติม W1 Buffer ปริมาตร 500 µL ใส่ลงในคอลัมน์ ทำการปั่นเหวี่ยง 13000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที จึงเติม Wash Buffer ปริมาตร 750 µL ลงใน Column ทำการปั่นเหวี่ยง 13000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที แล้วจึงทิ้งสารที่เหลืออยู่ในหลอด และใส่ FAPG Column กลับลงสู่ Collection tube เดิม ทำการปั่นเหวี่ยง 13000 rpm เป็นเวลา 3 นาที โดยต้องมั่นใจว่า FAPG Column แห้งแล้วจริง ๆเพราะของเหลวที่เหลืออยู่จะส่งผลต่อคุณภาพของการสกัด

5. DNA Elute: นำ FAPG Column ที่ปั่นเหวี่ยงจนแห้งแล้วใส่ใน Clean 1.5 mL tube แล้วทำการเติม Elute Buffer ที่บ่มไว้ที่ 65 ˚c ปริมาตร 50-200 µL ให้ลงในตรงกลางของคอลัมน์ จากนั้นตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 3 นาที นับตั้งแต่เติม Elution Buffer เมื่อครบ 3 นาทีแล้วจึงนำมาทำการปั่นเหวี่ยง 13000 rpm เป็นเวลา 2 นาที สารที่ได้ออกมาจะเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอของข้าวทั้ง 4 สายพันธุ์ ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20˚c จากนั้นจึงนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการเช็คผลด้วย เทคนิค Gel Electrophoresis และวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง UV Spectrophotometer เพื่อเปรียบเทียบการสกัดทั้ง 2 วิธี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ

การวิเคราะห์ความเข้มของสีด้วยโปรแกรม Image J

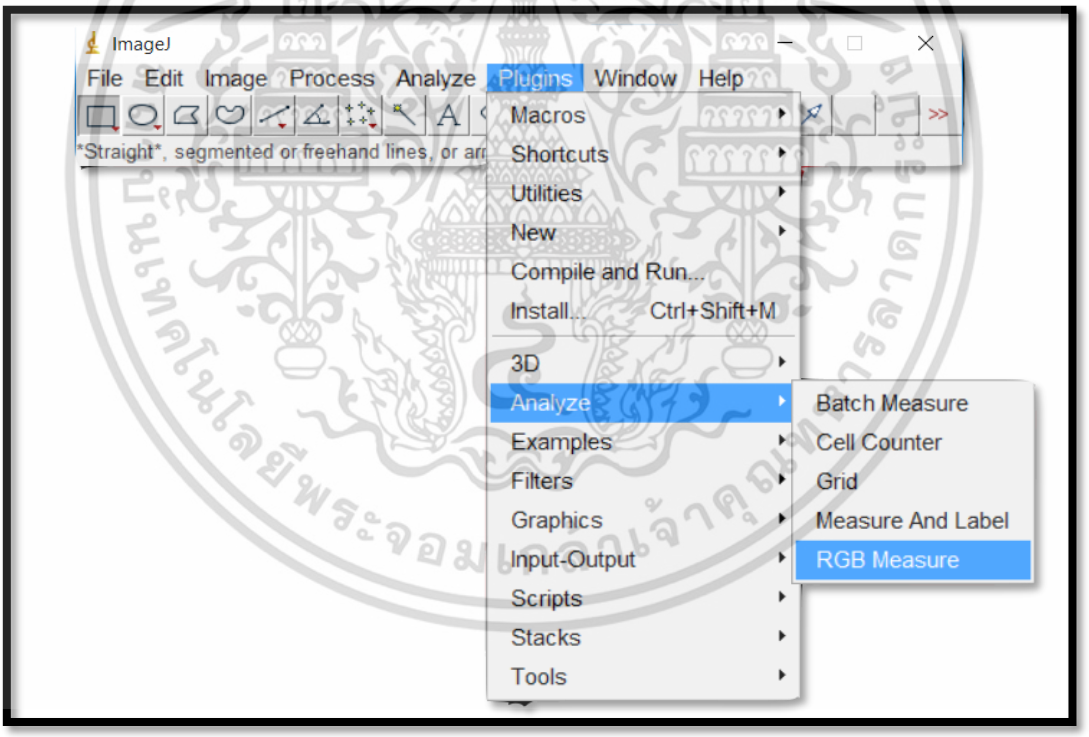
1. สแกนภาพอุปกรณ์ที่ได้ทำการทดลองเพื่อวิเคราะห์ความเข้มสี ควบคุมปัจจัยต่าง ๆที่มีผลต่อความเข้มแสงบนภาพที่สแกน โดยใช้เครื่องสแกนรุ่น canner Brother ADS-1600W

2. นำภาพที่สแกนได้เข้าโปรแกรม Image J เพื่อวิเคราะห์ความเข้มสีในแต่ละความเข้มข้น โดยมีขั้นตอนการวิเคราะห์ดังรูปที่ จากซ้ายไปขวา เริ่มจากการสแกนแต่ละความเข้มข้น แล้วทำการปรับสีเพื่อคัดให้ได้สีที่ต้องการซึ่งในที่นี่คือสีม่วงอมฟ้าด้วยการปรับ color threshold จาก Image J

3. วาดวงกลมลงบนบริเวณวงสีที่ต้องการวิเคราะห์ จะสามารถวัดความเข้มที่ได้จากการวิเคราะห์ LCV ในงานวิจัยนี้คือความเข้มของสีม่วงอมน้ำเงิน

4. นำค่าความเข้มสีที่ได้จากการวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมมาแสดงค่า RGB ที่ค่าของสีแดง สีเขียว และสีน้ำเงิน และค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวิเคราะห์ ดังรูปที่ 3.4

5. สร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มเฉลี่ยของสีกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน



รูปที่ ฉ1 แสดงภาพขั้นตอนการวิเคราะห์ผลของสีด้วยโปรแกรม Image J

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ช

การใช้เครื่อง UV-Visible Spectrophotometer รุ่น Hitachi Spectrophotometer Model U-2900 Double Beam Spectrophotometer

1. เปิดเครื่อง spectrophotometer เลือกแหล่งกำเนิดแสง และกำหนดความยาวคลื่นแสงที่ต้องการ โดยการเปิดเครื่องก่อนใช้งานเป็นเวลา 5 นาที

2. เลือก cuvette ให้เหมาะกับสารตัวอย่าง ใส่สารตัวอย่างใน cuvette เช็ดด้านข้างของ cuvette ให้ใสะอาด

3. วาง cuvette ในช่องสำหรับใส่ในเครื่อง ปิดฝาเครื่อง และวัดค่าการดูดกลืนแสงจากจอแสดงผล ใน กรณีที่เป็นเครื่องแบบ double beam จะใช้ cuvette 2 อันคือ blank และสารตัวอย่าง เครื่องจะทำการหักลบค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างและ blank ให้อ่านผลได้จากจอแสดงผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ซ

ค่าสเปกตรัมของการตรวจวัดด้วยวิธี Spectroscopy ที่ช่วงความยาวคลื่น UV-Visible

ตารางที่ ซ 1 : ค่าการดูดกลืนแสงและค่าความยาวคลื่นช่วง 350 – 750 nm ของสารละลาย HNB ที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมช่วง 0-14 Mm

Wavelength(nm)	[20] mM	[30] mM	[40] mM	[50] mM	[60] mM	[70] mM	[80] mM
350	0.3181	0.2851	0.2521	0.2190	0.1860	0.1304	0.0748
360	0.3065	0.2736	0.2407	0.2077	0.1748	0.1220	0.0692
370	0.2913	0.2593	0.2273	0.1953	0.1632	0.1134	0.0635
380	0.2853	0.2535	0.2217	0.1899	0.1582	0.1092	0.0602
390	0.2793	0.2478	0.2163	0.1847	0.1532	0.1064	0.0597
400	0.2754	0.2440	0.2127	0.1813	0.1500	0.1048	0.0595
410	0.2737	0.2424	0.2111	0.1798	0.1484	0.1043	0.0601
420	0.2727	0.2413	0.2100	0.1786	0.1473	0.1038	0.0603
430	0.3081	0.2632	0.2182	0.1732	0.1282	0.0892	0.0501
440	0.3104	0.2652	0.2201	0.1749	0.1298	0.0908	0.0518
450	0.3147	0.2692	0.2237	0.1782	0.1327	0.0935	0.0543
460	0.3207	0.2747	0.2288	0.1828	0.1369	0.0971	0.0573
470	0.3338	0.2866	0.2393	0.1921	0.1449	0.1043	0.0636
480	0.3459	0.2973	0.2487	0.2002	0.1516	0.1103	0.0689
490	0.3665	0.3156	0.2646	0.2137	0.1627	0.1202	0.0776
500	0.3879	0.3343	0.2808	0.2273	0.1738	0.1298	0.0859
510	0.4137	0.3570	0.3003	0.2436	0.1869	0.1414	0.0958
520	0.4451	0.3846	0.3240	0.2635	0.2030	0.1554	0.1079
530	0.4653	0.4023	0.3393	0.2764	0.2134	0.1644	0.1155
540	0.4582	0.4021	0.3461	0.2900	0.2340	0.1806	0.1271
550	0.4692	0.4122	0.3552	0.2982	0.2412	0.1865	0.1318
560	0.4867	0.4273	0.3680	0.3086	0.2492	0.1939	0.1386
570	0.5171	0.4532	0.3894	0.3255	0.2617	0.2062	0.1507
580	0.5334	0.4672	0.4010	0.3348	0.2686	0.2129	0.1572
590	0.5210	0.4572	0.3934	0.3296	0.2658	0.2087	0.1517
600	0.4835	0.4258	0.3681	0.3104	0.2527	0.1943	0.1359
610	0.4264	0.3775	0.3285	0.2796	0.2306	0.1716	0.1126
620	0.3766	0.3346	0.2926	0.2505	0.2085	0.1509	0.0932
630	0.3373	0.3000	0.2628	0.2256	0.1884	0.1336	0.0789
640	0.3009	0.2676	0.2344	0.2011	0.1678	0.1172	0.0666
650	0.2843	0.2527	0.2210	0.1894	0.1577	0.1096	0.0614
660	0.2692	0.2390	0.2088	0.1785	0.1483	0.1025	0.0566
670	0.2628	0.2334	0.2040	0.1746	0.1452	0.1001	0.0550
680	0.2595	0.2303	0.2011	0.1719	0.1427	0.0983	0.0539
690	0.2575	0.2281	0.1988	0.1695	0.1402	0.0965	0.0527
700	0.2563	0.2270	0.1978	0.1686	0.1394	0.0959	0.0523
710	0.2549	0.2259	0.1969	0.1678	0.1388	0.0953	0.0519

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

720	0.2542	0.2253	0.1964	0.1674	0.1385	0.0951	0.0517
730	0.2534	0.2246	0.1958	0.1670	0.1382	0.0948	0.0514
740	0.2528	0.2241	0.1953	0.1666	0.1379	0.0945	0.0512
750	0.2523	0.2237	0.1950	0.1664	0.1377	0.0943	0.0509

ตารางที่ ซ 2 : ค่าการดูดกลืนแสงและค่าความยาวคลื่นช่วง 400- 750 nm ของสารละลาย LCV ที่ความเข้มข้นของโซเดียมซัลไฟต์ช่วง 20-80 mM

Wavelength (nm)	[0] mM	[2] mM	[4] mM	[6] mM	[8] mM	[10] mM	[14] mM
400	0.26486	0.26379	0.26307	0.26272	0.26200	0.26129	0.26057
410	0.21740	0.21569	0.21455	0.21398	0.21284	0.21170	0.21056
420	0.18337	0.18398	0.18438	0.18459	0.18499	0.18540	0.18580
430	0.17229	0.17709	0.18030	0.18190	0.18510	0.18830	0.19151
440	0.18109	0.19020	0.19627	0.19930	0.20537	0.21144	0.21751
450	0.21105	0.22580	0.23564	0.24056	0.25040	0.26023	0.27007
460	0.24332	0.26170	0.27396	0.28009	0.29234	0.30460	0.31685
470	0.29068	0.31046	0.32365	0.33025	0.34344	0.35662	0.36981
480	0.31969	0.33931	0.35239	0.35893	0.37202	0.38510	0.39818
490	0.36187	0.38334	0.39765	0.40480	0.41912	0.43343	0.44774
500	0.43679	0.46199	0.47879	0.48719	0.50399	0.52079	0.53759
510	0.51274	0.54077	0.55946	0.56880	0.58749	0.60617	0.62486
520	0.66006	0.69492	0.71816	0.72978	0.75303	0.77627	0.79951
530	0.78206	0.82315	0.85054	0.86423	0.89162	0.91901	0.94640
540	0.92639	0.96975	0.99866	1.01311	1.04202	1.07093	1.09984
550	1.01381	1.05235	1.07805	1.09090	1.11659	1.14229	1.16798
560	1.09838	1.13361	1.15710	1.16884	1.19233	1.21582	1.23931
570	1.25991	1.29539	1.31905	1.33088	1.35454	1.37819	1.40185
580	1.32678	1.35504	1.37388	1.38330	1.40214	1.42097	1.43981
590	1.29793	1.30043	1.30209	1.30293	1.30459	1.30626	1.30792
600	1.20210	1.18073	1.16648	1.15936	1.14512	1.13087	1.11662
610	1.07783	1.03791	1.01129	0.99799	0.97137	0.94476	0.91814
620	0.97859	0.92499	0.88925	0.87139	0.83565	0.79992	0.76418
630	0.95528	0.89285	0.85123	0.83042	0.78881	0.74719	0.70557
640	1.00683	0.92681	0.87347	0.84680	0.79346	0.74011	0.68677
650	1.00314	0.91679	0.85922	0.83043	0.77286	0.71529	0.65772
660	0.77978	0.71236	0.66741	0.64493	0.59999	0.55504	0.51009
670	0.48833	0.43982	0.40749	0.39132	0.35898	0.32664	0.29431
680	0.24187	0.21226	0.19251	0.18264	0.16290	0.14316	0.12342
690	0.05343	0.03876	0.02898	0.02409	0.01431	0.00452	-0.00526
700	-0.03680	-0.04422	-0.04916	-0.05163	-0.05658	-0.06152	-0.06646
710	-0.08823	-0.09148	-0.09364	-0.09472	-0.09689	-0.09905	-0.10121
720	-0.10845	-0.11006	-0.11113	-0.11167	-0.11274	-0.11381	-0.11489
730	-0.12089	-0.12149	-0.12189	-0.12209	-0.12249	-0.12288	-0.12328
740	-0.12595	-0.12617	-0.12632	-0.12639	-0.12654	-0.12668	-0.12683
750	-0.12880	-0.12885	-0.12888	-0.12890	-0.12893	-0.12896	-0.12900
720	1.20210	1.18073	1.16648	1.15936	1.14512	1.13087	1.11662
730	1.07783	1.03791	1.01129	0.99799	0.97137	0.94476	0.91814

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

740	0.97859	0.92499	0.88925	0.87139	0.83565	0.79992	0.76418
750	0.95528	0.89285	0.85123	0.83042	0.78881	0.74719	0.70557

ตารางที่ ซ 3 : แสดงค่าการดูดกลืนแสงกับความยาวคลื่นของ CV LCV และ LCV เมื่อทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ความยาวคลื่น 300 – 700 nm

Wavelength (nm)	CV	dsDNA+LCV	LCV	Wavelength (nm)	CV	dsDNA+LCV	LCV
300	0.67579	0.43281	0.01257	510	0.91663	0.57798	0.00725
310	0.52563	0.33745	-0.00201	520	1.15504	0.73081	0.01834
320	0.29747	0.19230	-0.02135	530	1.30457	0.82622	0.02515
330	0.18293	0.11754	-0.02605	540	1.44708	0.92355	0.04244
340	0.14453	0.09225	-0.02743	550	1.52852	0.97514	0.04630
350	0.12982	0.08243	-0.02750	560	1.65439	1.05470	0.05183
360	0.11697	0.07371	-0.02799	570	1.90605	1.21269	0.06211
370	0.09270	0.05821	-0.03002	580	2.03094	1.28849	0.06698
380	0.08201	0.04989	-0.02617	590	1.87181	1.18486	0.06087
390	0.07747	0.04613	-0.02555	600	1.48404	0.94008	0.04568
400	0.07750	0.04556	-0.02480	610	0.96552	0.61271	0.02402
410	0.07958	0.04667	-0.02392	620	0.57212	0.36407	0.00764
420	0.09038	0.05313	-0.02276	630	0.34479	0.21959	-0.00285
430	0.11397	0.05864	-0.03637	640	0.18585	0.11752	-0.01051
440	0.13486	0.07235	-0.03460	650	0.13057	0.08144	-0.01367
450	0.17530	0.09774	-0.03226	660	0.09176	0.05562	-0.01566
460	0.22567	0.13003	-0.02985	670	0.07489	0.04400	-0.01587
470	0.32912	0.19698	-0.02464	680	0.06784	0.03928	-0.01646
480	0.42080	0.25667	-0.01972	690	0.06394	0.03624	-0.01826
490	0.56446	0.35025	-0.01168	700	0.06253	0.03507	-0.01813
500	0.72703	0.45581	-0.00287				

ตารางที่ ซ 4 : แสดงค่าการดูดกลืนแสงกับความยาวคลื่นของ CV LCV และ LCV ที่ความยาวคลื่น 400 – 700 nm เมื่อทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอมาตรฐานความเข้มข้น 0-100 ng/µL

Wavelength(nm)	[100] ng/µL	[80] ng/µL	[60] ng/µL	[40] ng/µL	[20] ng/µL	[0] ng/µL
400	0.47712	0.38849	0.29451	0.20053	0.10655	0.01257
410	0.37526	0.29963	0.22422	0.14881	0.07340	-0.00201
420	0.21941	0.16518	0.11855	0.07191	0.02528	-0.02135
430	0.13708	0.09799	0.06698	0.03597	0.00496	-0.02605
440	0.10910	0.07540	0.04969	0.02399	-0.00172	-0.02743
450	0.09807	0.06680	0.04322	0.01965	-0.00393	-0.02750
460	0.08831	0.05910	0.03733	0.01555	-0.00622	-0.02799
470	0.07165	0.04478	0.02608	0.00738	-0.01132	-0.03002
480	0.06087	0.03890	0.02263	0.00637	-0.00990	-0.02617
490	0.05621	0.03604	0.02064	0.00525	-0.01015	-0.02555
500	0.05517	0.03596	0.02077	0.00558	-0.00961	-0.02480
510	0.05609	0.03725	0.02196	0.00667	-0.00863	-0.02392
520	0.06279	0.04347	0.02691	0.01036	-0.00620	-0.02276

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

530	0.06855	0.04872	0.02745	0.00617	-0.01510	-0.03637
540	0.08345	0.06124	0.03728	0.01332	-0.01064	-0.03460
550	0.11085	0.08463	0.05541	0.02619	-0.00304	-0.03226
560	0.14609	0.11397	0.07802	0.04206	0.00610	-0.02985
570	0.21934	0.17461	0.12480	0.07498	0.02517	-0.02464
580	0.28473	0.22860	0.16652	0.10444	0.04236	-0.01972
590	0.38717	0.31332	0.23207	0.15082	0.06957	-0.01168
600	0.50267	0.40894	0.30599	0.20304	0.10008	-0.00287
610	0.63600	0.51996	0.39178	0.26361	0.13543	0.00725
620	0.80287	0.65875	0.49865	0.33855	0.17844	0.01834
630	0.90690	0.74554	0.56544	0.38535	0.20525	0.02515
640	1.01294	0.83415	0.63622	0.43830	0.24037	0.04244
650	1.06900	0.88127	0.67253	0.46379	0.25504	0.04630
660	1.15550	0.95391	0.72839	0.50287	0.27735	0.05183
670	1.32699	1.09838	0.83931	0.58025	0.32118	0.06211
680	1.40826	1.16873	0.89329	0.61785	0.34242	0.06698
690	1.29412	1.07560	0.82192	0.56824	0.31455	0.06087
700	1.02768	0.85247	0.65077	0.44907	0.24738	0.04568

ตารางที่ ซ 5 : แสดงค่าการดูดกลืนแสงกับความยาวคลื่นช่วง 300- 700 nm ของสารละลาย LCV เมื่อทำปฏิกิริยากับ KDML 105 RB_5 และ Blank (PCR Products)

Wavelength (nm)	Blank	RB_5	KDML 105	Wavelength (nm)	Blank	RB_5	KDML 105
300	0.05956	0.08306	0.43281	510	0.07134	0.10338	0.57798
310	0.03569	0.05455	0.33745	520	0.09839	0.13842	0.73081
320	0.00197	0.01362	0.19230	530	0.11520	0.16022	0.82622
330	-0.01055	-0.00279	0.11754	540	0.14140	0.19089	0.92355
340	-0.01458	-0.00815	0.09225	550	0.15067	0.20286	0.97514
350	-0.01571	-0.00982	0.08243	560	0.16459	0.22097	1.05470
360	-0.01710	-0.01166	0.07371	570	0.19164	0.25641	1.21269
370	-0.02067	-0.01600	0.05821	580	0.20470	0.27356	1.28849
380	-0.01804	-0.01397	0.04989	590	0.18771	0.25113	1.18486
390	-0.01785	-0.01400	0.04613	600	0.14653	0.19695	0.94008
400	-0.01721	-0.01341	0.04556	610	0.09023	0.12334	0.61271
410	-0.01627	-0.01245	0.04667	620	0.04756	0.06751	0.36407
420	-0.01448	-0.01034	0.05313	630	0.02192	0.03430	0.21959
430	-0.02573	-0.02042	0.05864	640	0.00363	0.01070	0.11752
440	-0.02262	-0.01663	0.07235	650	-0.00322	0.00201	0.08144
450	-0.01765	-0.01034	0.09774	660	-0.00785	-0.00394	0.05562
460	-0.01187	-0.00288	0.13003	670	-0.00929	-0.00600	0.04400
470	0.00027	0.01272	0.19698	680	-0.01034	-0.00728	0.03928
480	0.01132	0.02684	0.25667	690	-0.01229	-0.00930	0.03624
490	0.02894	0.04926	0.35025	700	-0.01228	-0.00936	0.03507
500	0.04861	0.07434	0.45581				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้