

การตรวจสอบข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอมโดยเทคนิคพีซีอาร์

Identification Non-fragrance rice by PCR technique



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเคมีสิ่งแวดล้อม

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2557

การตรวจสอบข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอมโดยเทคนิคพีซีอาร์
Identification Non-fragrance rice by PCR technique



โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเคมีสิ่งแวดล้อม
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2557

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Identification Non-fragrance rice by PCR technique



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULLFILLMENT
OF THE REQUIRMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
IN ENVIRONMENTAL CHEMISTRY
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2014




เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ การตรวจสอบข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอมโดยเทคนิคพีซีอาร์
 Identification Non- fragrance rice by PCR technique

ชื่อนักศึกษา นางสาวภัทรพร สืบสะอาด 54051104
 นางสาวสุชาดา เอียจะบก 54051136
 นางสาวสุนารี ชังอินทร์ 54051138

ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต
 สาขาวิชา เคมีสิ่งแวดล้อม
 อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.ชิปชัย วัฒนวิจารณ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้
 โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเคมี
 สิ่งแวดล้อม ประจำปีการศึกษา 2557

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.สุวรรณ จรรยาพูน	
ดร.เชิดศักดิ์ มณีรัตน์รุ่งโรจน์	
ดร.ชิปชัย วัฒนวิจารณ์	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การตรวจสอบข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอม โดยเทคนิคพีซีอาร์		
ชื่อนักศึกษา	นางสาวภัทรพร สืบสะอาด	54051104	
	นางสาวสุชาดา เอียจะบก	54051136	
	นางสาวสุนารี ชังอินทร์	54051138	
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต		
สาขาวิชา	เคมีสิ่งแวดล้อม		
ปีการศึกษา	2557		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์		

บทคัดย่อ

ข้าวหอมมะลิเป็นข้าวที่มีกลิ่นหอม เนื่องจากมีสาร 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้ความหอมโดยมีกลิ่นคล้ายใบเตย สารที่ทำให้ความหอมนี้เกิดจากยีน Betaine aldehyde dehydrogenase (Badh2) ที่มีความผิดปกติ ทำให้เกิดการสร้างสาร 2AP แต่ในยีน Badh2 ที่ปกติจะไม่เกิดการสร้างสารนี้ จึงเป็นจุดที่แตกต่างกันเพื่อที่จะนำมาแยกแยะระหว่างข้าวที่หอมและข้าวที่ไม่หอมได้ การตรวจสอบยีน Badh2 นี้ สามารถทำได้ด้วยการใช้เทคนิคพีซีอาร์ โดยได้ทำการศึกษาในข้าว 4 สายพันธุ์ คือ ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (KDML 105) ข้าวปทุมธานี 1 (PTT 1) ข้าว กข 31 (RD 31) และข้าว Rice Berry ผลที่ได้จากการสกัดยีนของข้าวแต่ละสายพันธุ์ นำมาตรวจสอบหา ยีน Badh2 ที่ปกติ โดยอาศัยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จับอย่างเฉพาะเจาะจงกับยีน Badh2 ที่ปกติ ซึ่งถ้าเป็นข้าวที่มีความหอมซึ่งจะมียีน Badh2 ไม่สมบูรณ์ ไพรเมอร์นี้จะไม่จับและผลการทดลองจะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แต่ถ้าเป็นข้าวที่ไม่มีความหอมซึ่งมียีน Badh2 สมบูรณ์ ไพรเมอร์จะจับและสร้าง PCR Product ทำให้ผลการทดลองจะปรากฏแถบดีเอ็นเอ โดยผลการทดลองจะได้ว่าข้าว KDML 105 และข้าว PTT 1 ซึ่งเป็นข้าวหอมจะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แต่ในข้าว RD 31 และข้าว Rice Berry ซึ่งเป็นข้าวไม่หอมนั้นจะปรากฏแถบดีเอ็นเอ ดังนั้น ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การใช้เทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะเจาะจงกับยีน Badh2 สามารถนำมาตรวจสอบการปลอมปนในข้าวหอมมะลิได้

คำสำคัญ : ข้าวไม่มีกลิ่นหอม ข้าวที่มีกลิ่นหอม 2AP PCR Badh2

Title	Identification Non-fragrance rice by PCR technique		
Students	Miss Pattaraporn Suebsa-ard	54051104	
	Miss Suchada Iachabok	54051136	
	Miss Sunaree Changin	54051138	
Degree	Bachelor of Science		
Major Program	Environmental Chemistry		
Academic Year	2014		
Advisor	Dr.Tipachai Vatanavicharn		

ABSTRACT

Aromatic rice or Jasmine rice is highly value by most rice consumers. 2-Acetyl-1-pyrroline (2AP) is the major aromatic compound in the rice. The accumulation of 2AP is due to the deletion of eight base pairs in an aromatic gene of the fragrance rice, Betaine aldehyde dehydrogenase2 (Badh2). In this study, the deletion region of Badh2 gene was used to discriminate between fragrance rice and non-fragrance rice. A part of Badh2 gene of the fragrance rice (KDML105 and PTT1) and non-fragrance rice (RD31) were amplified by PCR. Nucleotide sequence of the amplification fragments was performed. Nucleotide sequence alignment showed the eight-base-pair deletion region in Badh2 gene of the fragrance rice. Base on the nucleotide sequence of the mutation region, a pair of fragrance rice Badh2 specific primer was designed. The primers were tested by a conventional PCR. The positive DNA band at the approximate size of 494 base pairs was showed in the PCR result of non-fragrance rice but was not in the fragrance rice. Non identified rice, Rice berry, was also showed the positive DNA band. The Badh2 gene of Rice berry was sequenced and identified as the non-fragrance rice. From these results, the Badh2 gene specific primers have a potential to discriminate the non-fragrance rice from the fragrance rice using the conventional PCR technique.

Keywords : Non-fragrance rice, Fragrance rice, 2AP, PCR, Badh2

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ต้องขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ รวมไปถึงข้อเสนอแนะต่างๆในการแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นในการทำโครงการพิเศษนี้จนประสบความสำเร็จ

ขอขอบคุณศูนย์แม่ลัดพันธุ์ข้าวชลบุรี กรมการข้าว ที่ได้อนุเคราะห์แม่ลัดพันธุ์ข้าวแท้ ตลอดถึงการต้อนรับและการแนะนำเกี่ยวกับแม่ลัดพันธุ์ข้าวต่างๆที่ใช้ในการทำโครงการพิเศษ

ขอขอบคุณหน่วยวิจัยเคมีวิเคราะห์เชิงประยุกต์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้อนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือและสารเคมี ตลอดการทำโครงการพิเศษ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมี เจ้าหน้าที่ห้องธุรการภาควิชาเคมี ในการอำนวยความสะดวกในการเปิดอุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ

ขอขอบคุณพี่ๆนักศึกษาปริญญาโทและปริญญาเอก ภาควิชาเคมีที่ได้อนุเคราะห์เครื่องมือสารเคมี รวมไปถึงคำปรึกษาและคำแนะนำต่างๆ

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และบุคคลในครอบครัว ที่ให้ความช่วยเหลือ อนุเคราะห์อำนวยความสะดวกในด้านต่างๆตลอดการทำโครงการพิเศษ

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณเพื่อนๆ ที่พูดคุยและให้กำลังใจกันตลอดการทำโครงการพิเศษ

ภัทรพร สืบสะอาด

สุชาดา เขียวจะบก

สุนารี ชังอินทร์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญรูป	VII
คำย่อและสัญลักษณ์	IX
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	4
2.1.1 ปฏิกริยาถูกโซ่โพลีเมอร์หรือพีซีอาร์	4
2.1.2 เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Gel Electrophoresis)	9
2.1.3 สารให้ความหอมของข้าว	11
2.1.4 ยีนความหอม	12
2.1.5 ข้าวหอมมะลิ (Jasmine rice)	14
2.1.6 ข้าวปทุมธานี 1 (PTT 1)	15
2.1.7 ข้าวพันธุ์ กข 31 (ปทุมธานี 80) หรือ RD31 (Pathum Thani 80)	16
2.1.8 ข้าวพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่ (Rice Berry)	17
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	18
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์	20
3.2 สารเคมี	20
3.3 วิธีการทดลอง	21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
3.3.1 การสกัดสารพันธุกรรม (DNA) จากเมล็ดข้าวอย่างง่าย	21
3.3.2 การสกัดสารพันธุกรรม (DNA) จากเมล็ดข้าวโดยใช้ชุด Kit (Favorgen, Biotech Corp)	21
3.3.3 การออกแบบไพรเมอร์	22
3.3.4 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสสำหรับผลิต PCR Product	24
3.3.5 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสสำหรับตรวจสอบ ยีนความหอมของข้าวแบบปกติ	25
3.3.6 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสสำหรับตรวจสอบ ยีนความหอมของข้าวแบบใส่ตัวควบคุม	26
3.3.7 การวิเคราะห์ผล PCR Product ด้วยเทคนิค Agarose Gel Electrophoresis	28
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	
4.1 ผลจากการสกัดตัวอย่างข้าว	29
4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์สำหรับผลิต PCR Product	30
4.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์สำหรับตรวจสอบยีนความหอมของข้าว	
4.3.1 การทำพีซีอาร์สำหรับตรวจสอบยีนความหอมของข้าวแบบปกติ	32
4.3.2 การทำพีซีอาร์สำหรับตรวจสอบยีนความหอมของข้าวแบบ ใส่ตัวควบคุม	33
บทที่ 5 สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปผลการทดลอง	35
5.2 วิจัยรณัผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	35
เอกสารอ้างอิง	36
ภาคผนวก ก	39
ภาคผนวก ข	45
ภาคผนวก ค	47
ภาคผนวก ง	49

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1 ตารางแสดงไพรเมอร์ที่ออกแบบได้	22
ตารางที่ 3.2 ตารางแสดงสารผสมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์ สำหรับผลิตสาร PCR Product	24
ตารางที่ 3.3 ตารางแสดงสารผสมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์ สำหรับตรวจสอบยีนความหอมของข้าวแบบปกติ	26
ตารางที่ 3.4 ตารางแสดงสารผสมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์ สำหรับตรวจสอบยีนความหอมของข้าวแบบใส่ตัวควบคุม	27
ตารางที่ 4.1 แสดงความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้	30



สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1.1 ข้าวหอมพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105	1
รูปที่ 2.1 แสดงการจำลองตัวของสายดีเอ็นเอ (DNA Replication)	4
รูปที่ 2.2 แสดงการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	5
รูปที่ 2.3 การตรวจผลโดย Gel Electrophoresis	10
รูปที่ 2.4 ลำดับการเคลื่อนที่ของขนาดของดีเอ็นเอช่วง 100bp ถึง 1000bp	11
รูปที่ 2.5 แสดงโครงสร้างของสาร 2-acetyl-1-pyrroline (2AP)	12
รูปที่ 2.6 แสดงโครงสร้างและตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีน Badh2	13
รูปที่ 2.7 การเกิดกระบวนการเกิดสาร 2AP ในข้าวหอม	13
รูปที่ 2.8 ข้าวหอมพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 (Khao Dawk Mali 105; KDML105)	14
รูปที่ 2.9 ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (PTT 1)	15
รูปที่ 2.10 ข้าวพันธุ์กข31 หรือ ปทุมธานี80 (RD 31)	16
รูปที่ 2.11 ข้าวพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่ (Rice Berry)	17
รูปที่ 3.1 การเปรียบเทียบความแตกต่างของยีน Badh1 และยีน Badh2	23
รูปที่ 3.2 แสดงอุณหภูมิช่วงต่างๆในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส สำหรับผลิตPCR Product	25
รูปที่ 3.3 แสดงอุณหภูมิช่วงต่างๆในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส สำหรับตรวจสอบยีนความหอมของข้าวแบบปกติ	26
รูปที่ 3.4 แสดงอุณหภูมิช่วงต่างๆในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส สำหรับตรวจสอบยีนความหอมของข้าวแบบใส่ตัวควบคุม	27
รูปที่ 3.5 แสดงภาพขั้นตอนของกระบวนการ Gel Electrophoresis	28
รูปที่ 4.1 แสดงการเปรียบเทียบคุณภาพของการสกัดดีเอ็นเอ	29
รูปที่ 4.2 แสดงผลการวิเคราะห์ PCR Product โดยใช้ Gel Electrophoresis	30
รูปที่ 4.3 ผลของลำดับสารพันธุกรรมข้าว (DNA Sequencing)	31

สารบัญรูป(ต่อ)

หน้า

รูปที่ 4.4 แสดงผลการวิเคราะห์ PCR Product โดยใช้ Gel Electrophoresis สำหรับตรวจสอบยีนความหอมของข้าวแบบปกติ	33
รูปที่ 4.5 แสดงผลการวิเคราะห์ PCR Product โดยใช้ Gel Electrophoresis สำหรับตรวจสอบยีนความหอมของข้าวแบบใส่ตัวควบคุม	34
รูปที่ ก-1 โครงสร้าง BADH2 Chr8 ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์	40
รูปที่ ก-2 หน้าจอแสดงขั้นตอนที่ 1 ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์	40
รูปที่ ก-3 หน้าจอแสดงขั้นตอนที่ 2 ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์	41
รูปที่ ก-4 หน้าจอแสดงขั้นตอนที่ 3 ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์	41
รูปที่ ก-5 หน้าจอแสดงขั้นตอนที่ 4 ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์	42
รูปที่ ก-6 หน้าจอแสดงขั้นตอนที่ 4 ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์	42
รูปที่ ก-7 หน้าจอแสดงขั้นตอนที่ 4 ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์	43
รูปที่ ก-8 หน้าจอแสดงขั้นตอนที่ 6 ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์	43
รูปที่ ก-9 หน้าจอแสดงขั้นตอนที่ 6 ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์	44
รูปที่ ก-10 หน้าจอแสดงขั้นตอนที่ 7 ที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์	44

คำย่อและสัญลักษณ์

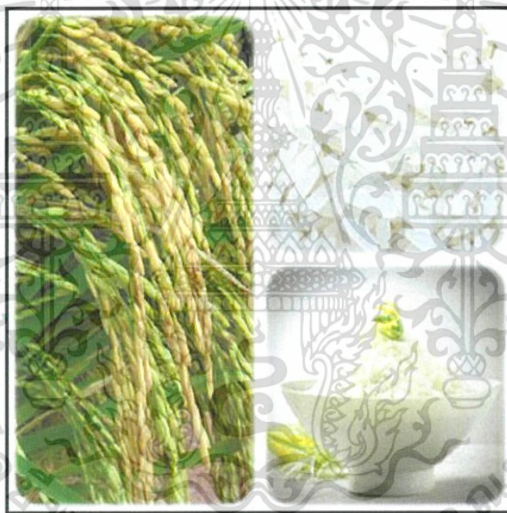
คำย่อ	ความหมาย
PCR Product	ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส
ไพรเมอร์	ดีเอ็นเอสายสั้นๆที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบซึ่งจะเข้าคู่กับด้าน 3' ของจุดเริ่มต้นในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่
DNA Template	ดีเอ็นเอต้นแบบ
KDML 105	ข้าวพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105
PTT 1	ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1
RD 31	ข้าวพันธุ์ กข 31 หรือ ปทุมธานี 80
Rice Berry	ข้าวพันธุ์ไรซ์เบอร์รี่
S	ดีเอ็นเอมาตรฐาน
μL	ไมโครลิตร
μM	ไมโคร โมล
mL	มิลลิลิตร
mM	มิลลิ โมล
M	โมล
bp	base pair
rpm	จำนวนรอบต่อนาที
คำย่อ	ความหมาย
F	Forward primer
R	Reverse primer
mm	มิลลิเมตร

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ข้าวขาวดอกมะลิ 105 เป็นข้าวที่มีประวัติความเป็นมาอันยาวนาน โดยกองบำรุงพันธุ์กรรมกรข้าว ได้รับพันธุ์ข้าวมาจากเกษตรกรใน อำเภอบางคล้า จังหวัดฉะเชิงเทรา และได้ทดลองเพื่อปลูกคัดเลือก แบบคัดสายพันธุ์บริสุทธิ์ จนได้สายพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 4-2-105 จากนั้นคณะกรรมการพิจารณาพันธุ์ให้ใช้ขยายพันธุ์เป็นพันธุ์รับรอง เมื่อวันที่ 25 พฤษภาคม 2505 ให้ชื่อว่า ข้าวดอกมะลิ 105 (สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว กรรมกรข้าว, 2553)



รูปที่ 1.1 ข้าวหอมพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105

(ที่มา : <http://www.imaimorganic.com/blog> , 17 พฤศจิกายน 2557)

ในปัจจุบันข้าวหอมมีความนิยมรวมถึงเป็นที่ต้องการมากของผู้บริโภคทั้งภายในประเทศและต่างประเทศ ทั้งในแถบเอเชีย ยุโรป และอเมริกา ส่งผลให้ราคาข้าวหอมนั้นมีมูลค่ามากกว่าข้าวที่ไม่หอม(ปาริฉัตร และคณะ, 2554) อีกทั้งข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้าวหอมมะลิ (ธิปชัย, 2555)เนื่องจากข้าวหอมมะลินั้นมีคุณสมบัติพิเศษ โดยเฉพาะข้าวขาวดอกมะลิ ที่เป็นข้าวหอมของไทยมีลักษณะพิเศษคือ เมล็ดข้าวสีขาว เรียวยาว เมล็ดข้าวกลี้ยงใส เลื่อมมัน จมูกเล็ก และจัดว่าเป็นข้าวอะไมโลสต่ำ ข้าวใหม่หุงให้ดีจะได้ข้าวสุกที่เป็นตัวเหนียวนุ่ม มีกลิ่นหอม (วรวิทย์, 2530)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากราคาขายของข้าวขาวดอกมะลิ 105 มีราคาที่สูงเมื่อเทียบกับข้าวชนิดอื่นๆ (thairicemillers, 2557) จึงมีผู้ค้าที่หาผลประโยชน์โดยนำข้าวคุณภาพด้อยกว่าไปปนในข้าวขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งเป็นข้าวคุณภาพสูง เพื่อผลกำไรที่มากขึ้น (พยอม และคณะ, 2550) ซึ่งไม่สามารถสังเกตความแตกต่างทางกายภาพได้ โดยในปัจจุบันประเทศไทยประสบกับปัญหาการปลอมปนข้าวหอมมะลิ ด้วยข้าวที่มีลักษณะทางกายภาพที่คล้ายคลึงกัน ซึ่งอาจทำให้นำไปสู่การขาดความเชื่อมั่นของผู้บริโภค ทั้งในระดับจุลภาค และมหภาค ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อระบบการค้า และเศรษฐกิจของชาติได้

ลักษณะสำคัญของข้าวหอมมะลิที่แตกต่างจากข้าวอื่นๆคือ ข้าวหอมมะลิมีลักษณะที่โดดเด่นที่ความหอมของข้าว กลิ่นหอมของข้าวเกิดจากสาร 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) ซึ่งถูกสังเคราะห์ในวิถี polyamine โดยมีกรดอะมิโน proline เป็นสารตั้งต้น และถูกควบคุมด้วยยีน cdo1 Badh ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 4 และ 8 ในสภาพปกติ ยีน Badh จะเปลี่ยนสาร gamma-aminobutyraldehyde (GABald) เป็นสาร gamma-aminobutyric acid (GABA) แต่ถ้ายีนดังกล่าวเกิดการกลายพันธุ์ ข้าวจะเปลี่ยนสาร GABald เป็นสาร 2AP จึงทำให้ข้าวมีกลิ่นหอม (สุทิน และศรีสวัสดิ์, 2553) ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล

เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นเทคนิคการเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในหลอดทดลอง และจะเกิดต่อเนื่องซ้ำกันเป็นวงจรลูกโซ่(วิระพงษ์ และ นิภาภรณ์, 2551) โดยเทคนิคพีซีอาร์เป็นเทคโนโลยีที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ในระดับโมเลกุลที่ให้ความถูกต้องและแม่นยำ ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (พยอม และคณะ, 2550) ดังนั้นการตรวจสอบความแตกต่างระหว่างข้าวหอมและข้าวไม่หอม สามารถทำได้ในระดับโมเลกุลโดยอาศัยเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งจะช่วยให้สังเกตเห็นความแตกต่างของข้าวที่มีกลิ่นหอมและข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอม รวมทั้งสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจสอบ และมีความถูกต้องแม่นยำ น่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

สามารถบอกความแตกต่างระหว่างข้าวที่มีกลิ่นหอม กับข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอมได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ในการแยกข้าวที่กลิ่นหอมและไม่มีกลิ่นหอมได้ โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดข้าวอย่างง่าย และการสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดข้าวด้วย Kit Plant Extraction และเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัด และนำสารดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่

โพลีเมอร์ และทำการส่งตัวอย่างตรวจหาลำดับสารพันธุกรรม แล้วจึงออกแบบไพรเมอร์ที่มีจำเพาะกับความแตกต่างของยีนที่แสดงออกถึงความมีกลิ่นหอมและไม่มีกลิ่นหอมของข้าว

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ใช้เทคนิค PCR ในการตรวจสอบยีนความหอมของข้าวได้
2. นำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1.1 ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หรือ พีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction: PCR)

ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หรือ พีซีอาร์ เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ เป้าหมาย (DNA target) ภายในระยะเวลาอันรวดเร็ว โดยอาศัยหลักการจำลองตัวของสายดีเอ็นเอ (DNA Replication) (รูปที่ 2.1) เทคนิคพีซีอาร์ถูกพัฒนาขึ้นโดย Kary Mullis ในปี 1983 ส่วนมากจะใช้เทคนิคพีซีอาร์ ในการเพิ่มปริมาณของสารพันธุกรรม หรือ ดีเอ็นเอ (DNA) โดยใช้เครื่อง PCR machine หรือ Thermal cycler เป็นตัวช่วยให้เกิดปฏิกริยา โดยสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้เป็นล้านๆเท่า ข้อดีของเทคนิคนี้คือ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างเฉพาะเจาะจง โดยมีขั้นตอนการทำงานน้อย และใช้เวลาไม่นาน (มาลินี ,2551) พีซีอาร์เป็นเทคโนโลยีที่สำคัญมาก สามารถนำไปใช้ได้กับงานวิจัยทางชีวโมเลกุล และพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) การสร้าง DNA probe และการวิจัยประยุกต์ เช่น การสร้างยีนกลายพันธุ์ (PCR based mutagenesis) การศึกษาการแสดงออกของยีนจาก mRNA การตรวจหาดีเอ็นเอของไวรัสซึ่งเป็นสาเหตุของโรค เป็นต้น (หน่วยปฏิบัติการนิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่า, 2554)



รูปที่ 2.1 แสดงการจำลองตัวของสายดีเอ็นเอ (DNA Replication)

(ที่มา : <http://www.vcharkarn.com/varticle/36810>)

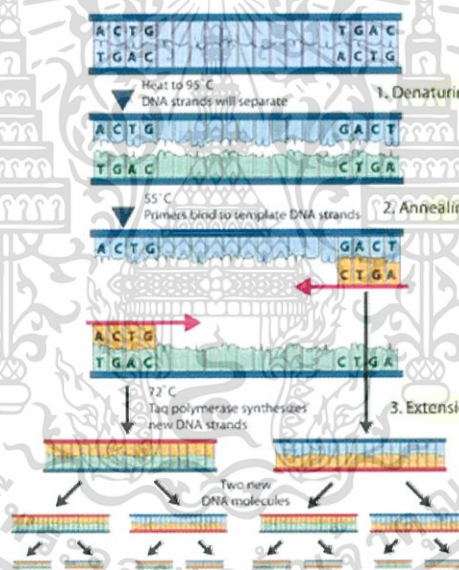
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลักการพื้นฐานของเทคนิคพีซีอาร์

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) จะทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ เป้าหมาย โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ในปริมาณที่น้อยมาก แล้วอาศัยการทำงานของ เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซ้ำกันหลายๆ รอบเป็นลูกโซ่ เพื่อให้เกิดการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอเป็นทวีคูณ (exponential)

หลักการทำงานของเทคนิคพีซีอาร์

เทคนิคนี้ใช้หลักการพื้นฐานในการเพิ่มดีเอ็นเอ ด้วยการจำลองดีเอ็นเอสายใหม่จากสายดีเอ็นเอ ที่เป็นต้นแบบหนึ่งสาย ด้วยเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) โดยใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้น หรือ ไพรมเมอร์ (Primer) 1 คู่ ทำให้สังเคราะห์ดีเอ็นเอได้คราวละ 2 สายพร้อมกัน หลักการทำงาน ประกอบด้วยปฏิกิริยาสำคัญ 3 ขั้นตอน และหมุนเวียนต่อเนื่องกันไป ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน (รูปที่ 2.2)



รูปที่ 2.2 แสดงการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

(ที่มา: <http://scienceinfoworld.blogspot.com/2012/11/polymerase-chain-reaction-pcr.html>)

ขั้นตอนแรกเรียกว่า **Denaturation** เป็นขั้นตอนการแยกสายดีเอ็นเอสายคู่ (double strand DNA) ให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single stranded DNA) โดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิสูง 90-95 °C

ขั้นตอนที่สองเรียกว่า **Primer Annealing** เป็นขั้นตอนการลดอุณหภูมิลงมาอยู่ที่ประมาณ 55-60° ทำให้ไพรมเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ ขั้นตอนนี้ต้องควบคุมอุณหภูมิให้ลดลงในระดับที่ใกล้เคียงกับ melting temperature (Tm) ของไพรมเมอร์ (โดยทั่วไปจะต่ำกว่า Tm 1-2 °C) เพื่อให้ไพรมเมอร์ สามารถจับกับกับ ดีเอ็นเอ ต้นแบบสายเดี่ยว ตรงบริเวณที่มีลำดับเบสคู่สมกับไพรมเมอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนที่สามเรียกว่า **Primer Extension** เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ ดีเอ็นเอสายใหม่จาก ส่วนปลาย 5' ของไพรเมอร์ไป 3' ตามดีเอ็นเอต้นแบบแต่ละสาย โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ผลจากปฏิกิริยาการสังเคราะห์ จะทำให้ได้ดีเอ็นเอสายใหม่ ซึ่งมีไพรเมอร์ ประกอบอยู่ด้วย ขั้นตอนนี้ใช้อุณหภูมิประมาณ 72-75 °C เพราะเป็นช่วงอุณหภูมิที่ เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุด(มาลินี, 2551)

ส่วนประกอบในปฏิกิริยาของเทคนิคพีซีอาร์ (คิวพร และคณะ, 2555)

ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) เป็นดีเอ็นเอสายคู่ (double stranded DNA) ที่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอต้นแบบที่ต้องการ และทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอต้นแบบ บริเวณช่วงที่เราต้องการ เพิ่มจำนวนเพื่อนำมาใช้สังเคราะห์ไพรเมอร์

1) ไพรเมอร์ (DNA primer) คือ ดีเอ็นเอสายสั้นๆ ที่มีลำดับเบสคู่สม (complementary sequence) กับ DNA template และใช้เป็น ดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่

2) ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) เอนไซม์ที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาในการเกิดปฏิกิริยา ลูกลิงโพลีเมอเรสที่นิยมใช้ คือ *Taq* DNA polymerase ซึ่งแยกได้จากเชื้อแบคทีเรียที่เจริญได้ในน้ำพุ ร้อนที่มีชื่อ *Thermus aquaticus* (*Taq*) ซึ่งมีคุณสมบัติทนความร้อนได้สูงและไม่เสียคุณสมบัติ ของเอนไซม์ในขั้นตอน Denaturation ที่มีความร้อนที่อุณหภูมิสูง 90-95 °C

3) ดิออกซีนิวคลีโอไทด์ (Deoxynucleotide triphosphate ; dNTPs) เป็น substrate สำหรับการสร้าง ดีเอ็นเอ สายใหม่ dNTPs ประกอบไปด้วย ดิออกซีอะดีโนซีนฟอสเฟต(dATP) ดิออกซี กวานโนซีนไตรฟอสเฟต(dGTP) ดิออกซีไซติดีนไตรฟอสเฟต(dCTP) และดิออกซีไทมีดีนไตร ฟอสเฟต(dTTP) ความเข้มข้นของ dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ปกติอยู่ระหว่าง 50-200mM ของแต่ละdNTP แต่ถ้าเป็น dNTPs ทั้ง 4 ตัว จะมีส่วนประกอบรวมไม่เกิน 800 mM การ เตรียม dNTPs ควรเตรียมเป็น Primary stock solution ที่เจือจาง 10 mM แล้วแบ่ง Aliquot เก็บที่ 20°C

4) บัฟเฟอร์ (PCR buffer) ส่วนประกอบของบัฟเฟอร์ประกอบด้วย Tris-HCL, KCL, MgCl₂ และ Glycerol ความเข้มข้นและภาวะที่เหมาะสมของส่วนประกอบต่างๆในบัฟเฟอร์มีดังนี้

ความเข้มข้นของ Mg²⁺ *Taq* DNA polymerase ต้องการ Mg²⁺ เพื่อช่วยส่งเสริมให้ ปฏิกิริยาขยายสายดีเอ็นเอดำเนินต่อไปได้ โดย Mg²⁺ จะทำหน้าที่เป็น Co-factor นอกจากนั้น Mg²⁺ ยังมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ด้วย และมีผลต่อการ Anneal ของ ไพรเมอร์ ความเข้มข้น ของMg²⁺ ต้องปรับเปลี่ยนให้พอเหมาะกับความเข้มข้นของ dNTPs โดยทั่วไปมักใช้ Mg²⁺ ความเข้มข้นทั้งหมดเป็น 1.5 mM

pH ค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานสำหรับ *Taq* DNA polymerase คือ ที่ pH 7-7.5 ที่ อุณหภูมิ 72 °C แต่ปกติ *Taq* DNA polymerase จะอยู่ใน Tris buffer ซึ่งมี pH 8.5-9.0 ที่ 25 °C เนื่องจาก pH ของ Tris-buffer จะลดลงประมาณ 0.03 ของอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นแต่ละองศาเซลเซียส ดังนั้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 72 °C จะได้ pH 7.3

การคัดเลือกและการออกแบบไพรเมอร์ (Primer Design) (สุสดี, 2553)

การออกแบบไพรเมอร์ ที่ใช้จะต้องเลือกให้เหมาะสม โดยอาศัยหลักการจับคู่แบบจำเพาะของดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจหากับไพรเมอร์ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์จะเป็นตัวกำหนดความจำเพาะในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

ข้อแนะนำในการคัดเลือกและออกแบบ ไพรเมอร์ คือ

- 1) ความยาวของไพรเมอร์ ควรมีความยาวประมาณ 18-30 นิวคลีโอไทด์
- 2) ควรเลือกไพรเมอร์ที่มี GC content อยู่ระหว่าง 50-60%
- 3) ควรเลือกไพรเมอร์ที่มี Random base distribution และมีปริมาณ GC ที่ใกล้เคียงกับซีดีเอ็นเอเป้าหมาย ควรหลีกเลี่ยงไพรเมอร์ ที่มี Polypurines และ Polypyrimidines หรือมีลำดับการเรียงตัวที่ไม่ปกติ (Unusual sequence)
- 4) ไพรเมอร์ ต้องมีความจำเพาะกับลำดับเบสเป้าหมายในดีเอ็นเอต้นแบบ คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ต้องมีความจำเพาะเพียงแห่งเดียวในสายดีเอ็นเอต้นแบบ
- 5) หลีกเลี่ยงลำดับเบสที่จับกับลำดับเบสของตัวเอง
- 6) ควรหลีกเลี่ยงลำดับเบสของแต่ละ ไพรเมอร์ ไม่ให้เป็นคู่สมกัน (complementary)
- 7) ค่า T_m (Melting temperature) ของแต่ละ ไพรเมอร์ ควรใกล้เคียงกัน โดยทั่วไปควรอยู่ในช่วง $55-80\text{ }^{\circ}\text{C}$
- 8) ไพรเมอร์ ควรมีลำดับคู่สมกับปลายด้าน 3' ของลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละสายของดีเอ็นเอต้นแบบ

ข้อดีของเทคนิค พีซีอาร์

- 1) ใช้ DNA template หรือ ดีเอ็นเอ ต้นแบบที่ต้องการศึกษาในปริมาณน้อยระดับไมโครลิตร ไม่จำเป็นต้องมีความบริสุทธิ์มาก สามารถใช้ดีเอ็นเอจากเส้นผม อสุจิ หรือเซลล์ขนาดเล็กๆ มาเป็นดีเอ็นเอ ต้นแบบได้
- 2) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้รวดเร็ว ประมาณ 1,000,000 เท่า ภายในเวลา 1 ชั่วโมง และสามารถนำดีเอ็นเอที่ได้ ไปศึกษาต่อได้โดยตรง
- 3) สามารถเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ ที่มีขนาดยาวได้ถึง 2,000 คู่เบส
- 4) ปฏิกริยาเกิดขึ้นในหลอด Microcentrifuge tube จึงไม่ต้องการเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียให้ยุ่งยาก

ข้อจำกัดทางด้านเทคนิคของวิธีพีซีอาร์

- 1) ต้องทราบลำดับเบสของยีน ที่ต้องการศึกษา
- 2) ต้องมีการสังเคราะห์ไพรเมอร์ขึ้น
- 3) อาจเกิดผลบวกปลอม (false-positive) เนื่องมาจากการปนเปื้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4) ความยาวของขนาดพีซีอาร์ แม้ว่าพีซีอาร์ จะสามารถทำให้ได้ผลผลิตที่มีขนาดยาว 10 kb ได้แต่ส่วนใหญ่จะได้ผลดีที่สุด เมื่อขนาดของพีซีอาร์ไม่มากกว่า 2 kb เพราะถ้ายาวกว่านี้ความผิดพลาดจะมากขึ้น เนื่องจากไพรเมอร์ และ Taq DNA polymerase ทำงานไม่สมบูรณ์ โดยจะมีการจับ dNTPs ที่ไม่ถูกต้องมาต่อเข้าภายในสาย ดีเอ็นเอ มากขึ้น

ประโยชน์ของพีซีอาร์ (มาลินี, 2555)

ปัจจุบันพบว่า พีซีอาร์ เป็นเทคนิคที่นำไปใช้ประโยชน์ได้หลายสาขาทั้งการแพทย์ การเกษตร โบราณคดี อุตสาหกรรม และอื่นๆอีกมากมาย จึงนับว่าเป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์มหาศาล ปัจจุบันมีเทคนิคใหม่ๆ ที่เพิ่มขึ้นมากมาย จึงเรียกว่า Advanced PCR อันได้แก่ Nested PCR, Reverse transcriptase PCR (RT-PCR) Multiplex PCR, Random Amplified Polymorphism of DNA (RAPD) และ Realtime PCR เป็นต้น ทำให้มีความหลากหลายในการเลือกใช้ให้เหมาะสมกับงานและได้ประโยชน์ยิ่งขึ้น

ประโยชน์ด้านการแพทย์ของเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) สามารถในการวินิจฉัยโรคต่าง ๆ ทั้งโรคติดเชื้อและโรคจากพันธุกรรม ได้แก่ การตรวจหาเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรค เช่น เอชไอวี โรค มาลาเรีย แม้มีเชื้อโรคในตัวอย่างที่ส่งมาตรวจจำนวนน้อย ทำให้การวินิจฉัยโรคเพื่อป้องกันและรักษาเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น และใช้เวลาน้อยลง ปัจจุบันมีการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นเพื่อลดขั้นตอนยุ่งยากต่างๆ ที่เสี่ยงต่อการปนเปื้อน นอกจากนี้จะยืนยันว่าเป็นโรคนั้นๆ ด้วยความไวและความจำเพาะสูงแล้ว ยังบอกความรุนแรงของโรคได้ด้วย

ประโยชน์ด้านการเกษตรของเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) สามารถต่อการตรวจ วินิจฉัยโรคพืช การตรวจสอบสายพันธุ์พืช นอกจากนี้แล้วเทคนิคพีซีอาร์ ยังช่วยให้ เข้าใจพันธุกรรมของเชื้อโรคพืชตลอดจนการนำไปใช้ในการป้องกันกำจัด โรคพืชที่เกิดจากเชื้อรา แบคทีเรีย และไวรัส หรือเชื้อสาเหตุโรคอื่น ๆ หรือนำมาใช้ในอุตสาหกรรม การเพาะเลี้ยงกิ่ง ซึ่งเป็นอุตสาหกรรมส่งออกที่ทำรายได้ให้กับประเทศจำนวนมาก โดยใช้เทคนิคนี้ตรวจ หาเชื้อสาเหตุโรคในกิ่ง เช่นเชื้อไวรัส ช่วยป้องกันการแพร่ระบาดของโรคได้ทันทั่วทั้ง

ประโยชน์ด้านการศึกษาจีโนม ของเทคนิคพีซีอาร์ (PCR) สามารถใช้ในการ ศึกษาความผันแปรหรือกลายพันธุ์ของยีน การทำแผนที่ยีน และการศึกษาลำดับเบสของสิ่งมีชีวิต นำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งในงานวิจัยทางชีววิทยาโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การเคราะห์ลำดับเบสของยีน (Gene sequencing) การสร้างดีเอ็นเอตรวจติดตาม (DNA probe) และการวิจัย อื่นๆ

ข้อควรระวังในการทำพีซีอาร์ (สุตติ, 2553)

การปนเปื้อน (Contamination) ถึงแม้ว่าเทคนิค พีซีอาร์ นี้จะเป็นวิธีที่สามารถเพิ่มจำนวน ดีเอ็นเอได้มากหลายล้านเท่า แต่ก็สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ที่ปนเปื้อนเพียงเล็กน้อยได้มากเช่นกัน ทำให้เกิดผลบวกปลอม (false positive) ได้ การปนเปื้อนอาจเกิดได้จาก

1) การปนเปื้อนขณะทำการสกัดแยก ดีเอ็นเอ หรือระหว่างทำการตรวจตัวอย่าง คือ Cross contamination

2) การปนเปื้อนแบบ Carry over contamination เป็นการปนเปื้อนของผลผลิตพีซีอาร์ ครั้งก่อนซึ่งมักจะอยู่ในรูปละอองลอย (Aerosol) ที่มักเกิดขณะการเปิด-ปิดฝาหลอด และการปั่นตกตะกอน ละอองลอยนี้สามารถปนเปื้อนกับสิ่งต่างๆ ในห้องปฏิบัติการทั้งอุปกรณ์เครื่องมือและวัสดุต่างๆ รวมทั้งผิวหน้า ผนัง และมือผู้ปฏิบัติการได้ ดังนั้น จึงควรมีการระวังการปนเปื้อนให้มาก โดยเฉพาะการปนเปื้อนชนิด Carry-over contamination

การป้องกันการปนเปื้อนที่อาจเกิดขึ้นในการทำพีซีอาร์ (สุตตี, 2553)

- 1) ควรแบ่งพื้นที่หรือห้องทำงานในการทำ พีซีอาร์
- 2) แบ่งสารเคมีหรือน้ำยาลงในหลอดเล็กๆ (Aliquot) เพื่อให้การนำมาใช้แต่ละครั้งไม่ปนกัน
- 3) ใช้ Micropipette และ Filter tip ซึ่งเป็น Tip ชนิดพิเศษที่ป้องกันการแพร่กระจายของละอองลอยโดยมีลักษณะสำคัญ คือ มีไส้กรอง (Membrane) อยู่ภายใน
- 4) มีตัวควบคุมที่เหมาะสมในการทำ พีซีอาร์ โดยตัวควบคุมจะมีด้วยกัน 3 แบบ คือ แบบแรกเป็นตัวควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอ เพื่อเป็นการควบคุมการปนเปื้อนของสารที่ใช้ (Negative control) แบบที่สองเป็นตัวควบคุมที่มีดีเอ็นเอ ชนิดที่ไม่มีลำดับเบสเป้าหมายอยู่ (Negative control) และแบบที่สามเป็นตัวควบคุมที่มีดีเอ็นเอ ต้นแบบที่มีลำดับเป้าหมายอยู่ (Positive control)
- 5) การปฏิบัติงานด้วยขบวนการปราศจากเชื้อ (Sterile technique) และด้วยความระมัดระวัง เช่น การสวมถุงมือ และเปลี่ยนถุงมือบ่อยๆ
- 6) ลดขั้นตอนย้ายถ่ายสารละลาย (Minimize handling of the solution) เช่น ลดขั้นตอนการใช้ปิเปต โดยการทำให้ Master mixture เมื่อต้องทำ พีซีอาร์ หลายตัวอย่าง

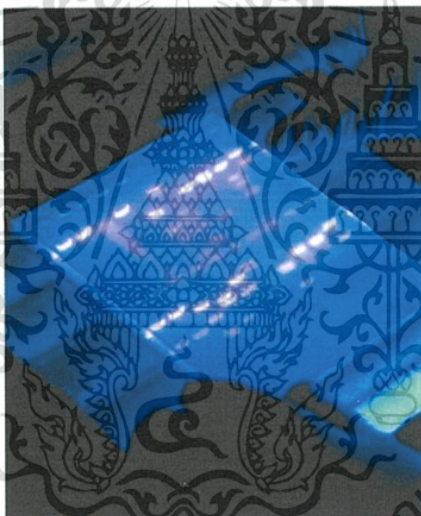
2.1.2 เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Gel Electrophoresis) (สุตตี, 2553)

เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Gel Electrophoresis) คือการวิเคราะห์ผลผลิตของพีซีอาร์ จากการย้อมดีเอ็นเอ ด้วยเอทิดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) หลังจากการผ่านกระบวนการ Electrophoresis แล้ว วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็วที่สุด เหมาะสำหรับการตรวจสอบหาผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ที่ทราบขนาดแน่นอน และได้ผลิตภัณฑ์ พีซีอาร์ เพียงชนิดเดียว หรือจำนวนน้อยชนิดที่สามารถเห็นความแตกต่างของขนาดได้ชัดเจน หากเป็นชิ้นส่วน ดีเอ็นเอ ที่มีขนาดยาวกว่า 500 คู่เบส นิยมใช้อะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเจลในการตรวจหา แต่หากเป็นดีเอ็นเอที่สั้นกว่า 500 เบส มักใช้อะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Agarose gel electrophoresis) ดีเอ็นเอที่เกิดจากเทคนิคนี้ไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ดังนั้นเพื่อตรวจหาผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ ต้องนำตัวอย่างที่ทำพีซีอาร์

มาทำการแยกหาดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิคที่เรียกว่าอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ซึ่งเป็นการแยกดีเอ็นเอ ด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้น (Agarose gel) โดยระยะทางที่ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ไปได้ขึ้นกับขนาดของดีเอ็นเอและกระแสไฟฟ้าที่ใช้ดีเอ็นเอที่แยกโดยวิธีนี้มองเห็นได้เมื่อย้อมด้วยสีพิเศษซึ่งเรืองแสงภายใต้แสงอุลตราไวโอเล็ต วิธีนี้เหมาะสำหรับการแยกสารที่มีขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลมากๆซึ่งไม่สะดวกหรือไม่สามารถวิเคราะห์ด้วยโพลีอะครีลาไมด์เจล อะกาโรสเป็นที่นิยมอย่างแพร่หลายในการวิเคราะห์เพราะมีรูตาข่ายของเจลขนาดใหญ่และการเตรียมเจลก็ง่ายกว่าโพลีอะครีลาไมด์เจล

อะกาโรส (Agarose) คือ Agar ชนิดหนึ่งซึ่งได้จากส่วนนอกสุดของผนังเซลล์ (cell wall) หรือส่วน intercellular matrix ของสาหร่ายสีแดง (Rhodophyta) เริ่มแรกมีการนำวุ้นมาใช้เป็นตัวก้ำจุนในการ electrophoresis แต่เนื่องจากตัววุ้นมีหมู่ประจุลบ เช่น ซัลเฟต และกลูโคเนต เป็นต้น จึงทำให้เกิดปัญหา electrophoresis ดังนั้น วุ้นที่ปราศจากประจุลบเหล่านี้เรียกว่า อะกาโรส ในปัจจุบันจึงมีการนำอะกาโรสมาใช้วิเคราะห์ในงานต่างๆแทนวุ้น (รูปที่ 2.3)



รูปที่ 2.3 การตรวจผลโดย Gel Electrophoresis

(ที่มา: <http://www.biologyreference.com/Dn-Ep/Electrophoresis.html>)

หลักการ

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดย Agarose gel electrophoresis ชิ้นส่วน ดีเอ็นเอ (DNA fragment) บนเจลจะวิเคราะห์ได้โดยการย้อมด้วยเอทีเดียมโบรไมด์ ซึ่งสอดแทรก (intercalate DNA) ระหว่างเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ และเรืองแสงในช่วงคลื่นของอุลตราไวโอเล็ต (ค่าความยาวคลื่นที่ 295 nm)

ในการวิเคราะห์จะอาศัยคุณสมบัติของ ดีเอ็นเอ ที่เคลื่อนใน Agarose gel โดยขึ้นกับ

- 1) ขนาดของ ดีเอ็นเอ ที่มีขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ช้ากว่าขนาดเล็ก (รูปที่ 2.4)
- 2) รูปร่างของ ดีเอ็นเอ ที่มีรูปร่างขดเป็นวง จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่า ดีเอ็นเอ ที่มีรูปร่างคล้ายเส้น

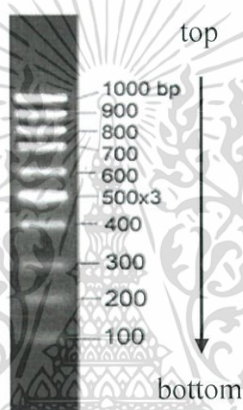
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับบัฟเฟอร์ (buffers) ที่ใช้ในการให้กระแสไฟฟ้าผ่าน gel electrophoresis ของดีเอ็นเอ จะใช้บัฟเฟอร์ pH 8 เช่น Tris-acetate ,Tris-borate และ Tris-phosphate บัฟเฟอร์ทั้ง 3 ชนิดนี้มีความแตกต่างกัน คือ

Tris-acetate เป็นบัฟเฟอร์ที่มีความจุบัฟเฟอร์ (buffer capacity) ต่ำที่สุด จึงจำเป็นต้องอาศัยการหมุนเวียน (recirculation) ระหว่างสองขั้วอยู่ตลอดเวลาในการวิเคราะห์เจล

Tris-borate เป็นบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้กันมาก เนื่องจากมีกรดบอริกเป็นตัวยับยั้งการเจริญเติบโตของพวกจุลินทรีย์จึงทำให้สามารถใช้บัฟเฟอร์ได้นาน

Tris-phosphate เป็นบัฟเฟอร์ที่ให้ความสะดวกกว่า Tris-borate ในกรณีที่จะนำเจลนั้นไปละลายโดยใช้โปตัสเซียมไอโอไดด์ (Potassium iodide) หรือโซเดียมเปอร์คลอเรท (Sodiumperchorate)



รูปที่ 2.4 ลำดับการเคลื่อนที่ของขนาดของดีเอ็นเอช่วง 100bp ถึง 1000bp

(ที่มา : <http://www.lightlabsusa.com/catalog/100-1000bp-DNA-Ladder-p-16211.html>)

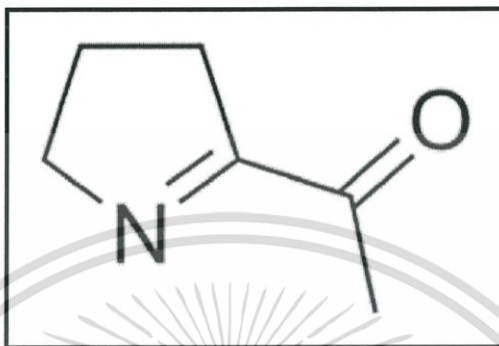
Agarose gel electrophoresis สามารถแยกดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน แต่มีลักษณะต่างกันออกจากกันได้ และผู้ใช้สามารถปรับรูปร่างของเจลให้เหมาะสมกับงาน โดยการเปลี่ยนความเข้มข้นของเจลได้อีกด้วย

2.1.3 สารให้ความหอมของข้าว

ความหอม หรือ กลิ่นหอมของข้าว เกิดจากความสามารถพิเศษในการผลิตสารหอมชนิดที่เรียกว่า popcorn-like scent แล้วเก็บสะสมไว้ในส่วนต่างๆของต้น โดยเฉพาะเมล็ด สารที่ทำให้เกิดกลิ่นหอมในข้าวหอมมีชื่อว่า 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) สารเคมีนี้ถูกค้นพบในข้าวหอมครั้งแรกเมื่อปี 1983 (Buttery et al. , 1983) เป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวน (heterocyclic) เป็นสารอยู่ในกลุ่ม pyrrol มีลักษณะทางเคมีเป็นวงห้าเหลี่ยมที่มีไนโตรเจนเกาะอยู่กลางวง มีพันธะระหว่างคาร์บอนกับไนโตรเจนเป็นพันธะคู่หนึ่งพันธะ และมีหมู่ acetyl เกาะอยู่กับคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตำแหน่งที่ 2 ของวง (รูปที่ 2.5) สาร 2AP มีชื่อเรียกอีกอย่างว่า 5-acetyl-3,4-dihydro-2H-pyrroline มีสูตรโมเลกุลคือ C_6H_9NO มีกลิ่นหอมคล้ายใบเตย หรือกลิ่นข้าวโพดคั่ว (Buttery and Ling , 1995) โดยข้าวหอม จะสร้างสาร 2AP ขึ้นมาเมื่ออยู่ในสภาวะที่เครียด ซึ่งจะถูกพบได้ในทุกส่วนของพันธุ์ข้าวหอม ยกเว้น ราก ส่วนในข้าวที่ไม่ใช่พันธุ์ข้าวหอมจะไม่พบสารดังกล่าวหรือพบในปริมาณน้อยมาก



รูปที่ 2.5 โครงสร้างของสาร 2-acetyl-1-pyrroline (2AP)

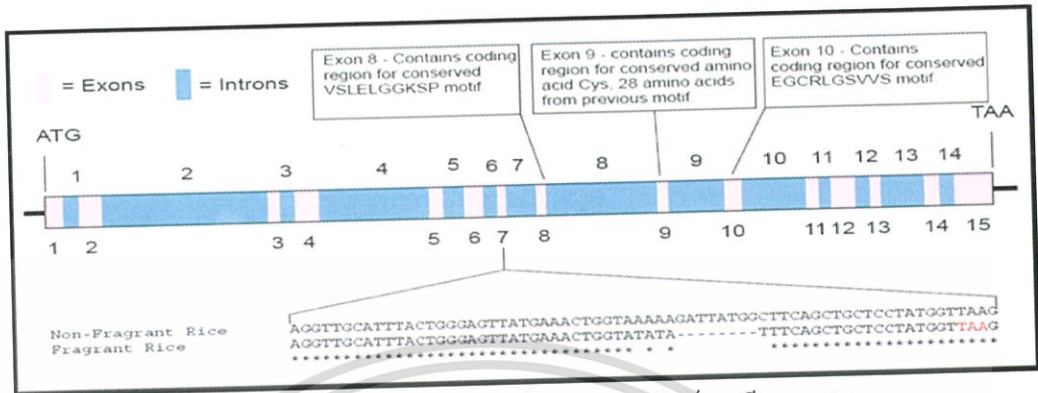
(ที่มา : Bradbury *et al.*, 2008)

2.1.4 ยีนความหอม

ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับยีนที่ควบคุมลักษณะความหอมในข้าวอย่างแพร่หลาย นับตั้งแต่มีรายงานการวางตำแหน่งยีนควบคุมลักษณะความหอมของข้าวเป็นครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2535 โดย Ahn *et al.* (1992) พบว่า ลักษณะความหอมถูกควบคุมด้วยยีนด้อย (Recessive gene) มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 8 ใกล้ชิดกับเครื่องหมายโมเลกุล RFLP clone RG28 ต่อมามีการรายงานการวางตำแหน่งยีนควบคุมลักษณะความหอมในข้าวหอมอีกครั้ง โดยส่วนใหญ่รายงานว่า ลักษณะความหอมถูกควบคุมด้วยยีนด้อย Badh และมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 8 (Bradbury *et al.*, 2005 ; Wanchana *et al.*, 2005 ; Shi *et al.* 2008) โครงสร้างและหน้าที่ของยีนBadh เป็นยีนควบคุมลักษณะความหอมมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 4 และ 8 โดยยีน Badh1 มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 4 และยีนBadh2 มีตำแหน่งอยู่ที่โครโมโซมคู่ที่ 8 ซึ่งมีโครงสร้างและหน้าที่คล้ายกัน แต่ยีนBadh2 มีการแสดงออกของยีนมากกว่ายีนBadh1 ซึ่งยีนBadhมีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 5,800 คู่เบส ประกอบด้วย 15 exons และ 14 intron สร้างกรดอะมิโนจำนวน 503 ตัว ทำให้อข้าวที่มียีนBadh อย่างสมบูรณ์ นั้น ไม่มีกลิ่นหอม (Bradbury *et al.*, 2005; Chen *et al.* 2008; Shi *et al.* 2008) แต่ยีนBadh ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ betaine aldehyde dehydrogenate (BADH) ซึ่งมีหน้าที่เปลี่ยนสาร GAbald เป็นสาร GABA ส่งผลให้ข้าวที่มียีนเด่น Badh (dominant gene) ไม่มีกลิ่นหอม แต่ถ้ามีการกลายพันธุ์ของยีน Badh จะทำให้ยีนดังกล่าวเป็นยีนด้อย Badh (recessive gene) ส่งผลให้ข้าวมีกลิ่นหอม เช่น การขาดหายของลำดับเบสจำนวนแปดเบส (8 bp deletion) บริเวณ exon 7 ของยีนBadh2 (รูปที่ 2.6) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส เป็นตำแหน่งหยุดก่อนกำหนด (premature

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

stop codon) และการสังเคราะห์กรดอะมิโนได้เพียง 251 ตัว ส่งผลให้สังเคราะห์เอนไซม์ได้ไม่สมบูรณ์ และไม่สามารถเปลี่ยนสาร GAbald เป็นสาร GABA ได้จึงทำให้ข้าวมีกลิ่นหอม (รูปที่ 2.7)



รูปที่ 2.6 โครงสร้างและตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีน Badh2 (ที่มา: Bradbury, 2009)



รูปที่ 2.7 การเกิดกระบวนการเกิดสาร 2AP ในข้าวหอม (ที่มา : Bradbury et al.,2008)

แนวทางการใช้ประโยชน์จากยีนความหอม

ความหอมเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่เป็นตัวกำหนดคุณภาพและราคาของข้าว ซึ่งเห็นได้จากข้าวที่มีกลิ่นหอมมีราคาสูงกว่าข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอม อีกทั้งลักษณะความหอมของข้าวยังถูกใช้เป็นมาตรฐานในการซื้อขายข้าวหอม (สุทิน และศรีสวัสดิ์, 2553)

จากองค์ความรู้ทางด้านอนุพันธุศาสตร์ของยีนความหอมในปัจจุบัน จึงนับเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอม โดยเฉพาะการปรับปรุงพันธุ์ข้าวที่มีคุณภาพดีแต่ไม่มีกลิ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หอมให้เป็นข้าวที่มีคุณภาพดีและมีกลิ่นหอมเพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับข้าวพันธุ์ดังกล่าวด้วยการยับยั้งการแสดงออกของยีน Badh ซึ่งในทางทฤษฎีสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) การใช้วิธีการทางด้านพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) และการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลช่วยในการคัดเลือก (marker assisted selection) เป็นต้น

2.1.5 ข้าวหอมมะลิ (Jasmine rice)

ข้าวหอมมะลิเป็นสายพันธุ์ข้าวที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย เป็นข้าวที่มีคุณภาพดีที่สุด และราคาแพงที่สุดของประเทศไทยเป็นที่นิยมบริโภคทั้งในประเทศและต่างประเทศ (banphoe farmer, 2557) ซึ่งพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (Khao Dawk Mali 105; KDML105) เป็นพันธุ์ข้าวหอมที่มีชื่อเสียงมากที่สุดในประเทศไทย (วรวิทย์, 2530)



รูปที่ 2.8 ข้าวหอมพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (Khao Dawk Mali 105; KDML105)
(เมล็ดพันธุ์ข้าวจากศูนย์เมล็ดพันธุ์ข้าวชลบุรี กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์)

ในปัจจุบันพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 (รูปที่ 2.8) มักถูกเรียกว่า ข้าวหอมมะลิ พันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 นี้เป็นข้าวนาปีสามารถปลูกได้เพียงปีละครั้ง เนื่องจากมีลักษณะไวต่อช่วงแสง (photoperiod sensitive) คือออกดอกในวันที่กลางคืนยาวกว่ากลางวันเท่านั้น ซึ่งอยู่ในช่วงของฤดูหนาวซึ่งอยู่ในช่วงเดือนกันยายน-มกราคม (ศูนย์สื่อสารวิทยาศาสตร์ไทย สวทช., 2552) ความสูงของต้นเมื่อออกเต็มที่แล้วปลูกในพื้นที่ที่อุดมสมบูรณ์จะมีความสูง 1.40-1.50 เมตร ข้าวพันธุ์นี้มีการแตกกออยู่ในเกณฑ์ดี มีต้นและใบค่อนข้างเล็ก ใบยาว สีเขียวอ่อน ออกดอกประมาณเดือนตุลาคม มีรวงขนาดปานกลางเมล็ดไม่ถี่และไม่ห่าง ลักษณะที่สำคัญของข้าวขาวดอกมะลิคือเมล็ดข้าวที่ยาวสีขาวเลื่อมมัน โดยมีความเฉลี่ยของข้าวเต็มเมล็ดที่ไม่มีส่วนใดหัก มีปริมาณแป้งอะไมโลสต่ำ ข้าวขาวดอกมะลิเป็นข้าวที่มีความต้านทานโรคใบแห้งได้ปานกลาง และไม่สามารถต้านทานโรคใบไหม้ โรคใบจุดสีน้ำตาล โรคใบไหม้สีเหลือง คุณภาพในการหุงต้มดี เมื่อหุงข้าวจะได้ข้าวที่อ่อนนุ่มมากกว่าข้าวทั่วไปและมีกลิ่นหอมคล้ายใบเตย เนื่องจากข้าวขาวดอกมะลิมีลักษณะความหอมเฉพาะที่ทำให้ข้าวน่ารับประทานซึ่งในทางโภชนาการกลิ่นหอมของข้าวช่วยทำ

ให้ความอยากรับประทานอาหารเพิ่มมากขึ้น โดยความหอมนั้นเกิดจากสารหอมระเหยที่ชื่อว่า 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) เป็นสารที่พบได้ในพันธุ์ข้าวที่มีกลิ่นหอม (fragrant rice) (วาสนา, 2538) ข้าวหอมจะสร้าง 2AP ขึ้นมาเมื่อปลูกในสภาพที่ไม่เหมาะสมเท่านั้น โดยจะเก็บสะสมไว้ในทุกส่วนของข้าว ยกเว้นราก และลักษณะความหอมของข้าวถูกควบคุมการสร้างด้วยยีน BADH คือ betaine aldehyde dehydrogenase (Bradbury *et al.*, 2005)

ความหอมของข้าวเป็นปัจจัยหนึ่งที่กำหนดคุณภาพและราคาของข้าว ส่งผลให้ข้าวหอมถูกจัดอยู่ในกลุ่มข้าวที่มีคุณภาพสูง จึงทำให้เป็นที่ชื่นชอบของผู้บริโภคโดยทั่วไป เนื่องจากคุณสมบัติของข้าวขาวดอกมะลิ ที่โดดเด่นเหนือกว่าพันธุ์ข้าวอื่นๆ ทั้งในแง่ความหอม นุ่ม และรสชาติ ตลาดสำคัญของข้าวหอมมะลิ คือ จีน สหรัฐอเมริกา ฮองกง สิงคโปร์ รวมทั้งประเทศในแอฟริกาบางประเทศ ตัวเลขการส่งออกข้าวหอมมะลิเพิ่มขึ้นเป็นลำดับ โดยคิดเป็นสัดส่วนการส่งออกประมาณร้อยละ 20–25 ของยอดการส่งออกข้าวไทยทั้งหมด (วิฑูรย์ และนิรมล, 2545)

2.1.6 ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (PTT 1)

ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (รูปที่ 2.9) นั้นพัฒนามาจากข้าวหอมพันธุ์ BKNA6-18-3-2 และ PTT85061 ที่ได้ผสมพันธุ์ในฤดูนาปรังเมื่อ ปี พ.ศ. 2533 ที่ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี ซึ่งทั้งสายพันธุ์แม่และพ่อพันธุ์มีเชื้อข้าวหอมจากพันธุ์ข้าว กข 15 และข้าวหอมมะลิจาก จ.ร้อยเอ็ด ที่ชนะการประกวดการคัดเลือกแบบสืบตระกูลจนถึงช่วงที่ 6 ระหว่างปี 2534-2536 จนได้มาเป็นสายพันธุ์ PTT90071-93-8-1-1 (วิฑูรย์ และนิรมล, 2545) จุดประสงค์หลักที่สำคัญในการคิดค้นข้าวปทุมธานี 1 นั้นมีสองประการคือ ให้ผลผลิตสูงปลูกได้ทั้งปี และต่อต้านโรคแมลงที่สำคัญได้ (ศิริพร, 2543)



รูปที่ 2.9 ข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 (PTT 1)

(เมล็ดพันธุ์ข้าวจากศูนย์เมล็ดพันธุ์ข้าวชลบุรี กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์)

เนื่องจากข้าวปทุมธานี 1 นั้นมีคุณสมบัติเด่นด้านความหอมเช่นเดียวกับข้าวขาวดอกมะลิ ข้าวปทุมธานี 1 จึงมีคุณสมบัติเด่นคือเป็นข้าวเจ้าหอมไม่ไวต่อแสง ลักษณะเมล็ดคล้ายพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 เมื่อหุงสุกจะมีลักษณะที่นุ่มเหนียวเช่นเดียวกันกับพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้าวปทุมธานี 1 สามารถต้านทานต่อศัตรูพืชที่สำคัญของข้าว เช่น เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพลี้ยกระโดดหลังขาว โรคใบไหม้และโรคขอบใบแห้ง ขณะที่คุณสมบัติเด่นที่ดีต่อเกษตรกรคือ ความไม่ไวต่อแสงของข้าวพันธุ์นี้นั้น ทำให้ปลูกข้าวได้ทั้งฤดูนาปีและนาปรัง อีกทั้งยังให้ผลผลิตค่อนข้างสูงประมาณ 80-100 ถังต่อไร่ เมื่อเทียบกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 ที่ปลูกได้เพียงปีละครั้งและให้ผลผลิตเพียง 20-30 ถังต่อไร่ นอกจากนี้ยังไม่จำเป็นต้องใช้ยาฆ่าแมลงและปุ๋ยมากอีกด้วย และเนื่องจากผลผลิตที่ได้มีปริมาณสูงความหอมที่ได้จึงด้อยกว่าข้าวขาวดอกมะลิ 105 ซึ่งหากเปรียบเทียบระหว่างข้าวปทุมธานีและข้าวขาวดอกมะลิ 105 ในทางกายภาพพบว่า ทั้งสองพันธุ์มีลักษณะทางกายภาพที่ค่อนข้างเหมือนกันทั้งสี ความเลื่อมมัน การเกาะตัว หรือเนื้อสัมผัสมีใกล้เคียงกันมาก แม้ว่าความหอมจะลดลงและจุดด้อยของข้าวปทุมธานีคือไม่สามารถต้านทานเพลี้ยจักจั่นสีเขียว โรคใบหงิกหรือโรคใบสีส้ม

2.1.7 ข้าวพันธุ์กช 31 (ปทุมธานี 80) หรือ RD31 (Pathum Thani 80)

ข้าวพันธุ์กช 31 (รูปที่ 2.10) นั้นเป็นข้าวเจ้าที่ผสมพันธุ์ข้าวระหว่างสายพันธุ์ SPR85163-5-1-2 และ IR54017-131-1-3-2 ที่ศูนย์วิจัยข้าวสุพรรณบุรีเมื่อปี พ.ศ. 2536 ปลูกคัดเลือกตั้งแต่ พ.ศ. 2537-2539 จึงได้สายพันธุ์ข้าว กช 31 ขึ้น โดยทำการศึกษาพันธุ์ข้าว ประเมินลักษณะพันธุ์และลักษณะทางการเกษตรเพื่อทดสอบความต้านทานต่อโรคและแมลงศัตรูข้าวที่สำคัญ วิเคราะห์คุณภาพเมล็ดทางกายภาพและเคมีที่ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี สุพรรณบุรี จะเชิงตรา คลองหลวง และราชบุรี โดยทำการปลูกเปรียบเทียบผลผลิตในนาเกษตรกร 8 จังหวัดในภาคกลาง จนถึง พ.ศ. 2549



รูปที่ 2.10 ข้าวพันธุ์กช 31 หรือ ปทุมธานี 80 (RD 31)

(เมล็ดพันธุ์ข้าวจากศูนย์เมล็ดพันธุ์ข้าวชลบุรี กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์)

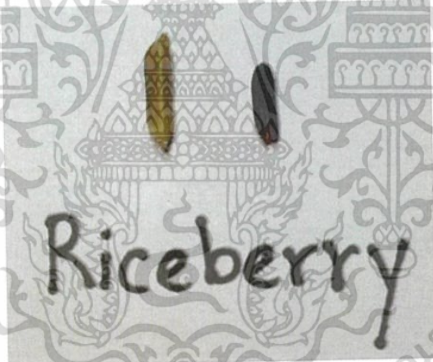
พันธุ์ข้าว กช 31 มีการรับรองพันธุ์ข้าวโดย คณะกรรมการกรมการข้าว และแนะนำให้ปลูกเมื่อ 6 มีนาคม 2550 มีลักษณะทางกายภาพของข้าวพันธุ์นี้เป็นข้าวเจ้าไม่ไวต่อแสง อายุเก็บเกี่ยวเมื่อปลูกโดยวิธีหว่านน้ำตม 111 วัน และอายุเก็บเกี่ยวเมื่อปลูกโดยวิธีปักดำคือ 118 วัน ข้าว กช 31 เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทรงกอดตั้ง ต้นแข็งแรงไม่ล้มง่าย ใบสีเขียว กากใบสีเขียว ใบทรงตั้ง คอรวงยาว มีรวงยาว 29.9 เซนติเมตร เมล็ดข้าวเปลือกมีสีฟาง เมล็ดไม่มีหาง ข้าวกล้องสีขาว รูปร่างเรียวยาว ระยะพักตัวของเมล็ดพันธุ์ ประมาณ 5 สัปดาห์ เมล็ดข้าวเปลือกยาว 10.4 มิลลิเมตร เมล็ดข้าวกล้องยาว 7.4 มิลลิเมตร มีประมาณอะไมโลสอยู่ในช่วง 27.3-29.8 เปอร์เซ็นต์ผลผลิตเฉลี่ยโดยการปักดำ 745 กิโลกรัมต่อไร่ และผลเฉลี่ยโดยการหว่านน้ำตม 738 กิโลกรัมต่อไร่ ลักษณะเด่นของพันธุ์ คือคุณภาพเมล็ดทางกายภาพสม่ำเสมอ สามารถต้านทานเพลี้ยกระโดดหลังขาว ค่อนข้างต้านทานต่อเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล โรคขอบใบแห้ง โรคใบจุดสีน้ำตาล และโรคเมล็ดด่าง ข้อระวังคือ ข้าวพันธุ์กช 31 อ่อนแอต่อโรคไหม้ โรคใบหงิก และโรคใบสีส้ม (สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว, 2557)

2.1.8 ข้าวพันธุ์ ไรซ์เบอร์รี่ (Rice Berry)

ข้าวไรซ์เบอร์รี่ (Rice Berry) (รูปที่ 2.11) ได้มาจากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างข้าวเจ้าหอม นิลกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 จากการพัฒนาพันธุ์ข้าวพิเศษจึงได้ข้าวกล้องที่มีความหอมนุ่มสูง ซึ่งคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติและศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (ศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว, 2557) ได้ปรับปรุงสายพันธุ์ข้าวไรซ์เบอร์รี่ เพื่อให้ได้เมล็ดพันธุ์ที่มีคุณภาพดีและให้ประโยชน์สูงสุดแก่ผู้บริโภค



รูปที่ 2.11 ข้าวพันธุ์ ไรซ์เบอร์รี่ (Rice Berry)

(เมล็ดพันธุ์ข้าวจากศูนย์เมล็ดพันธุ์ข้าวชลบุรี กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์)

ข้าวไรซ์เบอร์รี่จะมีลักษณะทางกายภาพเป็นข้าวเจ้าเมล็ดเป็นสีม่วงเข้ม รูปร่างเมล็ดเรียวยาวข้าวกล้องมีความนุ่มนวลมาก สามารถปลูกได้ตลอดทั้งปี ให้ผลผลิตต่อไร่สูง ด้านทางต่อโรคไหม้ได้อย่างดี (อภิชาติ, 2552) ลักษณะประจำพันธุ์ข้าวไรซ์เบอร์รี่ลำต้นมีความสูง 105-110 เซนติเมตร อายุการเก็บเกี่ยว 130 วัน ผลผลิตที่ได้คือ 300-500 กิโลกรัมต่อไร่ ความยาวของเมล็ดข้าวเปลือก 11 มิลลิเมตร เมล็ดข้าวกล้อง 7.5 มิลลิเมตร และเมล็ดข้าวขัดสีแล้ว 7.0 มิลลิเมตร คุณสมบัติเด่นทางด้านโภชนาการของข้าวไรซ์เบอร์รี่ คือมีสารต้านอนุมูลอิสระสูง ได้แก่ เบต้าแคโรทีน แกมมาโอไรซานอล วิตามินอี แทนนิน สังกะสี โฟเลตสูง มีดัชนีน้ำตาลต่ำ-ปานกลาง ซึ่งจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คุณสมบัติข้อนี้ นอกจากจะใช้รับประทานเพื่อเสริมสร้างสุขภาพที่ดี ลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็ง ทางการแพทย์ยังนำไปใช้ทำผลิตภัณฑ์อาหารโภชนาบำบัดอีกด้วย ข้อจำกัดในการดูแลข้าวไรซ์เบอร์รี่นั้น จะต้องดูแลเป็นพิเศษ โดยปลูกแบบเกษตรอินทรีย์ เหมาะสำหรับสภาพอากาศเย็น เพื่อช่วยในการสร้างเมล็ดสี

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

[Louis MT Bradbury *et al.*, 2005] ยีนความหอมในข้าวนั้น ล้วนแล้วแต่มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของสาร 2AP (2-acetal-1-pyrroline) 2AP เป็นที่รู้จักอย่างกว้างขวาง เพราะเป็นสาเหตุหลักของความหอมในข้าวบาสมาดิ และข้าวหอมมะลิ สำหรับการแสดงออกของลักษณะนี้พันธุ์ข้าวที่ไม่มีความหอมจะมีระดับของ 2AP ที่ต่ำมาก ขณะที่ข้าวหอมจะมีสูงกว่า เมื่อตรวจสอบยีนบนโครโมโซมคู่ที่ 8 ของข้าว พบว่า เกิดการควบคุมส่วนใหญ่ของระดับ 2AP ที่ได้รับการยืนยันจากการศึกษาพันธุศาสตร์ เครื่องหมายทางพันธุกรรมของยีนนี้ได้รับเลือกเพื่อนำไปพัฒนาลักษณะในการปรับปรุงพันธุ์ข้าว มีการกำหนดที่ตั้งของยีนบนโครโมโซม โดยการทำแผนที่ simple sequencing repeat (SSR) หรือ microsatellite และ single nucleotide polymorphism (SNP) Markers การนำไปใช้ประโยชน์ของลำดับจีโนม มีแนวโน้มว่าอาจจะมีการพบยีนที่ตรงกัน โดยการเปรียบเทียบระหว่างข้าวที่มีกลิ่นหอม และข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอม จะช่วยให้สามารถกำหนดเป้าหมายในการ re-sequencing ของยีนและลำดับจีโนม ในส่วนของจีโนมไทป์ที่มีกลิ่นหอมบนโครโมโซมคู่ที่ 8 ได้

[Louis MT Bradbury *et al.*, 2006] ทำการ re-sequencing ด้วยเทคนิค PCR มีการค้นพบของยีนที่ควบคุมลักษณะสำคัญ และความหลากหลายของยีน ที่ควบคุมลักษณะเชิงพาณิชย์ที่สำคัญ การระบุยีนที่ควบคุมความหอมก็ประสบความสำเร็จโดยการทำ SSRs มีการวิเคราะห์ความหลากหลายบนยีนพบว่าการ mutation ซึ่งเป็นเหตุผลที่อธิบายความรู้ทางชีวเคมีของยีนความหอมได้

[ปาริฉัตร และคณะ, 2555] การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เฉพาะกับการทำหน้าที่ของยีนความหอมในข้าวเป็นประโยชน์ต่อการช่วยคัดเลือกลักษณะความหอมในข้าว เครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นมานั้น ได้ออกแบบให้ครอบคลุมตำแหน่งที่มีการขาดหายไปของเบสจำนวน 8 เบสที่ exon 7 ของยีน Badh2 ซึ่งเป็นส่วนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของลักษณะความหอมในข้าว เมื่อนำเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ออกแบบใหม่มาทดสอบทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) และตรวจสอบผลการทำปฏิกิริยาโดยวิธี Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) ในพันธุ์ข้าว 2 กลุ่มคือข้าวที่มีกลิ่นหอมและไม่หอมนั้นพบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นมานั้น สามารถแบ่งข้าวออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือข้าวที่มีกลิ่นหอมและไม่มีกลิ่นหอม โดยมี PCR product ขนาด 236 bp และ 244 bp ตามลำดับ เครื่องหมายดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้ เป็นเครื่องหมายประเภท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Codominance และเป็นการจำแนกส่วนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของยีน โดยตรงจึงเป็นเครื่องหมาย ดีเอ็นเอที่มีประสิทธิภาพและมีความแม่นยำในการตรวจสอบเหมาะสำหรับการใช้เป็นเครื่องหมาย โมเลกุลช่วยในการคัดเลือก



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่อง Thermal Cycler รุ่น T100 Thermal Cycler ยี่ห้อ BIO – RAD ประเทศสิงคโปร์
2. เครื่อง Gel Electrophoresis รุ่น GelMate 2000 ยี่ห้อ Toyobo ประเทศญี่ปุ่น
3. เครื่อง BioSpectrometer UV-Vis Spectrophotometer ยี่ห้อ Eppendorf ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. เครื่อง UV รุ่น star 8 ยี่ห้อ Biometra An Analytik Jena Company ประเทศไต้หวัน
5. เครื่อง Centrifuge ยี่ห้อ WiseSpin ประเทศสาธารณรัฐเกาหลี
6. เครื่องให้ความร้อน รุ่น C-MAG HS 7 S77 ยี่ห้อ IKA ประเทศสหรัฐอเมริกา
7. เครื่องเขย่าสารแนวตั้ง รุ่น Vortex-genie 2 ยี่ห้อ Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา
8. ไมโครเวฟ รุ่น MS2323DAR ยี่ห้อ LG ประเทศไทย
9. ไมโครปิเปต ยี่ห้อ Discovery Comfort ประเทศโปแลนด์
10. ทิปดูดสาร ยี่ห้อ Gilson ประเทศฝรั่งเศส
11. หลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 mL ยี่ห้อ Axygen ประเทศสหรัฐอเมริกา
12. หลอด Microcentrifuge ขนาด 0.2 mL ยี่ห้อ Sorenson BioScience ประเทศสหรัฐอเมริกา
13. Microcentrifuge tube Rack
14. โกร่งบดสาร

3.2 สารเคมี

1. ชุด Kit สำหรับสกัด DNA จากเมล็ดข้าว Favorgen, Biotech Corp ประเทศไต้หวัน
2. ชุด Kit สำหรับทำ PCR ยี่ห้อ RBC BioScience ประเทศไต้หวัน
3. ชุด Kit สำหรับทำ PCR Clean – Up ยี่ห้อ Axygen ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. ผง LE Agarose เกรดพรีเมียม ประเทศสหรัฐอเมริกา
5. TBE (Tris Borate EDTA)
6. Loading Dye
7. Ethidium bromide
8. NaOH เกรด AR บริษัท Antibioticos ประเทศอิตาลี
9. EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid)
10. Tris HCl

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

11. ตัวอย่างข้าวทั้ง 4 สายพันธุ์ คือ ข้าว KDML 105 ข้าว PTT 1 ข้าว RD 31 และข้าว Rice Berry จากศูนย์เมล็ดพันธุ์ข้าวชลบุรี กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การสกัดสารพันธุกรรม (DNA) จากเมล็ดข้าวอย่างง่าย (jaxmice.jax.org, 2557)

ฆ่าเชื้อ โกร่งด้วยเอทานอลเล็กน้อยแล้วจุดไฟเผา ทิ้งให้เย็นแล้วจึงบดจุ่มข้าวทั้ง 4 สายพันธุ์คือ KDML 105 PTT 1 RD 31 และ Rice Berry มาบดให้ละเอียด จากนั้นจึงนำข้าวที่บดละเอียดแล้ว 100 mg ใส่ใน Eppendorf Tube และเติมสาร 25 mM NaOH / 0.2 mM EDTA ปริมาตร 75 μ L ลงในหลอดดังกล่าว แล้วจึงให้ความร้อนที่ 98 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงโดยการต้มในน้ำ เมื่อครบตามเวลา 1 ชั่วโมงแล้วจึงนำมาทำให้อุณหภูมิลดลงถึง 15 °C แล้วจึงเติมสาร 40 mM Tris HCl (pH 5.5) ปริมาตร 75 μ L ลงในหลอด เหย้าให้เข้ากัน แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ดูดส่วนใสที่ได้ คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของข้าวทั้ง 4 สายพันธุ์เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C

3.3.2 การสกัดสารพันธุกรรม (DNA) จากเมล็ดข้าวโดยใช้ชุด Kit (Favorgen, Biotech Corp)

วิธีการสกัด

ขั้นตอนที่ 1: Tissue Dissociation ฆ่าเชื้อ โกร่งด้วยเอทานอลเล็กน้อยแล้วจุดไฟเผา ทิ้งให้เย็นแล้วจึงบดจุ่มข้าวทั้ง 4 สายพันธุ์ คือ KDML 105 PTT 1 RD 31 และ Rice Berry มาบดจนเป็นผงละเอียด ใส่ตัวอย่างที่บดแล้วลงใน microcentrifuge tube

ขั้นตอนที่ 2: Lysis เติม 400 μ L FAPG 1 Buffer และ RNase A 8 μ L ลงในทุกตัวอย่าง และผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าสาร โดยห้ามผสม FAPG1 และ RNase A ก่อนใช้งาน แล้วจึงนำไปบ่มที่ 65 °C เป็นเวลา 10 นาที โดยพลิกคว่ำหงายไปมา ทุกๆ 5 นาที และขณะเดียวกัน ให้บ่ม Elute Buffer (200 μ L/ตัวอย่าง) ที่ 65 °C ไปด้วยจนกว่าจะนำมาใช้ เมื่อครบ 10 นาทีจึงเติม FAPG 2 Buffer ปริมาตร 130 μ L ลงในหลอดสาร และผสมโดยใช้เครื่องเขย่าสารเสร็จแล้วจึงบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำ Filter Column ใส่ลงในหลอด Collection tube ขนาด 2 mL แล้วจึงนำสารผสมที่เตรียมไว้ ใส่ลงใน Filter Column ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที แล้วจึงทิ้ง Filter Column แล้วนำส่วนใสใส่ลงในหลอด Microcentrifuge tube

ขั้นตอนที่ 3: DNA Binding เติม 1.5 Volume ของ FAPG 3 Buffer ลงในหลอดที่ได้จากขั้นตอนที่ 2 แล้วผสมด้วยเครื่องเขย่าสารเป็นเวลา 5 วินาที (เช่น เติม 750 μ L FAPG 3 ใน 500 μ L Lysate) และเตรียม FAPG Column ใส่ใน 2 mL Collection tube แล้วจึงนำสารที่ผสมไว้ (รวมทั้งตะกอน) 750 μ L ใส่ใน FAPG Column แล้วทำการปั่นเหวี่ยง 13000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ทิ้งสารที่อยู่ในหลอด แล้วเติมสารผสมที่เหลืออยู่ผ่าน FAPG Column และปั่นเหวี่ยง 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ทิ้งสารที่เหลืออยู่ในหลอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้


```

BADH2      TTATGTTTTCTGTTAGGTTGCATTACTGGGAGTTATGAACTGCTAAAAAGATTATGGC 3047
BADH1      TACCCTAAGTTGTTT--TTGAATTTTATG-----TGGATCCTTCTGTAGATTG---C 2472
*:. *:. ***: **:*:***:..**      **:*:*      *:.:****. *

BADH2      TTCAGCTG-CCTCTATGGTTAAGGTTGTTCCTCAAAATTTCTGTGGATATTTTTGTTCCT 3106
BADH1      TTTTACTGGAAGCAGAAACTGGTAAGAGGATAATGATTACTGCTTCCCAAATGGTCAA 2532
** :.*** :. *:.:*.:.:****:..** :. * : * * :. :.*** **:.

BADH2      TTTCTACTAACTCTCTATTATCAATTCTCAATGTTGTCCTTTTCTTTAACTCCTTTACT 3166
BADH1      GGTGTTGTCTCTATATATGATCATG---CCCTGAAGAGAATTTCTAATAACTTCTGCAT 2589
* * . * :.***.*.*** ***:      *:.***:..:****:**** ** :.

BADH2      TTTTAGAATTG---TGATCAAGACACTTGAGCATCAT-TCTAGTAGCCAGTTCATCCT 3222
BADH1      TGAATGCTTCTGTGGAGCAAGAACCT-GTGCATTATGCCTTGATGTCC-----TCGT 2642
* :.***:..*      ** ***.*** ** * :.*** ** ***:..* * .      ** *

BADH2      GTTCTTACCTTTTTATGGTTCGTTCTTTCTTGACAGCCTGTTTCTACTGGAAGTTGGTGG 3282
BADH1      AAGTCTAATATATTGTGCTTTTTTTTCTTGAACAGCCTGTTTCTGTAGAGCTTGGTGG 2702
.: ***:* :.***.* ** * ** * .*****. *..*****

BADH2      AAAAAAGTCCTATAGTGGTGTGATGATGTTGATGTTGAAAAAGGTACATGCCACTTGCT 3342
BADH1      CAAAAGTCCTCTTATTGCTTTGATGATGTTGATATTGATAAAGG----- 2747
.*****.*. * * *****.***:****

BADH2      ATGATTAACCTAATCTGAAGTGGGGACTTTGTAAAGCACTTAAGTCTGAGCTGGATGCTAG 3402
BADH1      -----

BADH2      ACCCCCAAAAGCCCTTTTTGGTGTCTTGGGCTTGTTCAGAAATACTGGTCCCAGACGAG 3462
BADH1      -----TATTAGGTATCTT----- 2760
*:.***.*.***

BADH2      CAGGATGCAAGAAAATTAAGTACTTTTCCACTGATTAGTATTCTTAGAAGTTACACCT 3522
BADH1      -----CCACT-----CT 2767
***** **

```

รูปที่ 3.1 การเปรียบเทียบความแตกต่างของยีน Badh1 และยีน Badh2

จากการสังเกตุจะพบว่าบริเวณในกรอบสี่เหลี่ยม เป็นบริเวณที่มีความแตกต่างกัน จึงทำการออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุมบริเวณดังกล่าวและครอบคลุมบริเวณโดยรอบด้วย ซึ่งจะทำได้ขนาดของ PCR Product เท่ากับ 910 bp และจากนั้นจึงนำ PCR Product ที่ได้ส่งตรวจหาลำดับสารพันธุกรรม (DNA Sequencing) ของข้าวทั้ง 4 สายพันธุ์ และเมื่อได้ผลลำดับสารพันธุกรรม (DNA Sequencing) แล้วจึงนำมาออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจหายีน Badh2 ซึ่งจะออกแบบให้ครอบคลุม และจำเพาะต่อบริเวณที่แสดงถึงความมีกลิ่นหอมของข้าว ทำให้ได้ขนาดของ PCR Product เท่ากับ 494 bp และจากการออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม Cm suite ได้ทำการวิเคราะห์และเลือกไพรเมอร์ที่มีความเหมาะสมที่สุดดังนี้

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ออกแบบได้

ชนิดของไพรเมอร์	
F10	5' ACTGCAGGAAGTATCCTCTC 3'
R10	5' TCTTGCATCCTGCTCGTCTG 3'
F20	5' ACTGGTAAAAAGATTATGGC 3'
R20	5' GAGCAGCTGAAGCCATAATC 3'

3.3.4 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) สำหรับผลิต PCR

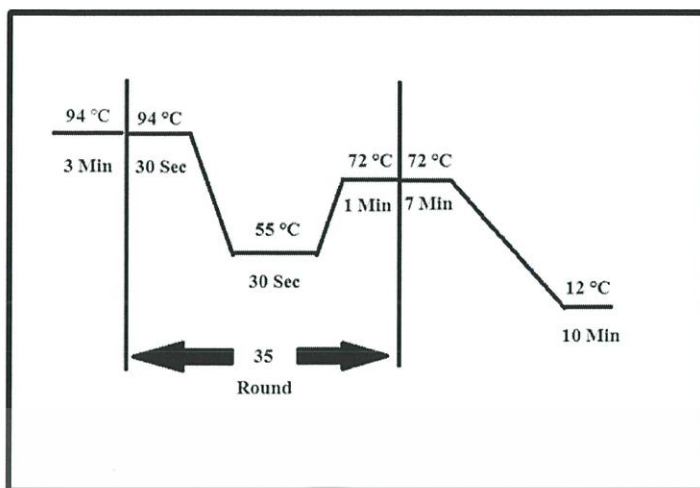
Product

การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างรวดเร็ว และจำเพาะเจาะจง โดยการเตรียมสาร Master Mixture สำหรับการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเพื่อการผลิต PCR Product ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาในปริมาตร 12.5 μL โดยมีส่วนประกอบดังตารางที่ 3.2 (ส่วนผสมสำหรับทำ PCR 1 ชุด) โดยการผสมสาร Master Mixture นั้น จะผสมลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 0.5 mL โดยยกเว้นสาร Template DNA คือ ในแต่ละหลอดจะเติมสาร Template DNA ที่แตกต่างกัน ตามลำดับคือ Blank KDML 105 PTT 1 RD 31 และ Rice Berry ลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 0.5 mL แล้วจึงบีบเปิดสาร Master Mixture ลงบนฝาของหลอด Microcentrifuge แต่ละหลอด แล้วปิดฝา จากนั้นผสมสารด้วยเครื่อง Quick Spin ก่อนนำเข้าเครื่อง Thermal Cycle โดยตั้งอุณหภูมิต่างๆดังรูปที่ 3.2 และหลังจากที่นำสารออกจากเครื่อง Thermal Cycle ควรเก็บสารไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรักษาสภาพของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

ตารางที่ 3.2 สารผสมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสสำหรับผลิตสาร PCR Product

สาร	ปริมาตร(μL)
10X Reaction Buffer	1.25
10mM dNTP Mix	0.125
Primer F10	0.25
R10	0.25
Template DNA	5
RBC <i>Taq</i> DNA Polymerase	0.0625
H ₂ O Clave	5.5625
ปริมาตรรวมทั้งหมด	12.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3.2 อุณหภูมิช่วงต่างๆในการทำปฏิกิริยาอุทกโซโพลีเมอเรสสำหรับผลิต PCR Product

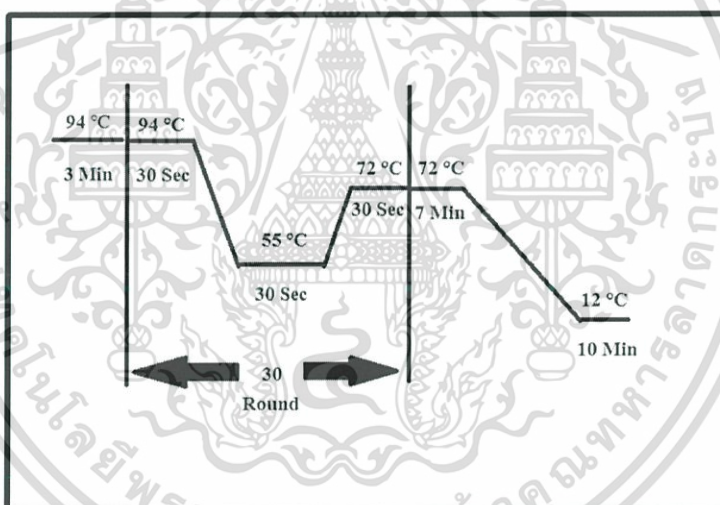
หลังจากการทำปฏิกิริยาอุทกโซโพลีเมอเรสในขั้นตอนที่เราจะได้ PCR Product จากนั้นนำสารที่ได้ส่งตรวจหาลำดับสารพันธุกรรม (DNA Sequencing) ของข้าวแต่ละสายพันธุ์

3.3.5 การทำปฏิกิริยาอุทกโซโพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) สำหรับตรวจสอบยีนความหอมของข้าวแบบปกติ

เตรียมสาร Master Mixture สำหรับการทำปฏิกิริยาอุทกโซโพลีเมอเรสเพื่อการผลิต PCR Product สำหรับตรวจสอบยีนความหอมของข้าวแบบปกติ ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาในปริมาตร 12.5 μL โดยมีส่วนประกอบดังตารางที่ 3.3 (ส่วนผสมสำหรับทำ PCR 1 ชุด) โดยการผสมสาร Master Mixture นั้น จะผสมลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 0.5 mL โดยยกเว้นสาร Template DNA คือ ในแต่ละหลอดจะเติมสาร Template DNA ที่แตกต่างกัน ตามลำดับคือ Blank KDML 105 PTT 1 RD 31 และ Rice Berry ลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 0.5 mL แล้วจึงเปิดสาร Master Mixture ใส่ลงบนฝาของหลอด Microcentrifuge แต่ละหลอด แล้วจึงทำการปิดฝา จากนั้นผสมสารด้วยเครื่อง Quick Spin ก่อนนำเข้าเครื่อง Thermal Cycler โดยตั้งอุณหภูมิต่างๆดังรูปที่ 3.3 และหลังจากที่นำสารออกจากเครื่อง Thermal Cycler ควรเก็บสารไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรักษาสภาพของปฏิกิริยาอุทกโซโพลีเมอเรส

ตารางที่ 3.3 สารผสมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) สำหรับตรวจสอบยีนความหอมของข้าวแบบปกติ

สาร	ปริมาตร(μL)
10X Reaction Buffer	1.25
10mM dNTP Mix	0.125
Primer F20	0.25
R10	0.25
Template DNA	5
RBC <i>Taq</i> DNA Polymerase	0.0625
H ₂ O Clave	5.5625
ปริมาตรรวมทั้งหมด	12.5



รูปที่ 3.3 อุณหภูมิช่วงต่างๆในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) สำหรับตรวจสอบยีนความหอมของข้าวแบบปกติ

3.3.6 การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) สำหรับตรวจสอบยีนความหอมของข้าวแบบใส่ตัวควบคุม

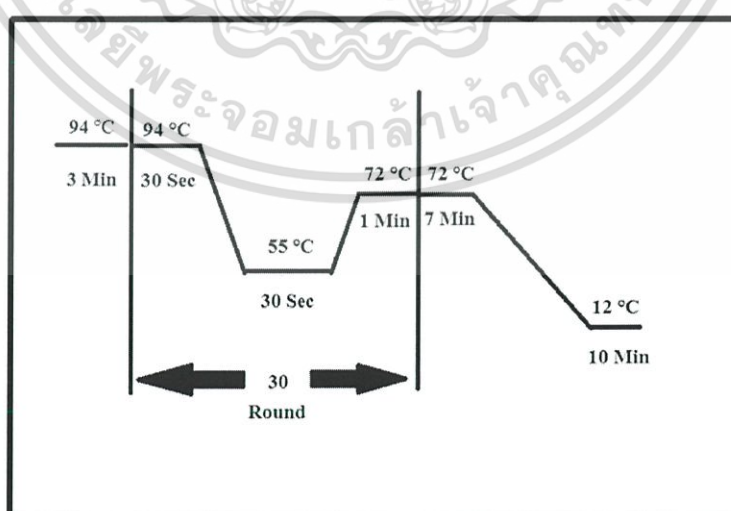
โดยการเตรียมสาร Master Mixture สำหรับการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเพื่อผลิต PCR Product สำหรับตรวจสอบยีนความหอมของข้าวแบบใส่ตัวควบคุม มีส่วนผสมของปฏิกิริยาในปริมาตร 12.5 μL โดยมีส่วนประกอบดังตารางที่ 3.4 (ส่วนผสมสำหรับทำ PCR 1 ชุด) โดยในการตรวจหาความหอมต้องใส่ตัวควบคุมลงไปในส่วนผสมด้วย คือ Primer F10 และ Primer R10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพื่อยืนยันผลการทดลองโดยการผสมสาร Master Mixture นั้น จะผสมลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 0.5 mL โดยยกเว้นสาร Template DNA คือ ในแต่ละหลอดจะเติมสาร Template DNA ที่แตกต่างกัน ตามลำดับคือ Blank KDML 105 PTT 1 RD 31 และ Rice Berry ลงในหลอด Microcentrifuge ขนาด 0.5 mL แล้วจึงปิเปตสาร Master Mixture ใส่ลงบนฝาของหลอด Microcentrifuge แต่ละหลอด แล้วทำการปิดฝา จากนั้นผสมสารด้วยเครื่อง Quick Spin ก่อนนำเข้าเครื่อง Thermal Cycler โดยตั้งอุณหภูมิต่างๆดังรูปที่ 3.4 และหลังจากที่นำสารออกจากเครื่อง Thermal Cycler ควรเก็บสารไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรักษาสภาพของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

ตารางที่ 3.4 สารผสมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) สำหรับตรวจสอบยีนความหอมของข้าวแบบใส่ตัวควบคุม

สาร	ปริมาตร(μL)
10X Reaction Buffer	1.25
10mM dNTP Mix	0.125
Primer F10	0.25
R10 x2	0.5
F20	0.25
Template DNA	5
RBC <i>Taq</i> DNA Polymerase	0.0625
H ₂ O Clave	5.0625
ปริมาตรรวมทั้งหมด	12.5

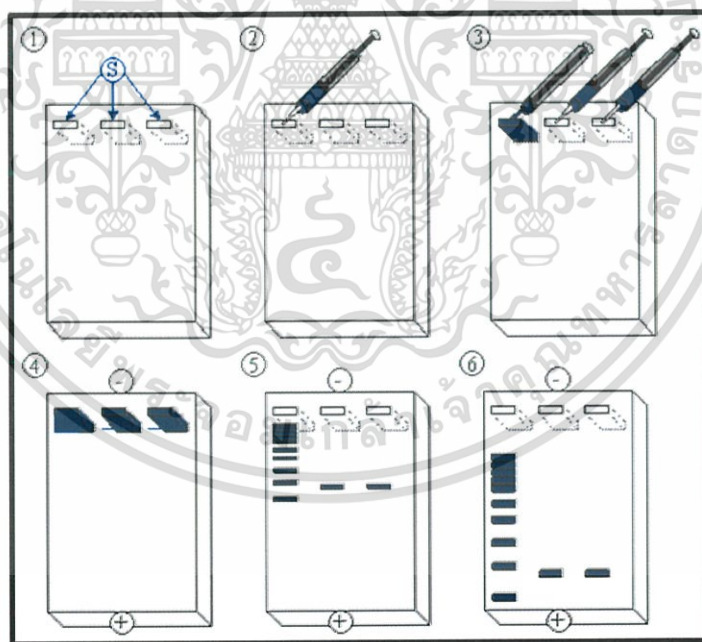


รูปที่ 3.4 อุณหภูมิช่วงต่างๆในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) สำหรับตรวจสอบยีนความหอมของข้าวแบบใส่ตัวควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.8 การวิเคราะห์ผล PCR Product ด้วยเทคนิค Agarose Gel Electrophoresis

ในการวิเคราะห์ผลจะต้องเตรียมเจลโดย ชั่ง Agarose จำนวนที่ต้องการลงในขวดรูปชมพู่ แล้วจึงเติมสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-borate-EDTA(TBE) นำไปละลายในไมโครเวฟและทิ้งให้เย็นลงแล้วจึง เท Agarose Gel ที่ได้ลงใน Gel chamber ที่วาง comb ไว้แล้ว ปล่อยให้เซตตัวอย่างน้อย 15 นาที แล้วจึงนำภาดเจลไปวางในเครื่อง Electrophoresis เทบัฟเฟอร์ TBE ลงไปจนท่วมเจลขึ้นมาประมาณ 1-2 mm และทำการผสม PCR Product กับ loading dye แล้วบีบตัวอย่างลงในหลุมเจล ซึ่งในกระบวนการ gel electrophoresis ทุกครั้งต้องมีดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดแน่นอนเป็นตัวเปรียบเทียบ หลังจากนั้นจึงต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่อง Electrophoresis ให้ด้านที่มีตัวอย่างดีเอ็นเออยู่ทางขั้วลบจากนั้นตั้งกระแสไฟฟ้าให้มีความต่างศักย์ที่ 100 Volt เมื่อพบว่าแถบสีน้ำเงินของ loading dye วิ่งไปอยู่ด้านล่าง จากนั้นให้หยุดกระแสไฟฟ้าและนำเจลออกจากภาด แล้วจึงนำเจลไปแช่ในสารละลายเอทีเดียมโบรไมด์ 1 นาที แล้วล้างน้ำกลั่น 15 นาที (ข้อควรระวัง : เอทีเดียมโบรไมด์เป็นสารก่อมะเร็ง ควรสวมถุงมือทุกครั้งในขณะที่ทำการทดลอง) จากนั้นนำมาตรวจดูแถบดีเอ็นเอ โดยดูการเรืองแสงภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต และบันทึกผลโดยการถ่ายภาพ โดยกระบวนการ Gel Electrophoresis แสดงดังรูป 3.5



รูปที่ 3.5 แสดงภาพขั้นตอนของกระบวนการ Gel Electrophoresis

(ที่มา : <http://ku-scmicro36bkk.tripod.com/PCR.html>, 17 พฤศจิกายน 2557)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลจากการสกัดตัวอย่างข้าว

ในการสกัดดีเอ็นเอจากข้าวนั้น ได้ทำการศึกษาและดำเนินการทดลอง 2 แบบ คือการสกัดอย่างง่าย และการสกัดโดยใช้ชุด Kit (Favorgen, Biotech Corp) เพื่อทำการเปรียบเทียบคุณภาพของการสกัด โดยการสกัดอย่างง่ายมีการใช้สารเคมี และขั้นตอนที่น้อยกว่า แต่การสกัดโดยใช้ชุด Kit (Favorgen, Biotech Corp) มีการใช้สารเคมี อุปกรณ์และมีขั้นตอนที่มากกว่า แต่จะให้ผลการสกัดที่มีความบริสุทธิ์มากกว่าซึ่งจะเห็นได้จากการทดสอบโดยใช้เทคนิค Gel Electrophoresis ดังแสดงในรูปที่ 4.1 และผลการวัดความเข้มข้นดังแสดงในตารางที่ 4.1



รูปที่ 4.1 แสดงการเปรียบเทียบคุณภาพของการสกัดดีเอ็นเอ หมายเลข 1 คือ ข้าวKDML 105 หมายเลข 2 คือ ข้าวPTT 1 หมายเลข 3 คือ ข้าวRD 31และหมายเลข 4 คือ ข้าวRice Berry จากวิธีการสกัดดีเอ็นเออย่างง่าย ส่วนหมายเลข 5 คือ ข้าวKDML 105 หมายเลข 6 คือ ข้าวPTT 1 หมายเลข 7 คือ ข้าวRD 31 และหมายเลข 8 คือ ข้าวRice Berry จากวิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุด Kit(Favorgen, Biotech Corp) และ S คือ ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน

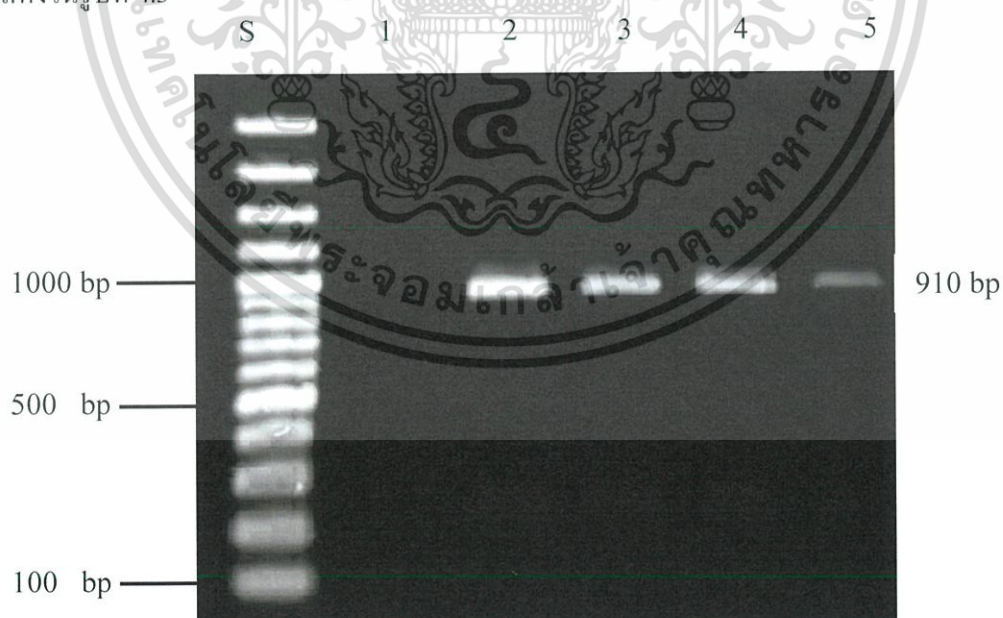
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ความเข้มข้นของ DNA ที่สกัดได้

ชนิดของข้าว	การสกัด DNA อย่างง่าย		การสกัด DNA โดยใช้ชุด Kit	
	ความเข้มข้นที่วัดได้ (ng/ μ L)	A 260/280	ความเข้มข้นที่วัดได้ (ng/ μ L)	A 260/280
KDML 105	266.8	1.63	1.2	1.84
PTT1	387.7	1.78	1.3	1.87
RD31	223.9	1.67	12.9	1.98
Rice Berry	166.9	1.61	0.8	1.83

4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์สำหรับผลิต PCR Product เพื่อส่งตรวจสอบลำดับสารพันธุกรรมในข้าว (DNA Sequencing)

การทำพีซีอาร์ของชิ้นตอนนี้เพื่อที่จะให้ได้ PCR Product ที่มีขนาดตามที่ออกแบบไว้ 910 bp ซึ่งการตรวจเช็คผลด้วย Gel Electrophoresis จะทำให้เห็นผลของ PCR Product ที่ชัดเจนและแสดงความถูกต้องว่าเป็นช่วง PCR Product ที่ต้องการ ดังแสดงในรูปที่ 4.2 เพื่อที่จะส่ง PCR Product นี้ไปตรวจวิเคราะห์ลำดับสารพันธุกรรม (DNA Sequencing) ต่อไปซึ่งจะได้ลำดับสารพันธุกรรม ดังแสดงในรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.2 ผลการวิเคราะห์ PCR Product โดยหมายเลข 1 คือ Blank หมายเลข 2 คือ ข้าว KDML 105 หมายเลข 3 คือ ข้าว PTT 1 หมายเลข 4 คือ ข้าว RD 31 หมายเลข 5 คือ ข้าว Rice Berry และ S คือ ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

AB 1 ----ancnnngganaaattcctctcctgatggcaacatggaaggtagct
 KDML 1 a---antgnnnggnaaatacctctcctgatggcaacatggaaggtagct
 PTT 1 gcatantnncngga-actatcctctcctgatggcaacatggaaggtagct
 Rberry 1 ----actgcmngga-aatatacctctcctgatggcaacatggaaggtagct

AB 47 cctgccctggctgctggctgtacagctgtactaaaaccatctgaattggc
 KDML 48 cctgccctggctgctggctgtacagctgtactaaaaccatctgaattggc
 PTT 50 cctgccctggctgctggctgtacagctgtactaaaaccatctgaattggc
 Rberry 46 cctgccctggctgctggctgtacagctgtactaaaaccatctgaattggc

AB 97 ttccgtgtaagtttaacatgttaacttgtaatgtcatacccatgctagt
 KDML 98 ttccgtgtaagtttaacatgttaacttgtaatgtcatacccatgctagt
 PTT 100 ttccgtgtaagtttaacatgttaacttgtaatgtcatacccatgctagt
 Rberry 96 ttccgtgtaagtttaacatgttaacttgtaatgtcatacccatgctagt

AB 147 tgcaatgacatttgattttaaaatgttgtggcatgtccatgctgcaagca
 KDML 148 tgcaatgacatttgattttaaaatgttgtggcatgtccatgctgcaagca
 PTT 150 tgcaatgacatttgattttaaaatgttgtggcatgtccatgctgcaagca
 Rberry 146 tgcaatgacatttgattttaaaatgttgtggcatgtccatgctgcaagca

AB 197 atgtaatttgaaatctctctctatcattaattaccaggactgtttggag
 KDML 198 atgtaatttgaaatctctctctatcattaattaccaggactgtttggag
 PTT 200 atgtaatttgaaatctctctctatcattaattaccaggactgtttggag
 Rberry 196 atgtaatttgaaatctctctctatcattaattaccaggactgtttggag

AB 247 cttgctgatgtgtgtaaagaggttggctcttccttcagggtgtgctaaacat
 KDML 248 cttgctgatgtgtgtaaagaggttggctcttccttcagggtgtgctaaacat
 PTT 250 cttgctgatgtgtgtaaagaggttggctcttccttcagggtgtgctaaacat
 Rberry 246 cttgctgatgtgtgtaaagaggttggctcttccttcagggtgtgctaaacat

AB 297 agtgactggattaggttctgaagccgggtgctcctttgtcatcacaccctg
 KDML 298 agtgactggattaggttctgaagccgggtgctcctttgtcatcacaccctg
 PTT 300 agtgactggattaggttctgaagccgggtgctcctttgtcatcacaccctg
 Rberry 296 agtgactggattaggttctgaagccgggtgctcctttgtcatcacaccctg

AB 347 gtgtagacaaggtaacagctattcctcctgtaacatgtataccccatcaa
 KDML 348 gtgtagacaaggtaacagctattcctcctgtaacatgtataccccatcaa
 PTT 350 gtgtagacaaggtaacagctattcctcctgtaacatgtataccccatcaa
 Rberry 346 gtgtagacaaggtaacagctattcctcctgtaacatgtataccccatcaa

AB 397 tggaaatgatattcctctcaatacatggtttatgttttctggttaggttgc
 KDML 398 tggaaatgatattcctctcaatacatggtttatgttttctggttaggttgc
 PTT 400 tggaaatgatattcctctcaatacatggtttatgttttctggttaggttgc
 Rberry 396 tggaaatgatattcctctcaatacatggtttatgttttctggttaggttgc

AB 447 atttactgggagttagaaactggtaaaaagattatggcttcagctgctc
 KDML 448 atttactgggagttagaaactggtaata-----tttcagctgctc
 PTT 450 atttactgggagttagaaactggtaata-----tttcagctgctc
 Rberry 446 atttactgggagttagaaactggtaaaaagattatggcttcagctgctc

AB 497 ctatgggtaaggttggtttccaaatctctgtggatatttttggttctctt
 KDML 490 ctatgggtaaggttggtttccaaatctctgtggatatttttggttctctt
 PTT 492 ctatgggtaaggttggtttccaaatctctgtggatatttttggttctctt
 Rberry 496 ctatgggtaaggttggtttccaaatctctgtggatatttttggttctctt

AB 547 tctactaactctctattatcaattctcaatgttgtccttttcttttaact
 KDML 540 tctactaactctctattatcaattctcaatgttgtccttttcttttaact
 PTT 542 tctactaactctctattatcaattctcaatgttgtccttttcttttaact
 Rberry 546 tctactaactctctattatcaattctcaatgttgtccttttcttttaact

AB 597 cctttactttttagaattgtgatcaagacactttgagcatcattctagta
 KDML 590 cctttactttttagaattgtgatcaagacactttgagcatcattctagta
 PTT 592 cctttactttttagaattgtgatcaagacactttgagcatcattctagta
 Rberry 596 cctttactttttagaattgtgatcaagacactttgagcatcattctagta

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

AB	647	gccagttctatcctgtttctttacctttttatggttcgtcttttcttgaca
KDML	640	gccagttctatcctgtttctttacctttttatggttcgtcttttcttgaca
PTT	642	gccagttctatcctgtttctttacctttttatggttcgtcttttcttgaca
Rberry	646	gccagttctatcctgtttctttacctttttatggttcgtcttttcttgaca
AB	697	gcctgtttcactggaacttggtggaaaaagtccctatagtggtggttgatg
KDML	690	gcctgtttcactggaacttggtggaaaaagtccctatagtggtggttgatg
PTT	692	gcctgtttcactggaacttggtggaaaaagtccctatagtggtggttgatg
Rberry	696	gcctgtttcactggaacttggtggaaaaagtccctatagtggtggttgatg
AB	747	atggtgatggtgaaaaaggtacatgccacttggtatgattaactaattct
KDML	740	atggtgatggtgaaaaaggtacatgccacttggtatgattaactaattct
PTT	742	atggtgatggtgaaaaaggtacatgccacttncctatgntnantaattct
Rberry	746	atggtgatggtgaaaaaggtgca-gncactatcctcgcangaacaatnct
AB	797	gaagtgcaggactttgtaaagcacttaactgagctggatgctagaccccc
KDML	790	gaagtgcgggactttgtaaagcacttaactgagctggatgctagaccccc
PTT	792	gaagtgcgggactnngtaangcacttaantgagctggatgctagnncccc
Rberry	795	gtatancagggctnctnntaaca-nccannagcctcctgctaggnan
AB	847	aaaagccctttttggtgtct--tggtgntnaga---nnncc--
KDML	840	aaaagccc-ttttggtgtctgctggcagatn-----nnnn---
PTT	842	aaaagcnc-ttttggt-tcg--taacatttcagaatcnnn----
Rberry	844	aaagatcccgtctgagtcct--nnacatatccg---nnnccnnn

รูปที่ 4.3 ผลของลำดับสารพันธุกรรมข้าว (DNA Sequencing)

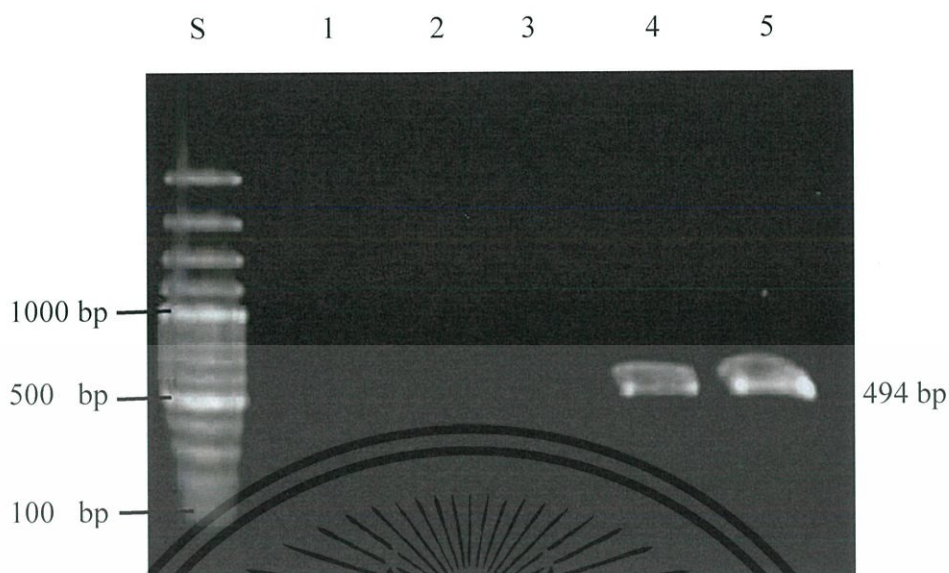
จากรูปที่ 4.3 จะเห็นความแตกต่างระหว่างข้าวที่มีกลิ่นหอมและข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอมโดยสังเกตจากบริเวณในกรอบสี่เหลี่ยม โดยข้าวที่มีกลิ่นหอม คือ ข้าว KDML 105 และข้าว PTT 1 นั้นจะมีการขาดหายไปของลำดับดีเอ็นเอ แต่ในข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอมคือ ข้าว RD 31 และข้าว Rice Berry จะมีลำดับดีเอ็นเอที่สมบูรณ์

และเพื่อความถูกต้องแม่นยำ จึงได้ทำการทดลองส่งตัวอย่างข้าวทั้ง 4 สายพันธุ์ ไปตรวจสอบหาสารให้ความหอม (2-acetyl-1-pyrroline) ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งผลการทดสอบ เป็นไปในทิศทางเดียวกันคือ พบว่ามีสารให้ความหอมอยู่ในข้าว 2 ชนิดคือ ข้าว KDML 105 และข้าว PTT 1 แต่ในข้าว RD 31 และข้าว Rice Berry ไม่พบสารให้ความหอม ดังแสดงในผลการตรวจวิเคราะห์ในภาคผนวก ง

4.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์สำหรับตรวจสอบยีนความหอมของข้าว

4.3.1 การทำพีซีอาร์สำหรับตรวจสอบยีนความหอมของข้าวแบบปกติ

การทำพีซีอาร์ในขั้นตอนนี้ ถ้าตัวอย่างเป็นข้าวที่มีกลิ่นหอมจะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แต่ถ้าหากตัวอย่างเป็นข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอมจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 494 bp เนื่องจากมีการออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะเจาะจงกับยีน Badh2 ที่สมบูรณ์ ซึ่งพบได้ในข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอมเท่านั้น ดังนั้น จะเห็นได้ว่าข้าว KDML 105 และข้าว PTT1 ซึ่งเป็นข้าวที่มีกลิ่นหอมจะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ แต่ข้าว RD 31 และข้าว Rice Berry ซึ่งเป็นข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอมจะปรากฏแถบดีเอ็นเอ ดังแสดงในรูปที่ 4.4



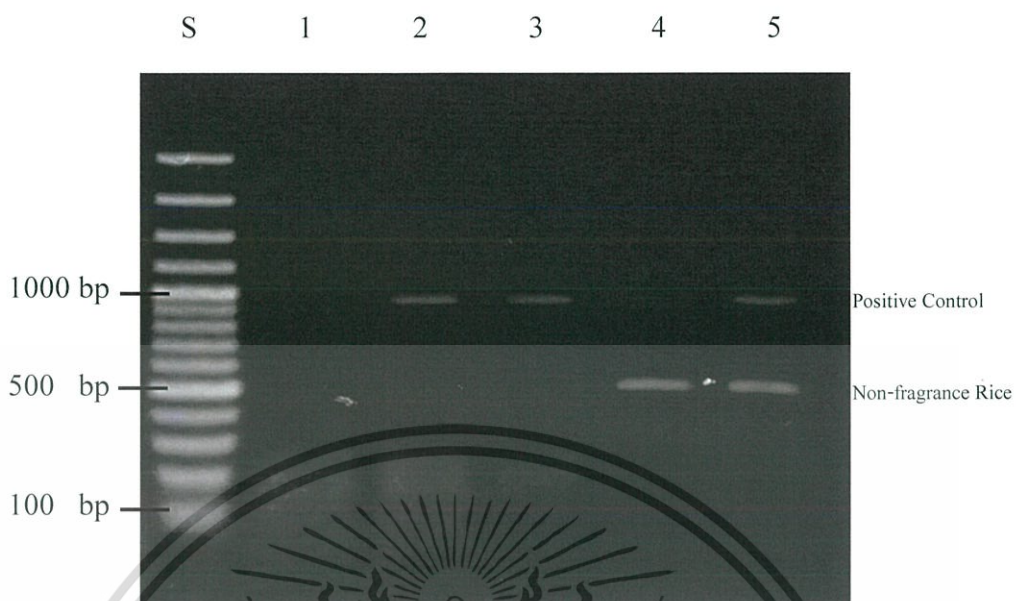
รูปที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์ PCR Product โดยหมายเลข 1 คือ Blank หมายเลข 2 คือ ข้าว KDML 105 หมายเลข 3 คือ ข้าว PTT 1 หมายเลข 4 คือ ข้าว RD 31 หมายเลข 5 คือ ข้าว Rice Berry และ S คือ ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน

4.3.2 การทำพีซีอาร์สำหรับตรวจสอบยีนความหอมของข้าวแบบใส่ตัวควบคุม

เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองว่ามีความถูกต้อง และเกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์ไม่ได้เกิดจากความตั้งใจไม่ใส่สารตัวอย่างดีเอ็นเอลงไปในการทำปฏิกิริยา จึงทำการทดลองโดยใส่ตัวควบคุมลงไปในการทำปฏิกิริยา ซึ่งจะให้ผลการทดลอง มีการปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือช่วง 494 bp และช่วง 910 bp

โดยในตัวอย่างเป็นข้าวที่มีกลิ่นหอม จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ เพียงขนาดเดียว คือ 910 bp แต่ถ้าตัวอย่างเป็นข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอม จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 ขนาด คือ 494 bp และ 910 bp

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า ข้าว KDML 105 และข้าว PTT 1 ซึ่งเป็นข้าวที่มีกลิ่นหอมมีการปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงขนาดเดียว แต่ข้าว RD 31 และข้าว Rice Berry ซึ่งเป็นข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอมจะปรากฏแถบดีเอ็นเอ ทั้ง 2 ขนาด ดังแสดงในรูปที่ 4.5



รูปที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์ PCR Product โดยหมายเลข 1 คือ Blank หมายเลข 2 คือ ข้าว KDML 105 หมายเลข 3 คือ ข้าว PTT 1 หมายเลข 4 คือ ข้าว RD 31 หมายเลข 5 คือ ข้าว Rice Berry และ S คือ ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองสรุปได้ว่า วิธีการสกัดข้าวที่ให้ปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสม และมีความบริสุทธิ์ของสารดีเอ็นเอที่สกัดได้ คือ วิธีการสกัดด้วยชุด Kit (Favorgen, Biotech Corp) และเมื่อนำมาทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในสภาวะที่เหมาะสม โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะเจาะจงกับยีน Badh2 ของข้าวแต่ละสายพันธุ์ เพื่อนำ PCR Product ส่งตรวจหาลำดับสารพันธุกรรม (DNA Sequencing) ของข้าวแต่ละชนิด แล้วนำมาใช้วิเคราะห์ห่ออกแบบไพรเมอร์

ไพรเมอร์ที่ได้รับการออกแบบมาอย่างเฉพาะเจาะจงเพื่อใช้กับยีน Badh2 ที่สมบูรณ์ที่ซึ่งจะพบได้ในพันธุ์ข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอมเท่านั้น เมื่อนำมาทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในสภาวะที่เหมาะสม และทำการวิเคราะห์ผลการทดลองด้วย 1.2% Agarose Gel Electrophoresis จะพบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอเฉพาะตัวอย่างข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอม ส่วนในข้าวที่มีความหอมจะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ และผู้ทดลองได้มีการยืนยันความถูกต้อง และความน่าเชื่อถือของการทดลองโดยการใส่ตัวควบคุมเข้าไป ซึ่งจะเห็นได้ว่า ตัวอย่างข้าวทุกชนิดจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 910 bp ซึ่งเป็นตัวควบคุม แต่ในการที่จะแสดงว่าข้าวนั้นเป็นข้าวหอมหรือไม่ใช่ข้าวหอมนั้น จะต้องดูที่แถบดีเอ็นเอขนาด 494 bp โดยในข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอมจะปรากฏแถบดีเอ็นเอขึ้น แต่ในข้าวหอมจะไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขึ้น ดังนั้น งานวิจัยนี้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวที่มีกลิ่นหอม (KDML 105 และ PTT 1) และข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอม (RD 31 และ Rice Berry) ได้

5.2 วิจารณ์ผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาเฉพาะความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ต่อยีน Badh2 ในข้าวที่มีกลิ่นหอม (KDML 105 และ PTT 1) และข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอม (RD 31 และ Rice Berry) ซึ่งในการทดลองได้แยกข้าวแต่ละชนิดออกจากกัน ดังนั้น ถ้าหากต้องการนำไปใช้ในการตรวจสอบจริงจะต้องนำไปศึกษาความสามารถในการตรวจสอบการปลอมปนของข้าวที่มีกลิ่นหอม และข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอมในสัดส่วนต่างๆ และตรวจสอบว่าไพรเมอร์นี้สามารถตรวจสอบสัดส่วนการปลอมปนที่น้อยสุดเท่าไร เพื่อที่จะได้นำไปใช้ในการออกแบบและผลิตชุดตรวจสอบได้

เอกสารอ้างอิง

- ชิปชัย วัฒนวิจารณ์. 2555. การพัฒนาโปรตีนBADH2 เป็นโปรตีนบ่งชี้ในการคัดแยกข้าวหอมมะลิ. คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ธีรพร นุศยอังกูร. 2543. ข้าวพันธุ์ปทุมธานี1. สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร: กรุงเทพฯ.
- ปาริฉัตร รัตนผล และ ธาณี ศรีวงศ์ชัย. 2554. การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เฉพาะกับการทำหน้าที่ของยีนความหอมในข้าว.
- พยอม โคเบลตี และคณะ. 2550. การพัฒนาวิธีการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของพันธุ์ข้าวด้วยโมเลกุลเครื่องหมาย. ศูนย์วิจัยข้าวอุบลราชธานี.
- มาลินี อัสวดิษฐเสสิศ. 2551. เทคนิคพีซีอาร์เทคนิคเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออย่างรวดเร็ว. บทความวิชาการ. หน่วยบริหารจัดการความรู้ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค).
- วรวิทย์ พาณิชพัฒน์. 2530. ข้าวหอมขาวดอกมะลิ105บริสุทธิ์และอื่นๆ.
- วิฑูรย์ เตียนจำรูญ และ นิรมล ยวนบุญย์. 2546. หอมกลิ่นข้าวมะลิหอม.
- วีระพงษ์ ลูติดานนท์ และ นิภาภรณ์ แสนคุณท้าว. 2551. พื้นฐานเทคนิค polymerase chain reaction. มหาวิทยาลัยขอนแก่น พ.ศ.2551.
- วาสนา วรมิศร์. 2538. การปรับปรุงพันธุ์ข้าวหอมของไทย. ศูนย์วิจัยข้าวพิษณุโลก สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- ศิวพร อินตะหล่อ และคณะ. 2555. การระบุดีเอ็นเอของสุกรด้วยการวิเคราะห์ยีนไซโตโครมบีในไมโทคอนเดรีย. วารสารนิติเวชศาสตร์ ปีที่4(3) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ พ.ศ.2555.
- ศูนย์วิทยาศาสตร์ไทย สวทช.. 2552. ข้าวขาวดอกมะลิและสิทธิบัตรเทคโนโลยีการใช้ยีนควบคุมความหอมในข้าว. เอกสารประกอบการเสวนา เรื่องอนาคตข้าวไทย. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.
- สำนักวิจัยและพัฒนาข้าว. 2553. ข้าวขาวดอกมะลิ105. กรมการข้าว. ISBN 978-974-403-690-2 พ.ศ.2553.
- หน่วยปฏิบัติการนิติวิทยาศาสตร์สัตว์ป่า. 2554. เทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ(Polymerase Chain Reaction;PCR). บทความสารระนำรู้. กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช.
- สุทิน พรหมโชติ และ ศรีสวัสดิ์ ชันทอง. 2553. ยีนความหอมและลักษณะพื้นฐานทางอนุพันธุศาสตร์ของข้าวหอม.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- สุสติ รังคะกนก. 2553. การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง8271-8873ของไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอของชาวยไทยและชาวยพม่า. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัย ศิลปากร พ.ศ.2553.
- อภิชาติ วรณวิจิตร. 2552. ข้าวไรซ์เบอร์รี่. ศูนย์วิทยาศาสตร์ข้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยา เขตกำแพงแสน.
- 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.
- Butter,R.G., 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.
- Buttery,R.G. and Ling,L.C. 1995. Volatile flavor components of corn tortillas and related products. **Agric Food Chem Journal** 43, 1878-1882.
- 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.
- Bradbury,L.M.T., Henry,R.J., JinQ.S., Reinke,R.F. and Waters,D.L.E. 2005. A perfect marker for fragrance genotyping in rice. **Molecular Breeding** 16(4), 279-283.
- Bradbury, L.M.T., Waters,D.L.E. and Henry,R.J. 2007. Generation of simple perfect markers for cereals. **Plant and Animal Genomes Conference XV, Population and Conservation Genomics workshop**, San Diego, USA, 13-17 January
- Bradbury,L.M.T., Gillies,S.A., Brushett,D.J., Waters,D.L.E. and Henry,R.J. 2008. Inactivation of an aminoaldehyde dehydrogenase is responsible for fragrance in rice. **Plant Molecular Biology** 68, 439–449.
- 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.
- Chen,S., Yang,Y., Shi,W., Ji,Q., He,F. and Zhang,Z. 2008. Badh2, encoding betaine aldehyde dehydrogenase, inhibits the biosynthesis of 2-acetyl-1-pyrroline, a major component in rice fragrance. **Plant Cell** 20, 1850–1861.
- Shi,W., Yang,Y., Chen,S. and Xu,M. 2008. Discovery of a new fragrance allele and the development of functional markers for the breeding of fragrant rice varieties. **Molecular Breeding** 22, 185–192.

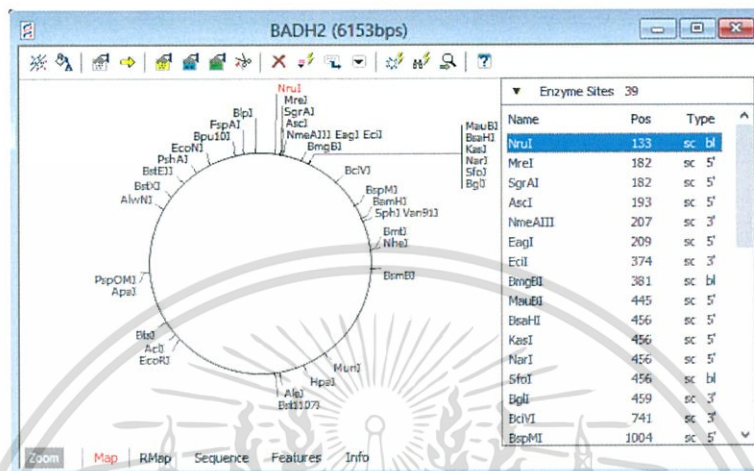
- Wanchana,S.,Kamolukyonyong,W.,Ruengphayak,S.,Toojinda,T.,Tragoonrung,S. and Vanavichit, A. 2005. A rapid construction of a physical contig across a 4.5 cM region for rice grain aroma facilitates marker enrichment for positional cloning. **Science Asia** 31, 299–306.
- [online].Available: www.banphoefarmer.com/articles/42179212/จุดกำเนิดข้าวหอมมะลิไทย.html
- [online].Available: www.biologyreference.com/Dn-Ep/Electrophoresis.html
- [online].Available: www.brrd.in.th.
- [online].Available: www.dna.kps.ku.ac.th/index.php/update-news-rice-science/24-blog-news/78-2014-11-17-07-21-13
- [online].Available: www.imaimorganic.com/blog/
- [online].Available: www.jaxmice.jax.org/support/genotyping/dna-isolation-protocols.html
- [online].Available: www.lightlabsusa.com/catalog/100-1000bp-DNA-Ladder-p-16211.html
- [online].Available: www.scienceinfoworld.blogspot.com/2012/11/polymerase-chain-reaction-per.html
- [online].Available: www.vcharkarn.com/varticle/36810
- [online].Available: www.thairicemillers.com/images/stories/2557/Pricerice2557/August2557/RICEPRICE%20AUGUST%202557.pdf



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

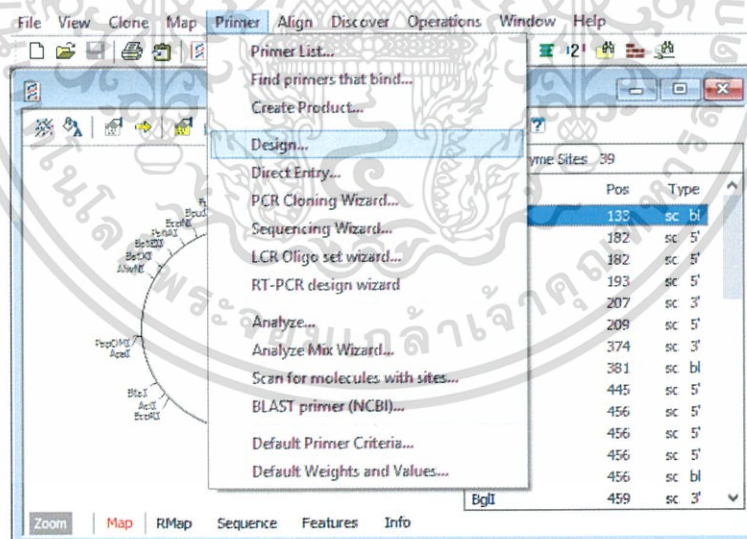
ขั้นตอนการออกแบบไพรเมอร์

เริ่มต้นด้วยการเปิดโปรแกรม Cm Suite เปิดไฟล์ DNA ที่ต้องการออกแบบในโปรแกรม โดย DNA ที่ใช้คือ BADH2 Chr8 ดังรูปที่ 1



รูปที่ ก-1 โครงสร้าง BADH2 Chr8

ขั้นตอนที่ 1 เริ่มทำการออกแบบไพรเมอร์ โดยเลือกที่ Primer แล้วคลิกที่ Design... ดังรูปที่ 2



รูปที่ ก-2 หน้าจอแสดงขั้นตอนที่ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนที่ 2 ออกแบบไพรเมอร์ โดยกำหนดค่าดังต่อไปนี้ ดังรูปที่ 3

Primer type เป็น One PCR Primer

กำหนด Primer Required length ที่ 20 base pairs

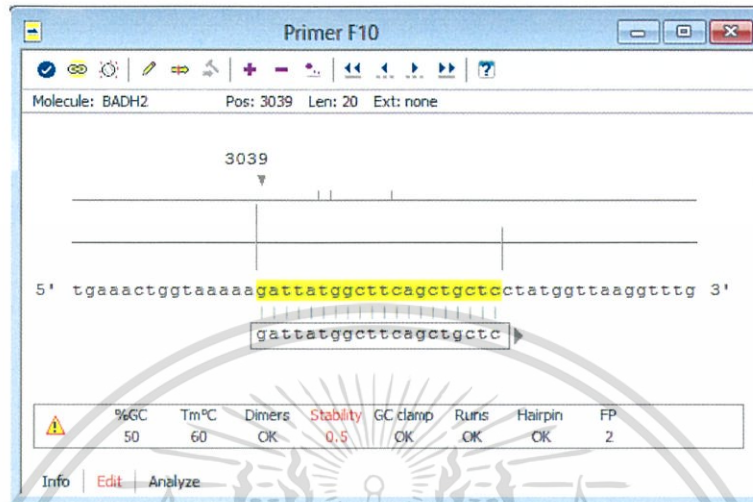
รูปที่ ก-3 หน้าจอแสดงขั้นตอนที่ 2

ขั้นตอนที่ 3 กำหนด Target region เป็น 1 ดังรูปที่ 4

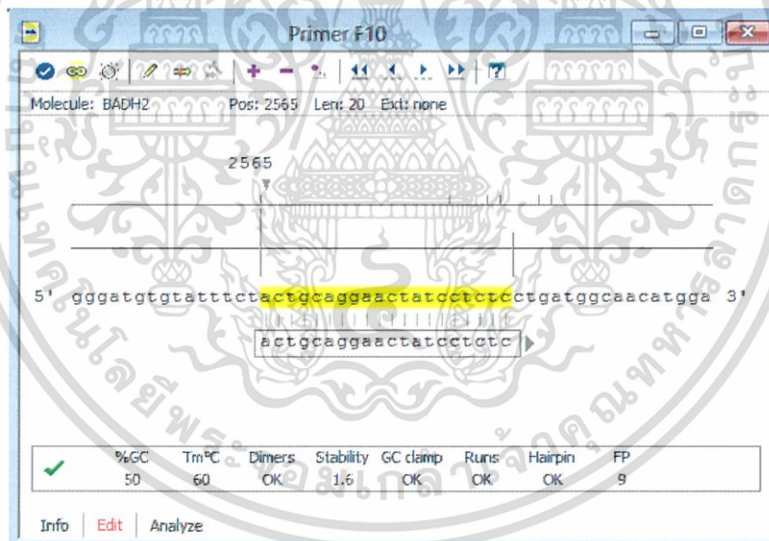
รูปที่ ก-4 หน้าจอแสดงขั้นตอนที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนที่ 4 ตั้งชื่อไพรเมอร์ แล้วทำการเลือกช่วงไพรเมอร์ที่โปรแกรมวิเคราะห์ให้ โดยเลือกให้ครอบคลุมช่วงของ DNA ที่เกิดการ Mutation ดังรูปที่ 5,6,7

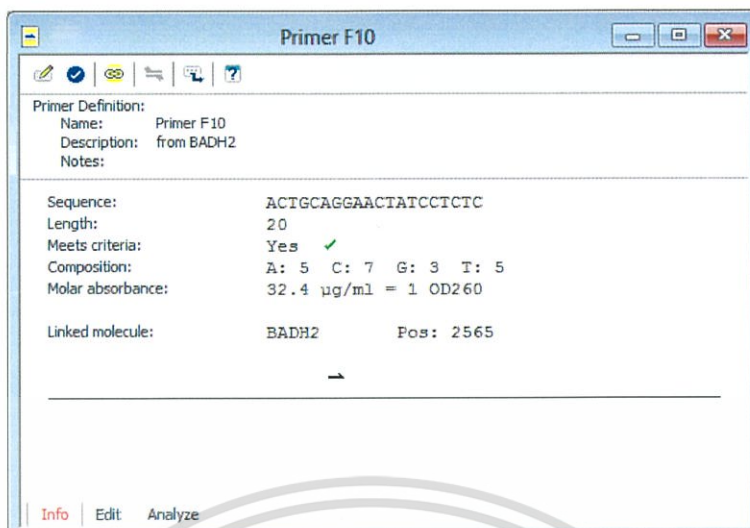


รูปที่ ก-5 หน้าจอแสดงขั้นตอนที่ 4



รูปที่ ก-6 หน้าจอแสดงขั้นตอนที่ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ก-7 หน้าจอแสดงขั้นตอนที่ 4

ขั้นตอนที่ 5 เปิดไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ โดยคลิกที่ Primer list แล้วเลือกไพรเมอร์ที่บันทึกไว้

ขั้นตอนที่ 6 วิเคราะห์ไพรเมอร์ที่ออกแบบ โดยกดเลือกที่ Analyze ดังรูปที่ 8 และ 9

Criteria Used:	PCR Primer	This Primer	Meets Criteria
% GC	Range 50-60	50	Yes
Tm °C	Range 55-80	60	Yes
3' Dimers	< 3 matches at 3' end	2	Yes
Dimers-Airy	< 7 adj homol bases	6	Yes
Stability	>= 1.2 kcal: 5' vs 3'	1.6	Yes
GC clamp	>= 1 G or C at 3' end	1	Yes
Runs	< 4 base runs	2	Yes
Repeats	< 3 dinuc repeats	2	Yes
Hairpins	Annealing 55°C	none	Yes
Worst-case False Priming °C		9	

รูปที่ ก-8 หน้าจอแสดงขั้นตอนที่ 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Primer R10

PCR Primer: Primer R10 Pos: 3474 C BADH2
One Primer Report

Criteria Used:	PCR Primer	This Primer	Meets Criteria
% GC	Range 50-60	55	Yes
Tm °C	Range 55-80	64	Yes
3' Dimers	< 3 matches at 3' end	2	Yes
Dimers-Any	< 7 adj homol bases	4	Yes
Stability	>= 1.2 kJ/mol 5' vs 3'	1.3	Yes
GC clamp	>= 1 G or C at 3' end	1	Yes
Runs	< 4 base runs	2	Yes
Repeats	< 3 dinuc repeats	none	Yes
Hairpins	Annealing 55°C	none	Yes
Worst-case False Priming °C		14	

Info Edit Analyze

รูปที่ ก-9 หน้าจอแสดงขั้นตอนที่ 6

ขั้นตอนที่ 7 ตรวจสอบผลการวิเคราะห์ และขนาดของ PCR Product ดังรูปที่ 10

BADH2-910ตัว.ctl (910bps)

```

1  actgcagga  ctatcctctc  ctgatggcaa  caaggaaagt  agctcctgcc  ctggctgctg
61  gctgtacagc  tctactaaa  ccatctgaat  tggcttccgt  gtaagttaa  catgtaaaact
121  tgttaagtgc  ataccatgc  tagttgcaat  gacattgat  ttaaaaagt  tgtggcatgt
181  ccatgctgca  agcaatgtaa  tttagaaatc  ctctctatca  ttaattacca  ggacttgttt
241  ggaacttggc  gatgtgtgta  aagaggttgg  tcttcttca  ggtgtgctaa  acatagtgac
301  tggattaggt  tctgaagcag  gtgctccttt  gtcatcaacc  cctgggtgag  accaaggtaca
361  gctatctctc  ctgtaaatca  gtatacccca  tcaatggaaa  tgalatctct  ctcaatcacat
421  ggtttatggt  tctgtttagg  ttgcatttcc  tgggaggtat  gaaaactggt  aaaaagtatat
481  ggcctcagct  gctcctatgg  ttaagggttg  tttccaaaat  tctgtggata  tttttgttc
541  tcttctact  aactctctat  tacaattct  caatgttgtc  ctctctctt  aactccttta
601  ctttttgaa  ttgtgatcaa  gacactttga  gcatcatctc  agtagcaggt  tctatccctg
661  tcttaccct  tttatggctc  gtctttctt  gacagccctg  tcaactggaa  ctgggtggaa
721  aaagtctat  agtgggtgtt  gatgatgttg  atgttgaaaa  aggtacatgc  cacttgcctat
781  gattaaccaa  tcttgaaagt  cgggactttg  caaagcactt  aactgagctg  gatgctagac
841  ccccaaaa  cctttttggt  gcttgggct  tgttgcagaa  ataactggct  cagacgagca
901  ggatgcaaga
    
```

Zoom Map RMap Sequence Features Info

รูปที่ ก-10 หน้าจอแสดงขั้นตอนที่ 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมสารเคมี

1. 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

2. 0.5X TBE 1000 mL

เตรียมโดยการตวง 5X TBE (ในข้อที่ 1) มาปริมาตร 100 mL และเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตรครบ 1000 mL

3. 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 cyanol FF 0.075 g คนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วจึงนำไปกรองลดความดัน ผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 2 นำสารละลายที่กรองได้มาเติม Glycerol จนมีปริมาตรครบ 250 mL เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C

4. Ethidium bromide 10 mg/mL ปริมาตร 100 mL

เตรียมโดยการชั่ง Ethidium bromide 1 g แล้วจึงเติมน้ำกลั่น 100 mL ผสมสารให้เข้ากัน และเก็บรักษาในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง และนำไปใช้โดยการผสมกับน้ำกลั่น

*** Ethidium bromide เป็นสารก่อมะเร็ง ขณะใช้ควรระมัดระวัง และสวมถุงมือทุกครั้ง***

5. 5 M NaOH 1 mL

เตรียม โดยการชั่ง NaOH 200 mg ละลายในน้ำ 1000 μL ในหลอด 1.5 mL

6. 100 mM EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)

เตรียม โดยการชั่ง EDTA 29.2 mg ละลายในน้ำ 1000 μL ในหลอด 1.5 mL

7. 25 mM NaOH/0.2 EDTA

เตรียม โดยปิเปต 5 M NaOH ปริมาตร 5 μL และ 100 mM EDTA ปริมาตร 2 μL ในหลอด 1.5 mL และปิเปตน้ำเติมลงไป 993 μL

8. 40 mM Tris HCl (pH 5.5)

เตรียมโดยชั่ง Tris HCl มา 0.121 g ละลายในน้ำ 5 mL ปรับค่า pH ด้วยสาร HCl และ NaOH จนมีค่า pH = 5.5 แล้วจึงปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 25 mL



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนการเตรียมเจล

อะกาโรสที่ใช้มีความหนาอย่างน้อยประมาณ 3 mm ถ้าใช้เจลที่หนากว่านี้จะส่งผลให้เตรียมเจลยากอาจเกิดความผิดพลาด

1. เตรียมพิมพ์สำหรับเท Agarose โดยการต่อชิ้นส่วนต่างๆของอุปกรณ์ โดยการวาง comb ลงใน gel chamber

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

ถ้าต้องการเตรียม 1.2% Agarose ปริมาตร 40 mL ให้ชั่ง Agarose 0.48 g ละลายใน 0.5X TBE 40 mL

ถ้าต้องการเตรียม 1.2% Agarose ปริมาตร 20 mL ให้ชั่ง Agarose 0.24 g ละลายใน 0.5X TBE 20 mL

3. นำไปให้ความร้อนให้ละลายจนหมด หรือเข้าไมโครเวฟ 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 ไปจนท่วมเจลขึ้นมาประมาณ 1-2 มิลลิเมตร

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

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

8. นำเจลออกจากถาดแช่ในสารละลายเอทิลเดียมโบรไมด์ 1 นาที แล้วล้างน้ำกลั่น


**เอทิลเดียม โบรไมด์เป็นสารก่อมะเร็ง ควรสวมถุงมือทุกครั้งในขณะที่ทำการทดลอง

9. ตรวจสอบแถบสีดีเอ็นเอโดยการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต บันทึกผลโดยการถ่ายภาพ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการวิเคราะห์สาร 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) ในตัวอย่างข้าว ด้วยเทคนิค HS-GC
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่



CHIANG MAI UNIVERSITY

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai 50200, Thailand.
Tel: 66-0-5394-3341-5 Fax: 66-0-5389-2277

Rice Chemistry Research Laboratory and Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC)

วันที่ 13 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2557

ผลการวิเคราะห์สาร 2-acetyl-1-pyrroline (2AP) ในตัวอย่างข้าวด้วยเทคนิค HS-GC

Sample	file name	Concentration of 2AP in rice sample, ppm	Average of Concentration of 2AP in rice sample, ppm	SD	%RSD
กข 31	04101403		ไม่พบสารหอม	-	-
	04101404				
	04101405				
PTT 1	04101406	1.39	1.37	0.024	1.75
	04101407	1.35			
	04101408	1.36			
KDML105	04101409	3.53	3.45	0.107	3.10
	04101410	3.33			
	04101411	3.49			
Rice Berry	04101412		ไม่พบสารหอม	-	-
	04101413				
	04101414				

%RSD = ค่าการเบี่ยงเบนของผลการวิเคราะห์ทั้ง 3 ครั้ง (ต้องต่ำกว่า 7%)
หมายเหตุ ดูข้อมูล chromatograms ที่แนบมาโดยเทียบกับ file name

ผู้วิเคราะห์ บุษมาศดี ผู้วิเคราะห์
(นางสาวพิทยาพร บุญพาคำ)

ช-2 ผู้ตรวจผลการวิเคราะห์
(รศ.ดร.สุกัญญา มหาธีรานนท์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้