พัฒนาวิธีการตรวจการปลอมปนของข้าวสารพันธุ์ปทุมธานี 1 ในข้าวหอมมะลิไทย[1]

Improving Verification Method for Thai Hom Mali Rice and Pathumthani Rice Variety

ณัฐหทัย เอพาณิช หทัยรัตน์ อุไรรงค์

กลุ่มวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

Abstract

The Ministry of Commerce has set up Thai Hom Mali Rice standards which allow not more than 8% mixture of the other varieties for the first grade, and not more than 20% and 30% for other lower quality grades. Quality control by chemical process examination cannot prove other varieties having the same range of amylose content. Using DNA fingerprint technology to check other varieties in milled rice is different from that in seed, because seed can be germinated for DNA extraction for examination. Milled rice has gone through milling process in which embryo is removed and cannot, therefore, be germinated. Having starch as the main part of milled rice cells and very low DNA quantity making it relatively difficult to extract DNA from milled rice. It is hence necessary to conduct research and development method for DNA extraction from milled rice that is easy, rapid and inexpensive to operate. The experiment comprised 2 methods of 2 varieties each having 94 seed per variety and conducted in 3 replicates. In the first method, milled rice was boiled and freezed, which in the second the milled rice was boiled and freezed followed by DNA precipitation. Clear liquid, or DNA, was taken from both methods to make PCR compairing to DNA extracted from leaf using 6 pairs of primer i.e. RM17, RM157, RM168, RM202, RM213 and RM247. It was found that in the first method, PCR prepared from DNA gave 50 - 60% result which it was 95-100% in the second method. Analyzing the size of DNA fingerprint may use automatic equipment or extract by submarine gel electrophoresis using 1.5% Metaphore + 2% Sea Kem LE Agarose or 3.5% Metaphore Agarose.

รหัสกิจกรรม 05-01-47-06

รหัสการทดลอง 05-01-47-0601

[1] เป็นกิจกรรมที่อยู่ในชุดโครงการวิจัยลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์ข้าวไทย

บทคัดย่อ

ตามที่กระทรวงพาณิชย์ได้จัดทำมาตรฐานสินค้าข้าวหอมมะลิไทย (Thai Hom Mali Rice Standards) โดยยอมให้มีข้าวพันธุ์อื่นปนได้ไม่เกิน 8% สำหรับข้าวคุณภาพดีเลิศ ปนไม่เกิน 20 และ 30% สำหรับชั้นคุณภาพรองลงมาตามลำดับ การควบคุมมาตรฐานโดยใช้วิธีตรวจสอบทางเคมีจะไม่สามารถตรวจสอบข้าวปนที่มีอมิโลสใกล้เคียงกัน การใช้เทคโนโลยีลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ตรวจการปลอมปนในข้าวสารต่างจากการตรวจ พันธุ์ปนในเมล็ดพันธุ์ เพราะเมล็ดพันธุ์สามารถเพาะให้งอกเป็นต้นอ่อนแล้วนำไปสกัดดีเอ็นเอเพื่อทำการตรวจสอบ แต่ในข้าวสารเมล็ดที่ผ่านกระบวนการขัดสีจนส่วนของ embryo หลุดไปไม่สามารถงอกเป็นต้นอ่อนได้ การที่เซลล์ในเมล็ดข้าวสารมีแป้งเป็นองค์ประกอบหลัก และมีปริมาณ ดีเอ็นเอน้อยมาก ทำให้ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากข้าวสารเป็นขั้นตอนที่ยากมาก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องวิจัย และพัฒนาวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากข้าวสารที่ทำได้ง่าย รวดเร็ว และไม่แพงจนเกินไปโดยทำการทดลองสกัดดีเอ็นเอจากข้าวสารแต่ละเมล็ด เปรียบเทียบกัน 2 วิธี วิธีละ 2 พันธุ์ๆ ละ 94 เมล็ด จำนวน 3 ซ้ำ โดยวิธีที่ 1 ทำการต้มข้าวสารแล้วแช่แข็ง ส่วนวิธีที่ 2 ทำการต้มข้าวสารแล้วแช่แข็ง และตามด้วยการตกตะกอนดีเอ็นเอแล้วดูดน้ำใสหรือดีเอ็นเอจากทั้ง 2 วิธี ไปทำ PCR เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอที่สกัดจากใบโดยใช้ primer จำนวน 6 คู่ ได้แก่ RM17 RM157 RM168 RM202 RM213 RM247 ผลการทดลองพบว่า วิธีที่ 1 ดีเอ็นเอที่นำไปทำ PCR ได้ผล 50-60% ส่วนวิธีที่ 2 ได้ผล 95 -100% การวิเคราะห์ขนาดของลายพิมพ์ดีเอ็นเออาจใช้เครื่องอัตโนมัติ หรือแยกด้วย Submarine gel electrophoresis โดยใช้ 1.5% Metaphore + 2% Sea Kem LE Agarose หรือ 3.5% Metaphore Agarose

คำนำ

ข้าวไทยมีชื่อเสียงไปทั่วโลกเรื่องคุณภาพมานาน มีหลักฐานยืนยันได้จากผลการประกวดข้าวโลกปีพุทธศักราช 2475 ที่เมืองเรจินา ประเทศแคนาดา ได้รับรางวัลชนะเลิศที่ 1, 2, 3 และรางวัลอื่นๆ อีกรวม 11 รางวัล พันธุ์ข้าวที่ได้รับรางวัลที่ 1 คือ พันธุ์ปิ่นแก้ว ซึ่งมีลักษณะเมล็ดเรียวยาวใส นักปรับปรุงพันธุ์ข้าวในสมัยต่อมายึดถือเมล็ดลักษณะนี้เป็นแบบอย่างในการปรับปรุงพันธุ์เรื่อยมาจนถึงปัจจุบัน ทำให้ข้าวพันธุ์แนะนำและพันธุ์รับรองของไทยส่วนใหญ่ มีเมล็ดยาวตั้งแต่ 6–7 ซม. ขึ้นไป รูปร่างเรียว (อัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้างมากกว่า 3.0) คล้ายๆ กันหมด ยิ่งเมื่อสีเป็นข้าวสารจะผสมกันได้อย่างกลมกลืนแยกไม่ออกเลย ทั้งๆ ที่คุณภาพของข้าวสุกในแต่ละพันธุ์แตกต่างกันสูงมาก ตัวอย่างเช่น ข้าวชัยนาท 1 ซึ่งเป็นข้าวแข็งมีลักษณะเมล็ดข้าวสารเหมือนกับข้าวดอกมะลิ

105 และปทุมธานี 1 ซึ่งเป็นข้าวอ่อนนุ่ม ทั้งนี้เนื่องจากแป้งในเมล็ดข้าวมีสัดส่วนของอมิโลสกับอมิโลเปคตินต่างกัน กล่าวคือ ข้าวเหนียวมีอมิโลสในเมล็ด 0–5% ส่วนข้าวเจ้าที่มีอมิโลสปานกลางคือ 21–26% เมื่อหุงแล้วจะได้ข้าวสวยค่อนข้างนุ่ม เรียกข้าวอ่อน เช่น พันธุ์ขาวตาแห้ง 17 สำหรับข้าวเสาไห้จะจัดเป็นข้าวแข็งมีอมิโลส 26–34% แป้งที่เหลือเป็นอมิโลเปคติน

ในช่วงที่ประเทศประสบปัญหาวิกฤตเศรษฐกิจ (พ.ศ. 2540 – 2541) การส่งออกข้าวสามารถนำรายได้เข้าประเทศเป็นอันดับ 3 ของสินค้าเกษตรที่ส่งออกทั้งหมด คิดเป็นมูลค่าถึง 60,619.2 – 85,019.3 ล้านบาท ในจำนวนนี้ข้าวหอมมะลิมีส่วนแบ่งตลาดถึงร้อยละ 20 – 27 ของการส่งออกข้าวรวมในแต่ละปี เนื่องจากความต้องการข้าวหอมมะลิสำหรับบริโภคทั้งภายในประเทศและตลาดต่างประเทศทวีมากขึ้นทุกปี ทำให้ราคาข้าวเปลือกของข้าวหอมมะลิโดยเฉลี่ยสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง จากราคาตันละ 4 พันกว่าบาท เป็นราคาตันละ 8 พันกว่าบาท ในปี 2536 และ 10,000 บาท ในปี 2540 และคาดว่าในฤดูการผลิต ปี 2546 ข้าวเปลือกเจ้าหอมมะลิ จะขายได้ถึงราคาตันละหนึ่งหมื่นบาทด้วยเช่นกัน

ปัญหาการปลอมปนในข้าวหอมมะลิ นั้นเนื่องจาก ราคาข้าวเปลือกของข้าวพันธุ์หอมมะลิมีราคาสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ผู้ค้าบางรายจึงนำข้าวชนิดอื่นมาปนเพื่อลดต้นทุนให้ต่ำลงส่วนการปนในระดับเกษตรกรเกิดขึ้นได้ยาก เพราะการปนข้าวตั้งแต่ปลูกในนาจะประสบปัญหาการสุกแก่ของข้าวไม่พร้อมกันทำให้การเก็บเกี่ยวลำบาก ประกอบกับข้าวหอมมะลิ 105 ปลูกได้เฉพาะฤดูนาปี การกระจายของผลผลิตไม่สม่ำเสมอ ทำให้ราคาข้าวในช่วงก่อนถึงฤดูเก็บเกี่ยวใหม่มีราคาสูงมาก การปลอมปนของข้าวนี้ทำให้คุณภาพของข้าวหอมมะลิต่ำลงไม่เหนียวนุ่มอย่างข้าวหอมมะลิพันธุ์แท้ ถ้าสถานการณ์เป็นเช่นนี้ต่อไปโดยรัฐไม่เข้าไปช่วยแก้ไข อนาคตผู้บริโภคจะลืมรสชาดที่แท้จริงของข้าวหอมมะลิ และคำว่าข้าวหอมมะลิจะค่อยๆ หายไปจากตลาด เป็นการทำลายการตลาดและความเชื่อที่ว่าข้าวหอมมะลิเป็นข้าวคุณภาพดีที่สุดของประเทศไทย การรณรงค์ให้ภาพลักษณ์ของข้าวไทยกลับคืนมาจะยากมาก ซึ่งย่อมส่งผลกระทบต่อการส่งออกในเวลาต่อมา ท้ายสุดผู้ได้รับความเดือดร้อนคือ เกษตรกร

เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวกระทรวงพาณิชย์จึงได้จัดทำมาตรฐานสินค้าข้าวหอมมะลิไทย (Thai Hom Mali Rice) หรือ Thai Jasmine Rice, หรือ Thai Fragrant Rice โดยให้คำนิยามว่า ข้าวหอมมะลิไทยเป็นข้าวที่แปรรูปจากข้าวเปลือกเจ้าพันธุ์ข้าวหอมที่ผลิตในประเทศไทยซึ่งกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ประกาศรับรองว่าเป็นพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ กข 15 มีการแบ่งข้าวหอมมะลิไทยออกเป็น 3 ชั้น คือ ชั้นดีเลิศ (Prime quality) ยอมให้มีข้าวพันธุ์อื่นปนได้ 8% ชั้นดีพิเศษ (Super quality) ยอมให้มีข้าวพันธุ์อื่นปนได้ไม่เกิน 20% และชั้นดีพิเศษ (Premium quality) มีข้าวพันธุ์อื่นปนได้ไม่เกิน 30% สำหรับข้าวเจ้าที่นำมาปนหรือผสมต้องมี

คุณภาพไม่ต่ำกว่าข้าวตามประเภท ชนิด และชั้นเดียวกับข้าวหอมมะลิไทยนั้นๆ เพื่อรักษาคุณภาพข้าวหอมมะลิไทย และให้ผู้บริโภคได้รับความเป็นธรรมในการซื้อสินค้า ขจัดปัญหาโต้แย้งระหว่างผู้ประกอบการกับผู้บริโภค กระทรวงพาณิชย์จึงให้ผู้ค้าข้าวทำตามมาตรฐานข้าวหอมมะลิไทยที่กำหนดไว้ ซึ่งแน่นอนว่าเมื่อมีมาตรฐานสินค้าแล้ว จะต้องมีการตรวจสอบ ควบคุมมาตรฐานให้ได้ ปัจจุบันใช้วิธีตรวจสอบทางเคมีในการหาปริมาณข้าวอื่นปนโดยใช้วิธีการหาค่าการสลายเมล็ดในด่างและการตรวจอมิโลส ซึ่งบางครั้งทำได้ยาก เพราะถ้าข้าวที่นำมาปน มีค่าอมิโลสใกล้เคียงกับข้าวขาวดอกมะลิ 105 และ กข 15 ดังนั้นการใช้เทคนิคลายพิมพ์ดีเอ็นเอจึงเข้ามามีบทบาทในการช่วยพิสูจน์การปลอมปนส่วนนี้ซึ่งจะให้ผลการตรวจ สอบที่แม่นยำได้

แต่การใช้เทคโนโลยีลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ตรวจการปลอมปนในข้าวสารนั้น ต่างจากการตรวจการปลอมปนในระดับเมล็ดพันธุ์ เพราะเมล็ดพันธุ์สามารถเพาะให้งอกได้แล้วนำส่วนของใบ หรือรากไปสกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการตรวจสอบจึงสามารถใช้วิธีการทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวไทยมาตรวจสอบได้ทันทีโดยไม่ต้องปรับปรุงวิธีการหรือเทคนิคต่างๆ แต่ในข้าวสารที่ผ่านขบวนการขัดสีแล้วไม่สามารถนำมาเพาะให้งอกได้เพราะส่วนของต้นอ่อน (embryo) หรือที่เรียกจมูกข้าวได้ถูกขัดออกไป ฉะนั้นการที่จะตรวจพันธุ์ปนในข้าวสารจึงจำเป็นต้องสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ดข้าวสารโดยตรง ซึ่งเซลในเมล็ดข้าวสารมีแป้งเป็นองค์ประกอบหลัก นอกนั้นก็จะมีโปรตีน (polysaccharides) และ enzymes ต่างๆ ที่ละลายน้ำได้ดีพอๆ กับดีเอ็นเอซึ่งมีน้อยในเมล็ด ทำให้การแยกดีเอ็นเอออกจากสารอื่นๆ ดังกล่าวที่มักตกตะกอนมาพร้อมกันด้วยนี้ทำได้ยาก ฉะนั้นหัวใจสำคัญของการตรวจการปลอมปนในข้าวสารอยู่ที่เทคนิคการสกัดดีเอ็นเอในข้าวสารให้ได้คุณภาพและปริมาณเพียงพอที่จะใช้ตรวจสอบได้โดยมีสารอื่นดังกล่าวข้างต้นปนอยู่ในดีเอ็นเอปริมาณน้อยจนไม่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาการตรวจสอบในขั้นต่อไปได้ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อพัฒนาวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากข้าวสารที่ง่ายไม่แพงจนเกินไปและรวดเร็วสำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการ 1 วิธี ดีเอ็นเอที่ได้มีประสิทธิภาพดีเพียงพอสำหรับการตรวจสอบการปลอมปนในข้าวสารด้วยวิธี microsatellite PCR

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ข้าวสารพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และ ปทุมธานี 1 (ได้จากแปลงพันธุ์คัดที่ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี นำไปสีและขัดเพื่อใช้ในการทดลองนี้)
2. CTAB (hexadecyltrimetyl ammonium bromide)
3. Chloroform : isoalmyl alcohol 24 : 1 (v/v)
4. Sodium chloride solution (3 M)
5. Isopropanol
6. Ethanol solution (95%)
7. sterile water
8. Eppendorf tubes, PCR tube
9. pipette tip
10. $MgCl_2$
11. dNTPs
12. microsatellite primer
13. 10X PCR buffer
14. Tag polymerase
15. Agarose
16. Loading buffer
17. TBE buffer (Tris-0.045 M, boric acid 0.045 M EDTA 0.001 M)
18. Ethidium bromide
19. Molecular weight size standard (100 bp)
20. Submarine gel electrophoresis
21. Gel Documentation
22. Centrifuge
23. เครื่อง ABI Prism 377, 310 Genetic Analyzer

วิธีการ

1. การสกัดดีเอ็นเอจากข้าวสาร

การสกัดดีเอ็นเอจากข้าวสารแต่ละเมล็ด ได้ทำการเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอของข้าวสาร 2 พันธุ์ๆ ละ 2 วิธีๆ ละ 94 เมล็ดต่อพันธุ์จำนวน 3 ซ้ำ ดังนี้คือ

วิธีที่ 1 ต้ม + แช่แข็ง นำข้าวสารพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และปทุมธานี 1 มาล้างน้ำให้สะอาดซับให้แห้งด้วยกระดาษซับ จากนั้นนำข้าวแต่ละพันธุ์ๆ ละ 94 เมล็ด ใส่หลอด PCR ขนาด 200 μl เติม 10 mM Tris-HCl pH 8.0 ลงไป 120 μl ต้มที่ 95°C 15 นาที แล้วนำไปแช่ -20 °C นาน 1 ชั่วโมง เมื่อนำออกจากตู้แช่แข็ง ปล่อยให้ละลายแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ดูดน้ำใส 30 μl ใส่หลอดใหม่พร้อมที่จะนำไปใช้ทำ PCR ต่อไป

วิธีที่ 2 ต้ม + แช่แข็ง + ตกตะกอน นำข้าวสารทั้ง 2 พันธุ์ ล้างน้ำให้สะอาดซับให้แห้ง แล้วใส่ในหลอด PCR ขนาด 200 μl เติม TE buffer 200 μl แล้วนำไปต้มที่ 95°C 15 นาที เสร็จแล้วนำไปแช่แข็งที่ -20 °C นาน 1 ชั่วโมง (หรือ -80 °C ครึ่งชั่วโมง หรือแช่ liquid N_2 ใช้ได้ทันที) นำออกมาปล่อยให้ละลายแล้วปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที จากนั้นดูดน้ำใสใส่หลอดใหม่ 100 - 120 μl นำไป vortex เป็นเวลา 1 – 2 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที ดูดน้ำใส 80 μl ใส่หลอดใหม่ ในหลอดใหม่เติม 3 M Sodium chloride ลงไป 8 μl เติม 2 μl ของ glycogen ที่เข้มข้น 20 mg/ml ลงไป จากนั้นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย 60 μl isopropanol ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที จึงนำไปปั่นที่ 12,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที ล้างตะกอน 1 ครั้งด้วย 70% Ethanol ปล่อยตะกอน ให้แห้ง ละลายตะกอนด้วย TE 20 μl จะได้ดีเอ็นเอของข้าวสารพร้อมที่จะนำไปทำ PCR ต่อไป

2. การตรวจสอบข้าวสารพันธุ์ปทุมธานี 1 ปนในข้าวหอมมะลิไทย โดยการขยายยีนในหลอดทดลอง (PCR Amplification) ด้วย microsatellite primer

คัดเลือก primer ที่ใช้แยกพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 กับปทุมธานี 1 โดยดูจากฐานข้อมูลลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวไทย ที่ได้จากโครงการวิจัยลายพิมพ์ดีเอ็นเอของข้าวพันธุ์รับรอง และข้าวสายพันธุ์ดี ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดง primer ที่ใช้ในการจำแนกข้าวขาวดอกมะลิ 105 กับข้าวปทุมธานี 1

ลำดับที่	Primer/locus	Sequence	Repeat type and length	Chromosome No.
1	RM17	R ggtgatcctttcccatttca F tgccctgttattttcttctctc	(GA)21	12
2	RM157	R gggcttcttctccgccggcttc F cctcctcctcacgaatcccgcc	(CT)11(TC)10	3
3	RM168	R gaaacgaatcaatccacggc F tgctgcttgcctgcttccttt	T15(GT)14	3
4	RM202	R ccagcaagcatgtcaatgta F cagattggagatgaagtcctcc	(CT)30	11
5	RM213	R aggtctagacgatgtcgtga F atctgtttgcaggggacaag	(CT)17	2
6	RM247	R catatggttttgacaaagcg F tagtgccgatcgatgtaacg	(CT)16	12

ปฏิกิริยา PCR ที่ทำใน 20 μl มีส่วนประกอบดังนี้ primer แต่ละสายจำนวน 0, 1 mM 200 mM dNTP 50 mM KCl 10 mM Tris-HCl (pH 8.3) 0.01% gelatin 3 mM $MgCl_2$ และ 0.5 unit Tag DNA Polymerase ในกรณีที่ใช้เครื่องอัตโนมัติ ABI Prism 310 หรือ 377 ในการตรวจผลต้องติดฉลากส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกขยายขึ้นมา (PCR Product) ด้วยสีฟลูออเรสเซน โดยใส่ dCTP ที่ติดฉลากด้วยสีเหลือง (TAMRA) สีฟ้า (R110) และสีเขียว (R6G) ลงไป 0.1 mM ขณะเตรียมปฏิกิริยา PCR และใส่ DNA ของข้าวสารที่สกัดไว้แล้วในข้อ 1 จำนวน 2 μl เป็นแม่พิมพ์ ทำการทดลองพันธุ์ละ 94 ตัวอย่างเมล็ด และใช้ดีเอ็นเอจากใบของพันธุ์ข้าวขาวดอกมะลิ 105 และปทุมธานี 1 จำนวน 80 ng เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อใช้ตรวจสอบปฏิกิริยาของ PCR และใช้สำหรับเปรียบเทียบขนาดของ PCR Product จากนั้นนำปฏิกิริยาเข้าเครื่องขยายยีน (Thermal cycle 9700 Perkin-Elmer) โดยตั้งเครื่องเป็น 3 ระดับ ดังนี้ 94°C นาน 3 นาที 1 รอบ ตามด้วย 35 รอบของ 94°C นาน 30 วินาที 55°C 30 วินาที และ 72°C 30 วินาที และ 1 รอบของ 72°C นาน 8 นาที

3. การวิเคราะห์ PCR Product

PCR Product ที่แยกพันธุ์ข้าวสารสามารถวิเคราะห์ได้ 2 วิธี

3.1 วิเคราะห์ PCR Product ด้วย Submarine gel electrophoresis โดยใช้ 3.5% Metaphore Agarose ใน 1X TBE buffer และ 1.5% Metaphore Agarose ผสมกับ 2% SeaKem LE ย้อมสีดีเอ็นเอด้วย Ethidium Bromide ดูแถบดีเอ็นเอด้วย Gel Documentation และบันทึกภาพไว้

3.2 วิเคราะห์ PCR Product ที่ติดฉลากด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ด้วยเครื่อง ABI Prism 310 และ 377 ต้องมีขั้นตอนดังนี้

3.3 ล้างสีฟลูออเรสเซนต์ส่วนเกิน

ทำการล้างสีฟลูออเรสเซนต์ (F dCTP) ส่วนเกินออกจาก PCR Product โดยการเติม 75% isopropanol 80 μl ลงในหลอด PCR ที่ทำปฏิกิริยาเสร็จแล้ว จากนั้นตกตะกอน PCR Product โดยการนำไปปั่นที่ 12,000 rpm นาน 15 นาที เทน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol แล้วปล่อยให้ตะกอนของดีเอ็นเอแห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำ หรือ TE 10 μl

การวิเคราะห์ PCR Product (Fragment Analysis) ด้วยเครื่อง ABI Prism 310

- เตรียมหลอด 310 Sample tube แต่ละหลอดใส่
  - Deionized formamide 12.75 μl
  - Internal Size Standard GS-500 (ROX) 0.25 μl
  - PCR Product หลังจากล้างสีส่วนเกินแล้ว 1 μl
- ปิดหลอดด้วย Septa ซึ่งเป็นฝายางที่มีช่องสำหรับ Capillary และ Electrode แทงทะลุได้เพื่อดูด Sample ไปวิเคราะห์
- จากนั้นนำ 310 Sample tube ที่มีตัวอย่างซึ่งเตรียมเสร็จเรียบร้อยแล้ว โดยไม่มีการต้มเพื่อ denature PCR Product ใส่ Sample Tray และนำเข้าเครื่อง ABI Prism 310 for Genetic Analyzer ที่ได้ Set up ทุกอย่างไว้พร้อมแล้ว เมื่อเครื่องเริ่มทำงานจะทำการดูดตัวอย่างตามเวลาที่ตั้งไว้
- แยกขนาดดีเอ็นเอ โดยวิธี electrophoresis ซึ่งมี Capilliary ที่ใส่โพลีเมอร์ POP4 เป็นตัวกลาง
- ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอโดย Argon Lazer
- บันทึกผลโดยใช้โปรแกรม Gene Scan (Gene Scan Reference Guide)
- และวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอ ด้วยโปรแกรม Genotyper

ซึ่งทุกขั้นตอนที่กล่าวมาแล้ว เครื่องจะทำงานโดยอัตโนมัติ

3.4 การวิเคราะห์ PCR product ด้วยเครื่อง ABI 377 ซึ่งเป็นเครื่องวิเคราะห์กึ่งอัตโนมัติ ดังนั้นก่อนที่จะนำตัวอย่างเข้าเครื่องจะต้องเตรียมกระจกและฉีด gel acrylamide 5% เข้าไปในกระจกที่เตรียมไว้ ซึ่งส่วนประกอบของ acrylamide gel สำหรับกระจกขนาด 36 × 48 ซม. ที่ใช้กับเครื่อง ABI 377 มีดังนี้

Urea	9.0	กรัม
น้ำกลั่น	13	มิลลิลิตร
50% Long Ranger	2.5	มิลลิลิตร
10X TBE	2.5	มิลลิลิตร
10% Ammonium persulfate	125.0	ไมโครลิตร
TEMED	17.5	ไมโครลิตร
รวม	25	มิลลิลิตร

เมื่อ gel แข็งตัวหลังจากฉีดเข้าไปในกระจกแล้วประมาณ 2 ชั่วโมง จึงประกอบกระจก gel เข้ากับเครื่องและตั้งค่าต่างๆ ของเครื่องพร้อมใส่ Sample sheet ที่มีชื่อพันธุ์ข้าวและ primer ตรงกับช่องของ gel ที่จะหยดตัวอย่างลงไปซึ่งมีทั้งหมด 36 ช่อง

3.5 บันทึกและจัดเก็บลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากทั้ง 2 เครื่องไว้ในรูปของ digital file

เวลาและสถานที่ทำการทดลอง

ระยะเวลาทำการทดลอง ปี 2546

สถานที่ทำการทดลอง ห้องปฏิบัติการกลางของสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลการสกัดดีเอ็นเอในข้าวสารแต่ละเมล็ด พบว่าทั้ง 2 วิธีคือ วิธีที่ 1 ต้ม + แช่แข็ง กับวิธีที่ 2 ต้ม + แช่แข็ง + ตกตะกอน สามารถสกัดดีเอ็นเอข้าวสารได้เพียงพอที่จะนำไปใช้ทำ PCR แต่วิธีที่ 2 ให้ผลดีกว่าดังแสดงในตารางที่ 2 กล่าวคือ วิธีที่ 1 ดีเอ็นเอที่ได้เมื่อนำไปทำ PCR แล้วได้ผลหรือให้ PCR Product 50 – 60% นอกนั้นปฏิกิริยาล้มเหลว แต่เมื่อนำดีเอ็นเอของเมล็ดข้าวสารที่สกัดจากวิธีที่ 2 ไปทำ PCR จะให้ผล 95 – 100% แต่ทั้งนี้จะเห็นว่าวิธีสกัดดีเอ็นเอจากข้าวสารวิธีที่ 1 ใช้เวลาน้อยเพียง 1 – 2 ชม. งานจะเสร็จ 1 ชุด ขณะที่วิธีที่ 2 ใช้เวลามากกว่า 1 เท่าตัว

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอของข้าวสารแต่ละเมล็ด

วิธี	ระยะเวลาที่ใช้สกัด DNA	DNA ที่ได้นำไปทำ PCR ได้ผล (%)	จำนวนตัวอย่างที่ทำได้/คน/วัน	เสียค่าใช้จ่าย/ตัวอย่าง
1. ต้ม + แช่แข็ง	1 – 2 ชม.	50 – 60%	1000	3 – 3.5 บาท
2. ต้ม + แช่แข็ง + ตกตะกอน	2 – 4 ชม.	95 – 100%	360	6 – 7 บาท

หมายเหตุ คิดแต่เฉพาะค่าหลอด + pipette tip + สารเคมี (ไม่คิดค่าไฟฟ้าที่ใช้ต้ม และแช่แข็ง ค่าแรง และอื่นๆ)

นอกจากนั้นจะเห็นว่าจำนวนตัวอย่างที่ทำได้ต่อวันยังมากกว่าขณะเสียค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่างต่ำกว่ามากแทบไม่มีต้นทุนสารเคมี เสียแต่ค่าหลอดพลาสติก และ pipette tip เท่านั้น ขณะที่ห้องปฏิบัติการเลือกวิธีที่ 2 ในการสกัดดีเอ็นเอเพื่อตรวจสอบการปลอมปนของข้าวพันธุ์อื่นในข้าวหอมมะลิไทย เพราะให้ผลในการทำ PCR Product ได้ดีกว่า แต่ก็พยายามพัฒนาวิธีสกัดดีเอ็นเอจากวิธีที่ 1 ต่อไป เพราะวิธีที่ 1 ราคาต่อตัวอย่างถูก ใช้เวลารวดเร็วกว่าสะดวกสำหรับผู้ปฏิบัติและยังไม่มีสารเคมีอันตรายขณะที่วิธีที่ 2 ยังมีขั้นตอนที่ต้องใช้ chloroform อยู่ด้วย

ได้ทดลองเติม Protenase K 20 mg/ml ลงในตัวอย่างของวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากข้าวสารวิธีที่ 1 ในขั้นตอนหลังออกจากตู้ -20° C เพื่อช่วยลดปริมาณ Endonuclease ที่จะย่อยสลายดีเอ็นเอ พบว่าให้ผลในการสกัดดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น 15% ทั้งนี้เทียบจากความสำเร็จในการนำดีเอ็นเอไปทำ PCR แล้วให้ PCR Product ออกมา โดยเทียบกับดีเอ็นเอของใบข้าว ที่ต้องวัดผลโดยวิธีนำเอาดีเอ็นเอไปทำ PCR เพราะดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเมล็ดข้าวสารแต่ละเมล็ดมีปริมาณน้อยมาก จนไม่สามารถวัดได้ โดยใช้เครื่อง Spectophotometer ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ หรือมีปริมาณน้อยมากจนไม่เพียงพอที่จะนำไป run gel แล้วย้อมสีด้วย Ethidium bromide ดูได้

แต่ข้อดีของการตรวจผลการสกัดดีเอ็นเอข้าวสารโดยนำไปทำ PCR คือสามารถทำให้ทราบว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอนั้นดีเพียงพอหรือไม่ มีสารปนเปื้อนที่จะยับยั้งปฏิกิริยา PCR หรือไม่กล่าวคือ

- ในกรณีที่นำดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดไปทำ PCR แล้วไม่ได้ผลทั้งนี้ส่วนใหญ่เนื่องมาจากมีสารปนเปื้อน (contaminant) ที่ไปยับยั้งปฏิกิริยาของ PCR สารปนเปื้อนในกรณีสกัดดีเอ็นเอจากข้าวสาร คาดว่าส่วนใหญ่จะเป็น Polysaccharides เพราะในเมล็ดข้าวสารมีแป้งเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่ง Polysaccharides ที่ตกตะกอนมาพร้อมกับดีเอ็นเอจะไปยับยั้งปฏิกิริยา PCR ทั้งหมด แต่การสกัดดีเอ็นเอข้าวสาร วิธีที่ 2 ต้ม + แช่แข็ง + ตกตะกอน ที่ให้ผลดีกว่าเพราะในขั้นตอนตกตะกอน

มีการเติมเกลือ NaCl ลงไปด้วยโดยเกลือจะไปช่วยให้ Polysaccharide ที่มีอยู่ละลายใน ethanol ได้ดีขึ้นไม่ตกตะกอนตามดีเอ็นเอ ซึ่งตรงกับรายงานของ Fang *et al*. (1992) ที่พบว่าใส่ 1 M NaCl ลงในขั้นตอนตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย Ethanol จะช่วยให้ Polysaccharides ละลาย ethanol ดีขึ้น ยิ่งใส่มากกว่า 2.5 M จะยิ่งให้ผลดียิ่งขึ้น

นอกจากนั้นยังได้ทดลองนำวิธีสกัดดีเอ็นเอจากใบข้าว (CTAB method) มาสกัดดีเอ็นเอของข้าวสาร พบว่าให้ผลไม่ดีมีแป้งขาวๆ ตกตะกอนมากับดีเอ็นเอมาก และพบว่าถ้าไม่ต้มข้าวสารก่อน ดีเอ็นเอที่ได้มักจะทำปฏิกิริยา PCR ไม่ให้ PCR Product ทั้งนี้คาดว่าการต้มจะมีผลไปทำลาย endonuclease จึงไม่สามารถย่อยสลายดีเอ็นเอที่มีอยู่น้อยในเมล็ดได้

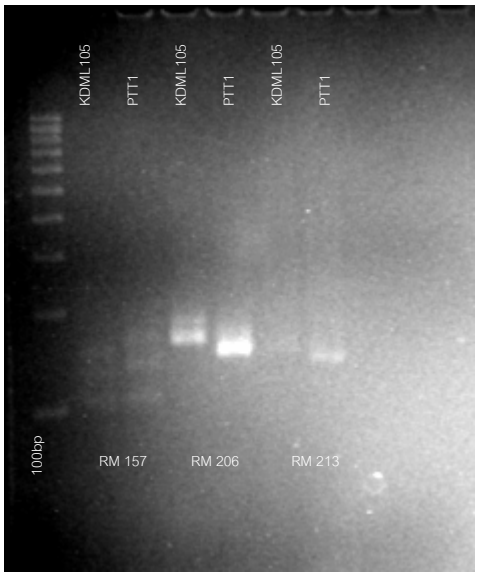
2. ผลการตรวจสอบข้าวสารพันธุ์ปทุมธานี 1 ปนในข้าวขาวดอกมะลิ 105 พบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดโดยวิธีที่ 2 คือ ต้ม + แช่แข็ง + ตกตะกอน เมื่อทำ PCR แล้วนำมาแยกขนาดของชิ้น PCR Product primer ที่ใช้ 6 คู่ สามารถแยกข้าวพันธุ์ปทุมธานี 1 ออกจากข้าวขาวดอกมะลิ 105 ได้อย่างชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 1 ทั้งๆ ที่ข้าวทั้ง 2 พันธุ์นี้มีคุณภาพการหุงต้ม คุณภาพทางเคมีใกล้เคียงกันมากจนไม่สามารถแยกออกจากกันโดยวิธีการตรวจ amylose และ alkaline test กล่าวคือ เมื่อใช้ microsatellite primer 6 คู่ ให้ผลดังนี้

ตารางที่ 3 แสดงความแตกต่างของ PCR Product ที่ได้จากข้าวขาวดอกมะลิ 105 และปทุมธานี 1 โดยใช้ primer 6 คู่

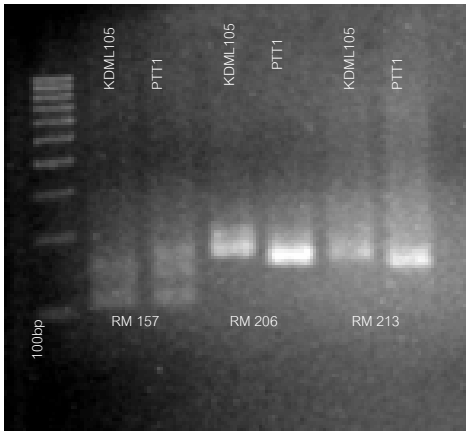
PRIMER	**ขนาดของ** PCR Product (basepair)		**ความแตกต่าง**
	KDML 105	PTT 1	
RM 17	175.58	183.62	8.04
RM 157	124.57	132.66	8.09
RM 168	112.63	94.61	18.02
RM 202	160.71	143.42	17.29
RM 213	145.08	132.37	12.71
RM 247	134.74	130.57	4.17

จากการทดลองจะเห็นว่ามี primer เดียวคือ RM 247 ที่ข้าวปทุมธานี 1 และข้าวขาวดอกมะลิ 105 ให้ความแตกต่างของ PCR Product ค่อนข้างน้อย คือ 4.17 basepair เท่านั้น ซึ่งจะทำให้การแยกขนาดบนตัวกลางที่เป็น agarose โดยวิธี gel electrophoresis ไม่สามารถบอกความแตกต่างได้อย่างชัดเจน ยกเว้นการใช้เครื่องอัตโนมัติซึ่งมีราคาแพงหลายล้าน เช่น ที่ทำในการทดลองนี้

ฉะนั้นเพื่อให้เทคนิคนี้สามารถนำออกส่งเสริมให้ผู้ประกอบการภาคเอกชนหรือภาครัฐที่ต้องการจัดตั้งห้องปฏิบัติการตรวจการปลอมปนของข้าวทั้งข้าวสารและพันธุ์ข้าว จึงได้ทำการวิเคราะห์ PCR Product ที่ได้นี้บน Submarine gel electrophoresis โดยใช้ 3.5% Metaphore Agarose และ 1.5% Metaphore + 2% Sea Kem LE Agarose ใน 1X TBE พบว่าตัวกลางทั้งสองสามารถแยกความแตกต่างของ PCR Product ชัดเจนพอควร แต่ Metaphore Agarose อย่างเดียวจะราคาแพงกว่าให้ผลชัดเจนกว่า และใช้เวลามากกว่า การใช้ Agarose ผสมระหว่าง 1.5% Metaphore + 2% Sea Kem LE Agarose ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 a. ภาพแสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จาก run gel 45 นาที 250 Volt ด้วย1.5% Metaphore + 2% Sea Kem LE Agarose



ภาพที่ 2 b. ภาพแสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จาก run gel 60 นาที 150 Volt ด้วย 3.5% Metaphore Agarose

สำหรับการตรวจสอบข้าวพันธุ์อื่นๆ ปนในข้าวหอมมะลิไทยก็ใช้วิธีเดียวกันที่ทำไปแล้วข้างต้นแต่ต่างกันที่การเลือกใช้ primer ซึ่งได้ทำการสรุปไว้ใน ตารางที่ 3

สรุปผลการทดลอง

1. ได้วิธีสกัดดีเอ็นเอจากข้าวสาร 1 วิธี สำหรับใช้ในงานบริการตรวจสอบการปลอมปนของข้าวสารพันธุ์อื่นในข้าวหอมมะลิไทย

2. ควรมีการพัฒนาเทคนิคการสกัดดีเอ็นเอจากข้าวสารเพิ่มเติมโดยมีหลักว่า ควรเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็วที่สุด ราคาไม่แพงและลดการใช้สารเคมีที่เป็นพิษต่อผู้ใช้และสิ่งแวดล้อมให้เหลือน้อยสุด เช่น ในกรณีวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากข้าวสารวิธีที่ 2 ต้ม + แช่แข็ง + ตกตะกอน อาจนำเกลือ NaCl ในความเข้มข้นสูงมาใช้ร่วมกับการตกตะกอนด้วย ethanol โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการใช้ chloroform

3. ได้ primer ที่ใช้ในการแยกข้าวสารพันธุ์ปทุมธานี 1 ออกจากข้าวหอมมะลิไทย คือ RM 17, RM 157, RM 168, RM 202, RM 213, และ RM 247 โดยจะเลือกใช้ตัวใดก็ได้แต่ควรมีการทำร่วมกับวิธีอื่น เช่น การต้มข้าวสารเพื่อแยกข้าวแข็งออกจากข้าวนุ่มก่อน ดังภาพ 3

ภาพที่ 3 แสดงผลการต้มข้าวโดยใช้น้ำ 15 µl/เมล็ด นาน 10 นาที พันธุ์ชัยนาท 1 ที่มีอมิโลสสูง กข 23 ที่มีอมิโลสปานกลางจะไม่สุกและมีไตสีขาว สำหรับข้าวขาวดอกมะลิ 105 และปทุมธานี 1 ซึ่งมีอมิโลสต่ำจะค่อนข้างสุกหรือไตน้อยมาก

เอกสารอ้างอิง

กรมการค้าต่างประเทศ. 2540. มาตรฐานข้าวไทย. โรงพิมพ์คุรุสภา กรุงเทพ. 146 หน้า.

Fang, G., S., Hammar and R. Rebeea, 1992, A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. Biotechnique 13 : 52 – 56.