การวิจัยลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไหม

DNA Fingerprinting of Silkworm

นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ นางกอบกุล แสนนามวงศ์[1]

กลุ่มวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

Abstract

Genetic characteristics of 43 silkworm species were examined. These silkworm were obtained from former Ubonratchathanee Sericulture Experiment Station. The 3 techniques used for DNA examination were AFLP, ISSR and RAPD techniques. It was found that using ISSR technique to examine silkworm genetic diversity with the aid of 12 micro satellite primers which were (GA)12, (GT)12, (CT)12, (AG)12, (CGT)8, (TGA)8, (TGT)9, (GTG)8, (GAG)8, (GCT)8, (TGT)8 and (TCT)8 could not increase quantity of silkworm genomic DNA. This may due to the used primers had inadequate amount and dissimilar to the characteristics of micro satellite DNA in silkworm genome. There was a report stated that insect micro satellite DNA had CT repeated core base lined up order. Furthermore, AFLP technique was not suitable to examine silkworm genetic diversity due to its difficult steps of work and relatively expensive, and its also required large quantity of DNA . However , silkworm were small and each gave very small amount of DNA. Therefore, the old technique of RAPD was used to analyze silkworm fingerprint with 4 primers, namely OPX-12, OPU-10, OPN-05 and OPL-12.

DNA was extracted from silkworm blood. The obtained DNA was purer than that extracted from the insect gland, but the quantity obtained was somewhat small. PCR reaction was activated and DNA bands were analyzed by NTSYS program that used binary reading and scoring. The result revealed that the studied silkworm could be divied into four groups. The first groups comprised 4 species i.e., K1, UB2, UB22 and Y, the

รหัสทะเบียนวิจัย 45-35-401-004

[1] ศูนย์วิจัยหม่อนไหมอุดรธานี สถาบันวิจัยหม่อนไหม กรมวิชาการเกษตร

second group 19 species i.e., M2, M4, O4, UB18, UB6, UB17, UB13, UB3, UB5, UB24, UB7, UB10, UB11, A, NN, UB15, UB20, UBX and UB24Z, the third group 10 species i.e. , K8, S, KYP, (AxUB24=10), NB7, N2, EA5, 39S2, UB1 and NB18, and the fourth group 10 species i.e., K15, K21, UB9, UB8, M3, UB16, UB19, UB26, UB14 and UB24W. This related information of silkworm could be used to develop new silkworm hybrids. However, the parents should have adequate genetic distance.

The silkworm species used in this study were thoroughbred and were mostly used in Sericulture Research Institute silkworm improvement program.

บทคัดย่อ

ตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมของไหมจำนวน 43 สายพันธุ์โดยได้รับพันธุ์ไหมจากสถานีทดลอง หม่อนไหมอุบลราชธานี (เดิม) ใช้เทคนิคในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอ 3 เทคนิค ได้แก่ เทคนิค AFLP เทคนิค ISSR และเทคนิค RAPD จากการใช้เทคนิค ISSR ในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของไหม โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ 12 ชนิดได้แก่ (GA)12 , (GT)12, (CT)12, (AG)12, (CGT)8, (TGA)8, (TGT)9, (GTG)8, (GAG)8, (GCT)8, (TGT)8 และ (TCT)8 พบว่าไพรเมอร์ชุดดังกล่าวไม่สามารถเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอของจีโนมไหมได้อาจเนื่องจากจำนวนไพรเมอร์ที่ใช้ทดสอบมีไม่มากพอและไม่ตรงกับลักษณะของ microsatellite DNA ในจีโนมของไหมซึ่งมีรายงานว่า microsatellite DNA ของแมลงมีลำดับเบสแกนซ้ำแบบ CT ในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของไหมโดยใช้เทคนิค AFLP พบว่าเป็นเทคนิคที่ไม่เหมาะสมสำหรับไหมเนื่องจากมีขั้นตอนการปฏิบัติงานยุ่งยาก มีต้นทุนสูง และต้องการดีเอ็นเอปริมาณมากแต่หนอนไหมมีขนาดเล็ก สกัดดีเอ็นเอได้ปริมาณน้อยมากต่อตัวหนอน 1 ตัว จึงเลือกใช้เทคนิคเดิมคือ RAPD ในการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์ไหมดังกล่าวโดยใช้ไพรเมอร์4 ชนิดได้แก่ OPX-12, OPU-10, OPN05 และ OPL-12

สกัดดีเอ็นเอจากเลือดไหมซึ่งทำได้ง่ายและได้ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์กว่าการสกัดจากต่อมไหมแต่ได้ ดีเอ็นเอปริมาณน้อย ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์และตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟริซิสและวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม NTSYS ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่อ่านข้อมูลและให้ค่าคะแนนแบบไบนารี จากการวิเคราะห์สามารถจัดกลุ่มไหมออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยไหม 4 สายพันธุ์ คือ K1, UB2, UB22 , และ Y กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยไหม 19 สายพันธุ์

ได้แก่ M2, M4, O4, UB18, UB6, UB17, UB13, UB3, UB5, UB24, UB7, UB10, UB11, A, NN, UB15, UB20, UBX, และ UB24Z กลุ่มที่3 ประกอบด้วยไหม 10 สายพันธุ์ ได้แก่ K8, S, KYP, (AxUB24=10), NB7, N2, EA5, 39S2, UB1 และ NB18 กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยไหม 10 สายพันธุ์ ได้แก่ K15, K21, UB9, UB8, M3, UB16, UB19, UB26, UB14 และ UB24W ข้อมูลความสัมพันธ์ของพันธุ์ไหมนี้สามารถนำไปใช้พิจารณาในการสร้างพันธุ์ไหมลูกผสมใหม่ๆ ได้โดยคัดเลือกพันธุ์ที่มีความห่างของพันธุกรรมให้มากพอและพันธุ์ไหมที่นำมาวิเคราะห์พันธุกรรมเหล่านี้เป็นพันธุ์ไหมพันธุ์แท้ที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ของสถาบันวิจัยหม่อนไหมเป็นส่วนใหญ่

คำนำ

การพัฒนาระบบการเกษตรให้มีประสิทธิภาพและมีการพัฒนาอย่างยั่งยืน จะทำให้คุณภาพชีวิตของเกษตรกรดีขึ้น พันธุ์ไหมเป็นองค์ประกอบหนึ่งของการพัฒนาระบบการปลูกหม่อนเลี้ยงไหม จำเป็นอย่างยิ่งต้องทำให้เกิดความหลากหลายของพันธุ์ไหม การที่จะประยุกต์ใช้พันธุ์ไหมที่มีลักษณะประจำพันธุ์แตกต่างจากพันธุ์อื่น นอกจากพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้ว การพิจารณาจากชิ้นส่วนของโครโมโซม (Chromosome fragment) โดยการทำเอกลักษณ์ประจำพันธุ์ (DNA Fingerprint) จะมีความแน่นอนและแม่นยำยิ่งขึ้น ดังนั้นเพื่อเป็นการสนับสนุนพระราชบัญญัติคุ้มครองพันธุ์พืชที่จะเกิดขึ้นจึงเห็นสมควรที่จะทำเอกลักษณ์พันธุ์ไหมที่ผ่านการรับรองและแนะนำจากกรมวิชาการเกษตร เพื่อประโยชน์ในการบ่งชี้พันธุ์

การจำแนกสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตในระดับดีเอ็นเอในยุคแรกนิยมใช้วิธี RFLP ซึ่งเป็นการจำแนกความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดหลายประการคือ จะมีชิ้นส่วนที่ตัดได้เป็นจำนวนมากเมื่อนำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้า จะแยกแถบได้ไม่ชัดเจนและชิดกันมากจึงต้องมีการตรวจสอบอีกขั้นตอนโดยการใช้ probe (ตัวตรวจสอบ) ทำให้การใช้วิธีนี้มีความยุ่งยากและใช้เวลาในการตรวจสอบหลายขั้นตอน นอกจากนี้ DNA ที่จะใช้ในปฏิกิริยาจะต้องมีปริมาณมากพอ และต้องมีความสมบูรณ์ไม่มีบางส่วนที่เสียสภาพไป ทำให้วิธีการนี้ไม่เป็นที่นิยม ต่อมามีการทำเทคนิค PCR – based typing มาประยุกต์ ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์สิ่งมีชีวิตและพัฒนาเทคนิคต่างๆ เช่น RAPD-PCR, Microsattellite DNA typing, AFLP เป็นต้น

การประยุกต์ใช้เทคนิคเหล่านี้ในแมลงยังมีการศึกษาไม่มากนัก พบรายงานการใช้ genomic เพื่อจำแนกชนิดของแมลงหวี่ขาว (Perring และคณะ, 1993)

สำหรับเทคนิค RAPD พบรายงานโดย Saksoong และคณะ (1993) ใช้ในการจำแนกไหมพันธุ์ต่างๆ ที่เลี้ยงในประเทศไทย ; Promboon และคณะ (1995) ในการศึกษา genetic linkage map ; Nagaraga and Nagaraju (1995) ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในไหม 13 สายพันธุ์ ซึ่งมีการเลี้ยงอย่างแพร่หลายในอินเดีย, ญี่ปุ่น และจีน อาทิ HU204, KA, NB1, C. nichi และ Gungnong โดยใช้ arbitrary primers 40 ชนิดพบ RAPD-PCR products หลายชนิดที่สามารถใช้เป็น specific marker ต่อสายพันธุ์ที่มีการพักตัว และสายพันธุ์ที่ไม่มีการพักตัวได้ เช่น OPA-01_{700} (RAPD-PCR product ขนาด 700 bp เกิดจากการใช้ primer ชนิด OPA-01 ในการทำ RAPD) เป็น specific marker ต่อสายพันธุ์ที่มีการพักตัวขณะที่ OPB-10_{700} (RAPD-PCR product ขนาด 700 bp เกิดจากการใช้ primer ชนิด OPB-10 ในการทำ RAPD) เป็น specific marker ต่อสายพันธุ์ที่ไม่มีการพักตัว เป็นต้น นอกจากนั้นยังสามารถสร้าง dendrogram เพื่อบ่งบอก genetic distance ของไหมทั้ง 13 สายพันธุ์ด้วย (NB18, BN4D2, HU204, KA, NB1 และ NB7) และสายพันธุ์ที่ไม่มีการพักตัว (Moria, Surapat, Pure mysore, Diazo, C. nichi, Gungnong และ Nistari) และสายพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดกันอย่างมากที่สุดคือ NB18 กับ NB4D2, HU204 กับ KA และ Moria กับ Surapat เป็นต้น

สำหรับการใช้ Micro satellite marker ในแมลง Choudhary และคณะ (1993) ได้ศึกษาความแปรปรวนของ micro satellite DNA ในแมลงสังคม (social insect) ได้แก่แมลงในกลุ่ม Hymenoptera เป็นต้น micro satellite DNA Typing เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพ และเริ่มใช้กันกว้างขวางในปี 1993 โดย หา micro satellite loci สำหรับใช้เป็น genetic markers ของ social wasp (*Pacharterqus colobopterus*) (Thoren และคณะ,1995) ได้ใช้ oilqonucleotide repeat molifs หลาย ๆ ชนิดเพื่อคัดเลือกนำ clone ที่ผลเป็นบวกไป sequence แล้วคัดเลือกไว้สำหรับ การทำงานขยายส่วน tandem repeat ของ loci เหล่านี้ พบว่ามี 5 loci ที่มีความแปรปรวนสูงกว่า allozyme ที่ค่า heterozyqosity 0.35 สำหรับเทคนิค AFLP ในแมลงนั้น Reineke และคณะ (1998) ได้ศึกษาเทคนิคการเตรียม DNA ของแมลง สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค AFLP

อุปกรณ์และวิธีการ

พันธุ์ไหมที่ใช้ในการทดลอง

พันธุ์ไหมที่ใช้เก็บรวบรวมโดยสถานีทดลองหม่อนไหมอุบลราชธานี สังกัดสถาบันวิจัยหม่อนไหม กรมวิชาการเกษตร (เดิม) จำนวน 43 สายพันธุ์ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 พันธุ์ไหมต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง

ลำดับที่	สายพันธุ์ไหม	คัดมาจาก	แหล่งที่มา
1	39S2	N139	ญี่ปุ่น
2	A	H6 x R7	ศูนย์วิจัยหม่อนไหมนครราชสีมา
3	A x UB24	-	สถานีทดลองหม่อนไหมอุบลราชธานี
4	EA5	A5	บริษัทจุลไหมไทยจำกัด
5	K1	N124 x C124	ศูนย์วิจัยหม่อนไหมนครราชสีมา
6	K8	C134	ศูนย์วิจัยหม่อนไหมนครราชสีมา
7	K15	(K10 x K9) K1	ศูนย์วิจัยหม่อนไหมนครราชสีมา
8	K21	-	ศูนย์วิจัยหม่อนไหมนครราชสีมา
9	KYP	(Kinshu x Showa) x นค1 x EC32	ญี่ปุ่น
10	M2	-	-
11	M3	-	-
12	M4	-	-
13	N2	ไหมกล่อง	ไร่ปรือควาย
14	NB7	-	อินเดีย
15	NB18	(KoKKoxSeihako)x(N124xC124)	อินเดีย
16	NN	ไหมพื้นบ้าน	ศรีสะเกษ
17	O4	-	-

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ลำดับที่	สายพันธุ์ไหม	คัดมาจาก	แหล่งที่มา
18	S	N112 x C110	ญี่ปุ่น
19	UB1	Guang Nong no. 3	-
20	UB2	N17 x (Showa x Kinsho)	ญี่ปุ่น
21	UB3	C51	จีน
22	UB5	NB18 x UB1	-
23	UB6	NB7 x K8	-
24	UB7	K13 x นางลาย	-
25	UB8	Guang Nong no.5	-
26	UB9	UB1 x นางลาย	-
27	UB10	-	-
28	UB11	ลูกผสมจากสาธารณรัฐเกาหลี	-
29	UB13	UB3 x UB9	-
30	UB14	นางเหลือง x Guang Nong no. 34	-
31	UB15	-	-
32	UB16	Guang Nong no. 34	-
33	UB17	-	-
34	UB18	Guang Nong no.34 x 6 x UB14	-
35	UB19	-	-
36	UB20	ลูกผสมจากประเทศสาธารณรัฐไต้หวัน	-
37	UB22	KYP x UB18	-
38	UB24	-	-
39	UB24W	-	-
40	UB24Z	-	-
41	UB26	-	-
42	UBX	-	-
43	Y	(KinshuxShowa) x (นค.4 x EC32)	-

ที่มา : สุธาทิพย์และคณะ , 2537

ขั้นตอนและวิธีการดำเนินการ

1. การสกัดดีเอ็นเอจากหนอนไหมและการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ

1.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดไหม (heamolymph)

นำหนอนไหมที่ขึ้นวัย 5 วันที่ 2 ไปแช่เย็นที่ –80°ซ 10 นาที เพื่อให้หนอนไหมสลบ หรืออาจเก็บไว้ได้นานหลายเดือนก็ได้ นำหนอนไหมมาตัดขาเทียมซึ่งอยู่ที่ปล้องสุดท้ายของลำตัว จะมีหยดของเหลวสีเหลืองอ่อนไหลออกมา นำไปแตะที่กระดาษซับดีเอ็นเอเรียกว่ากระดาษ FTA® (Whatman®) จะเก็บดีเอ็นเอในกระดาษนี้นานนับ 10 ปี ที่อุณหภูมิห้อง และสามารถนำกระดาษนี้ไปเก็บตัวอย่างในพื้นที่เลี้ยงไหมแล้วส่งกระดาษที่มีเลือดไหมมาทางไปรษณีย์ก็จะสะดวกในการเก็บรวบรวมตัวอย่างมากขึ้น ก่อนเก็บให้เขียนรายละเอียดข้อมูลตัวอย่างหนอนไหมบนกระดาษส่วนที่ใช้บันทึกข้อมูลให้เรียบร้อยก่อนนำไปเก็บในกล่องพลาสติกปิดฝาให้มิดชิดหรือเก็บในขวดดูแรนฆ่าเชื้อปิดฝาให้สนิททิ้งไว้ในอุณหภูมิปกติโดยไม่ต้องแช่เย็น ดีเอ็นเอที่ได้จะบริสุทธิ์และแยกเก็บตัวอย่างพันธุ์ละ 1 ตัว จำนวน 10 ซ้ำ และสามารถนำไปใช้ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ต่อไปตามวิธีการและใช้สารเคมีที่บริษัทแนะนำ โดยตัดกระดาษส่วนที่อยู่ด้านในวงกลมโดยใช้กรรไกรหรือคัตเตอร์ที่สะอาดและฆ่าเชื้อ ตัดมาขนาด 1.2 มิลลิเมตร ใส่ลงในหลอดพีซีอาร์แล้วเติม FTA purification reagent 200 µl ลงในหลอดพีซีอาร์ บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที พร้อมกับการวางบนเครื่องเขย่าจนครบเวลา จากนั้นใช้ไปเปตดูดสารละลายทิ้ง ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง รวมเป็น 3 ครั้ง แล้วล้างด้วย TE buffer pH8 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายทิ้งด้วยไปเปต ทำการล้าง 2 ครั้ง แล้วทำให้กระดาษแห้งที่อุณหภูมิห้องหรือที่ 56 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที นำกระดาษนี้ไปตรวจวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบต่อไป

1.2 การสกัดดีเอ็นเอจากต่อมไหม (silkgland)

การสกัดดีเอ็นเอจาก silk gland (ตามวิธีของ Her mann และ Frischauf, 1981) นอกจากได้ดีเอ็นเอจากเลือด (heamolymph) แล้วนำซากตัวหนอนมาตัดเลาะเอาผิวหนังออกใช้ forcep ปลายแหลม เล็กๆ ค่อยๆ ดึงเอา silk glands จากส่วนหัวบริเวณด้านข้างของลำตัวแล้วตัดเอาเฉพาะส่วนที่เป็นสาย เล็กๆ ที่ติดอยู่กับส่วนหัว ล้างด้วย 0.7 N NaCl นำมาเติมไนโตรเจนเหลว แล้วนำไปแช่ใน ตู้ควบคุมอุณหภูมิ –80°ซ ให้แข็งตัว แล้วจึงนำมาบดด้วยโกร่งจนละเอียด ตักผง silk gland ใส่ลงใน micro tube แล้วเติม homogenization buffer 1 มิลลิลิตร (0.1 M Tris-HCL pH 9.1, 0.1 M NaCl, 0.2 M sucrose, 0.05 M EDTA และ 0.5% SDS) ผสมให้เข้ากันดีด้วยวอร์เท็กซ์ นำไปบ่มที่ 65°ซ นาน 30 นาที เพื่อย่อยเซลล์ ตกตะกอนด้วย SDS แล้วกำจัดกากของเซลล์โดยการ

เติม 8 M potassium acetate ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทันทีนำไปวางบนน้ำแข็งนาน 30-60 นาที แล้งตกตะกอนด้วยการเซนตริฟิวจ์ ที่ 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°ซ นาน 5 นาที ดูดเอาเฉพาะส่วนน้ำใสข้างบนใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ กำจัดโปรตีนโดยการเติม phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ในแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากันด้วยวอร์เท็กซ์ นำไปเซนตริฟิวจ์ ที่ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°ซ นาน 10 นาที เพื่อแยกสารละลายดีเอ็นเอออกจากกากของเซลและโปรตีน ดูดของเหลวส่วนบนลงในหลอดใหม่แล้วกำจัดฟีนอลด้วยการเติม chloroform:isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ในแต่ละหลอด ผสมให้เข้ากันดีนำไปเซนตริฟิวจ์ ที่ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°ซ นาน 10 นาที ดูดของเหลวส่วนบนอย่างระมัดระวังลงในหลอดใหม่แล้วตกตะกอนดีเอ็นเอโดยการเติม absolute ethanol 2.5 เท่า ผสมเบาๆ โดยการกลับหลอด นำไปเซนตริฟิวจ์ ที่ 14,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°ซ นาน 10 นาที ใช้พาสเจอร์ไปเปตดูดเอาแอลกอฮอล์ออกให้หมด เติมเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อล้างเกลือหรือ phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) ที่อาจตกค้างอยู่ในหลอดซึ่งจะไปรบกวนการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ ในภายหลังได้ ทำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งด้วยการบ่มที่ 37°ซ นาน 30 นาที ละลายดีเอ็นเอที่ได้ด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCL pH 8.0, 0.1 mM EDTA) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บดีเอ็นเอที่ -20°ซ ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ ด้วยวิธี อิเล็กโทรโฟรีซีสในเจลอะกาโรส (agarose gel) 0.8 เปอร์เซนต์ (Sam brook และคณะ, 1989)

2. การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

2.1 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ISSR (Inter Simple Sequence Repeat)

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ใช้ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ 12 ชนิดได้แก่ (GA)12 , (GT)12, (CT)12, (AG)12, (CGT)8, (TGA)8, (TGT)9, (GTG)8, (GAG)8, (GCT)8, (TGT)8 และ (TCT)8

การทำพีซีอาร์

เตรียมสารผสมสำหรับการทำปฏิกิริยา ISSR-PCR เมื่อใช้ PCR Master Mix Kit (Qaigen) ให้มีปริมาตรสุดท้ายต่อ 1 ตัวอย่าง เป็น 20 ไมโครลิตร โดยเติม Template DNA ความเข้มข้น 10 - 50 ng/ul ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์สำหรับ ISSR ความเข้มข้น 4 uM ปริมาตร 2 ไมโครลิตร น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 6.0 ไมโครลิตร แล้วเติม PCRMaster Mix ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่เป็นอันดับสุดท้าย

ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 35 รอบ โดยมีรายละเอียดของอุณหภูมิดังนี้

95° ซ	4 นาที
94° ซ	1 นาที
45° ซ	1 นาที
72° ซ	2 นาที
72° ซ	10 นาที
4° ซ	α

การตรวจสอบผลด้วยเทคนิคอิเลคโตรโฟริซิส

1. เตรียมเจลความเข้มข้น 2.5% (metaphore 3 ส่วน : agarose 1 ส่วน) ใน 1X TBE buffer (ปริมาตรที่ใช้ขึ้นอยู่กับขนาดของเครื่องอิเลคโตรโฟริซิส) หลังจากนั้นนำไปหลอมในเตาไมโครเวฟเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน

2. เมื่อเจลมีอุณหภูมิลดลงเป็น 50° ซ แล้วจึงเทลงถาด โดยให้มีความหนาประมาณ 0.5 เซนติเมตร เสียบหวีลงในถาดแล้วปล่อยให้เจลแข็งตัว

3. เมื่อเจลแข็งตัวดึงหวีออกนำไปวางใน chamber ของเครื่องอิเลคโตรโฟริซิสที่มีบัฟเฟอร์ TBE ความเข้มข้น 1 เท่า โดยให้ระดับของบัฟเฟอร์อยู่สูงกว่าเจลเล็กน้อย

4. เติม 6X loading buffer 3 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่มีผลผลิตของ ISSR PCR ทำให้สารละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกันโดยการใช้ปิเปตดูดขึ้นลง

5. ดูดสารละลายจากข้อ 4 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยอดลงในช่องเจลที่เกิดจากหวี ใช้ DNA marker ชนิด 100 bp ขนาด 100 ng เป็นดีเอ็นเอเปรียบเทียบ

6. ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเลคโตรโฟริซิส โดยใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เมื่อดีเอ็นเอเคลื่อนไปในแผ่นเจลอยู่ในความยาวที่ต้องการซึ่งสังเกตได้จากสีใน loading buffer แล้วจึงปิดเครื่อง

7. แช่แผ่นเจลในสารละลาย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 10 - 20 นาที (10 µl 10 mg/ml EtBr ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 1 ลิตร)

8. ล้างเอทิเดียมโบรไมด์ส่วนเกินออกจากแผ่นเจลด้วยน้ำประปานาน 5 - 10 นาที

9. นำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation บันทึกภาพเจล

2.2 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดีไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

ใช้ไพรเมอร์4 ชนิดได้แก่ OPX-12, OPU-10, OPN05 และ OPL-12

การทำพีซีอาร์

ใช้เทคนิคอาร์เอพีดี เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอหนอนไหม 40 ng ด้วย PCR Master Mix kit (Qaigen) ใช้ไพรเมอร์ 4 ชนิดได้แก่ OPN–05 OPU–10 OPX–12 และ OPL–12 ความเข้มข้น 5 pmole/μl นำตัวอย่างเข้าเครื่อง DNA thermal cycler ตั้งโปรแกรมสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ 1 รอบ (94°ซ 5 นาที) 45 รอบ (94°ซ 1 นาที 37°ซ 1 นาที และ 72°ซ 2 นาที) และ 1 รอบ (72°ซ 10 นาที)

ตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้โดยแยกด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซนต์ ใน 0.5X Tris-borate buffer (TBE) ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ย้อมสีเจลด้วย ethidium bromide และตรวจแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel documentation วิเคราะห์ข้อมูลแถบดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม NTSys

ผลการทดลองและวิจารณ์

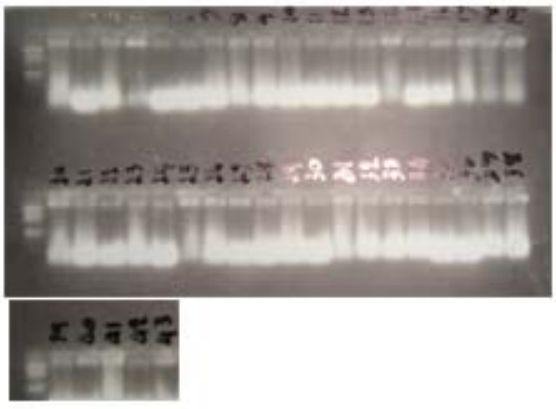
1. การสกัดดีเอ็นเอจากหนอนไหมและการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ

1.1 การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดไหม

การสกัดดีเอ็นเอด้วยเลือดไหมโดยใช้กระดาษ FTA จะได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีแต่ไม่สามารถตรวจสอบด้วยการทำอิเลคโตรโฟรีซิส หรือการวัดค่าโอดีได้ เมื่อนำดีเอ็นเอที่ได้ไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ให้ผลดีเนื่องจากดีเอ็นเอไม่ฉีกขาดเพราะถูกตรึงอยู่กับ membrane จึงเลือกใช้ดีเอ็นเอจากวิธีการนี้

1.2 การสกัดดีเอ็นเอจากต่อมไหม (silk gland)

การสกัดดีเอ็นเอจากต่อมไหม เมื่อวัดค่าโอดี มีการปนเปื้อนของ RNA สูงมาก และเมื่อนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเลคโตรโฟริซิสพบว่ามีการปนเปื้อนของ RNA มากดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ภาพดีเอ็นเอของหนอนไหมที่สกัดจากต่อมไหม (silk gland)

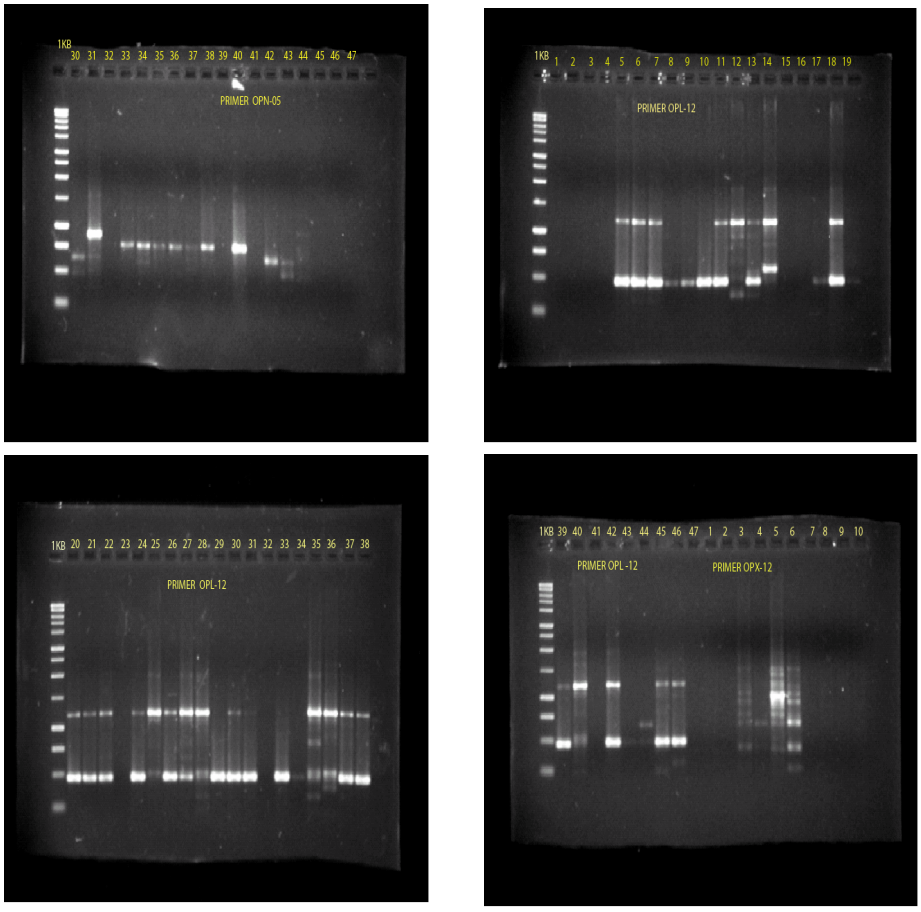
2. การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไหม

2.1 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค ISSR (Inter Simple Sequence Repeat)

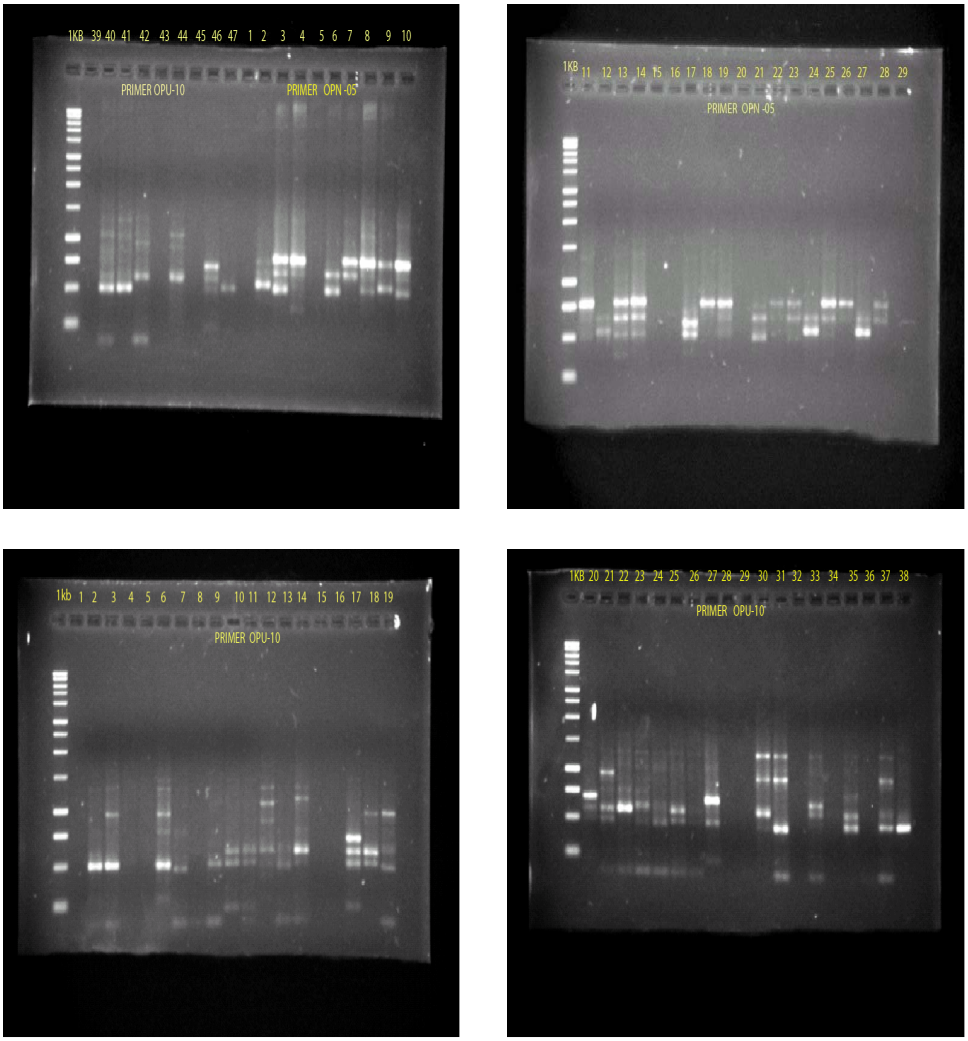
จากการใช้เทคนิค ISSR ในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของไหม โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ 12 ชนิด ได้แก่ (GA)12, (GT)12, (CT)12, (AG)12, (CGT)8, (TGA)8, (TGT)9, (GTG)8, (GAG)8, (GCT)8, (TGT)8 และ (TCT)8 พบว่าไพรเมอร์ชุดดังกล่าวไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของจีโนมไหมได้อาจเนื่องจากจำนวนไพรเมอร์ที่ใช้ทดสอบมีไม่มากพอ และไม่ตรงกับลักษณะของ microsatellite DNA ในจีโนมของไหมซึ่งมีรายงานว่า microsatellite DNA ของแมลงมีลำดับเบสแกนซ้ำแบบ CT

2.2 การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี

เมื่อใช้ไพรเมอร์ 4 ชนิดได้แก่ OPN–05 OPU–10 OPX–12 และ OPL–12 ความเข้มข้น 5 pmole/µl เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไหมด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี พบว่า ไพรเมอร์ทั้งหมดสามารถเพิ่มปริมาณได้ ดังภาพที่ 2

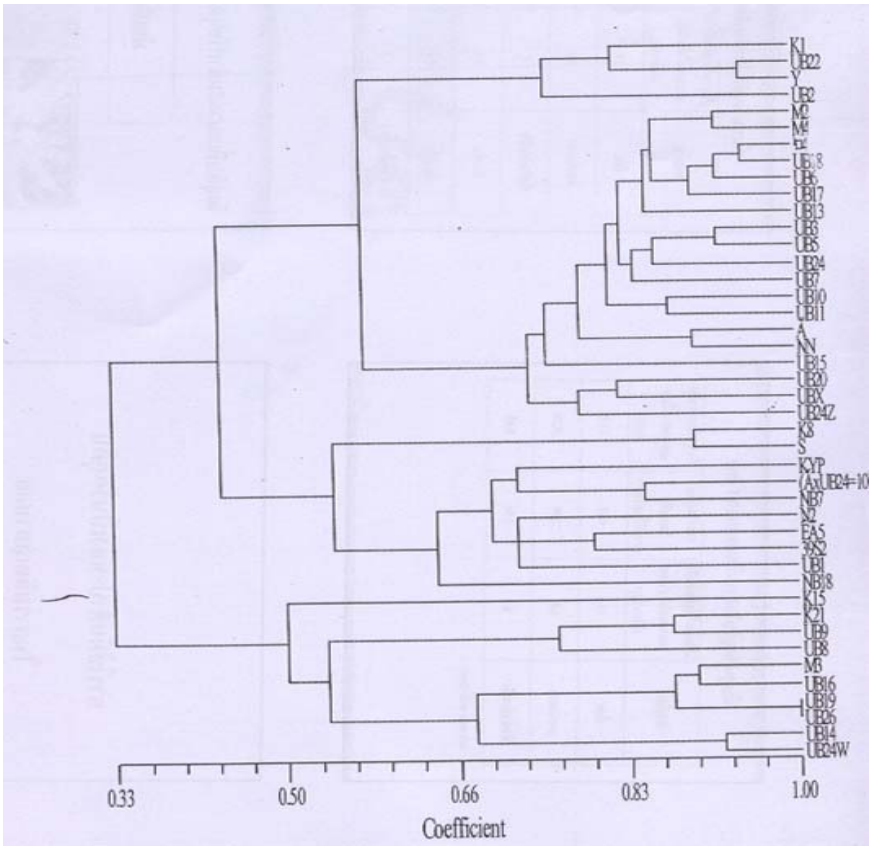


ภาพที่ 2 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้หนอนไหม 43 สายพันธุ์ และไพรเมอร์ 4 ชนิด ได้แก่ OPL-12, OPX-12, OPU-10 และ OPN05 บนอากะโรสเจล 1.5%



ภาพที่ 2 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้หนอนไหม 43 สายพันธุ์ และไพรเมอร์ 4 ชนิด ได้แก่ OPL-12, OPX-12, OPU-10 และ OPN05 บนอากะโรสเจล 1.5% (ต่อ)

และเมื่อนำไปตรวจวิเคราะห์โดยใช้ โปรแกรม NTSys จะได้ความสัมพันธ์ของพันธุ์ไหมทั้งในรูปของเดนโดรแกรม ดังภาพ ที่ 3



ภาพที่ 3 แสดงเดนโดรแกรมของพันธุ์ไหม 43 สายพันธุ์ได้แก่ K1, UB2, UB22, Y, M2, M4, O4, B18, UB6, UB17, UB13, UB3, UB5, UB24, UB7, UB10, UB11, A, NN, UB15, UB20, UBX, UB24Z, K8, S, KYP, (AxUB24=10), NB7, N2, EA5, 39S2, UB1 ,NB18, K15, K21, UB9, UB8, M3, UB16, UB19, UB26, UB14 และ UB24W โดยใช้โปรแกรม NTSys

และสามารถจัดกลุ่มพันธุ์ไหมที่นำมาทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1ประกอบด้วยไหม 4 สายพันธุ์ คือ K1, UB2, UB22 , และ Y กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยไหม 19 สายพันธุ์ ได้แก่ M2, M4, O4, UB18, UB6, UB17, UB13, UB3, UB5, UB24, UB7, UB10, UB11, A, NN, UB15, UB20, UBX, และ UB24Z กลุ่มที่3 ประกอบด้วยไหม 10 สายพันธุ์ ได้แก่ K8, S, KYP, (AxUB24=10), NB7, N2, EA5, 39S2, UB1 และ NB18 กลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยไหม 10 สายพันธุ์ได้แก่ K15, K21, UB9, UB8, M3, UB16, UB19, UB26, UB14 และ UB24W

การใช้ไพรเมอร์เพียง 4 ชนิดที่ผ่านการคัดเลือกมาแล้วเพื่อจำแนกความแตกต่างของไหม 43 สายพันธุ์ พบว่า สามารถแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ไหมทั้งหมดได้ วิธีการนี้จึงเป็นวิธีการที่ได้ผลดีในการจำแนกพันธุ์ไหมในด้านชีวโมเลกุล

เอกสารอ้างอิง

สุธาทิพย์ ห้องทองแดง ส่งรักษ์ เต็งรัตนประเสริฐ นภดล พันธุ์คำเกิด ปาน ปั้นเหน่งเพชร สาน วิไล ชาญณรงค์ พูลศิลป์ และทรงสิทธิ์ สิงหวิสัย. 2537. การอนุรักษ์เชื้อพันธุกรรมไหมต่างประเทศชนิดที่ฟักปีละ 2 ครั้ง. ใน รายงานผลงานวิชาการหม่อนไหมปี 2537, สถาบันวิจัยหม่อนไหม กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 327 - 337.

Barcaccia, G., Albertini,E., and Falcinelli, M. 1999. AFLP fingerprinting in *Pelargonium peltatum* : its development and potential in cultivar identification. Journal of Horticulture Science and Biotechnology, v.74 (2) p. 243-250.

Barrett, B.A., and Kidwell, K.K. 1998. AFLP-based genetic diversity assessment among wheat cultivars from the Pacific Northwest. Crop-science , v.38(5) p. 1261 – 271.

Choudhary, M., Strassmann, J.E., Solis, C.R., and Queller, D.C. 1993. Microsattelite variation in a social insect. Biochemical genetics . v31(1/2) p. 87-96.

Folkertsa, -R.T., Rouppe-van-der-Voort, -J.N.A.M., Groot,K.E. de, Zandvoort, P.M. van, Schots, A., Gommers, F.J., Helder, J,, and Bakker, J. 1996. Gene pool similarities of potato cyst nematode populations assessed by AFLP analysis. Molecular plant microbe interactions . v. 9(1) p. 47-54.

Lange, D.A., Penuela, S., Denny, R.L., Mudge, J., Concibido, V.C., Orf, J.H., Young N.D. 1998. A plant DNA isolation protocol suitable for polymerase chain reaction based marker-assisted breeding. Crop Science, v. 38(1) p. 217-220.

Lin, J.J., Kuo, J., Ma, J., Saunders, J.A., Beard, H.S., MacDonal, M.H., Kenworthy, W., Ude, G.N., Matthews, B.F. 1996. Identification of molecular markers in soybean comparing RFLP, RAPD and AFLP DNA mapping techniques. Plant molecular biology reporter. V14(2) p. 156-169.

Nagaraja. F.M. and J. Nagaraju. 1995. Genome fingerprinting of the silkworm, *Bombyx mori* using random arbitray primers. Electrophoresis. 19. 1633- 1638.

Nei.M. 1972. Genetic distance between populations. AM. Natue. 106 : 283-292.

Nei. M. and W.H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76(10): 5296-5273.

Perring. T.M., A.D. Cooper, R.J. Rodriguea, C.A. Farrar and T.S. Bellows (Jr). 993. Identification of a whitefly species by genomic and behavioral studies. Science. 259 (5091) : 74 - 77.

Promboon.A. , t. shimada, H. fujuwara and M. Jobayashi. 1995. Linkage map of random amplified polymorphic DNA(RAPD) in the silkworm, *Bombyx mori*. Genetical research. 66 (1) : 1 - 7.

Reineke,-A, Karlovsky, -P, and Zebitz, -C.P.W. 1998. Preparation of DNA from insects or AFLP analysis. Insect molecular biology . : V. 7(1) p. 95 - 99.

Rohde, W. 1996. Inverse sequence-tagged repeat (ISTR) analysis. A novel and universal PCR (polymerase chain reaction) -based technique for genome analysis in plant and animal kingdom. Journal 0f Genetics & Breeding. v. 50(3) p. 249-261.

Rongwen, J., Akkaya, M.S., Bhagwat, A.A. Lavi, U., Cregan, P.B. 1995. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype idintification. Theoretical and Applied Genetics. 90 (1) : 43 - 48.

Rohde, W. 1996. Inverse sequence-tagged repeat (ISTR) analusis. A novel and universal PCR (polymerase chain reaction) -based technique for genome analysis in plant and animal kingdom. Journal 0f Genetics & Breeding. v. 50(3) p. 249-261.

Saksoong ,P., Sornchatrarak, N., and Peyachokakul, S. 1993. RAPD Technique in silkworm (*Bombyx mori*) : Strain Differentiation and Identification. ใน รายงานผลงานวิชาการหม่อนไหม ปี 2537. สถาบันวิชาหม่อนไหม กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. หน้า 353 - 362.

Song WeiNing, and Henry, R.J. 1995. Molecular analysis of the DNA polymorphism of wild barley (Hordeum spontaneum) germplasm using the polymerase chain reaction. Genetic Resources and Crop Evolution. 42 (3): 273-280.

SuZuki, Y., L.P. Gage and D.D. Brown. 1972. The gene for sili fibroun un *Bombyx mori*. J. Mol. Biol. 70(3) : 637-649.

Thomas, M.R. Scott, N.S. 1993. Micrisatekkute reoeatsub grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). Theoretical-and – Applied-Genetics (Germany). V. 86(8) p. 985-990.

Thoren, P.A. Paxton , R.J., and Estoup, A. 1995. Unusually high frequency of (CT)n and (GT)n microsatellite loci in a yellowjacket wasp, Vespula rufa (L.) (Hymenoptera : Vespidae). Insect- Molecular-Biology. v. 4(3) p. 141-148.

Wu, W., Welsh, M.J., Kuafman, P.B., and Zhang, H.H. 1997. Methods in Gene Biotechnology. CRC Press, Boca Roton New York. 406 p.

Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)- anchored polymerase chain reaction amplification. Genome (San Diego). 20(2): 176-183.