การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์และการทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลชนิดไมโครแซทเทลไลท์ในกล้วยไม้สกุลแวนดา

Development and test of Microsattellite marker in Vanda Orchid (*Vanda* spp.)

บุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ [1] , สุปัน ไม้ดัดจันทร์ [2] , ธำมรงค์ ศิริยามัน[1], อนุชา สุขสังวาลย์[1], อภิญญา สลีวงศ์[1], ศิริวรรณ รุ่งอินทร์[1], หทัยรัตน์ อุไรรงค์[1]

Boonruanrat Ruangwised[1], Supan Maidudjun[2], Thammarong Siriyaman[1], Anucha Suksangwal[1], Apinya Sliwong[1], Siriwan Rung-in[1], Hathairat Urairong[1]

บทคัดย่อ

ไมโครแซทเทลไลท์ หรือ SSRs marker เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างและเป็น co-dominant marker ที่ใช้ศึกษาความแตกต่างของพันธุกรรมในประชากรของสิ่งมีชีวิตต่างๆ แต่การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้มีต้นทุนสูงและเสียเวลามาก แวนด้าเป็นกล้วยไม้ที่เป็นสกุลเล็กมีเพียงประมาณ 50 ชนิดเท่านั้น แต่เป็นกล้วยไม้ที่มีความสำคัญมากชนิดหนึ่งในกลุ่มไม้ตัดดอก มีราคาสูง บางชนิดมีกลิ่นหอม และมีความทนทานในการใช้มาก มีสีสันสวยงามหลากหลาย ซึ่งในประเทศไทยเป็นกล้วยไม้สกุลที่มีความสำคัญในการตัดดอกเพื่อส่งออก ในการวิจัยได้ใช้เทคนิคแมกเนติก บีด ไฮบริดไดเซชั่น (magnetic bead hybridization) เพื่อสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอชนิดที่มีแกนซ้ำปริมาณมาก สามารถพัฒนาและออกแบบไพรเมอร์ จำนวน 101 คู่ ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอ จำนวน 1-5 อัลลีล และเมื่อทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากกล้วยไม้แวนด้าพันธุ์พื้นเมือง 5 ชนิดสามารถคัดเลือกได้จำนวน 64 คู่ ไพรเมอร์ และแสดงความแตกต่างได้ ผลการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้สามารถนำไปแยก หาความหลากหลาย ของพันธุกรรมกล้วยไม้นี้ แต่ละสายพันธุ์ โดยใช้ข้อมูลแมททริกซ์ ของไพรเมอร์จำนวน 10-15 คู่ และไพรเมอร์ที่ได้นี้สามารถนำไปจำแนกความแตกต่าง ในกล้วยไม้สกุลใกล้เคียงกับสกุลแวนด้าได้

คำสำคัญ ไมโครแซทเทลไลท์ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ แมกเนติก บีด กล้วยไม้สกุลแวนด้า เครื่องหมาย SSRs

---

1/สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร 85 หมู่ 1 ตำบลรังสิต อำเภอธัญบุรี ปทุมธานี 12110

1/Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, 85 Moo 1 Tumbon Rungsit Amphur Thanyaburi, Pathum Thani, 12110, Thailand

2/ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร ๗๒ หมู่ ๑ บนถนนเด่นห้า-ดงมะดะ ต.รอบเวียง อ.เมือง จ.เชียงราย

2/Horticulture Research Center, Horticulture Research Institute, Department of Agriculture, 72 Moo 1 Denha - dongmada road, Tumbon Robvieng Amphur Moung, Chieng Rai.

บทนำ

แวนด้าเป็นกล้วยไม้ประเภทโมโนโพเดี้ยล ไม่แตกกอ เจริญเติบโตไปทางยอด รากเป็นรากอากาศ ใบมีลักษณะกลม แบนหรือร่อง ใบซ้อนสลับกัน ช่อดอกจะออกด้านข้างของลำต้นสลับกับใบ ช่อดอกยาวและแข็ง กลีบนอกและกลีบในมีรูปร่างคล้ายคลึงกัน โคนกลีบแคบ และไปรวมกันที่โคนเส้าเกสร กลีบดอกในล่างด้านใต้มีเดือยแหลมยื่นออกมาเป็นส่วนท้ายของปากกระเป๋า ปากกระเป๋าของแวนด้าเป็นแบบธรรมดาแบนเป็นแผ่นหนาแข็ง และพุ่งออกด้านหน้า รูปลักษณะคล้ายช้อน หูกระเป๋าทั้งสองข้างแข็งและตั้งขึ้น สีดอกมีมากมายแตกต่างกันตามแต่ละชนิด กล้วยไม้สกุลแวนด้าพบในป่าตามธรรมชาติประมาณ 40 ชนิด มีกระจายพันธุ์อยู่ในทวีปเอเชีย ตั้งแต่อินเดีย ศรีลังกา พม่า ไทย อินโดนีเซีย จนถึงฟิลิปปินส์ แวนด้าได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์ขึ้นอีกหลายพันธุ์ ปัจจุบันได้มีการจำแนกประเภทของแวนด้า โดยอาศัยรูปร่างลักษณะของใบออกเป็น 4 ประเภท คือ แวนด้าใบกลม มีลักษณะของใบกลมยาวทรงกระบอก ต้นสูง ข้อห่าง สังเกตได้ที่ใบติดอยู่ห่างๆ กัน มีดอกช่อละหลายดอก แต่ดอกจะบานติดต้นอยู่คราวละ 2–3 ดอกเท่านั้น เมื่อดอกข้างบนบานเพิ่มขึ้น ดอกข้างล่างจะโรยไล่กันขึ้นไปเรื่อยๆ การปลูกใช้ดอกจึงนิยมปลิดดอกมากกว่าตัดดอกทั้งช่อ แวนด้าใบแบน ลักษณะใบแผ่แบนออก ถ้าตัดมาดูหน้าตัดจะเป็นรูปตัววี มีข้อถี่ปล้องสั้น ใบซ้อนชิดกัน ปลายใบโค้งลงและจักเป็นแฉก แวนด้าใบร่อง มีรูปทรงของใบและลำต้นคล้ายใบแบนมากกว่าใบกลม แวนด้าประเภทนี้ไม่พบในป่าธรรมชาติ การนำมาปลูกเลี้ยงเป็นพันธุ์ลูกผสมทั้งสิ้น โดยนำแวนด้าใบกลมมาผสมกับแวนด้าใบแบน แวนด้าก้างปลา มีรูปทรงของใบและลำต้น กึ่งใบกลมกับใบแบน พบตามป่าธรรมชาติน้อยมาก เพราะกล้วยไม้พันธุ์นี้เป็นหมันทั้งสิ้น กล้วยไม้สกุลแวนดานี้ในประเทศไทยเป็นไม้ตัดดอกเพื่อการส่งออกที่สำคัญรองลงมาจากกล้วยไม้สกุลหวายและได้ปรับปรุงสร้างสายพันธุ์ลูกผสมขึ้นมาหลายสายพันธุ์ มีเกษตรกรหลายรายได้เตรียมขอยื่นจดทะเบียนพันธุ์เพื่อผลิตเป็นกล้วยไม้ตัดดอก ในการจำแนกพันธุ์ยังไม่มีเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อสายพันธุ์ ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่นิยมใช้กันมากได้แก่ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ (simple sequence repeat (SSRs)) เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ความผันแปรสูงมากจึงนิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในการจำแนกพันธุ์พืชในระดับสายพันธุ์ในชนิดเดียวกันได้ดี (Martin และคณะ, 2004) เนื่องจาก microsatellite markers จะไม่ถ่ายทอดในระหว่างพืชชนิดเดียวกัน แต่การนำมาใช้งานจะต้องพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้ในพืชแต่ละชนิดและมักจะใช้ร่วมกันได้ยาก ดังนั้นจึงต้องพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอนี้ใหม่ตลอดเวลา แม้ว่าบางครั้งจะพบการถ่ายทอด SSRs ระหว่างพืชชนิดที่ใกล้เคียงกันบ้าง ในการพัฒนาขึ้นมาจะต้องสร้างห้องสมุดของไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite-enriched libraries) ซึ่งปัจจุบันมีหลายเทคนิค จากการทดลองของ Martin และคณะ (2004) ได้ใช้เทคนิค magnetic capture พบว่า ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของไมโครแซทเทลไลท์มากถึง 95.8 % และมีชิ้นส่วนที่มีขนาดยาวอยู่ 30.8 % จึงเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงมากจึงใช้วิธีดังกล่าวในการทดลองครั้งนี้

วิธีการศึกษา

ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลแวนดาและการสกัดดีเอ็นเอ

ในการจำแนกชิ้นส่วนที่เป็นไมโครแซทเทลไลท์ ได้สกัดแยกกรดนิวคลีอิกจากกล้วยไม้สกุลแวนดาที่ได้คัดเลือกไว้ 20 สายพันธุ์ จากสวนกล้วยไม้เกษตรกรในจังหวัดราชบุรีและจังหวัดเชียงใหม่ นำใบอ่อนมาบดในไนโตรเจนเหลวจน

ละเอียดเป็นผง แล้วนำไปสกัดดีเอ็นเอด้วย CTAB ตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยแยกด้วย 1% agrose gel electrophoresis แล้วย้อมเจลด้วยสารละลาย Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transluminators พร้อมบันทึกภาพ และทำการวัดปริมาณดีเอ็นเอ จากนั้นเจือจางดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C สำหรับนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่อไป

การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอต้นแบบ

ตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเลคโตรโฟริซิส โดยการนำดีเอ็นเอปริมาณรวม 2000 นาโนกรัม มาตัดด้วยเอนไซม์ *Mbo* I (Fast Digest Enzyme) โดยใช้ 10X Fast digest buffer 5 ไมโครลิตร เอนไซม์ 5 ไมโครลิตร และน้ำ (PCR grade water) 35 ไมโครลิตร รวมปริมาตรทั้งหมด 50 ไมโครลิตร นำมาบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม PCR (Thermal Cycle 9700) เก็บตัวอย่างไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำดีเอ็นเอมาเชื่อมต่อกับอะแดบเตอร์ โดยเตรียม Adaptor ชนิดปลายเหนียว โดยการสังเคราะห์ oligo primer 2 สาย ที่มีปลายเป็นรอยตัดของเอนไซม์ *Mbo* I ซึ่งจะใช้ต่อกับดีเอ็นเอของกล้วยไม้ที่ตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกันแล้ว มีลำดับเบสดังนี้ Sticky end adaptor (*Sau*3A1*(Mbo* I)-specific).Oligo A 5'GGC CAG AGA CCC CAA GCT TCG3' [21-mer] Oligo B 5'PO4 - GAT CCG AAG CTT GGG GTC TCT GGC C3' [25-mer] โดยการผสมอัตราส่วน Oligo A (ความเข้มข้น 200 พิโคโมล/ไมโครลิตร) จำนวน 20 ไมโครลิตร Oligo B (ความเข้มข้น 200 พิโคโมล/ไมโครลิตร) จำนวน 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันดีโดยการดูดปล่อยด้วยไปเปตนำไปตกตะกอนแล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาทีในเครื่องพีซีอาร์ แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่น 40 ไมโครลิตรแล้วเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จะได้ดีเอ็นเอสายคู่ชนิดปลายเหนียวดังนี้ Adaptor GGC CAG AGA CCC CAA GCT TCG

CCG GTC TCT GGG GTT CGA AGC CTA G - PO4

ทำการเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ Adaptor โดยนำดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมาทั้งหมด 90 ไมโครลิตร แล้วผสมสารละลายต่าง ๆ ดังนี้ 2x T4 DNA ligase buffer 50 ul น้ำ (PCR grade water : BDH) 6 ul Adaptor 1 ul (25 uM) T4 DNA ligase (Promega) 1.5 ul (100u) ปริมาตรรวม 100 ul ผสมให้เข้ากันโดยดูดสารละลายขึ้นลงด้วยไปเปต นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน หรือที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที ตรวจสอบผลการตัดต่อเอนไซม์ด้วยการทำ เจลอิเลคโตรโฟริซิสด้วยอะกะโรส 2 % นำดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ Oligo A และ Oligo B ให้มีปริมาณมากขึ้นสำหรับทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป จากนั้นทำการคัดขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่คัดเลือกโดยนำดีเอ็นเอทั้งหมดที่เชื่อมต่อ Adapter และเพิ่มปริมาณด้วยการทำพีซีอาร์มา ทำเจลอิเลคโตรโฟริซิสโดยใช้ อะกะโรสชนิด low melting point 1 % แล้วตัดเจลบริเวณดีเอ็นเอที่มีขนาด 400-1000 คู่เบส ทำการแยกดีเอ็นเอจากเจลด้วยการใช้ QIAquick gel extraction kit (QIAGEN) ตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยการทำเจลอิเลคโตรโฟริซิสอีกครั้งเพื่อดูว่ามีดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการหรือไม่ ซึ่งดีเอ็นเอนี้จะใช้เป็นต้นแบบสำหรับการทำพีซีอาร์ต่อไป นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาด 400-1000 คู่เบสให้เพิ่มมากขึ้นด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ด้วย Hot star taq PCR Master Mix Kit (QIAgen) โดยใช้ DNA-adaptor เป็นไพรเมอร์ ตรวจสอบด้วยอะกะโรสเจล 1.5 % ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการโพรบต่อไป

การคัดเลือกชิ้นส่วนไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ ด้วย streptavidine-coated magnetic beads

เตรียมโพรบด้วยการสังเคราะห์ดีเอ็นเอชนิดเบสแกนซ้ำ di-nucleotide ได้แก่ Biotin-(GA)12, Biotin-(GT)12, Biotin-(CT)12, Biotin-(AG)12, tri- nucleotide ได้แก่ Biotin-(TGT)9, Biotin-(GTG)8, Biotin-(GAG)8, Biotin-(GCT)8, Biotin-(TCT)10, Biotin-(CGT)8, Biotin-(AGT)10, Biotin-(TGA)10 และ tetra-nucleotide repeat tandem ได้แก่ Biotin-(TGTT)8 , Biotin-(GTAT)8 ซึ่งติดฉลากไบโอตินเพื่อทำเป็นโพรบตรวจจับดีเอ็นเอที่เราตัดและคัดเลือกขนาดไว้ นำมา เชื่อมต่อกับ streptavidine-coated magnetic beads (M2-80 Dynabeads : Streptavidin-coated magnetic beads , Invitrogen) จะได้โพรบที่มีปลายข้างหนึ่งเป็นแม่เหล็ก นำโพรบที่ติดแม่เหล็กทั้งหมดไปทำไฮบริไดเซชั่นกับชิ้นดีเอ็นเอขนาด 400-1000 คู่เบสที่เตรียมไว้ ใช้ดีเอ็นเอปริมาตร 20-30 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดพีซีอาร์ นำไปบ่มในเครื่องพีซีอาร์ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกดีเอ็นเอให้เป็นสายเดี่ยว แล้วแช่น้ำแข็งทันที ดูดสารละลายที่มีดีเอ็นเอทั้งหมดนี้เติมลงในหลอดไมโครที่มีโพรบที่เตรียมไว้นั้น ผสมให้เข้ากันดีด้วยไปเปต นำไปบ่มในเครื่อง incubator shaker ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และเปิดเขย่าเบา ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวางบน magnetic stand ดีเอ็นเอที่มีเบสคู่สมกับโพรบจะถูกไฮบริไดซ์และดูดติดกับแม่เหล็กอยู่ข้างหลอด แล้วดูดน้ำทิ้งไป ดึงหลอดออกจากแท่นแม่เหล็ก แล้วละลายตะกอนข้างหลอดด้วย 2X SSC ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นล้างด้วย 2 X SSC ปริมาตร 1 มล. อีก 4 ครั้ง โดยแต่ละครั้งให้บ่มทิ้งไว้ 5 นาทีก่อนดูด 2X SSC ทิ้งไป แล้วล้างด้วย 1 X SSC ปริมาตร 1 มล. อีก 4 ครั้ง โดยแต่ละครั้งให้บ่มทิ้งไว้ 5 นาทีก่อนดูด 1X SSC ทิ้งไป ในขั้นตอนสุดท้าย ละลายตะกอนที่ได้ด้วย น้ำหรือ TE 50 ul บ่มทิ้งไว้ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาทีเพื่อแยกแม่เหล็กออกจากดีเอ็นเอ แล้ววางบน magnetic stand ดูดน้ำใสที่มีดีเอ็นเอที่ต้องการเก็บไว้ทำพีซีอาร์ต่อไปส่วน beads นำไปละลายด้วย TE หรือน้ำ 50 ul เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส นำกลับมาใช้ได้อีก

การสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์ (SSR-enrich library)

เมื่อได้ชิ้นดีเอ็นเอ นำมาตรวจสอบด้วยอะกะโรสเจล 1.5 % ถ้ามีแถบดีเอ็นเอขนาด 400-1000 คู่เบสจึงนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออีกครั้งด้วยไพรเมอร์ OligoA ดีเอ็นเอที่ได้นี้จะเป็นไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ นำดีเอ็นเอที่ตรวจสอบแล้วนั้นมาโคลนเข้าในเวคเตอร์ TA Cloning Kit (Invitrogen) ซึ่งใช้เวคเตอร์ pCR 2.1 และใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase เป็นเอนไซม์เชื่อมต่อ โดยใช้ *E. coli* สายพันธุ์ TOP10F' ตามวิธีการของบริษัท คัดเลือกโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่เราสนใจที่มีสีขาว มาทั้งหมด 250 โคลนแล้วนำไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณใน SOC media นำ *E. coli* ที่ได้มาสกัดพลาสมิด โดยใช้ ชุดสกัดพลาสมิดสำเร็จรูป GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas)โดยขั้นตอนที่บริษัทแนะนำ ตรวจสอบผลการโคลนด้วยการทำเจลอิเลคโตรโฟริซิสด้วย อะกะรส 1.5 % นำตัวอย่างส่งให้บริษัทเอกชนนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 101 โคลน

การออกแบบไพรเมอร์และทดสอบดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ 101 สาย มาออกแบบไพรเมอร์จำเพาะของดีเอ็นเอแต่ละชิ้นโดยใช้โปรแกรม Prim3 แล้วสังเคราะห์ไพรเมอร์และนำมาคัดเลือกหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมด้วยการทดสอบการทำพีซีอาร์โดยการนำไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลแวนดา จำนวน 5 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ 101 คู่ โดยใช้ค่า

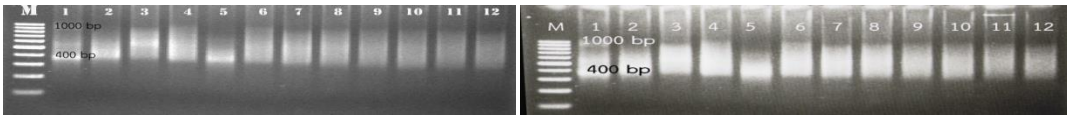
Tm ตามโปรแกรมคำนวณได้ ตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้โดยใช้ เมตาพอร์ 3 % ซึ่งเตรียมโดยใช้ อะกะโรส 1 ส่วน เมตาพอร์ 2 ส่วน ซึ่งการละลายเมตาพอร์จะต้องค่อย ๆ เทผงวุ้นลงไปใน TE buffer ทีกวนด้วยเครื่อง magnetic sterer อยู่ตลอดเวลาให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปหลอมให้ละลายอย่างดีในไมโครเวฟที่เปิดไฟกลางนาน ราว 5 นาที โดยนำออกมาแกว่งทุก ๆ 1 นาที ก่อนนำไปใช้งานต่อไป ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเมทิเดียมโบรไมด์ อ่านแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏด้วย เครื่อง Gel documentation และบันทึกผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ผลการศึกษาและวิจารณ์

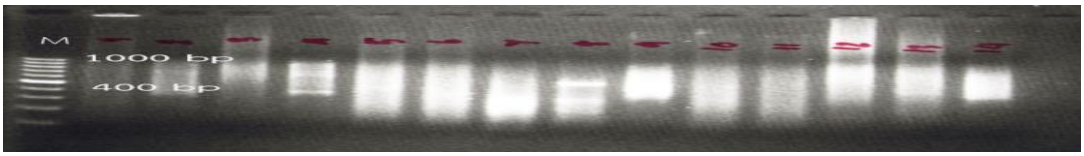
การสร้าง SSR-enrich library

การสร้าง SSR library โดยการตัดจีโนมิคดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Mbo* I แล้วนำไปเชื่อมต่อกับอะแดบเตอร์ชนิดปลายเหนียวเพื่อให้เป็นบริเวณสำหรับไพรเมอร์เข้าเกาะจับ โดยการเตรียมอะแดบเตอร์ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นสายตรงข้ามกับรอยตัดของเอนไซม์ *Mbo* I ซึ่งจะทำให้เพิ่มปริมาณได้เป็นจำนวนมากเพียงพอสำหรับการนำไปทำไฮบริไดเซชั่นกับโพรบดีเอ็นเอที่เตรียมไว้ด้วยการสังเคราะห์จำนวน 14 โพรบดังกล่าว จากการทดลองเมื่อนำจีโนมิคดีเอ็นเอไปตัดและเชื่อมต่อแล้วได้ดีเอ็นเอตามต้องการ นำดีเอ็นเอที่ได้นี้ไปแยกด้วยอะกะโรสเจลชนิดหลอมละลายที่อุณหภูมิต่ำแล้วตัดแยกดีเอ็นเอโดยการตัดเอาจากเจลบริเวณที่มีขนาด 400-1000 คู่เบสโดยการเปรียบเทียบกับ 100 bp DNA marker แยกดีเอ็นเอจากเจลดังแสดงในภาพที่ 1 ก นำดีเอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ชนิดเดียวกับอะแดบเตอร์ทำให้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาด 400 -1000 คู่เบส ได้ปริมาณมาก ดังแสดงในภาพที่ 1 ข จากนั้นจึงนำดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคพีซีอาร์นี้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการทำไฮบริไดเซชั่นกับโพรบต่อไป ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้นี้จะประกอบด้วยชิ้นดีเอ็นเอที่มีการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์หลากหลายแบบเพราะเป็นดีเอ็นเอจากจีโนมิคและการที่เราใช้ดีเอ็นเอขนาดนี้เพื่อความสะดวกในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องอัตโนมัติต่อไป เมื่อได้ดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการในปริมาณมากพอแล้วจึงนำไปทำไฮบริไดเซชั่นกับโพรบที่เตรียมไว้ โดยโพรบจะเชื่อมต่อด้วย biotin ที่ปลาย 5’ แล้วไบโอตินนี้จะไปทำปฏิกิริยากับ streptavidin ซึ่งเชื่อมต่ออยู่กับ magnetic bead มีคุณสมบัติเป็นแม่เหล็ก ในที่นี้ใช้ผลิตภัณฑ์ของ Invitrogen ได้แก่ M2-80 Dynabeads : Streptavidin-coated magnetic beads เมื่อจะใช้งานต้องนำมาวางบนแถบแม่เหล็ก โดยมีหลักการคือ magnetic beads ที่เชื่อมกับ Streptavidin แล้ว Biotin ที่เชื่อมต่ออยู่กับดีเอ็นเอโพรบก็จะเข้ามาเกาะกับ beads และเมื่อวางหลอดบนแท่นแม่เหล็กก็จะเกาะอยู่ข้างหลอด เมื่อเราเติมดีเอ็นเอขนาด 400-1000 คู่เบสลงไป สายดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เข้ากันได้กับโพรบแต่ละชนิดก็จะเข้าเกาะกับดีเอ็นเอคู่สม (complementary) ของตน แล้วล้างดีเอ็นเอที่ไม่ได้ใช้ทิ้งไป จะเหลือเฉพาะดีเอ็นเอที่มีเบสเรียงลำดับเป็นแกนซ้ำติดอยู่กับโพรบและติดอยู่ที่ข้างหลอดล้างดีเอ็นเอที่ได้แล้วแยกออกจากโพรบ นำดีเอ็นเอที่แยกได้นี้ไปเพิ่มปริมาณอีกครั้งด้วยเทคนิคพีซีอาร์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของโพรบจำนวน 14 โพรบดังภาพที่ 1 ค ซึ่งจะมีปริมาณมากพอสำหรับการโคลนเข้าสู่เวคเตอร์ TA cloning kit ต่อไป เมื่อนำดีเอ็นเอที่มีการเรียงลำดับดีเอ็นเอแบบ repetitive DNA เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ชุดเดิมแล้วไปโคลนเข้าสู่เวคเตอร์ของชุดโคลนสำเร็จรูป TA cloning kit คัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอที่ต้องการซึ่งจะมีโคโลนีสีขาว แต่ละโคลนจะมีดีเอ็นเอเข้าเพียง 1 สาย แล้วเลือกดีเอ็นเอมาชนิดละ 10-15 โคโลนี ตรวจสอบผลการโคลนด้วยการทำ colony PCR เพื่อตรวจสอบว่ามีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการจริง ดังแสดงในภาพ ที่ 2 ก แล้วเพิ่มปริมาณด้วยการเลี้ยงในอาหาร SOC

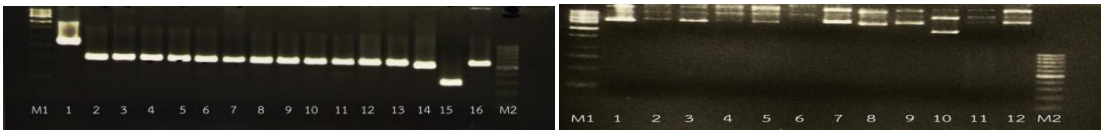
media นำไปสกัดพลาสมิด ตรวจดูอีกครั้งด้วยการทำเจลอิเลคโตรโฟริซิส พลาสมิดที่มีดีเอ็นเอจะมี 3 แถบดังภาพที่ 2 ข จากนั้นนำพลาสมิดไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป



ภาพที่ 1 ก และ 1 ข แสดงดีเอ็นเอขนาด 400 – 1000 คู่เบสก่อนและหลังจากเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ของอะแดบเตอร์ oligoA โดย M หมายถึง 100 bp DNA ladder บน 1% agarose gel



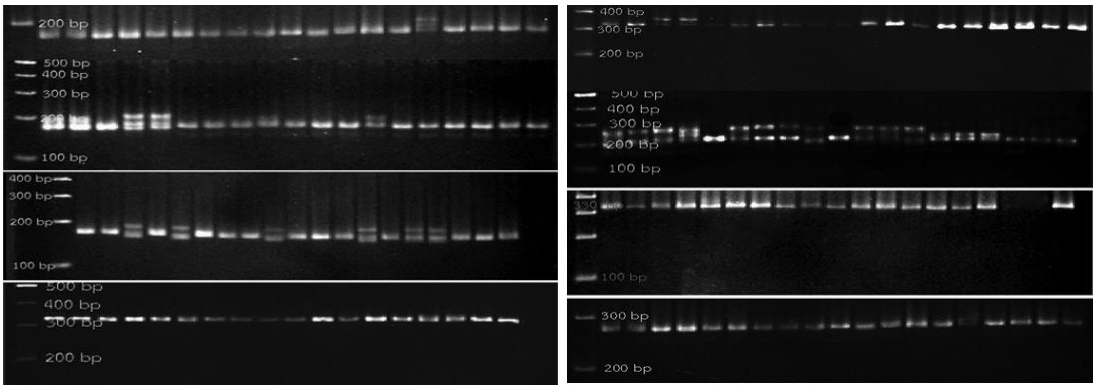
ภาพที่1 ค แสดงไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอขนาด 400 -1000 คู่เบสซึ่งได้จากการเพิ่มปริมาณจากดีเอ็นเอของโพรบ 14 ชนิด ชนิดละ 1 ไลบรารี่โดย M หมายถึง 100 bp DNA ladder บน 1% agarose gel



ภาพที่ 2 ก และ 2 ข แสดงผลของการทำ colony PCR และการสกัดพลาสมิด เพื่อนำไปหาลำดับกรดนิวคลีอิคโดย M1 และ M2 หมายถึง 100 bp DNA ladder ฉ,ธ 1kb DNA ladder บน 1% agarose gel

ผลการหาลำดับกรดนิวคลีโอไทด์และการออกแบบไพรเมอร์

นำไปหาลำดับเบสโดยบริษัทเอกชนจำนวน 101 โคโลนี จากนั้นนำลำดับกรดนิวคลีอิคที่ได้ มาออกแบบไพรเมอร์ส่วนหัวและท้าย ด้วยโปรแกรมPrimer3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer /primer3_www.cgi) ได้ไพรเมอร์จำนวน 101 คู่ เมื่อนำมาทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 ผลการทดสอบการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์จำนวน 101 คู่ กับกล้วยไม้สกุลแวนดาจำนวน 5 สายพันธุ์ โดยการแยกแถบดีเอ็นเอด้วย เมตาพอร์ 3 % โดยการเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอด้วย 100 bp DNA ladder

และสามารถคัดเลือกไพรเมอร์ได้ 64 คู่ โดยคัดเลือกจากผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้ที่ใช้ในการทดลอง ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงผลการออกแบบไพรเมอร์จากลำดับดีเอ็นเอที่ได้จากการอ่านแถบดีเอ็นเอของชิ้นส่วนดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์ (SSRs motif) ที่คัดเลือกได้จำนวน 64 คู่

ลำดับที่	ชื่อ	Forward primer sequence (5′ ⟶ 3′)	Reverse primer sequence (5′ ⟶ 3′)	Tm (°C)	ขนาดของอัลลีล (bp)	จำนวนอัลลีล	รวม	MP
1	BIRDOV01	CCACCCAACTGCTCTATCGG	AGCTTCGTCCTCACTTGGTG	60	375	1	4	M
2	BIRDOV02	TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC	CGAACCGAACAGGCTTATGT	55	215	1-2	10	P
3	BIRDOV03	GCATCCAGCTGAAATCCTCT	AGTTTACACGGTGTGCGTCA	50	204	1-2	6	P
4	BIRDOV04	TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC	ACGAACCGAACAGGCTTATG	55	204	1	5	M
5	BIRDOV05	CAAGCTTCGGATCAACCCTA	GAGGTGCTTGGCATATTCGT	60	217	1	1	P
6	BIRDOV06	TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC	CGAACCGAACAGGCTTATGT	60	209	1-2	9	P
7	BIRDOV07	TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC	CGAACCGAACAGGCTTATGT	60	219	1-2	10	P
8	BIRDOV08	AGAGTGTGGGGCAAGAGAGA	CTTCGGATCCTCATCACACA	60	219	1-2	6	P
9	BIRDOV09	GGTCGAGGCAAAAGTGATGT	GCAACGAATTAGCCCAAAAA	60	221	1	15	M
10	BIRDOV10	GCAACTGGTCCAGAACCTTG	CTTTGTTTTAGGGCGACTGC	60	210	1	2	M
11	BIRDOV11	CGAAGAGATCCTCCTGTTGC	TTTGTCCGGTCATTCAGTCA	60	215	2-3	8	P
12	BIRDOV12	ATCCCACTCTCATCCCTCAC	TCCTCTTCCACCTTCCTCCT	60	254	5-6	22	P
13	BIRDOV13	TCGCCGAGCTTTAGGTAGAA	TCATCACCTCCATCCTCCTC	60	211	1-2	7	P
14	BIRDOV14	GCCCGTGTCTCAAAATCTCT	GCGCATACGTTCTTGCATTA	59	206	1	5	M
15	BIRDOV15	CAGTCCAACCGAAGCTTTTC	AGAAGGATTGGCATGTTTGC	60	209	2	6	P
16	BIRDOV16	CAGTCCAACCGAAGCTTTTC	AGAAGGATTGGCATGTTTGC	60	198	1-2	6	P
17	BIRDOV17	GAGAGAGAAAGGGAGCAGGAG	GGTCCCAACCTCTTCCAATC	60	234	2	4	M
18	BIRDOV18	AGCTGACTTGGCGAAACACT	TTACGCTCCGGAACAAAAGT	60	202	1	5	M
19	BIRDOV19	CGAGGGATGGAATGATTGTT	TCTCACCAGAAGGAGGCATT	60	212	1	5	M
20	BIRDOV20	TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC	CGAACCGAACAGGCTTATGT	60	225	1-2	5	P
21	BIRDOV21	CATGCTTTGAGTTGGGAGGT	ACCTGGACGGCAAATAATGA	60	211	1	5	M
22	BIRDOV22	CGTGCACGTCTTACACACCT	TTACAACTTTCGCCCTCGAC	55	206	1-2	6	P
23	BIRDOV23	CCAAGCTTCGGATCATTTCT	CCACCCCCTACACGACTATC	59	206	1-2	9	P
24	BIRDOV24	TGTTGCAACGAACAGGTCAC	TGTCCTGGCTGGTTTAGAGG	60	201	1	3	M
25	BIRDOV25	CCCTTCAAGAACTCCACCAA	AATCCATGTGTGCGGATTTT	60	216	1	2	M
26	BIRDOV26	TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC	CGAACCGAACAGGCTTATGT	60	203	2	9	P
27	BIRDOV27	CCCTTCAAGAACTCCACCAA	AATCCATGTGTGCGGATTTT	60	204	1	3	M
28	BIRDOV28	CTTGGGTTTGAGTGGGATTG	AGACACCTTGCCCTCATTTG	60	213	2	10	M
29	BIRDOV29	GATCGAAGCTTGGGGTCTCT	GACACGAACCAGAGCAGACA	60	225	2-4	16	P
30	BIRDOV30	CTCATATGCAAGGGGGAGAA	CCAAGCTTCGATCGTCTCTC	60	224	2-3	12	P

31	BIRDOV31	TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC	ACGAACCGAACAGGCTTATG	60	198	1-3	8	P
32	BIRDOV32	TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC	GACCGAACAGGCTTATGTCC	60	200	1	5	M

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ลำดับที่	ชื่อ	Forward primer sequence (5′ ⟶ 3′)	Reverse primer sequence (5′ ⟶ 3′)	Tm (˚C)	ขนาดของอัลลีล (bp)	จำนวนอัลลีล	รวม	MP
33	BIRDOV33	CCTCTAGACCAGCCAGGACA	CCATTGGACCGTTACACACA	60	215	4-9	21	P
34	BIRDOV34	CATGGGGTGTTGTTTGAGTG	CATGGGGTGTTGTTTGAGTG	60	209	3-5	13	P
35	BIRDOV35	TTCGGATCCTCCTTCGTAGA	CTCGCACAACAGAACTTGGA	60	203	1	5	M
36	BIRDOV36	TGAGGCTCACAACTCCAACA	CAAGGGTCGTAGTCGGTTGT	60	193	2-6	13	P
37	BIRDOV37	GAAGGACTTGAAAAGGGCAGT	GCCCCAAACAGACCCTAAAT	50	203	3-9	18	P
38	BIRDOV38	TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC	AACCGAACAGGCTTATGTCC	60	199	1	4	M
39	BIRDOV39	TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC	ACGAACCGAACAGGCTTATG	55	202	1	4	M
40	BIRDOV40	GCTGTAGGAGCCCAAACTGA	TTTGGTTGAGCTCCCTTTTG	60	222	1	5	M
41	BIRDOV41	GAAAATGGGTCATTGGTTGG	ATGTCCTTGGCTTCAAATGG	60	202	1-2	8	P
42	BIRDOV42	TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC	GACCGAACAGGCTTATGTCC	55	199	1	5	M
43	BIRDOV43	AAGTTGGCCTCAACAACCAG	CCCTCCACCTAAACAGCAAA	60	210	1	3	M
44	BIRDOV44	GTGCCACCCTCTTTTGTTGT	ATCCCACGCAGAATCATTTC	60	197	1	1	M
45	BIRDOV45	TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC	CGAACCGAACAGGCTTATGT	60	201	1	2	M
46	BIRDOV46	ACCCGCTTAGCTAGCACGTA	TGTTTCCCTCTATCCGCTCA	60	191	1-2	5	P
47	BIRDOV47	TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC	CGAACCGAACAGGCTTATGT	60	201	1	2	M
48	BIRDOV48	AGGGCGTGCTGTAGGAGTAA	CCCAAGCTTCGAATACCAAA	60	201	1	5	M
49	BIRDOV49	AGCTTCGGATCAAGGTGCTA	CACGGTCTCCTTTGTGAGTG	60	206	3-4	8	P
50	BIRDOV50	TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC	CGAACCGAACAGGCTTATGT	60	201	1	2	M
51	BIRDOV51	AGGGCGTGCTGTAGGAGTAA	CCCAAGCTTCGAATACCAAA	60	201	1	5	M
52	BIRDOV52	GCAACTGGTCCAGAACCTTG	CTTTGTTTTAGGGCGACTGC	60	201	1	3	M
53	BIRDOV53	TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC	CGAACCGAACAGGCTTATGT	60	200	1	2	M
54	BIRDOV54	TCGAACCGTAGACCTTCTCG	CCAAGCTTCGGATCAGGATA	60	221	1	5	M
55	BIRDOV55	CTGCCCAGAATGAAGTGTGA	CAGCTGGATGGCAAATAATG	60	202	1-2	8	P
56	BIRDOV56	GGCGCTTTCTCATAGCTCAC	GCCTACATACCTCGCTCTGC	60	207	1	2	M
57	BIRDOV57	GGCGCTTTCTCATAGCTCAC	GCTACATACCTCGCTCTGC	60	205	1	2	M
58	BIRDOV58	TGTTGCAACGAACAGGTCAC	CGAAGTCGAGGCATTTCTGT	60	209	1	2	M
59	BIRDOV59	TGGAGGTGCTGGTGATATTG	ACACAGGCATCTCCACACAC	60	197	2-3	10	P

60	BIRDOV60	GGCGCTTTCTCATAGCTCAC	GCCTACATACCTCGCTCTGC	60	207	1	5	M
61	BIRDOV61	GAGGGAGAGAGGGAGAAGGA	ACAAGAAACCTGCGTCGAAT	59	204	1-2	9	P
62	BIRDOV62	GATCGAAGCTTGGGTCTCT	GACACGAACCAGAGCAGACA	60	225	1-2	7	P
63	BIRDOV63	ATTCAACTTACCCCGTGTGC	TAACACACGGACGGCAAATA	60	254	1-2	5	P
64	BIRDOV64	CCCCCAACTTCTACAACAGC	GACCCCAAGCTTCGTAATCA	60	202	2-3	10	P

สรุป

จากการพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์โดยใช้ M2-80 Dynabeads : Streptavidin-coated magnetic beads ร่วมกับ biotin – lebelled probe สามารถคัดแยกดีเอ็นเอที่เป็น SSRs motif ได้ ในการทดลองนี้ได้พัฒนาไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลแวนดาได้ 64 ไพรเมอร์ จากทั้งหมด 101 ไพรเมอร์ที่ทำการทดสอบ ไพรเมอร์ที่ได้สามารถนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลแวนดาแต่ละอัลลีลเพื่อการตรวจสอบจำแนกพันธุ์ต่อไป นอกจากนี้สามารถนำไปทดสอบกับกล้วยไม้สกุลอื่น ๆ เช่นรองเท้านารี กล้วยไม้สกุลหวายและสกุลแคทลียาเป็นต้น

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงรายที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Ahmad R, Ferguson L, Southwick SM (2003). Identification of Pistachio *(Pistachio vera* L.) Nuts with microsatellite markers. *Amer Soc Hort Sci*. 128: 898-903.

Edwards KJ, Barker JH, Daly A, Jones C, Karp A (1996). Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants. *Biotechniques.* 20: 758-760

Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (2002). Strategies for microsatellite isolation: A Review. *Mol Ecol*. 11: 1-16.

Zhao W, Miao X, Jia S, Pan Y, Huang Y (2005). Isolation and characterization of microsatellite loci from the mulberry, *Morus* L. *Plant Sci.* 168: 519-525.