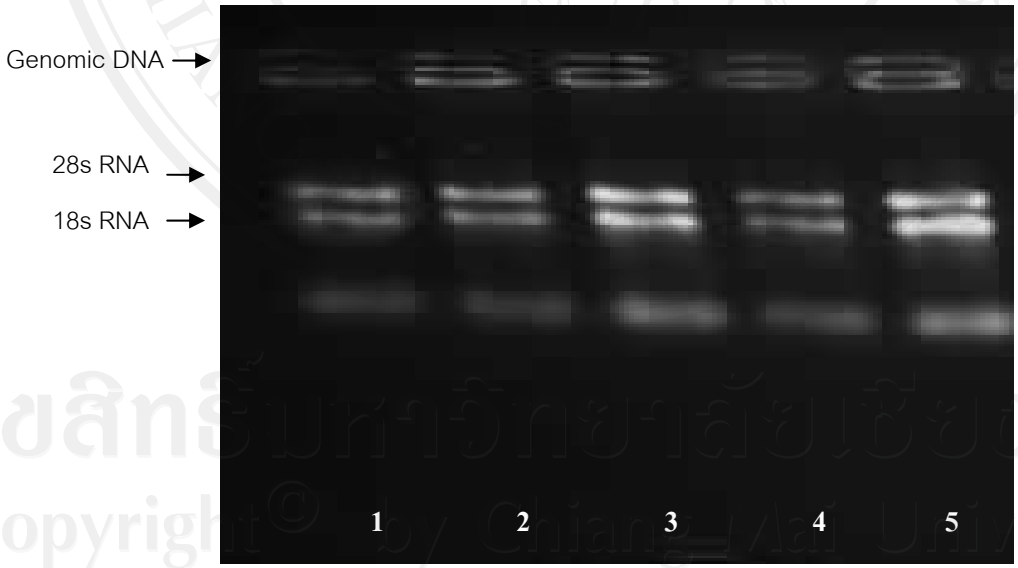
บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการสกัดอาร์เอ็นเอ

การสกัดอาร์เอ็นเอจากกล้วยไม้เอื้องดินใบหมาก 3 ชนิด 5 ตัวอย่างที่มีสีดอกต่างกันคือ *S. affinis* สีเหลือง, *S. plicata* สีม่วง สีชมพู และสีขาว และ *S. petri* สีบานเย็น โดยใช้ตัวอย่างพืช 3 ระยะ คือ ระยะดอกตูม (ระยะที่ 1) ดอกแรกแย้ม (ระยะที่ 2) และดอกบาน (ระยะที่ 3) โดยใช้ชุดสารเคมี Trizol ™ Reagent (Invitrogen, USA) เมื่อวัดค่าดูดกลืนแสงของอาร์เอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 nm พบว่ามีความเข้มข้น 35-45 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และตรวจสอบคุณภาพด้วย 1.2% agarose gel พบว่าอาร์เอ็นเอที่ได้ปรากฏเป็นแถบชัดเจน แต่มีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอในส่วนบนของเจล (ภาพที่ 4)



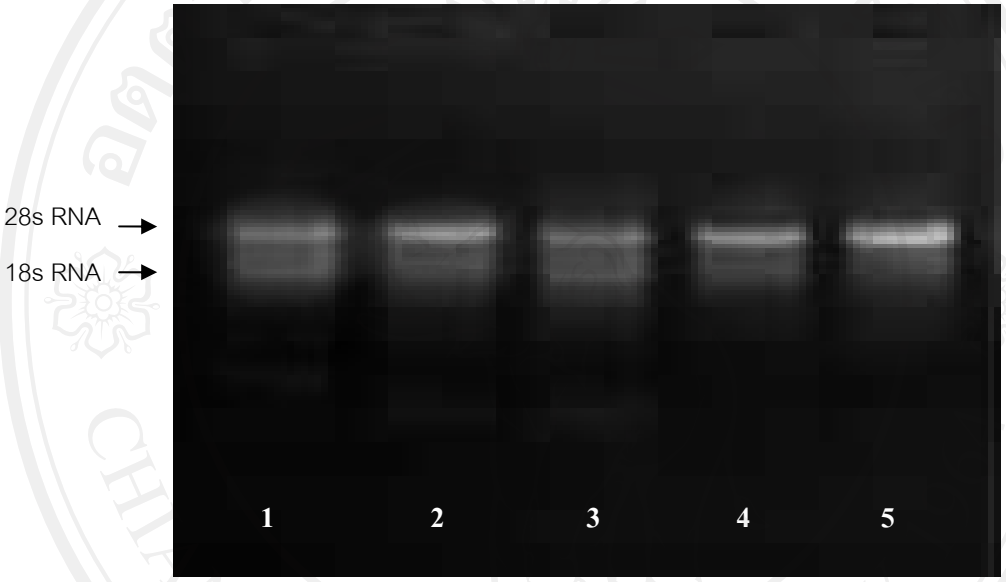
ภาพที่ 4 อาร์เอ็นเอของ *Spathoglottis* sp. ระยะดอกบาน

1.) *S. plicata* สีม่วง 2.) *S. plicata* สีชมพู 3.) *S. plicata* สีขาว 4.) *S. affinis* สีเหลือง 5.) *S. petri* สีบานเย็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.2 ผลการตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอที่ได้จากการทำ DNase digestion

ผลจากการกำจัดดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนออกจากอาร์เอ็นเอโดยเอนไซม์ DNase I พบว่าแถบอาร์เอ็นเอที่ได้มีคุณภาพดีขึ้น โดยแถบอาร์เอ็นเอมีความคมชัดขึ้น และไม่มีส่วนปนเปื้อนของดีเอ็นเอ (ภาพที่ 5)

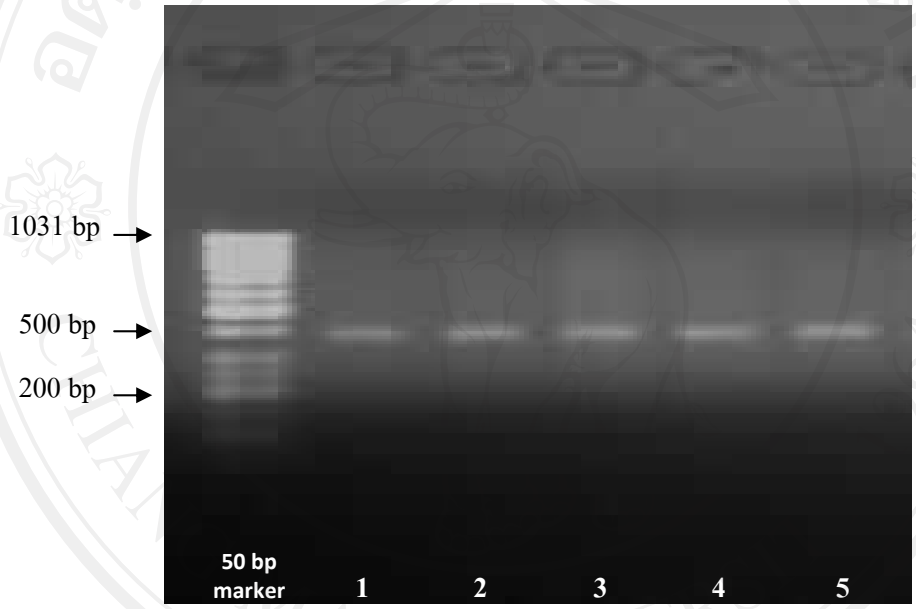


ภาพที่ 5 อาร์เอ็นเอหลังการทำ DNase digestion ของ *Spathoglottis* sp. ระยะดอกบาน
1.) *S. plicata* สีม่วง 2.) *S. plicata* สีชมพู 3.) *S. plicata* สีขาว 4.) *S. affinis* สีเหลือง 5.) *S. petri* สีบานเย็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3 ผลการสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ (cDNA synthesis)

การตรวจสอบคุณภาพของซีดีเอ็นเอ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ndhB ซึ่งออกแบบเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนในคลอโรพลาสต์ (Maier *et al*., 1992) นำมาทดสอบผลการทำ reverse transcription ของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากกลีบดอกของกล้วยไม้เอื้องดินใบหมาก พบแถบของซีดีเอ็นเอชัดเจน ขนาดประมาณ 500 bp และมีเพียงแถบเดียว (ภาพที่ 6)



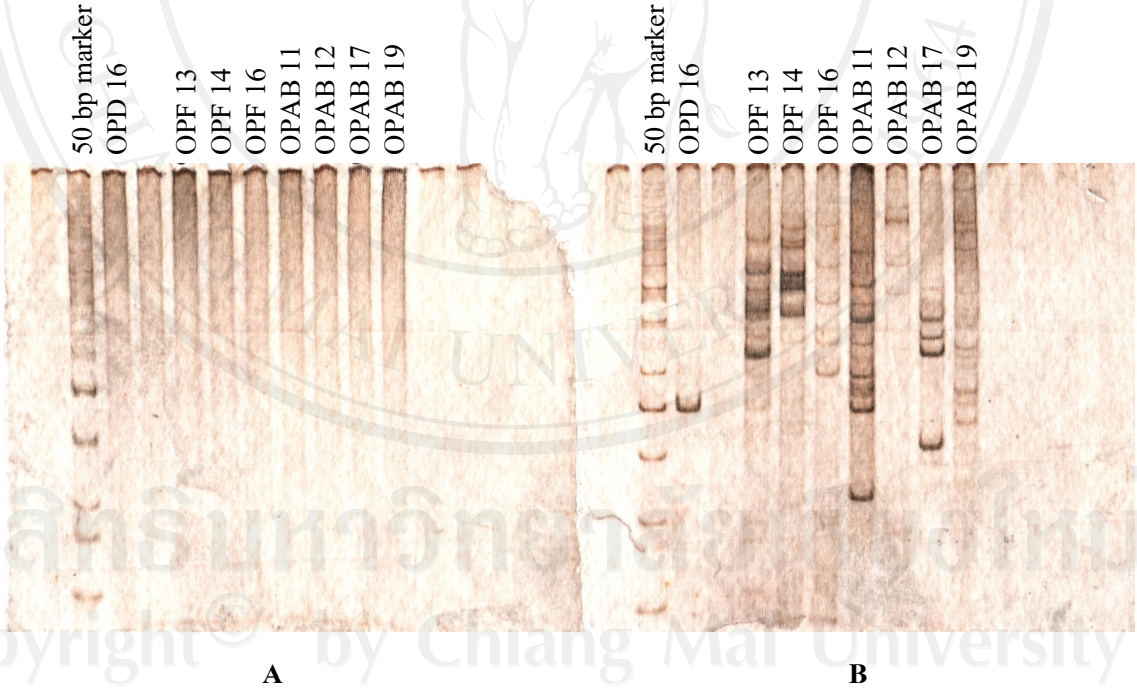
ภาพที่ 6 ผลผลิตพีซีอาร์โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ndhB ของ *Spathoglottis* sp. ระยะดอกบาน
1.) *S. plicata* สีม่วง 2.) *S. plicata* สีชมพู 3.) *S. plicata* สีขาว
4.) *S. affinis* สีเหลือง 5.) *S. petri* สีบานเย็น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.4 ผลการคัดกรองไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกล้วยไม้เอื้องดินใบหมาก

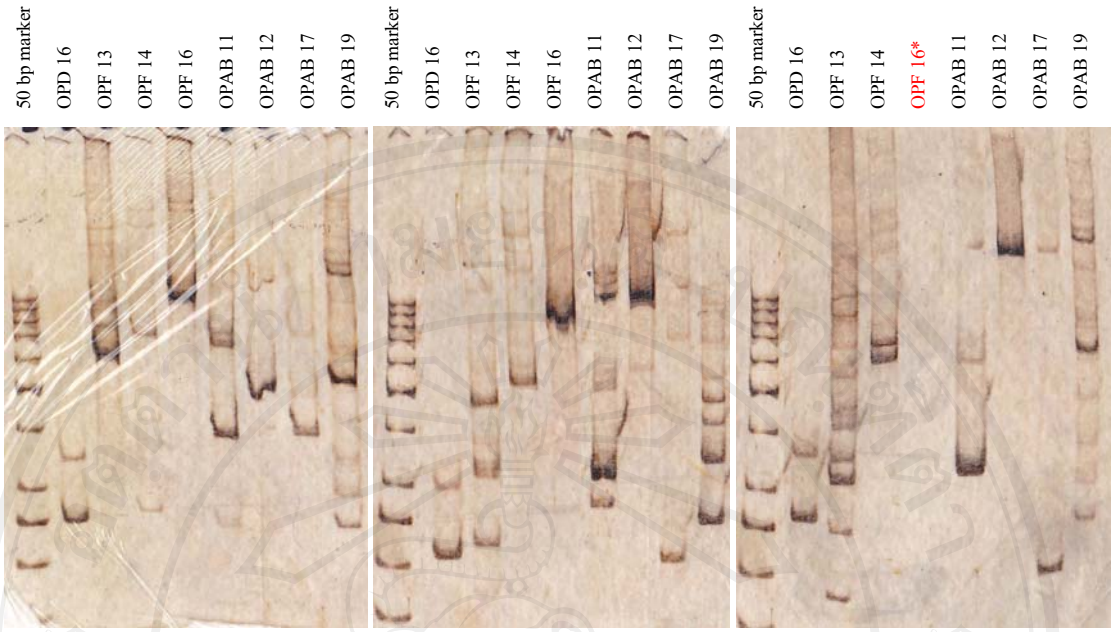
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกล้วยไม้เอื้องดินใบหมากด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ 2 ครั้ง เนื่องจากการทำปฏิกิริยาครั้งที่ 1 ยังไม่เห็นแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน มองเห็นเป็นปื้นยาว (ภาพที่ 7A) อย่างไรก็ตาม เมื่อนำผลผลิตของพีซีอาร์ ครั้งแรกมาเจือจางเพื่อใช้เป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยาครั้งที่ 2 พบว่าแถบดีเอ็นเอชัดเจนขึ้น (ภาพที่ 7B)

จากการใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มจำนวน 58 ชนิด ร่วมกับ anchored primer $dT_{12}VG$ ในการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอจากกลีบดอกเอื้องดินใบหมากทั้ง 5 ตัวอย่าง ที่ 3 ระยะ พบว่าไพรเมอร์ 8 ชนิด คือ OPD 16, OPF 13, OPF 14, OPF 16, OPAB 11, OPAB 12, OPAB 17 และ OPAB 19 สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ (ภาพที่ 8-12) โดยไพรเมอร์ 5 ชนิด ได้แก่ OPF13, OPF16, OPAB11, OPAB12, และ OPAB17 ให้ลักษณะแถบที่แตกต่าง (polymorphic) แต่แถบที่ได้ไม่มีความจำเพาะต่อกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา ส่วนไพรเมอร์อีก 3 ชนิด ได้แก่ OPD16, OPF14 และ OPAB19 สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอของทุกตัวอย่าง และสามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง (ภาพที่ 8-12)



ภาพที่ 7 ผลผลิตพีซีอาร์ 2 ครั้ง โดยใช้ไพรเมอร์ชนิดสุ่ม (OPD, OPF และ OPAB) ร่วมกับ Oligo $dT_{12}VG$ ของกล้วยไม้เอื้องดินใบหมากทั้ง 5 กลุ่มสี ใน 3 ระยะ ได้แก่ ระยะดอกตูม ดอกแรกแย้ม และดอกบาน รวมกัน **A :** ปฏิกิริยาพีซีอาร์ครั้งที่ 1 **B :** ปฏิกิริยาพีซีอาร์ครั้งที่ 2

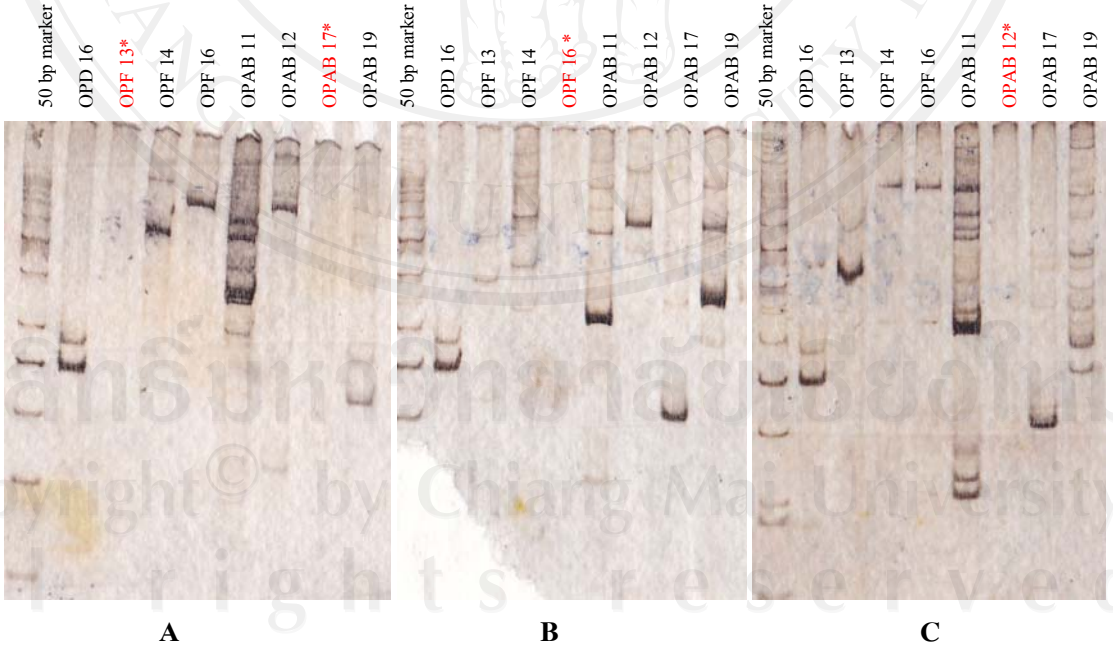
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 8 ผลการเพิ่มปริมาณผลผลิตพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ชนิดสุ่มของ *S. plicata* สีม่วง

A : ระยะดอกตูม **B** : ระยะดอกแรกแย้ม **C** : ระยะดอกบาน

* ตัวอักษรสีแดงแสดงไพรเมอร์ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตพีซีอาร์ได้

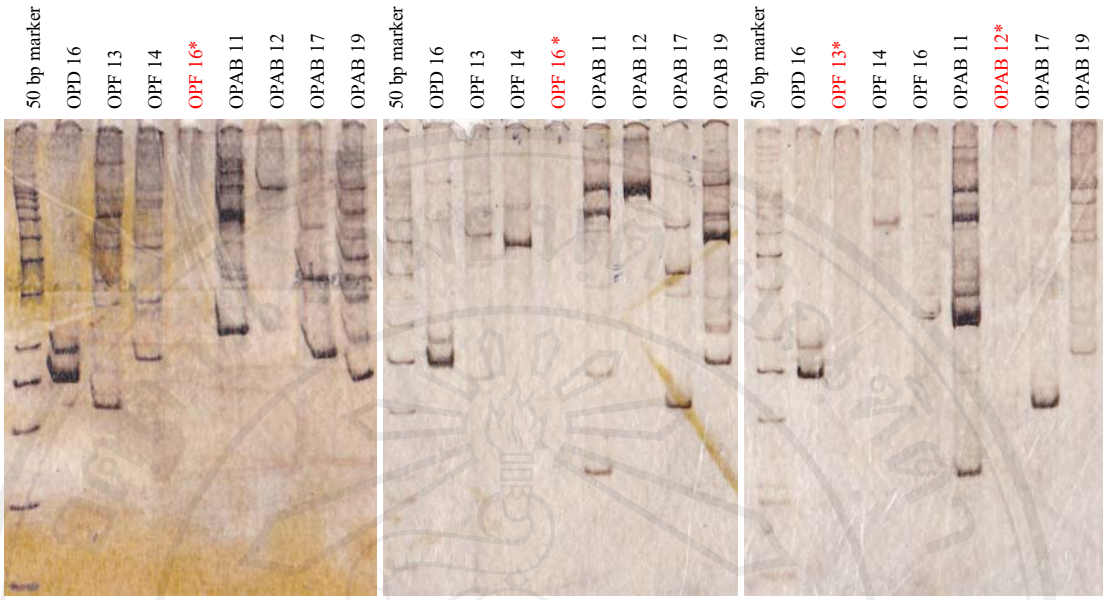


ภาพที่ 9 ผลการเพิ่มปริมาณผลผลิตพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ชนิดสุ่มของ *S. plicata* สีชมพู

A : ระยะดอกตูม **B** : ระยะดอกแรกแย้ม **C** : ระยะดอกบาน

* ตัวอักษรสีแดงแสดงไพรเมอร์ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตพีซีอาร์ได้

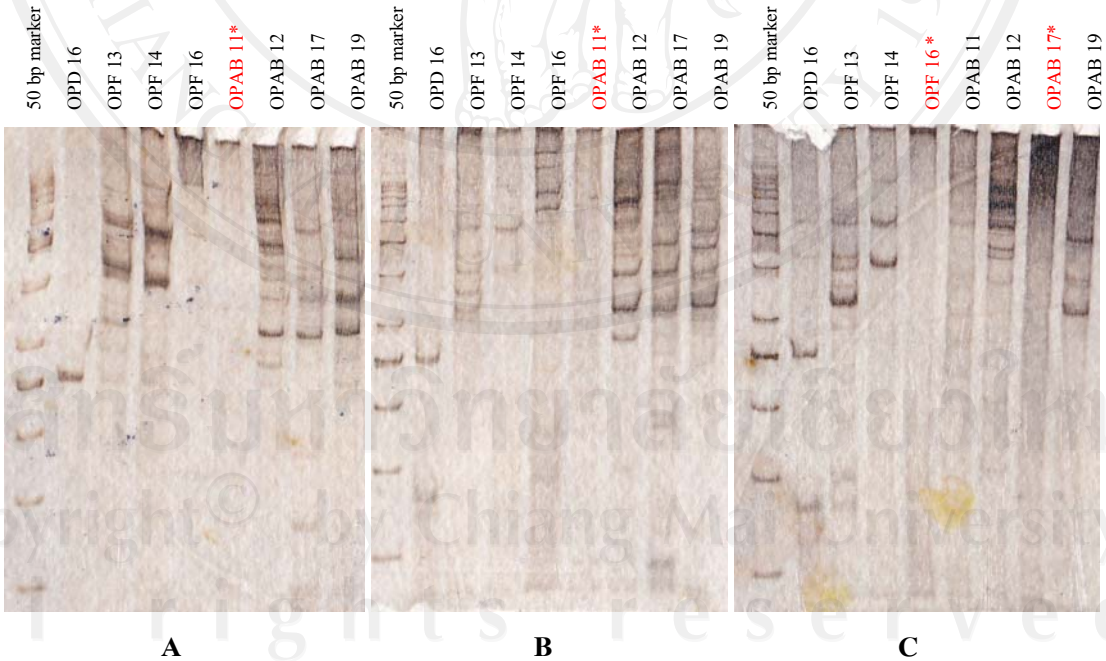
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 10 ผลการเพิ่มปริมาณผลผลิตพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ชนิดสุ่มของ *S. plicata* สีขาว

A : ระยะดอกตูม **B** : ระยะดอกแรกแย้ม **C** : ระยะดอกบาน

*ตัวอักษรสีแดงแสดงไพรเมอร์ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตพีซีอาร์ได้

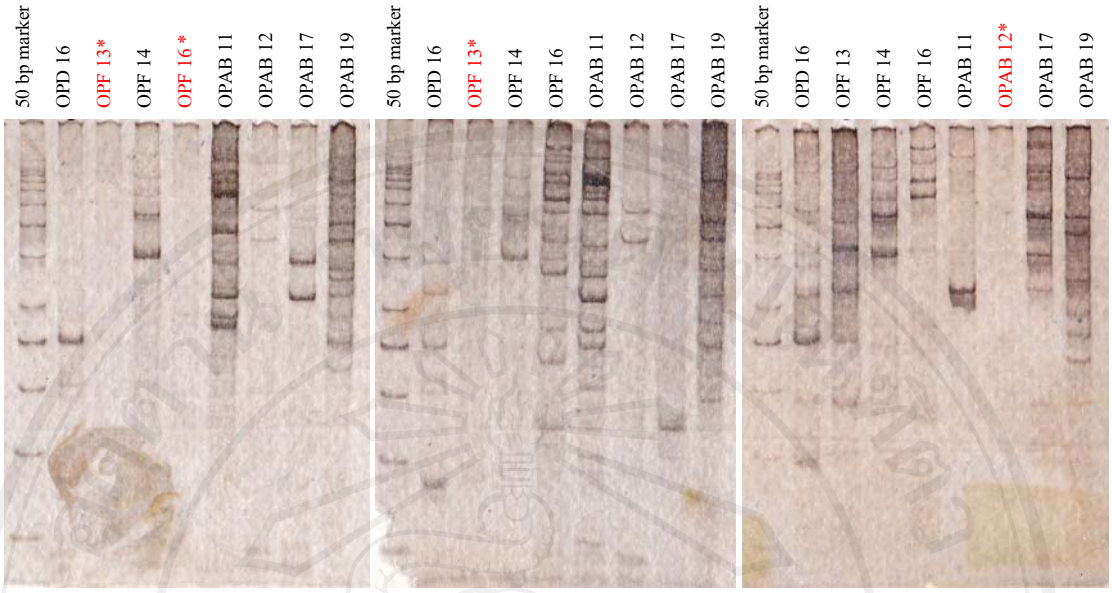


ภาพที่ 11 ผลการเพิ่มปริมาณผลผลิตพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ชนิดสุ่มของ *S. affinis* สีเหลือง

A : ระยะดอกตูม **B** : ระยะดอกแรกแย้ม **C** : ระยะดอกบาน

*ตัวอักษรสีแดงแสดงไพรเมอร์ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตพีซีอาร์ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



A **B** **C**

ภาพที่ 12 ผลการเพิ่มปริมาณผลผลิตพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ชนิดสุ่มของ *S. petri* สีบานเย็น

A : ระยะดอกตูม **B** : ระยะดอกแรกแย้ม **C** : ระยะดอกบาน

* ตัวอักษรสีแดงแสดงไพรเมอร์ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตพีซีอาร์ได้

4.5 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิคดีดีอาร์ที-พีซีอาร์

ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้เอื้องดินใบหมากแต่ละชนิด 5 กลุ่มสี 3 ระยะ ด้วยเทคนิคดีดีอาร์ที-พีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ที่คัดเลือก 3 ชนิด ตรวจสอบด้วย 6% polyacrylamide gel พบว่าให้แถบดีเอ็นเอจำนวนมากและชัดเจนสามารถบันทึกผลได้ 352 แถบ ขนาดตั้งแต่ 1,000–200 bp แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏพบ 2 ลักษณะคือ แถบดีเอ็นเอที่ไม่แสดงความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มตัวอย่าง และแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มตัวอย่าง สำหรับจำนวนแถบที่ไม่แสดงความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มตัวอย่างพบ 36-178 แถบต่อไพรเมอร์ (เฉลี่ย 108.33 แถบ) คิดเป็น 92.33 เปอร์เซ็นต์ของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด ส่วนจำนวนแถบที่แสดงความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มตัวอย่างพบ 3-18 แถบต่อไพรเมอร์ (เฉลี่ย 9 แถบ) คิดเป็น 7.67 เปอร์เซ็นต์ของแถบดีเอ็นเอทั้งหมด (ตารางที่ 2)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2 จำนวนแถบดีเอ็นเอจากการคัดกรองยีนของกล้วยไม้เอื้องดินใบหมากโดยเทคนิคดีดีอาร์ที-พีซีอาร์

Primer	Total bands per primer	Non-Polymorphic bands	Polymorphic bands	% Polymorphic bands
OPD16	42	36	6	14.29
OPF14	129	111	18	13.95
OPAB19	181	178	3	1.66
Total	**352**	**325**	**27**	**29.9**

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่ต่างกันระหว่างกลีบดอกเอื้องดินใบหมาก 5 ตัวอย่าง เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ 3 ชนิด ได้แก่ OPD16, OPF14 และ OPAB19 ร่วมกับ anchored primer $dT_{12}VG$ จากแถบดีเอ็นเอที่สามารถบันทึกผลได้รวม 352 แถบ ในการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มพบแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะทั้งหมด 9 แถบ ขนาด 534, 489, 464, 445, 419, 373, 337, 334 และ 270 bp (ภาพที่ 13) โดยเป็นกลุ่มที่มีความเข้มแถบเท่ากันในกลีบดอกแต่ละระยะ

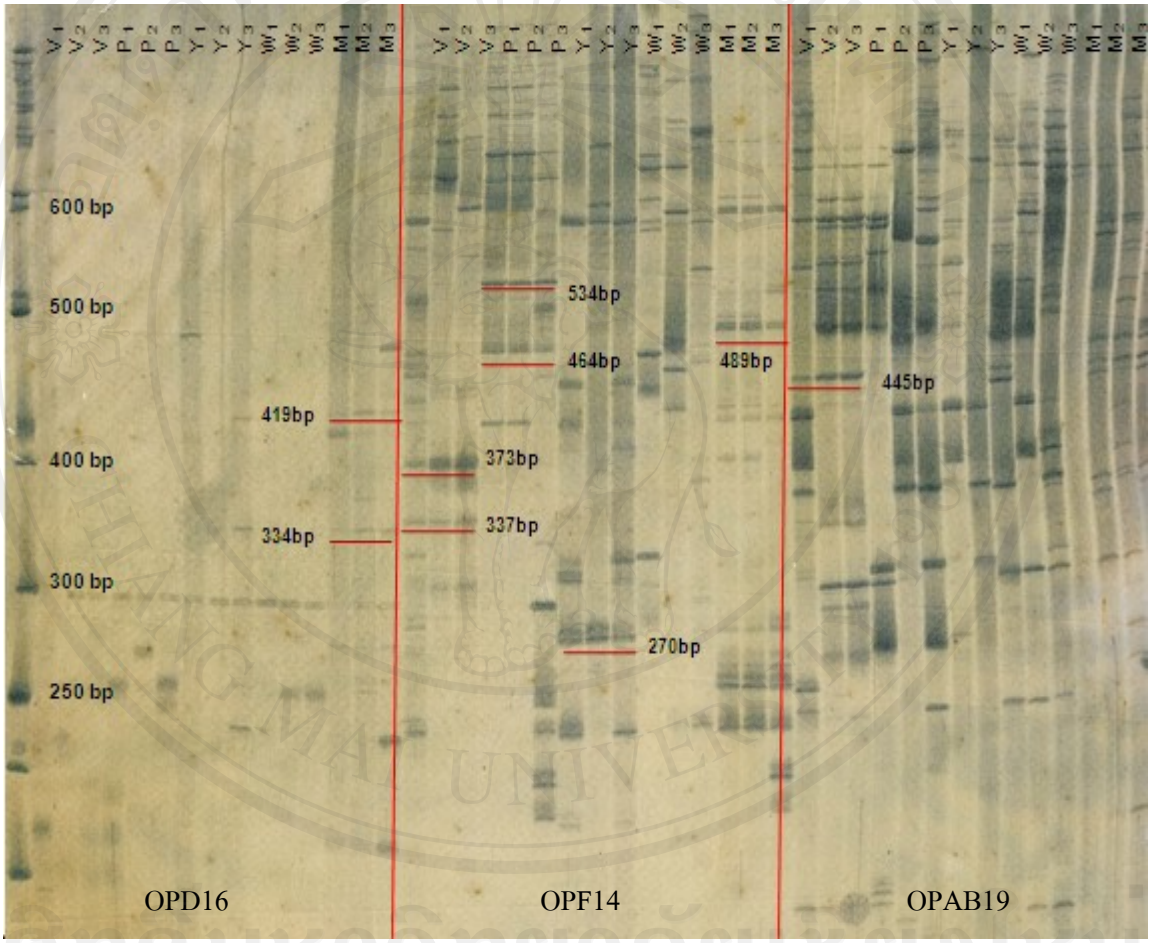
การใช้ไพรเมอร์ OPD16 สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอขนาด 419 bp และ 334 bp ที่มีความจำเพาะกับ *S. petri* ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีสีบานเย็น ทั้ง 3 ระยะ

ไพรเมอร์ OPF14 สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอขนาด 534, 489, 464, 373, 337 และ 270 bp จำนวน 6 แถบ ซึ่งมีความจำเพาะต่อกลุ่มตัวอย่างที่ต่างกัน โดยแถบขนาด 373 และ 337 bp พบเฉพาะใน *S. plicata* สีม่วง แถบขนาด 534 และ 464 bp พบเฉพาะใน *S. plicata* สีชมพู แถบขนาด 270 bp พบเฉพาะใน *S. plicata* สีขาว และแถบขนาด 489 bp ที่พบเฉพาะใน *S. petri* เท่านั้น

ไพรเมอร์ OPAB19 สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอขนาด 445 bp เฉพาะใน *S. plicata* สีม่วง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นอกจากความจำเพาะต่อเอื้องดินใบหมากในแต่ละกลุ่มแล้ว ยังพบว่าบางแถบมีการแสดงออกที่ต่างกันในแต่ละระยะภายในกลุ่ม คือ แถบขนาด 373 bp โดยไพรเมอร์ OPF14 และขนาด 445 bp โดยไพรเมอร์ OPAB19 (ภาพที่ 13) ซึ่งมีความเข้มของแถบเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ยังไม่พบแถบที่จำเพาะต่อ *S. affinis*



ภาพที่ 13 ผลผลิตพีซีอาร์ของกล้วยไม้เอื้องดินใบหมาก ที่ใช้ไพรเมอร์ชนิดสุ่ม 3 ชนิดร่วมกับ anchored primer $dT_{12}VG$

V = *S. plicata* สีม่วง P = *S. plicata* สีชมพู W = *S. plicata* สีขาว

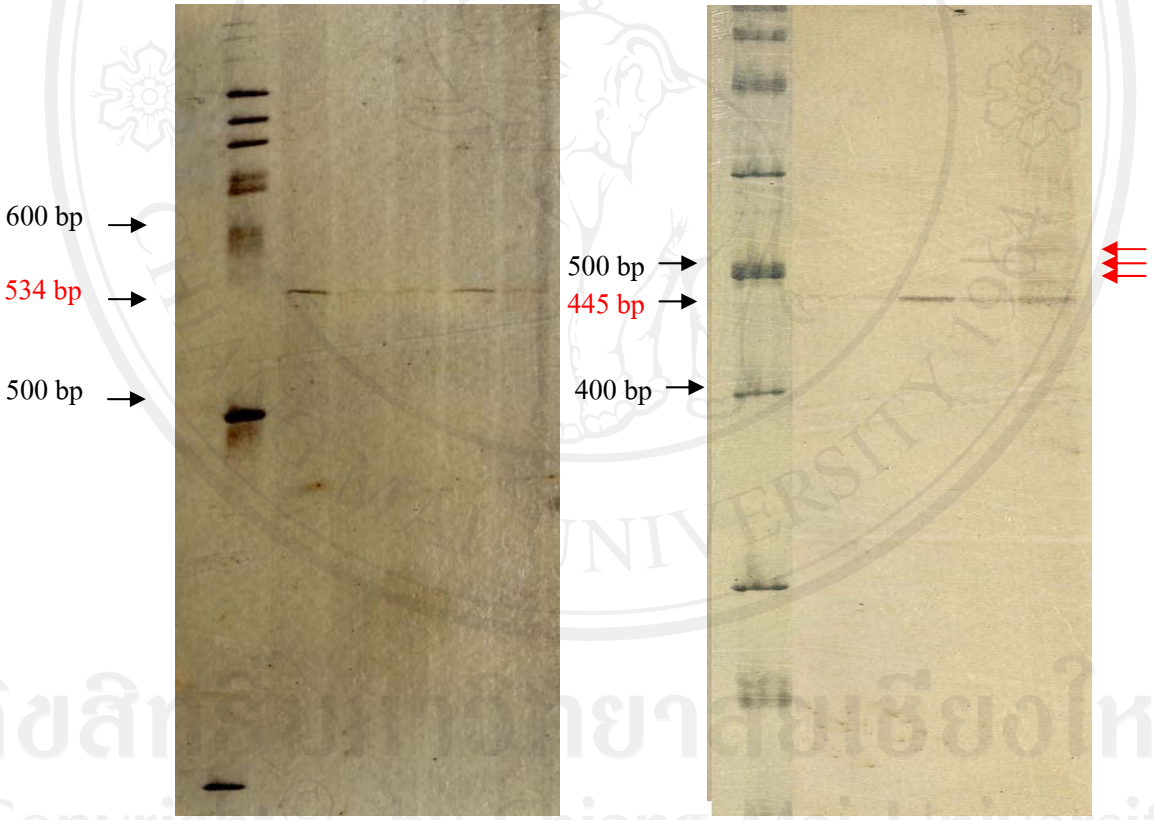
Y = *S. affinis* สีเหลือง M = *S. petri* สีบานเย็น

1 = ระยะดอกตูม 2 = ระยะดอกแรกแย้ม 3 = ระยะดอกบาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.6 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแถบคัดเลือก

จากการตัดแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มตัวอย่าง เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ และตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์บน 6% polyacrylamide gel พบว่าส่วนใหญ่แถบดีเอ็นเอที่ได้มีเพียงแถบเดียว ชัดเจน และตรงกับขนาดที่ต้องการ (ภาพที่ 14A) เว้นแต่แถบขนาด 445 bp ของ *S. petri* สีบานเย็น ระยะดอกบาน โดยไพรเมอร์ OPAB19 ที่พบแถบดีเอ็นเอที่ไม่ตรงกับขนาดที่ต้องการอยู่ด้วยบ้างในครั้งแรก (ภาพที่ 14B) จึงทำการตัดแถบดีเอ็นเอนี้อีกครั้งเพื่อเพิ่มปริมาณอีกครั้งจนได้แถบเดียว ชัดเจน



ภาพที่ 14 ตัวอย่างผลการตรวจสอบตำแหน่งผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณแถบดีเอ็นเอ
A : ขนาด 534 bp ของ *S. plicata* สีชมพู ระยะดอกบาน โดยใช้ไพรเมอร์ OPF14
B : ขนาด 445 bp ของ *S. petri* สีบานเย็น ระยะดอกบาน โดยใช้ไพรเมอร์ OPAB19
ลูกศรสีแดง แสดงแถบดีเอ็นเอที่ไม่ตรงกับขนาดที่ต้องการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.7 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอ

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอที่คัดเลือกมา 10 แถบ ได้แก่

1. แถบขนาด 534 bp ของ *S. plicata* สีชมพู ระยะดอกตูม โดยไพรเมอร์ OPF14
2. แถบขนาด 534 bp ของ *S. plicata* สีชมพู ระยะดอกบาน โดยไพรเมอร์ OPF14
3. แถบขนาด 373 bp ของ *S. plicata* สีม่วง ระยะดอกบาน โดยไพรเมอร์ OPF14
4. แถบขนาด 337 bp ของ *S. plicata* สีม่วง ระยะดอกบาน โดยไพรเมอร์ OPF14
5. แถบขนาด 270 bp ของ *S. affinis* สีเหลือง ระยะดอกตูม โดยไพรเมอร์ OPF14
6. แถบขนาด 445 bp ของ *S. plicata* สีม่วง ระยะดอกแรกแย้ม โดยไพรเมอร์ OPAB19
7. แถบขนาด 445 bp ของ *S. plicata* สีม่วง ระยะดอกบาน โดยไพรเมอร์ OPAB19
8. แถบขนาด 445 bp ของ *S. plicata* สีชมพู ระยะดอกบาน โดยไพรเมอร์ OPAB19
9. แถบขนาด 445 bp ของ *S. affinis* สีเหลือง ระยะดอกบาน โดยไพรเมอร์ OPAB19
10. แถบขนาด 445 bp ของ *S. petri* สีบานเย็น ระยะดอกบาน โดยไพรเมอร์ OPAB19

โดยส่งผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ให้บริษัท 1st BASE ประเทศมาเลเซีย ข้อมูลที่ได้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 สาย จึงนำมา alignment เพื่อยืนยันความถูกต้องของทั้ง 2 สายโดยใช้โปรแกรม DNAMAN พบว่าตัวอย่างที่ 5 มีค่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความเหมือนกัน (identity) สูงที่สุดคือ 44% (ภาคผนวก) และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย reverse primer ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) พบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีน *Sorghum bicolor* hypothetical protein, *Zea mays* tousled-like kinase 2, *Oryza sativa* Japonica Group Os03g0113500 (Os03g0113500) mRNA และ *Plasmodium yoelii* yoelii str. 17XNL chloroquine resistance marker protein (PY02945) partial mRNA (ตารางที่ 3)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความคล้ายคลึงกับลำดับพันธุกรรมของแถบดีเอ็นเอแถบที่ 5 บนฐานข้อมูลของ GenBank

Accession	Length (bp)	ยีนที่มีความคล้ายคลึงกัน	% identity	E-value
XM_002463829.1	2240	*Sorghum bicolor* hypothetical protein	87%	1.9
NM_001111776.1	2729	*Zea mays* tousled-like kinase 2	87%	2.0
NM_001055271.2	4146	*Oryza sativa* Japonica Group Os03g0113500 (Os03g0113500) mRNA	87%	6.8
XM_725807.1	19911	*Plasmodium yoelii* yoelii str. 17XNL chloroquine resistance marker protein (PY02945) partial mRNA	81%	6.8

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved