บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอ

อาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพดีควรมีอัตราส่วนของค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 เท่ากับ 1.9-2.0 จึงจะแสดงว่าอาร์เอ็นเอไม่มีการปนเปื้อนของโปรตีนและดีเอ็นเอ และเมื่อตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธีอิเล็คโตรโฟริซิสด้วยอกาโรสเข้มข้น 1.2% แล้วต้องเห็นแถบอาร์เอ็นเอที่ชัดเจนเพียงสองแถบ ไม่เป็นปื้น และไม่มีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอ (Hongbo *et al.*, 2008) ซึ่งการสกัดอาร์เอ็นเอจากเอื้องดินใบหมาก 3 ชนิด 5 ตัวอย่างที่มีสีดอกต่างกัน ทั้ง 3 ระยะ คือ ระยะดอกตูม (ระยะที่ 1) ดอกตูมก่อนบาน (ระยะที่ 2) และดอกบาน (ระยะที่ 3) เมื่อวัดค่าดูดกลืนแสงของอาร์เอ็นเอ ที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 ได้อัตรส่วน 2.2 ซึ่งถือว่ามีคุณภาพค่อนข้างดี เมื่อตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธีอิเล็คโตรโฟริซิสด้วยอกาโรสเข้มข้น 1.2% พบว่าอาร์เอ็นเอที่ได้ปรากฏเป็นแถบชัดเจน แต่ยังมีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอในส่วนบนของเจล ซึ่งจะส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณซีดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป หากไพรเมอร์ที่ใช้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนได้ อาจทำให้การแปลผลผิดพลาด (Maier *et al.*, 1992) การกำจัดดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนออกจากอาร์เอ็นเอโดยเอนไซม์ DNase I พบว่าแถบอาร์เอ็นเอมีความคมชัดขึ้น และไม่มีส่วนปนเปื้อนของดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอที่ได้จัดว่ามีคุณภาพดี และสามารถใช้เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ (Manoj *et al.*, 2008)

5.2 การตรวจสอบคุณภาพซีดีเอ็นเอ

การตรวจสอบคุณภาพของซีดีเอ็นเอใช้คู่ไพรเมอร์ ndhB ซึ่งออกแบบเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนในคลอโรพลาสต์ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้าง NADH ซึ่งเป็นยีนที่ต้องมีการแสดงออกตลอดเวลา จึงสามารถนำมาใช้ตรวจสอบได้ว่ามีการสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอได้จริง (Maier *et al.*, 1992) เมื่อนำมาทดสอบผลการทำ reverse transcription ของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากกลีบดอกของเอื้องดินใบหมากพบแถบของซีดีเอ็นเอที่ได้ แสดงแถบที่ชัดเจนขนาดประมาณ 500 bp และมีเพียงแถบเดียว แสดงให้เห็นว่าการสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอ ไม่มีการปนเปื้อนของจีโนมิกดีเอ็นเอ เนื่องจากถ้ามีการปนเปื้อนจะทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าซีดีเอ็นเอที่ได้ เช่นเดียวกับ

การใช้คู่ไพรเมอร์ ndhB ในข้าวโพดพบว่าสามารถสังเคราะห์แถบซีดีเอ็นเอ ขนาด 500 bp และมีเพียงแถบเดียวเช่นกัน (Maier *et al.*, 1992)

5.3 การคัดกรองไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกล้วยไม้เอื้องดินใบหมาก

คู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอคือ ต้องสามารถเพิ่มดีเอ็นเอเป้าหมายได้ และได้ผลผลิตปริมาณมาก (สุรินทร์, 2545) แต่การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอกล้วยไม้เอื้องดินใบหมากด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ครั้งที่ 1 ยังไม่เห็นแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และมองเห็นเป็นแถบปื้นยาว ซึ่งอาจเกิดจากการที่ไพรเมอร์มีลำดับเบสไม่เหมาะสม จับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้ไม่ดี จึงไม่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดยาวต่อออกไปได้ หรือภายในดีเอ็นเอต้นแบบนั้นมีลำดับเบสคู่สมกับไพรเมอร์จำนวนมาก ทำให้ไพรเมอร์เข้าคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบได้หลายตำแหน่ง เกิดผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาดแตกต่างกันจำนวนมาก แต่มีปริมาณน้อย หรืออาจเนื่องจากเงื่อนไขของสภาวะการทำปฏิกิริยาไม่เหมาะสมกับไพรเมอร์ชนิดนี้ จึงทำให้เกิดผลผลิตพีซีอาร์เป็นแถบปื้นยาว (สุรินทร์, 2545) นอกจากนั้นการใช้ไพรเมอร์ที่มีความยาวน้อยเพียง 10 นิวคลีโอไทด์ ทำให้ไม่เจาะจงกับดีเอ็นเอต้นแบบ เนื่องจากไพรเมอร์สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้หลายตำแหน่ง จึงปรับการทดลองโดยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 2 ครั้ง พบว่าแถบดีเอ็นเอชัดเจนขึ้น แสดงให้เห็นว่าการเข้าจับของไพรเมอร์มีความจำเพาะมากยิ่งขึ้น มองเห็นปื้นลดน้อยลง ซึ่งสอดคล้องกับ Roux *et al.* (1998) ซึ่งศึกษายีนที่ตอบสนองต่อออกซินในยาสูบโดยวิธี mRNA differential display โดยเริ่มต้นทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ครั้งแรก 40 รอบ ผลพบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้ไม่ชัดเจน และพบแถบปื้นยาวชัดมาก ทำให้ไม่สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจน จึงเพิ่มปฏิกิริยาอีกครั้งโดยใช้ผลผลิตพีซีอาร์ครั้งที่ 1 ไปเจือจางกับน้ำในอัตราส่วน 1 : 10 โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยาเช่นเดิม ทำปฏิกิริยาอีก 25 รอบ พบว่าสามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจน แถบปื้นยาวน้อยลง สามารถนำมาใช้จัดกลุ่มแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้

จากการคัดกรองไพรเมอร์ทั้งหมด 58 ไพรเมอร์ พบว่ามีไพรเมอร์เพียง 8 ชนิดเท่านั้นที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ ส่วนอีก 50 ไพรเมอร์ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้นั้น อาจเกิดจากไพรเมอร์ไม่มีเบสคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ หรือช่วงของ primer annealing อาจไม่เหมาะสมกับไพรเมอร์ จึงทำให้ไพรเมอร์ไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอต้นแบบเพื่อสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอต่อไปได้ จึงไม่เกิดผลผลิตพีซีอาร์ (สุรินทร์, 2545) ไพรเมอร์ 8 ชนิดที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้นั้น พบว่ามี 5 ชนิดที่ให้ลักษณะแถบที่แตกต่าง (polymorphic) แต่แถบที่ได้ไม่มีความจำเพาะต่อกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษา เนื่องจากไม่สามารถเพิ่ม

ปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างได้ครบทั้ง 5 ชนิด 3 ระยะ จึงมีไพรเมอร์เพียง 3 ชนิด ได้แก่ OPD16, OPF14 และ OPAB19 เท่านั้นที่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอของทุกตัวอย่าง และสามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างได้ เช่นเดียวกับการศึกษาการแสดงออกของยีนที่จำเพาะต่อการสร้างรวงของข้าวสาลีด้วยเทคนิคดีดีอาร์ที-พีซีอาร์ โดยสกัดอาร์เอ็นเอจากรวงข้าวสาลี ใบแก่ เกสรเพศผู้ เกสรเพศเมีย รังไข่ และราก และคัดเลือกไพรเมอร์แบบสุ่ม 76 ชนิด เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ พบว่ามีไพรเมอร์ 43 ชนิดไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ และมี 19 ชนิดที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายได้ ให้ลักษณะแถบที่แตกต่าง (polymorphic) แต่แถบที่ได้ไม่มีความจำเพาะต่อตัวอย่างทั้ง 6 ระยะ และมีเพียง 13 ชนิด เท่านั้นที่ให้แถบที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อรวงข้าวสาลี ซึ่งสามารถวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีน *LEAFY* และ *APETALA1* ใน *Arabidopsis* ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเนื้อเยื่อเจริญ และยังคล้ายกับยีน *UFO* ซึ่งเป็นยีนที่จำเพาะต่อการสร้างดอกใน *Arabidopsis* (Ogihara *et al.*, 1998)

5.4 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนโดยใช้เทคนิคดีดีอาร์ที-พีซีอาร์

ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่ต่างกันระหว่างกลีบดอกเอื้องดินใบหมากทั้ง 5 ตัวอย่าง 3 ระยะด้วยไพรเมอร์ 3 ชนิด ได้แก่ OPD16, OPF14 และ OPAB19 ร่วมกับ anchored primer $dT_{12}VG$ พบแถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างกันทั้งหมด 9 แถบ ที่แตกต่างกันตามกลุ่มของเอื้องดินใบหมากทั้ง 5 ชนิด แถบกลุ่มนี้มีความเข้มแถบเท่ากันในกลีบดอกแต่ละระยะ แสดงให้เห็นถึงระดับการแสดงออกของยีนตลอดระยะการพัฒนาดอก จากความแตกต่างกันนี้แสดงให้เห็นถึงการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันของเอื้องดินใบหมากแต่ละชนิด ที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณโดยไพรเมอร์แบบสุ่ม และแถบที่ได้มีความจำเพาะเจาะจงกับกล้วยไม้เอื้องดินใบหมากทั้ง 5 กลุ่มสี เช่นเดียวกับการศึกษาแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอและแถบเครื่องหมายดีเอ็นเอในกล้วยไม้กลุ่มเขาแกะและกลุ่มช้าง โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 24 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์ที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ 2 ชนิด และไพรเมอร์อีก 15 ชนิด สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้ทั้ง 2 กลุ่มได้ แต่ไม่เหมาะสำหรับการใช้จัดกลุ่มแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ทั้ง 2 กลุ่มได้ และพบว่ามีไพรเมอร์เพียง 7 ชนิดเท่านั้นที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้และสามารถนำมาจัดกลุ่มแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกล้วยไม้ทั้ง 2 กลุ่มได้ (สุพัตรา, 2547)

ส่วนไพรเมอร์ OPF14 ให้แถบขนาด 373 bp และไพรเมอร์ OPAB19 ให้แถบขนาด 445 bp ที่มีความเข้มของแถบเพิ่มมากขึ้นในแต่ละระยะการเจริญเติบโตแสดงให้เห็นว่าเป็นยีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อระยะการพัฒนามากขึ้น เช่นเดียวกับการศึกษาการแสดงออกของยีนในระหว่างการ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

พัฒนาดอกของคาร์เนชั่นในระยะดอกตูมและดอกบาน โดยพบว่ามี 21 โคลนจาก 35 โคลน ที่มีการแสดงออกที่สัมพันธ์กับยีนที่เกี่ยวกับการพัฒนาของดอก โดย 13 โคลน มีการแสดงออกเฉพาะในดอกบานแล้วเท่านั้น และอีก 8 โคลน มีการแสดงออกในดอกตูมและเพิ่มมากขึ้นในระยะดอกบาน (Ok *et al.*, 2003)

5.5 การวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอ

จากการวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ได้จากการคัดกรองยีนของกล้วยไม้เอื้องดินใบหมากโดยเทคนิคดีดีอาร์ที-พีซีอาร์ พบว่าไพรเมอร์ OPD16, OPF14 และ OPAB19 มีเปอร์เซ็นต์แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มตัวอย่าง 14.29%, 13.95% และ 1.66% ตามลำดับ ซึ่งความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้นั้นเกิดจากใช้ ไพรเมอร์ชนิดสุ่ม ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ไพรเมอร์ที่ให้เปอร์เซ็นต์แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มตัวอย่างสูง แสดงว่าตำแหน่งที่ไพรเมอร์เข้าไปจับและเพิ่มปริมาณนั้นเป็นตำแหน่งที่บ่งบอกความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างได้ดี ส่วนไพรเมอร์ที่ให้เปอร์เซ็นต์แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มตัวอย่างต่ำแสดงว่าตำแหน่งที่ไพรเมอร์เข้าไปจับและเพิ่มปริมาณนั้นยังใช้บ่งบอกความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างได้ไม่ดีเท่าที่ควร อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกไพรเมอร์ทั้ง 3 ชนิด แม้ว่าจะมีเปอร์เซ็นต์แถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มตัวอย่างค่อนข้างต่ำ เนื่องจากคัดเลือกแถบที่ให้ความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ชัดเจน ที่คาดว่าจะพบข้อมูลที่ใช้บ่งบอกความแตกต่างระหว่างกลุ่มของกล้วยไม้ทั้ง 5 ชนิดได้

5.6 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแถบที่คัดเลือก

ภายหลังจากการตัดแถบดีเอ็นเอที่น่าสนใจมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ อย่างไรก็ตามพบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้เป็นแถบที่มีขนาดตรงตามที่ต้องการ ในบางตัวอย่างมีแถบดีเอ็นเอที่ไม่ตรงกับขนาดที่ต้องการอยู่ด้วย ซึ่งอาจเป็นเพราะความไม่สม่ำเสมอในการทำปฏิกิริยาอาจมีผลจากการเกิดความเปลี่ยนแปลงในหลอดทดลอง เช่นมีการปนเปื้อน หรือเสื่อมสภาพขององค์ประกอบพีซีอาร์และปฏิกิริยาพีซีอาร์นั้นมีความไวสูงมาก เมื่อทำซ้ำจึงไม่เหมือนเดิมทุกประการ (สุรินทร์, 2545) อีกทั้งไพรเมอร์ที่ใช้มีขนาดค่อนข้างสั้น ทำให้สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้หลายตำแหน่ง ผลที่ได้จึงไม่สม่ำเสมอ (Weising *et al.*, 1995) ซึ่งในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแถบที่คัดเลือกนี้จึงต้องทำหลายครั้ง โดยเพิ่มเวลาของการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์บน

6% polyacrylamide gel ให้นานขึ้นกว่าเดิม เพื่อให้แถบดีเอ็นเอแยกออกจากกันชัดเจน และทำการตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการนั้นไปเพิ่มปริมาณอีกครั้งหนึ่ง จนได้แถบดีเอ็นเอที่มีเพียงแถบเดียวชัดเจน และตรงกับขนาดที่ต้องการ

5.7 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอ

จากการคัดเลือกแถบดีเอ็นเอทั้ง 10 แถบ ที่คัดเลือกจากแถบที่มีความน่าสนใจ มีความคมชัด และสามารถบ่งบอกความแตกต่างระหว่างกลุ่มของกล้วยไม้ทั้ง 5 ชนิดได้อย่างชัดเจน ซึ่งคาดว่าจะได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการคัดเลือกเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ และคาดว่าจะมีศักยภาพในการบ่งชี้ความแตกต่างทางพันธุกรรมที่สัมพันธ์กับลักษณะของดอกเอื้องดินใบหมาก

ตัวอย่างแถบที่คัดเลือกมา alignment เพื่อยืนยันความถูกต้องของทั้ง 2 สายโดยใช้โปรแกรม DNAMAN คือ แถบขนาด 270 bp จาก *S. plicata* สีชมพู ระยะดอกตูม โดยไพรเมอร์ OPF14 ซึ่งมีเบสที่มีความเหมือนกัน (identity) สูงที่สุด และเมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) พบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีน *Sorghum bicolor* hypothetical protein, *Zea mays* tousled-like kinase 2 และ *Oryza sativa* Japonica Group Os03g0113500 (Os03g0113500) mRNA ซึ่งส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องกับพืชทั้งสิ้น ได้แก่ ข้าวฟ่าง ข้าวโพด และ ข้าว ตามลำดับ ยกเว้นเพียงแต่ยีน *Plasmodium yoelii* yoelii str. 17XNL chloroquine resistance marker protein (PY02945) partial mRNA ที่เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนที่ต้านทานต่อเชื้อมาลาเรีย ผลการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลแม้ว่าจะเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับพืช ซึ่งยังไม่พบข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับพันธุกรรมกล้วยไม้แต่อย่างใด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเทคนิคดีดีอาร์ที-พีซีอาร์นี้ใช้ไพรเมอร์ชนิดสุ่มที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เพียง 10 เบส จึงทำให้ความสามารถในการเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบจับได้หลายตำแหน่ง ทำให้ผลที่ได้จึงไม่สม่ำเสมอ (Weising *et al.*, 1995) ในการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปอาจมีการปรับการทดลองโดยเพิ่มความยาวของไพรเมอร์ขึ้นเพื่อความจำเพาะเจาะจงในการเข้าจับทำปฏิกิริยา หรือหากต้องการบ่งชี้ในระดับสูงกว่านี้เพื่อให้โพลีมอร์ฟิซึมจำนวนมากและทำซ้ำได้มาก อาจใช้เทคนิคอื่นเช่น เทคนิค RFLP หรือเทคนิค AFLP อย่างไรก็ตามเทคนิคเหล่านี้มีความซับซ้อนยุ่งยาก ต้องใช้ความชำนาญสูง หรืออาจใช้เทคนิค SSR ที่สามารถให้โพลีมอร์ฟิซึมจำนวนมาก ไม่ซับซ้อนยุ่งยาก แต่ต้องมีข้อมูลทางพันธุกรรมมากกว่าเทคนิคดีดีอาร์ที-พีซีอาร์ ดังนั้นเทคนิคดีดีอาร์ที-พีซีอาร์จึงยังเป็นที่นิยมเนื่องจากสามารถปฏิบัติงานได้ง่าย และไม่ต้องมีข้อมูลทางพันธุกรรมมากนัก (Chen *et al.*, 2004)