ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. โคลนบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *accD* ปาล์มมันพันธุ์เทเนอรา (tenera) ดูรา (dura) และ พิสิเฟอรา (pisifera)
2. หาลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *accD* ในปาล์มน้ำมันทั้ง 3 พันธุ์และวิเคราะห์ตำแหน่งอนุรักษ์ด้วยชีวสารสนเทศ
3. ออกแบบไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการทำ SNP genotyping
4. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ที่เชื่อมโยงกันระหว่างระหว่าง SNPs บนโปรโมเตอร์ของยีน *accD* ในปาล์มน้ำมันทั้ง 3 พันธุ์

วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

ตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันพันธุ์ *E. guineensis* สายพันธุ์ เทเนอรา ดูรา พิสิเฟอรา จากแปลงทดลองของคณะทรัพยากรธรรมชาติที่มีการเก็บข้อมูลทางด้านผลผลิตและประวัติที่แน่นอน รวมทั้งพ่อแม่พันธุ์ เพื่อใช้สำหรับการสกัดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอในการทดลองวิจัย

การสกัดดีเอ็นเอ (DNA Extraction)

การสกัดดีเอ็นเอจากใบปาล์มน้ำมัน (ตามวิธีการของบริษัท Geneaid)

นำใบปาล์มน้ำมันซึ่งเก็บไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส ปริมาณ 0.1 g ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml เติมสารละลายบัฟเฟอร์ GT 200 ไมโครลิตร บดให้ละเอียดด้วย micropestle แล้วเติม Proteinase (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ GB 200 ไมโครลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จนกระทั่งเนื้อเยื่อตัวอย่างละลายหมด แล้วเติมสารละลายเอนไซม์ RNaseA (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที เติมเอทานอล 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นถ่ายโอนสารจากหลอดทดลองขนาด 1.5 ไมโครลิตร มาใส่ใน GD column บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วเติมสารละลายบัฟเฟอร์ W1 400 ไมโครลิตร นำมาหมุนเหวี่ยงความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างคอลัมน์ด้วยสารละลาย Wash buffer (ซึ่งมี 95% เอทานอล) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำมาหมุน

เหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง นำมาหมุนเหวี่ยงอีกครั้งด้วยความเร็วรอบเท่าเดิม จากนั้นย้ายคอลัมน์ไปยังหลอดทดลองขนาด 1.5 ไมโครลิตร ใช้น้ำปราศจาก nuclease ชะส่วนกลางของคอลัมน์ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis ใน TAE buffer และวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

โคลนยีนและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของโปรโมเตอร์

ออกแบบไพรเมอร์สำหรับศึกษาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของโปรโมเตอร์หน่วยย่อยของอะซิติล-โคเอ คาร์บอกซิเลส หรือคือยีน *accD* ด้วย Bioinformatics Tools และสังเคราะห์ไพรเมอร์เพื่อใช้ในการทำ PCR โดยการใช้น้ำยาชุดสำหรับการทำ Genome Chromosome Walking (BD Science) เพื่อสร้างชุดของโปรโมเตอร์ *accD* ชุดแรกและเพิ่มจำนวนสายโปรโมเตอร์ *accD* ที่ต้องการอีกครั้งด้วยการทำ Nested PCR โดยนำดีเอ็นเอที่ได้จากขั้นตอนที่ผ่านมา จำนวน 1 ไมโครลิตรมาผสมกับน้ำ 99 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน ดูดมา 5 ไมโครลิตร แล้วเติม 10x buffer 5 ไมโครลิตร $MgCl_2$ (25 มิลลิโมลาร์) 3 ไมโครลิตร dNTPs mix (10 มิลลิโมลาร์) 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ GSP 3 (10 ไมโครโมลาร์) 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ AP2 (10 ไมโครโมลาร์) 1 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 33.5 ไมโครลิตร บ่มที่ 94 องศาเซลเซียส 5 นาทีแล้วเติม pfu *Taq* DNA polymerase 0.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มให้เกิดปฏิกิริยาภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ดังต่อไปนี้คือ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 55 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 2 นาที 35 รอบ และ72 องศาเซลเซียส 10 นาที 4 องศาเซลเซียส 10 นาที 1รอบ ตรวจสอบผลผลิต ด้วย agarose gel electrophoresis ทำบริสุทธิ์ผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ด้วยชุดน้ำยา QIAquick PCR Purification ด้วยการเติม บัฟเฟอร์ PB (Binding buffer) ในปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรผลผลิตพีซีอาร์ ผสมให้เข้ากันดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ในคอลัมน์ หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที 1 นาที ทิ้งส่วนใส ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ PE (Wash buffer) 750 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที 1 นาที ทิ้งส่วนใส ทำการชะ PCR product ด้วยน้ำ 30 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บส่วนใส นำ PCR product ที่ได้มาตรวจคุณภาพด้วย 1.0% agarose gel electrophoresis และเชื่อมดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอพาหะ pGEM®- T Easy ในอัตราส่วน 3 : 1 ด้วย T4 DNA ligase ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง การนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* Top 10F' ตามวิธีการของ Maniatis, et. al., 1982 แล้วทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอลูกผสมตามวิธีของ Holmes และ Quigley, 1981 ทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอลูกผสมด้วย QIAprep Spin Miniprep Kits (QIAGEN) เพื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อตรวจสอบ

ลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์แบบแผนดีเอ็นเอด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ทางชีวสารสนเทศได้แก่ PromoterScan เป็นต้น เพื่อหาตำแหน่งอนุรักษ์ของโปรโมเตอร์ *accD*

ออกแบบเครื่องหมายโมเลกุล SNPs สำหรับทำ PCR โปรโมเตอร์ *accD* เป็นชุดแรก

ออกแบบไพร์เมอร์นำผลข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequence) ที่ได้จากการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ผลผลิตพีซีอาร์ในข้อที่ 3 ด้วย automated DNA sequencing โดยใช้โปรแกรม VectorNT I 10.0 และสังเคราะห์ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับโปรโมเตอร์ *accD* เพื่อทำใช้เป็นส่วนประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR กับตัวอย่างปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ เทเนอรา ดูรา พิสิเฟอรา สายพันธุ์ละ 3 ตัวอย่าง (รวมเป็น 9 ตัวอย่าง) ในปริมาณรวมของการเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสมที่ 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม, 2.5 Unit ของ pfu *Taq* polymerase , 10 x reaction buffer 2.5 ไมโครลิตร, 0.2 mM ของแต่ละ dNTP, 1.5 mM $MgCl_2$ และไพรเมอร์ที่มีความเข้มข้น 10 μM แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยา ดังนี้ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 1 รอบ, 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, 50-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จำนวน 35 รอบ และตามด้วย 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจสอบผลผลิต PCR (PCR product) ด้วย 1.5 % agarose gel electrophoresis ทำบริสุทธิ์ผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ด้วยชุดน้ำยา QIAquick PCR Purification นำ PCR product ที่ได้มาตรวจคุณภาพด้วย 1.0% agarose gel electrophoresis และเชื่อมดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอพาหะ pGEM®- T Easy ด้วย T4 DNA ligase ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม นำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* Top 10F' ตามวิธีการของ Maniatis, et. al., 1982 แล้วทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอลูกผสมตามวิธีของ Holmes และ Quigley, 1981 ทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอลูกผสมด้วย QIAprep Spin Miniprep Kits (QIAGEN) เพื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์แบบแผนดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม ClustalX 2.0 (Thompson et al. 1997) และโปรแกรม GENEDOC version 2.6 (; Nicholas and Nicholas 1997) เพื่อศึกษาความเหมือนและความแตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ในลำดับโปรโมเตอร์ของยีน *accD* จากตัวอย่างทั้ง 9 ตัวอย่าง จาก 3 สายพันธุ์เพื่อทำตรวจสอบตำแหน่งที่เป็น hot spot สำหรับการศึกษา SNP genotyping ของโปรโมเตอร์ของยีน *accD* และออกแบบเครื่องหมายโมเลกุล SNPs ที่มีความจำเพาะสูงเพื่อศึกษาตำแหน่งที่เป็น hot spot สำหรับการศึกษา SNP genotyping จำนวน 3 ชุด

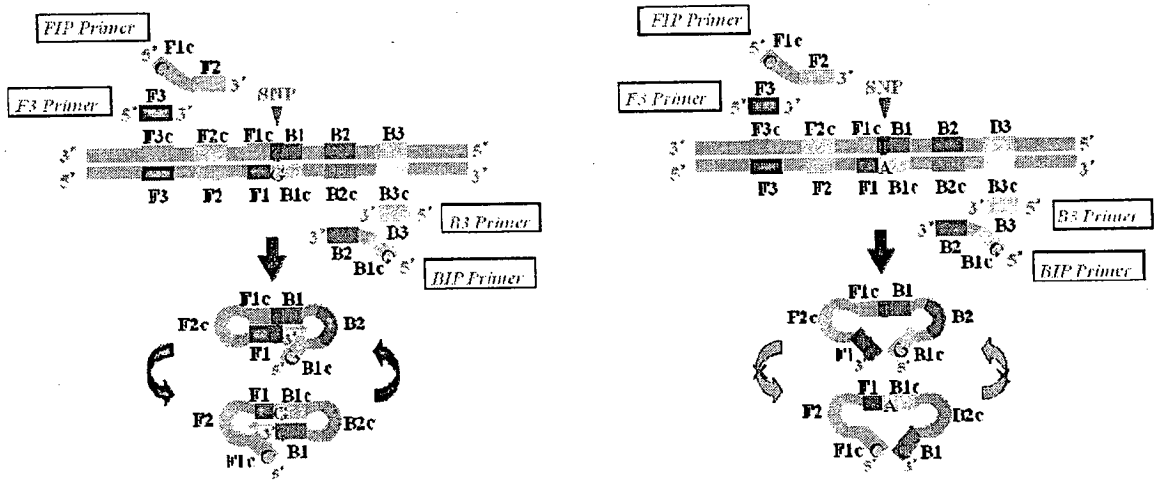
ศึกษา SNP genotyping ของโปรโมเตอร์ของยีน *accD*

ใช้เครื่องหมายโมเลกุล SNPs ที่มีความจำเพาะสูงเพื่อศึกษาตำแหน่งที่เป็น hot spot สำหรับการศึกษา SNP genotyping จำนวน 3 ชุดจากข้อ 4 เพื่อทำใช้เป็นส่วนประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR กับตัวอย่างปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ เทเนอรา ดูรา พิสิเฟอรา สายพันธุ์ละ 20 ตัวอย่าง

(รวมเป็น 60ตัวอย่าง) ในปริมาณรวมของการเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสมที่ 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม, 2.5 Unit ของ pfu *Taq* polymerase , 10 x reaction buffer 2.5 ไมโครลิตร, 0.2 mM ของ dNTP ทั้ง 4 ชนิด, 1.5 mM $MgCl_2$ และไพรเมอร์ที่มีความเข้มข้น 10 μM แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยาดังนี้ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 1 รอบ, 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที, 50-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที จำนวน 35 รอบ และตามด้วย 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจสอบผลผลิต PCR (PCR product) ด้วย 1.5 % agarose gel electrophoresis ทำบริสุทธิ์ผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ด้วยชุดน้ำยา QIAquick PCR Purification นำ PCR product ที่ได้มาตรวจคุณภาพด้วย 1.0% agarose gel electrophoresis และเชื่อมดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอพาหะ pGEM®- T Easy ด้วย T4 DNA ligase ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม นำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E.coli* Top 10F' ตามวิธีการของ Maniatis, et. al., 1982 แล้วทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอลูกผสมตามวิธีของ Holmes และ Quigley, 1981 ทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอลูกผสมด้วย QIAprep Spin Miniprep Kits (QIAGEN) เพื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ วิเคราะห์แบบแผนดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม ClustalX 2.0 (Thompson et al. 1997) และโปรแกรม GENEDOC version 2.6.001 (Garcia-Heras et al. 2005; Nicholas and Nicholas 1997) เพื่อศึกษาความเหมือนและความแตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโปรโมเตอร์ของยีน accD จากตัวอย่างเพื่อทำการตรวจสอบตำแหน่งที่เป็น hot spot สำหรับการศึกษา SNP genotyping ของโปรโมเตอร์ของยีน *accD*

ออกแบบเครื่องหมายโมเลกุล SNPs แบบลูปจากตำแหน่ง tranversion สำหรับทำ PCR โปรโมเตอร์ *accD*

ออกแบบไพร์เมอร์นำผลข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษาหลักการขั้นต้นของ LAMP-based SNPs typing และสังเคราะห์ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับโปรโมเตอร์ *accD* เพื่อทำเป็นส่วนประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR กับตัวอย่างปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ เทเนอรา ดูรา พิสิเฟอรา มีหลักการพื้นฐานเบื้องต้นที่พัฒนาขึ้นโดย โนโตมิและคณะ (2000) ซึ่งคล้ายกับการทำ PCR ได้แก่ เทคนิค Loop-Mediated isothermal amplification (LAMP) อาศัยการทำงานของเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase ที่เพิ่มจำนวนดีเอ็นเออย่างมีประสิทธิภาพความจำเพาะสูงด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อตำแหน่ง SNP ดังแสดงรูปแบบการเกิดลูปไพรเมอร์ ซึ่งจะสามารถเพิ่มจำนวนผลผลิตพีซีอาร์ได้เฉพาะในตัวอย่างที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ไป ดังในรูปซ้ายมือเท่านั้น



รูปที่ 5 แผนภาพแสดงตัวอย่างการทดสอบเครื่องหมายโมเลกุลด้วย LAMP-based SNPs typing

ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับจำแนกปาล์มน้ำมัน ทำการสกัดดีเอ็นเอจากใบปาล์มน้ำมันโดยใช้ Genomic DNA Kit (geneaid) แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันเพื่อใช้การจำแนกปาล์มน้ำมันสายพันธุ์เทเนอรา ด้วยเทคนิค Loop-mediate isothermal amplification ปริมาตรของปฏิกิริยาคือ 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย *Bst* DNA polymerase buffer ความเข้มข้น 10 เท่า, $MgSO_4$ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์, betaine ความเข้มข้น 1 โมลาร์, dNTP ทั้ง 4 ชนิด ความเข้มข้นอย่างละ 0.2 มิลลิโมลาร์ , ไพรเมอร์ F3, B3, FIP และ BIP ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์, ดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดจากปาล์มน้ำมันและน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที วางบนน้ำแข็งทันที 5 นาที เติมเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase ความเข้มข้น 1-8 ยูนิต ต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 55-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45-60 นาที เพื่อหาปริมาณเอนไซม์ อุณหภูมิ และเวลาที่เหมาะสมในทำงาน

ศึกษา SNP genotyping ของโปรโมเตอร์ของยีน *accD*

ใช้เครื่องหมายโมเลกุล SNPs ที่มีความจำเพาะสูงเพื่อศึกษาตำแหน่งที่เป็น hot spot สำหรับการศึกษา SNP genotyping จำนวน 3 ชุด เพื่อทำใช้เป็นส่วนประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR กับตัวอย่างปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ เทเนอรา ดูรา พิสิเฟอรา สายพันธุ์ละ 20 ตัวอย่าง (รวมเป็น 60 ตัวอย่าง) ในปริมาณรวมของการเกิดปฏิกิริยาที่เหมาะสม ด้วยเทคนิค Loop-mediate isothermal amplification ปริมาตรของปฏิกิริยาคือ 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย *Bst* DNA polymerase buffer ความเข้มข้น 10 เท่า, $MgSO_4$ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์, betaine ความเข้มข้น 1 โมลาร์, dNTP ทั้ง 4 ชนิด ความเข้มข้นอย่างละ 0.2 มิลลิโมลาร์ , ไพรเมอร์ F3, B3, FIP และ BIP ความเข้มข้น 10

ไมโครโมลาร์, ดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดจากปาล์มน้ำมันและน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที วางบนน้ำแข็งทันที 5 นาที เติมเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase ในความเข้มข้นที่เพียงพอแล้วนำไปบ่ม ที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม ตรวจสอบผลสำหรับการศึกษา SNP genotyping ของโปรโมเตอร์ของยีน *accD*

การศึกษาและวิเคราะห์ Association study และค่าทางพันธุกรรมต่างๆ ด้วยเครื่องมือทางชีวสารสนเทศ (Bioinformatics tools)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ได้มาเปรียบเทียบกันเพื่อจำแนกและศึกษาความหลากหลายของลำดับกับข้อมูลธนาคารยีน ซึ่งสามารถสืบค้นข้อมูลได้จาก Genbank เพื่อศึกษาความเหมือนและความแตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งที่อนุรักษ์ต่างๆ ของโปรโมเตอร์ *accD* ด้วยโปรแกรม MatInspector (Genomatix), PromoterScan และ AliBaba2.1 และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกันโดยใช้โปรแกรม ClustalX2.0 (Thompson et al. 1997) และโปรแกรม GENEDOC version 2.6.001 (Garcia-Heras et al. 2005; Nicholas and Nicholas 1997) ศึกษาความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโปรโมเตอร์ของยีน *accD* จากตัวอย่างใบปาล์มน้ำมัน ด้วยโปแกรม PHYLIP ศึกษา SNPs allele ที่แตกต่างกันในประชากรปาล์มน้ำมันทั้งสามสายพันธุ์ ทดสอบความสัมพันธ์ของแต่ละ SNPs เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง SNPs จากนั้นนำข้อมูลมาวิเคราะห์ เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันพันธุ์ *E. guineensis* สายพันธุ์ เทเนอรา ดูรา พิสิเฟอรา