

การพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ในกล้วยไม้ สกุลแวนด้าในประเทศไทย

Development of microsatellite marker in *Vanda* orchid (*Vanda* spp.) in Thailand

บุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ¹, สุปัน ไม้ตัดจันทร์², ชำรงศรี สิริยามัน¹, อรุณทัย ซาววา¹,
อภิญา สลิวงศ์¹, ศิริวรรณ รุ่งอินทร์¹ และ หทัยรัตน์ อุไรรงค์¹

Boonruanrat Ruangwised¹, Supan Maidudjun², Thammarong Siriyaman¹,
Aroonothai Sawwa¹, Apinya Sliwong¹, Siriwan Rung-in¹ and Hathairat Urairong¹

บทคัดย่อ: ไมโครแซทเทลไลต์ หรือ SSRs marker เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงและเป็น co-dominant marker ที่ใช้ศึกษาความแตกต่างของพันธุกรรมในประชากรของสิ่งมีชีวิตต่างๆ แม้ว่าการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้มีต้นทุนสูงและเสียเวลามาก แวนด้าเป็นกล้วยไม้ในวงศ์ Orchidaceae มีสมาชิกในวงศ์ประมาณ 50 ชนิดเท่านั้น เป็นกล้วยไม้ที่มีความสำคัญมากชนิดหนึ่งในกลุ่มไม้ตัดดอก มีราคาสูง บางชนิดมีกลิ่นหอม และมีความทนทานในการใช้มาก มีสีสันสวยงามหลากหลาย ซึ่งในประเทศไทยเป็นกล้วยไม้สกุลที่มีความสำคัญในการตัดดอกเพื่อส่งออก ในการวิจัยได้ใช้เทคนิคแมกเนติกบีด ไฮบริไดเซชัน (magnetic bead hybridization) เพื่อสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอชนิดที่มีดีเอ็นเอแกนซ้ำปริมาณมากสำหรับพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์สำหรับกล้วยไม้สกุลแวนด้า นำไปหาลำดับดีเอ็นเอแล้วออกแบบไพรเมอร์ขนาดสั้น โดยออกแบบไพรเมอร์จำนวน 101 คู่แล้วนำไปทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในกล้วยไม้แวนด้าพันธุ์พื้นเมืองของไทย 5 ชนิด พบว่ามีไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำนวน 64 ไพรเมอร์ โดยให้แถบดีเอ็นเอตั้งแต่ 1-9 อัลลิลโดยเฉลี่ยและมีค่าความถี่เฉลี่ย 1 อัลลิล จากการทดลองได้คัดเลือกไพรเมอร์จำนวน 25 คู่ที่แสดงผลของความแตกต่างทางพันธุกรรมจำนวน 1-3 อัลลิลในกล้วยไม้สกุลนี้ ผลการพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอสามารถนำไปสนับสนุนการศึกษารูปแบบความหลากหลายและตรวจวิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลแวนด้าต่อไปและไพรเมอร์ที่ได้ยังสามารถนำไปจำแนกความแตกต่างในกล้วยไม้สกุลใกล้เคียง กับสกุลแวนด้าได้

คำสำคัญ: ไมโครแซทเทลไลต์, ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ, แมกเนติกบีด, กล้วยไม้สกุลแวนด้า, *Vanda* spp., เครื่องหมาย SSRs

ABSTRACT: Microsatellite or simple sequence repeats (SSRs) are highly polymorphic, co-dominant genetic markers commonly used for population genetics analysis, although the development of microsatellites markers are cost and time-intensive. *Vanda* is a genus in the orchid family Orchidaceae which have only 50 species, is one of the most important florally. This genus and its allies are considered to be the most highly evolved of all orchids within Orchidaceae. The genus is very highly prized in horticulture for its showy, fragrant, long lasting and intensely colorful flowers. In Thailand, this orchid is very important genera for exporting as fresh cut flowers. In this study, we used magnetic bead hybridization method within enrichment library to develop microsatellite simple sequence repeats (SSRs) markers for *Vanda* orchids and applied to DNA sequencing to design primers from flanking regions. The 101 primer pairs sets were designed and amplified DNA of 5 natives *Vanda* orchids. The 64 primer pairs were successfully amplified and characterized by genotyping in 5 native species of *Vanda* orchids in Thailand. The number of alleles per locus ranged from 1-9 with the average number of alleles are 1. We have selected 25 specific primer pairs which showed polymorphism in 1-3 alleles in these orchids. The development of these markers will contribute to the studies or diversity patterns and fingerprinting for each variety with 10 to 15 primer pairs used. The 64 primer pairs we designed can be used to distinguish different ecotypes and species, and might be used for species related in genera *Vanda*.

Keywords: Microsatellite, DNA fingerprinting, Magnetic bead, *Vanda* Orchid, *Vanda* spp. SSRs marker

¹ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร 85 หมู่ 1 ตำบลรังสิต อำเภอรัญบุรี ปทุมธานี 12110
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 ถนนนาคะ-ดงมะดะ ต.รอบเวียง
อ.เมือง จ.เชียงราย
Horticulture Research Center, Horticulture Research Institute, Department of Agriculture, 72 Moo 1 Denha
- dongmada road, Tumbon Robvieng Amphur Moug, Chiang Rai.

บทนำ

แวนด้าเป็นกล้วยไม้ประเภทโมโนโพเดียล ไม่แตกกอ เจริญเติบโตไปทางยอด รากเป็นรากอากาศ ใบมีลักษณะกลม แบนหรือร่อง ใบซ้อนสลับกัน ช่อดอกจะออกด้านข้างของลำต้นสลับกับใบ ช่อดอกยาวและแข็ง กลีบนอกและกลีบในมีรูปร่างคล้ายคลึงกัน โคนกลีบแคบ และไปรวมกันที่โคนเส้นกลาง กลีบดอกในลำต้นใต้มีเดือยแหลมยื่นออกมาเป็นส่วนท้ายของปากกระเปาะ ปากกระเปาะของแวนด้าเป็นแบบธรรมดาแบน เป็นแผ่นหนาแข็ง และพุ่งออกด้านหน้า รูปลักษณะคล้ายช้อน หูกระเปาะทั้งสองข้างแข็งและตั้งขึ้น สีดอกมีมากมายแตกต่างกันตามแต่ละชนิด กล้วยไม้สกุลแวนด้าพบในป่าตามธรรมชาติประมาณ 40 ชนิด มีกระจายพันธุ์อยู่ในทวีปเอเชีย ตั้งแต่อินเดีย ศรีลังกา พม่า ไทย อินโดนีเซีย จนถึงฟิลิปปินส์ แวนด้าได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์ขึ้นอีกหลายพันธุ์ ปัจจุบันได้มีการจำแนกประเภทของแวนด้า โดยอาศัยรูปร่างลักษณะของใบออกเป็น 4 ประเภท คือ แวนด้าใบกลม มีลักษณะของใบกลมยาวทรงกระบอก ต้นสูง ช่อห่างสังเกตได้ที่ใบติดอยู่ห่างๆ กัน มีดอกช่อละหลายดอก แต่ดอกจะบานติดต้นอยู่คราวละ 2-3 ดอกเท่านั้น เมื่อดอกข้างบนบานเพิ่มขึ้น ดอกข้างล่างจะโรยไล่กันขึ้นไปเรื่อยๆ การปลูกใช้ดอกจึงนิยมปลิดดอกมากกว่าตัดดอกทั้งช่อ แวนด้าใบแบน ลักษณะใบแผ่แบนออก ถ้าตัดมาดูหน้าตัดจะเป็นรูปตัววี มีข้อถี่ปล้องสั้น ใบซ้อนชิดกัน ปลายใบโค้งลงและจักเป็นแฉก แวนด้าใบร่อง มีรูปทรงของใบและลำต้นคล้ายใบแบนมากกว่าใบกลม แวนด้าประเภทนี้ไม่พบในป่าธรรมชาติ การนำมาปลูกเลี้ยงเป็นพันธุ์ลูกผสมทั้งสิ้น โดยนำแวนด้าใบกลมมาผสมกับแวนด้าใบแบน แวนด้าก้านปลา มีรูปทรงของใบและลำต้น กิ่งใบกลมกับใบแบน พบตามป่าธรรมชาติ้น้อยมาก เพราะกล้วยไม้พันธุ์นี้เป็นหมันทั้งสิ้น กล้วยไม้สกุลแวนด้าในประเทศไทยเป็นไม้ตัดดอกเพื่อการส่งออกที่สำคัญรองลงมาจากกล้วยไม้สกุลหวายและได้ปรับปรุงสร้างสายพันธุ์ลูกผสมขึ้นมาหลายสายพันธุ์ มีเกษตรกรหลายรายได้เตรียมขอขึ้น

จดทะเบียนพันธุ์เพื่อผลิตเป็นกล้วยไม้ตัดดอก ในการจำแนกพันธุ์ยังไม่มีเครื่องหมายดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อสายพันธุ์ ดีเอ็นเอเครื่องหมายที่นิยมใช้กันมากได้แก่ ไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ (simple sequence repeat (SSRs)) เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายที่ความผันแปรสูงมากจึงนิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในการจำแนกพันธุ์พืชในระดับสายพันธุ์ในชนิดเดียวกันได้ดี (Martin และคณะ, 2004) เนื่องจาก microsatellite markers จะไม่ถ่ายทอดในระหว่างพืชชนิดเดียวกัน แต่การนำมาใช้งานจะต้องพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้ในพืชแต่ละชนิดและมักจะใช้ร่วมกันได้ยาก ดังนั้นจึงต้องพัฒนาเครื่องหมายดีเอ็นเอใหม่ตลอดเวลา แม้ว่าบางครั้งจะพบการถ่ายทอด SSRs ระหว่างพืชชนิดที่ใกล้เคียงกันบ้าง ในการพัฒนาขึ้นมาจะต้องสร้างห้องสมุดของไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellite-enriched libraries) ซึ่งปัจจุบันมีหลายเทคนิค จากการทดลองของ Martin และคณะ (2004) ได้ใช้เทคนิค magnetic capture พบว่า ได้ขึ้นดีเอ็นเอที่มีชิ้นส่วนของไมโครแซทเทลไลต์มากถึง 95.8 % และมีชิ้นส่วนที่มีขนาดยาวอยู่ 30.8 % จึงเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงมากจึงใช้วิธีดังกล่าวในการทดลองครั้งนี้

วิธีการศึกษา

ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลแวนด้า (*Vanda* spp.) และการสกัดดีเอ็นเอ

สกัดแยกกรดนิวคลีอิกจากกล้วยไม้สกุลแวนด้า (*Vanda* spp.) ที่ได้คัดเลือกไว้ 20 สายพันธุ์ จากสวนกล้วยไม้เกษตรกรในจังหวัดราชบุรีและจังหวัดเชียงใหม่ และศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย นำใบอ่อนมาบดในไนโตรเจนเหลวจนละเอียดเป็นผง แล้วนำไปสกัดดีเอ็นเอด้วย CTAB ตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยแยกด้วย 1% agarose gel electrophoresis แล้วย้อมเจลดด้วยสารละลาย Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร นำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transluminators พร้อมบันทึกภาพ รวมดีเอ็นเอด้วยกันและทำการวัดปริมาณดีเอ็นเอ จากนั้น

เชื้อจากดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C สำหรับนำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะต่อไป

การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอต้นแบบ

ตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยการนำดีเอ็นเอปริมาณรวม 2,000 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 นาทีด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม PCR (Thermal Cycle 9700) เก็บตัวอย่างไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำดีเอ็นเอมาเชื่อมต่อกับ Adaptor โดยเตรียม Adaptor ชนิดปลายเหนียว โดยการสังเคราะห์ oligo primer 2 สาย ที่มีปลายเป็นตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Mbo* I ซึ่งจะใช้ต่อกับดีเอ็นเอของกล้วยไม้ที่ตัดด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกันแล้ว มีลำดับเบสดังนี้ Sticky end adaptor (*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 ผสมให้เข้ากันดีโดยการดูดปล่อยด้วยไปเปิดนำไปตกตะกอนแล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาทีในเครื่องฟิชอาร์ แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่น 40 ไมโครลิตรแล้วเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จะได้ดีเอ็นเอสายคู่ชนิดปลายเหนียวดังนี้

Adaptor 5' GGC CAG AGA CCC CAA GCT TCG 3'
5' CCG GTC TCT GGG GTT CGA AGC
CTA G - PO4 3'

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 ผสมให้เข้ากันโดยดูดสารละลายขึ้นลงด้วยไปเปิด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน หรือที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที ตรวจสอบผลการตัดต่อเอนไซม์ด้วยการทำ เจลอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วย อะกาโรส 2 % นำดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ Oligo A และ Oligo B ให้มีปริมาณมากขึ้นสำหรับการทดลองในขั้นตอนต่อไป จากนั้นทำการคัดขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่คัดเลือกโดยนำดีเอ็นเอทั้งหมดที่เชื่อมต่อ Adapter และเพิ่มปริมาณด้วยการทำฟิชอาร์มา ทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้ อะกาโรสชนิด low melting point 1 % แล้วตัดเจลบริเวณดีเอ็นเอที่มีขนาด 400-1000 คู่เบส ทำการแยกดีเอ็นเอจากเจลด้วยการใช้ QIAquick gel extraction kit (QIAGEN) ตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสอีกครั้งเพื่อดูว่ามีดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการหรือไม่ ซึ่งดีเอ็นเอนี้จะใช้เป็นต้นแบบสำหรับการทำฟิชอาร์ต่อไป นำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาด 400-1000 คู่เบสให้เพิ่มมากขึ้นด้วยเทคนิคฟิชอาร์ ด้วย Hot star taq PCR Master Mix Kit (QIAGEN) โดยใช้ DNA-adaptor เป็นไพรเมอร์ ตรวจสอบด้วยอะกาโรส เจล 1.5 % ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการโพรบต่อไป

การคัดเลือกชิ้นส่วนไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอด้วย 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 ซึ่งติดฉลากไบโอดีนเพื่อทำเป็นโพรบตรวจจับดีเอ็นเอที่เราตัดและคัดเลือกลำดับไว้ นำมา เชื่อมต่อกับ streptavidine-coated magnetic beads (M2-80 Dynabeads : Streptavidin-coated magnetic beads , Invitrogen) จะได้โพรบที่มีปลายข้างหนึ่งเป็นแม่เหล็ก นำโพรบที่ติดแม่เหล็กทั้งหมดไปทำไฮบริดเชนซ์กับชิ้นดีเอ็นเอขนาด 400-1000 คู่เบสที่เตรียมไว้ ใช้ดีเอ็นเอปริมาตร 20-30 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดพีซีอาร์ นำไปป้อนในเครื่องพีซีอาร์ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกดีเอ็นเอให้เป็นสายเดี่ยว แล้วแช่น้ำแข็งทันที ดูดสารละลายที่มีดีเอ็นเอทั้งหมดนี้เติมลงในหลอดไมโครที่มีโพรบที่เตรียมไว้นั้น ผสมให้เข้ากันดีด้วยปิเปต นำไปป้อนในเครื่อง incubator shaker ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และเปิดเขย่าเบาๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวางบน magnetic stand ดีเอ็นเอที่มีเบสคู่สมกับโพรบจะถูกไฮบริดและดูดติดกับแม่เหล็กอยู่ข้างหลอด แล้วดูดน้ำทิ้งไป ดึงหลอดออกจากแท่นแม่เหล็ก แล้วละลายตะกอนข้างหลอดด้วย 2X SSC ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นล้างด้วย 2 X SSC ปริมาตร 1 มล. อีก 4 ครั้ง โดยแต่ละครั้งให้ป้อนทิ้งไว้ 5 นาที ก่อนดูด 2X SSC ทิ้งไป แล้วล้างด้วย 1 X SSC ปริมาตร 1 มล. อีก 4 ครั้ง โดยแต่ละครั้งให้ป้อนทิ้งไว้ 5 นาที ก่อนดูด 1X SSC ทิ้งไป ในขั้นตอนสุดท้าย ละลายตะกอนที่ได้ด้วย น้ำหรือ TE 50 μ l ป้อนทิ้งไว้ที่ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อแยกแม่เหล็กออกจากดีเอ็นเอ แล้ววางบน magnetic stand ดูดน้ำไลที่มีดีเอ็นเอที่ต้องการเก็บไว้ทำพีซีอาร์ต่อไป ส่วน beads นำไปละลายด้วย TE หรือน้ำ 50 μ l เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส นำกลับมาใช้ได้

การสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์

เมื่อได้ชิ้นดีเอ็นเอ นำมาตรวจสอบด้วยอะกาโรส เจล 1.5 % ถ้ามีแถบดีเอ็นเอขนาด 400-1000 คู่เบสจึง

นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออีกครั้งด้วยไพรเมอร์ OligoA ดีเอ็นเอที่ได้นี้จะป้อนไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ นำดีเอ็นเอที่ตรวจสอบแล้วนั้นมาโคลนเข้าในเวกเตอร์ TA Cloning Kit (Invitrogen) ซึ่งใช้เวกเตอร์ 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 ตรวจสอบผลการโคลนด้วยการทำเจลิอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วยอะกาโรส 1.5 % นำตัวอย่างส่งให้บริษัทเอกชนนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 101 โคลน

การออกแบบไพรเมอร์และทดสอบดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิดไมโครแซทเทลไลท์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ 101 สาย มาออกแบบไพรเมอร์จำเพาะของดีเอ็นเอแต่ละชิ้นโดยใช้โปรแกรม Prim3 แล้วสังเคราะห์ไพรเมอร์และนำมาคัดเลือกหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมด้วยการทดสอบการทำพีซีอาร์โดยการนำ ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลแวนดา จำนวน 5 สายพันธุ์โดยใช้ไพรเมอร์ 101 คู่ โดยใช้ค่า Tm ตามโปรแกรมคำนวณได้ ตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้โดยใช้เมตาฟอร์ 3 % ซึ่งเตรียมโดยใช้ อะกาโรส 1 ส่วน เมตาฟอร์ 2 ส่วน ซึ่งการละลายเมตาฟอร์จะต้องค่อยๆ เทลงไปใน TE buffer ที่กวนด้วยเครื่อง magnetic stirrer อยู่ตลอดเวลาให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปหลอมให้ละลายอย่างดีในไมโครเวฟที่เปิดไฟกลางนาน 5 นาที โดยนำออกมาแกว่งทุกๆ 1 นาที ก่อนนำไปใช้งานต่อไป ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเมทิเดียมโบรไมด์ อ่านแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏด้วย เครื่อง Gel documentation และบันทึกผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การสร้าง SSR-enrich library

การสร้าง SSR library โดยปรับปรุงจากวิธีการของ Bloor และคณะ (2001) ตัดจีโนมดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Mbo* I แล้วนำไปเชื่อมต่อกับอะแดปเตอร์ชนิดปลายเหนียวเพื่อให้เป็นบริเวณสำหรับไพรเมอร์เข้าเกาะจับ โดยการเตรียมอะแดปเตอร์ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นสายตรงข้ามกับรอยตัดของเอนไซม์ *Mbo* I ซึ่งจะทำให้เพิ่มปริมาณได้เป็นจำนวนมากเพียงพอสำหรับการนำไปทำไฮบริดเซชันกับโพรบดีเอ็นเอที่เตรียมไว้ด้วยการสังเคราะห์จำนวน 14 โพรบดังกล่าวจากการทดลองเมื่อนำจีโนมดีเอ็นเอไปตัดและเชื่อมต่อไปแล้วได้ดีเอ็นเอตามต้องการ นำดีเอ็นเอที่ได้ไปแยกด้วยอะกะโรสเจลชนิดหลอมละลายที่อุณหภูมิต่ำแล้วตัดแยกดีเอ็นเอโดยการตัดเอาจากเจลบริเวณที่มีขนาด 400-1000 คู่เบสโดยการเปรียบเทียบกับ 100 bp DNA marker แยกดีเอ็นเอจากเจลดังแสดงใน Figure 1A นำดีเอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มปริมาณด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ชนิดเดียวกับอะแดปเตอร์ทำให้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาด 400 -1000 คู่เบส ได้ปริมาณมากดังแสดงใน Figure 1B จากนั้นจึงนำดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคพีซีอาร์นี้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการทำไฮบริดเซชันกับโพรบต่อไป ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้นี้จะประกอบด้วยชิ้นดีเอ็นเอที่มีการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์หลากหลายแบบเพราะเป็นดีเอ็นเอจากจีโนมและการที่เราใช้ดีเอ็นเอขนาดนี้เพื่อความสะดวกในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่องอัตโนมัติต่อไป เมื่อได้ดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการในปริมาณมากพอแล้วจึงนำไปทำไฮบริดเซชันกับโพรบที่เตรียมไว้ โดย

โพรบจะเชื่อมต่อกับ biotin ที่ปลาย 5' แล้วไบโอดีเอ็นเอจะไปทำปฏิกิริยากับ streptavidin ซึ่งเชื่อมต่อกับ magnetic bead มีคุณสมบัติเป็นแม่เหล็ก ในที่นี้ใช้ผลิตภัณฑ์ของ Invitrogen ได้แก่ M2-80 Dynabeads : Streptavidin-coated magnetic beads เมื่อจะใช้งานต้องนำมาวางบนแท่นแม่เหล็ก โดยมีหลักการคือ magnetic beads ที่เชื่อมกับ Streptavidin แล้ว Biotin ที่เชื่อมต่อกับดีเอ็นเอโพรบก็จะเข้ามาเกาะกับ beads และเมื่อวางหลอดบนแท่นแม่เหล็กก็จะเกาะอยู่ข้างหลอด เมื่อเราเติมดีเอ็นเอขนาด 400-1000 คู่เบสลงไป สายดีเอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เข้ากันได้กับโพรบแต่ละชนิดก็จะเข้ามาเกาะกับดีเอ็นเอคู่สม (complementary) ของตน แล้วล้างดีเอ็นเอที่ไม่ได้ใช้ทิ้งไป จะเหลือเฉพาะดีเอ็นเอที่มีเบสเรียงลำดับเป็นแกนเข้าติดอยู่กับโพรบและติดอยู่ที่ข้างหลอดล้างดีเอ็นเอที่ได้แล้วแยกออกจากโพรบ นำดีเอ็นเอที่แยกได้ไปเพิ่มปริมาณอีกครั้งด้วยเทคนิคพีซีอาร์ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของโพรบจำนวน 14 โพรบ (Figure 1C) ซึ่งจะมีปริมาณมากพอสำหรับการโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ TA cloning kit ต่อไป เมื่อนำดีเอ็นเอที่มีการเรียงลำดับ ดีเอ็นเอแบบ repetitive DNA เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ชุดเดิมแล้วไปโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ของชุดโคลนสำเร็จรูป TA cloning kit คัดเลือกโคลนที่มีดีเอ็นเอที่ต้องการซึ่งจะมีโคลนสีขาว แต่ละโคลนจะมีดีเอ็นเอเข้าเพียง 1 สาย แล้วเลือก ดีเอ็นเอมาชนิดละ 10-15 โคลนนี้ ตรวจสอบผลการโคลนด้วยการทำ colony PCR เพื่อตรวจสอบว่ามีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการจริง (Figure 2A) แล้วเพิ่มปริมาณด้วยการเลี้ยงในอาหาร SOC media นำไปสกัดพลาสมิด ตรวจดูอีกครั้งด้วยการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พลาสมิดที่มีดีเอ็นเอจะมี 3 แถบ (Figure 2B) จากนั้นนำพลาสมิดไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

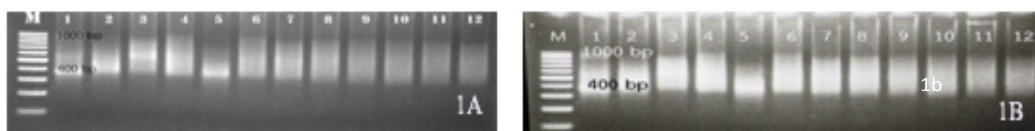


Figure 1. 1A) Digested genomic DNA and 1B) PCR amplification of digested genomic DNA with Adapter oligoA primer indicated that fragments in the size range of 400-1000 bp were amplified. The first lane shows the DNA size marker (100 bp DNA ladder(Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus,Fermentas), in 1% agarose gel. 1 Biotin-(GA)12, 2 Biotin-(GT)12, 3 Biotin-(CT)12, 4 Biotin-(AG)12, 5 Biotin-(TGT)9, 6 Biotin-(GTG)8, 7 Biotin-(GAG)8, 8 Biotin-(GCT)8, 9 Biotin-(TCT)10, 10 Biotin-(CGT)8, Biotin-(AGT)10, 11 Biotin-(TGA)10 12 Biotin-(GTAT)8



Figure 1C Electrophoretic profile showing amplified PCR products obtained from 14 oligonucleotide repeat as probes in the size range of 400-1000 bp. M is 100 bp DNA ladder(Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus,Fermentas), in 1% agarose gel.

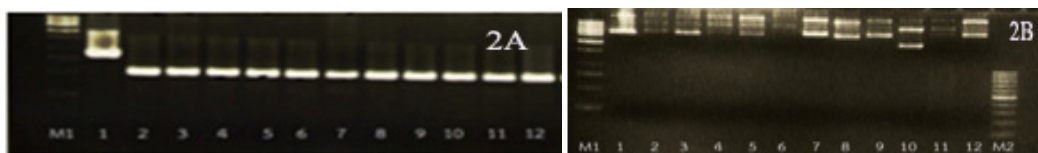


Figure 2 2A) PCR amplification of positive clones with M13 primers. 2B) Plasmid DNA of positive clones . M1 is 100 bp DNA ladder, M2 is 1kb DNA ladder in 1% agarose gel.

ผลการหาลำดับกรดนิวคลีอิกและการออกแบบไพรเมอร์

นำไปหาลำดับเบสโดยบริษัทเอกชนจำนวน 101 โคโลนี จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ มาออกแบบไพรเมอร์ส่วนขาบนข้าง ด้วยโปรแกรมออกแบบไพรเมอร์ Primer3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) ได้ไพรเมอร์จำนวน 101 คู่ เมื่อนำมาทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ (Figure 3)

และสามารถคัดเลือกไพรเมอร์ได้ 64 คู่ โดยคัดเลือกจากผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกล้วยไม้ที่ใช้ในการทดลองดัง Table 1 เมื่อตรวจสอบไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างทางพันธุกรรมแล้วพบว่ามีเพียง 25 ไพรเมอร์ที่ใช้กับกล้วยไม้สกุลแวนดาได้โดยคัดเลือกเฉพาะที่ให้ผลของอัลลีลไม่เกิน 3 อัลลีล

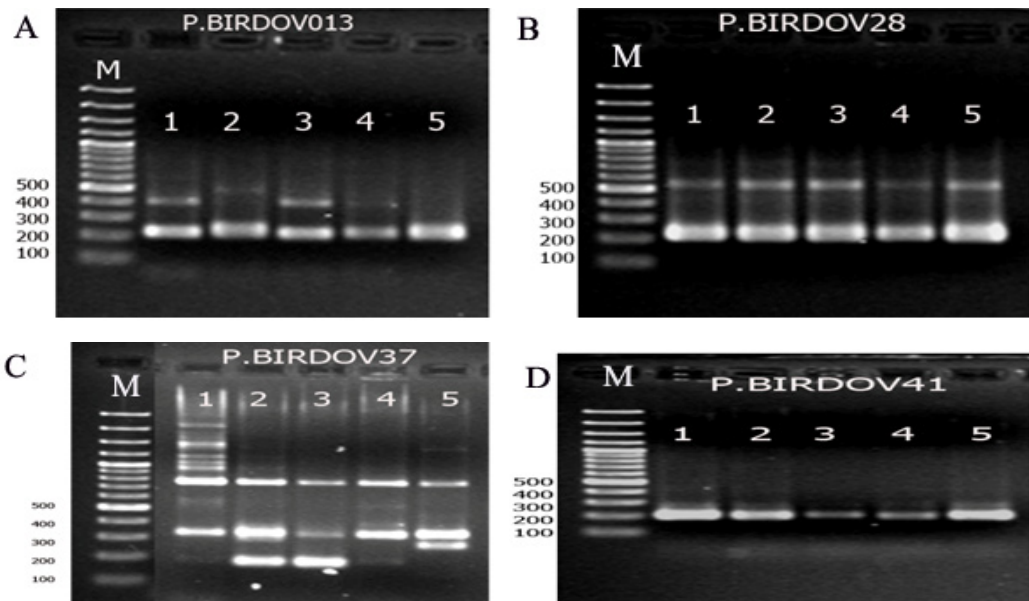


Figure 3. Allele characteristics of Vanda orchid , 1) Khemkhaw , 2) Khemleung , 3) Sampoihangpla 4) Sampoidong 5) Sampoiuang with A) BIRDOV13 primer, B) BIRDOV28 primer, C) BIRDOV37 primer, D) BIRDOV41 primer in 3% metaphor gel.

สรุป

จากการพัฒนาดีเอ็นเอเครื่องหมายชนิด ไมโครแซทเทลไลท์โดยใช้ M2-80 Dynabeads : Streptavidin-coated magnetic beads ร่วมกับ biotin -labelled probe สามารถคัดแยกดีเอ็นเอที่เป็น SSRs motif ได้ ในการทดลองนี้ได้พัฒนาไพรเมอร์สำหรับ ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลแวนดาได้ 25 ไพรเมอร์ จากทั้งหมด 101 ไพรเมอร์ที่ทำ การทดสอบ ไพรเมอร์ที่ได้สามารถนำไปเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลแวนดาแต่ละอัลลีลเพื่อการ ตรวจสอบจำแนกพันธุ์ต่อไป นอกจากนี้สามารถนำไป ทดสอบกับกล้วยไม้สกุลอื่นๆ เช่นรองเท้านารี กล้วยไม้ สกุลหวายและสกุล แคทลียาเป็นต้น

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงรายที่ให้ความ อนุเคราะห์ตัวอย่างพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Ahmad, R., L. Ferguson, and SM. Southwick. 2003. Identification of Pistachio (*Pistachio vera* L.) Nuts with microsatellite markers. *Amer Soc Hort Sci.* 128: 898-903.
- Bloor, P. A., F.S. Barker, P.C. Watts, H.A. Noyes, and S.J. Kemp. 2001. Microsatellite Libraries by Enrichment. Available: <http://www.liv.ac.uk/~kempsj/MicrosatelliteEnrichment.pdf>
- Edwards, KJ., JH. Barker, A. Daly, C. Jones, A Karp. 1996. Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants. *Biotechniques.* 20: 758-760.
- Zane, L., L. Bargelloni, and T. Patarnello. 2002. Strategies for microsatellite isolation: A Review. *Mol Ecol.* 11: 1-16.
- Zhao, W., X. Miao, S. Jia, Y. Pan, and Y Huang. 2005. Isolation and characterization of microsatellite loci from the mulberry, *Morus* L. *Plant Sci.* 168: 519-525.

Table 1 Primer sequences and allele characteristics of 25 forward and reverse microsatellite markers isolated from *Vanda spp.* using streptavidine-coated magnetic beads .

No.	ID.	Forward primer sequence (5' → 3')	Reverse primer sequence (5' → 3')	T _m (°C)	Allele size (bp)	No. of alleles	No. of total alleles
1	BIRDOV02	TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC	CGAACCGAACAGGCTTATGT	55	215	1-2	10
2	BIRDOV03	GCATCCAGCTGAAATCCTCT	AGTTTACACGGTGTGCGTCA	50	204	1-2	6
3	BIRDOV05	CAAGCTTCGGATCAACCCTA	GAGGTGCTTGGCATATTCGT	60	217	1	1
4	BIRDOV06	TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC	CGAACCGAACAGGCTTATGT	60	209	1-2	9
5	BIRDOV07	TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC	CGAACCGAACAGGCTTATGT	60	219	1-2	10
6	BIRDOV08	AGAGTGTGGGGCAAGAGAGA	CTTCGGATCCTCATCACACA	60	219	1-2	6
7	BIRDOV11	CGAAGAGATCCTCCTGTTGC	TTTGTCGGTCATTCACTCA	60	215	2-3	8
8	BIRDOV13	TCGCCGAGCTTTAGGTAGAA	TCATCACCTCCATCCTCCTC	60	211	1-2	7
9	BIRDOV15	CAGTCCAACCGAAGCTTTTC	AGAAGGATTGGCATGTTTGC	60	209	2	6
10	BIRDOV16	CAGTCCAACCGAAGCTTTTC	AGAAGGATTGGCATGTTTGC	60	198	1-2	6
11	BIRDOV20	TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC	CGAACCGAACAGGCTTATGT	60	225	1-2	5
12	BIRDOV22	CGTGACAGTCTTACACACCT	TTACAACTTTGCCCTCGAC	55	206	1-2	6
13	BIRDOV23	CCAAGCTTCGGATCATTTCT	CCACCCCTACACGACTATC	59	206	1-2	9
14	BIRDOV26	TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC	CGAACCGAACAGGCTTATGT	60	203	2	9
15	BIRDOV30	CTCATATGCAAGGGGGAGAA	CCAAGCTTCGATCGTCTCTC	60	224	2-3	12
16	BIRDOV31	TAGCTGTTTCCTGGCAGCTC	ACGAACCGAACAGGCTTATG	60	198	1-3	8
17	BIRDOV41	GAAAATGGGTCATTGGTTGG	ATGTCTTGGCTTCAAATGG	60	202	1-2	8
18	BIRDOV46	ACCCGCTTAGCTAGCACGTA	TGTTTCCCTCTATCCGCTCA	60	191	1-2	5
19	BIRDOV49	AGCTTCGGATCAAGGTGCTA	CACGGTCTCCTTTGTGAGTG	60	206	2-3	8
20	BIRDOV55	CTGCCCAGAATGAAGTGTGA	CAGCTGGATGGCAAATAATG	60	202	1-2	8
21	BIRDOV59	TGGAGGTGCTGGTGATATTG	ACACAGGCATCTCCACACAC	60	197	2-3	10
22	BIRDOV61	GAGGGAGAGAGGGAGAAGGA	ACAAGAAACCTGCGTCGAAT	59	204	1-2	9
23	BIRDOV62	GATCGAAGCTTGGGTCTCT	GACACGAACCAGAGCAGACA	60	225	1-2	7
24	BIRDOV63	ATTCAACTACCCCGTGTGC	TAACACACGGACGGCAAATA	60	254	1-2	5
25	BIRDOV64	CCCCCAACTTCTACAACAGC	GACCCCAAGCTTCGTAATCA	60	202	2-3	10