NU Science Journal 2008; 5(2): 165 - 175

การเปรียบเทียบวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการสกัดดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลช้าง

ธนากร วงษศา[1] อภินันท์ ลิ้มมงคล[2] และอนุพันธ์ กงบังเกิด*[1]

Comparison of the Methods for DNA Extraction from *Rhynchostylis* spp.

Thanakorn Wongsa[1], Apinun Limmongkon[2] and Anupan Kongbangkerd*[1]

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 65000

[2]ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 65000

*Corresponding author, E-mail: anupank73@hotmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการสกัดดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลช้างทั้ง 3 วิธี ได้แก่ วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ดัดแปลงจากวิธีของ Doyle และ Doyle (1987) วิธีสกัดดีเอ็นเอที่ดัดแปลงจากวิธีของ Lim และคณะ (1997) และชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปของ NucleoSpin® Plant จากผลการทดลองพบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบของกล้วยไม้สกุลช้างโดยวิธีของ Doyle และ Doyle (1987) มีคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอไม่แตกต่างจากวิธีสกัดโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปของ NucleoSpin® Plant เมื่อยืนยันผลด้วยการทำ AFLP และคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทั้งสองวิธีดังกล่าวมีคุณภาพดีกว่าดีเอ็นเอจากวิธี Lim เมื่อตรวจสอบผลจากวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสในอะกาโรสเจล และวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตโดยใช้เทคนิค spectrophotometer

คำสำคัญ: วิธีการสกัด ดีเอ็นเอ กล้วยไม้สกุลช้าง

Abstract

Three methods for DNA extraction of *Rhynchostylis* spp. were examined; Doyle and Doyle (1987), Lim et. al. (1997) and NucleoSpin® Plant DNA extraction kit. The results indicated that DNA isolation from leaf of *Rhynchostylis* spp. using Doyle and Doyle (1987) method showed no significant different in quality and quantity of DNA from the NucleoSpin® Plant DNA extraction kit. The high quality of DNA from both methods could be confirmed by AFLP analysis and showed

better results than Lim's method when detected by agarose gel electrophoresis and UV absorption spectrophotometer.

Key words: Extraction methods, DNA, *Rhynchostylis* spp.

บทนำ

เทคนิคการศึกษาทางอณูพันธุศาสตร์นั้นเริ่มต้นด้วยขั้นตอนที่สำคัญขั้นตอนหนึ่งคือ การสกัดดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิต ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ทำได้ยากในพืชแต่ละชนิด เนื่องจากเนื้อเยื่อแต่ละชนิดนั้นมีโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) และ/หรือ สารทุติยภูมิ (secondary metabolites) เป็นองค์ประกอบซึ่งสารเหล่านี้เป็นปัญหาหลักในการสกัดดีเอ็นเอ (Porebski *et al*., 1997) โดยเฉพาะการสกัดดีเอ็นเอจากพืชในวงศ์กล้วยไม้ มักพบปัญหาหลายประการที่ทำให้ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณและคุณภาพไม่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในการวิเคราะห์ความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคการตรวจสอบเครื่องหมายโมเลกุลต่างๆ ซึ่งมีความสำคัญอย่างยิ่งใน การตรวจพิสูจน์พันธุ์พืช (Smith and Smith, 1992) ทั้งนี้การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกของพืชอาจจะไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของพันธุ์ได้อย่างชัดเจน เนื่องจากลักษณะดังกล่าวสามารถผันแปรไปตามสภาพแวดล้อม ทำให้ผลการตรวจสอบที่ได้มีความแปรปรวนหรือมีความผิดพลาดเกิดขึ้นได้ ในการศึกษาวิเคราะห์ความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลนั้น จึงมีความจำเป็นต้องสกัดดีเอ็นเอให้ได้คุณภาพและปริมาณที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบแต่ละวิธี การสกัดดีเอ็นเอจากพืชนั้น มีอยู่หลายวิธีด้วยกัน ซึ่งแต่ละวิธีจะมีความเหมาะสมกับเนื้อเยื่อพืชแต่ละชนิด เนื่องจากเนื้อเยื่อพืชแต่ละส่วนมีปริมาณสารปนเปื้อนจำพวกโพลีฟีนอล (polyphenolic) และโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ในปริมาณที่แตกต่างกัน นอกจากนี้การสกัดดีเอ็นเอต้องคำนึงถึงงานที่ต้องนำดีเอ็นเอไปใช้ เช่น การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธี Southern blot hybridization เป็นวิธีที่ต้องการดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่แตกหักน้อย และมีความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ จึงมีความจำเป็นต้องเลือกวิธีการสกัดให้เหมาะสมกับความต้องการดังกล่าว สำหรับในพืชนั้น นิยมทำการสกัดดีเอ็นจากใบอ่อนหรือต้นอ่อนเพราะมีเส้นใยน้อย ทำให้เซลล์แตกและปลดปล่อยดีเอ็นเอออกมาได้ง่าย (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545) อย่างไรก็ตาม กล้วยไม้ไม่ว่าจะเป็นส่วนของใบ หรือต้นที่เจริญเติบโตในธรรมชาตินั้น มักมีโครงสร้างที่ค่อนข้างแข็ง และมีเส้นใยมาก จึงจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนดังกล่าว ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดให้ได้ดีเอ็นเอที่มีปริมาณและคุณภาพที่ดีเพื่อนำไปใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้สกุลช้างต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ตัวอย่างกล้วยไม้สกุลช้าง

กล้วยไม้สกุลช้างที่นำมาใช้สกัดดีเอ็นเอในการศึกษานี้ ได้มาจากการสุ่มคัดเลือกและเก็บตัวอย่างกล้วยไม้สกุลช้าง ในพื้นที่ที่มีการกระจายพันธุ์ของกล้วยไม้ดังกล่าว ได้แก่ จังหวัดตาก นครสวรรค์ ลำปาง และน่าน โดยทำการเก็บตัวอย่างของกล้วยไม้สกุลช้างจากพื้นที่ตัวอย่างต่างๆ ดังนี้ จากจังหวัดตาก จำนวน 8 ตัวอย่าง ได้แก่ ช้างกระ (*Rhynchostylis gigantea*) 4 ตัวอย่าง และไอยเรศ (*R. retusa*) 4 ตัวอย่าง จากจังหวัดนครสวรรค์ จำนวน 8 ตัวอย่าง ได้แก่ ช้างกระ (*R. gigantea*) 3 ตัวอย่าง และเขาแกะ (*R. coelestis*) 5 ตัวอย่าง จากจังหวัดลำปาง ได้แก่ ช้างกระ (*R. gigantea*) 2 ตัวอย่าง และจากจังหวัดน่าน ได้แก่ ไอยเรศดำ (*R.* sp.) 2 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 20 ตัวอย่าง โดยจำแนกเป็น ช้างกระ (*R. gigantea*) 9 ตัวอย่าง เขาแกะ (*R. coelestis*) 5 ตัวอย่าง ไอยเรศ (*R. retusa*) 4 ตัวอย่าง และไอยเรศดำ (*R.* sp.) 2 ตัวอย่าง จากนั้นสุ่มเลือกตัวอย่างในกลุ่มช้าง 3 ตัวอย่าง เขาแกะ 1 ตัวอย่าง ไอยเรศ 1 ตัวอย่าง ไอยเรศดำ 1 ตัวอย่าง และไอยเรศดำในสภาพปลอดเชื้อ 1 ตัวอย่าง เพื่อนำมาศึกษาหาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอ โดยเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากส่วนใบอ่อนของกล้วยไม้สกุลช้างด้วยวิธีการที่แตกต่างกัน 3 วิธี คือ วิธีการสกัดของ Doyle และ Doyle (1987) วิธีการสกัดของ Lim และคณะ (1997) และวิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป NucleoSpin® Plant โดยมีขั้นตอนต่างๆ คือ

วิธีสกัดดีเอ็นเอของ Doyle และ Doyle (1987)

นำใบกล้วยไม้สกุลช้างน้ำหนัก 0.1 กรัม มาบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว ถ่ายตัวอย่างที่บดลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม 2X CTAB buffer (2% CTAB, 1% PVP, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, 1.4 M NaCl, 0.2 % 2-mercaptoethanol) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 ^{0}C เป็นเวลา 30 นาที ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 ^{0}C ทำซ้ำขั้นตอนการเติม Chloroform : Isoamyl alcohol อีก 2 รอบ จากนั้นเติม Isopropanol 600 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 80% Ethanol ซ้ำ 2 รอบ ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งโดยอบที่อุณหภูมิ 60 ^{0}C นาน 15 นาที ละลายตะกอนใน TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) 50 ไมโครลิตร และเติม RNase A (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 ^{0}C เป็นเวลา 30 นาที เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 ^{0}C จนกว่าจะใช้งาน

วิธีสกัดดีเอ็นเอของ Lim และคณะ (1997)

นำใบกล้วยไม้สกุลช้างน้ำหนัก 0.1 กรัม บดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว เติม PVP (100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ถ่ายใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Extraction buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA pH 8.0, 500 mM NaCl, 100 mM 2-mercaptoethanol) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร 20% SDS ปริมาตร 40 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 ^{0}C เป็นเวลา 10 นาที ผสมให้เข้ากัน และเติม 5 M Potassium acetate (pH 5.2) บ่มบนน้ำแข็ง 20 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 ^{0}C ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ แล้วเติม Isopropanol ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -20 ^{0}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 ^{0}C เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นเติม TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ RNase A (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 ^{0}C เป็นเวลา 30 นาที กำจัดสารโปรตีนและสารปนเปื้อนอื่นๆ ด้วย Phenol : Chloroform (1:1) ซ้ำสองครั้ง จากนั้นเติม 3M Sodium acetate (pH 5.2) และ 100% Ethanol ตั้งทิ้งไว้ที่ -80 ^{0}C เป็นเวลา 30 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 ^{0}C ทำการล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 ^{0}C นาน 15 นาที เพื่อให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง จากนั้นละลายตะกอนด้วย TE buffer ปริมาตร 60 ไมโครลิตร และเก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่ -20 ^{0}C

ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปของ NucleoSpin® Plant

สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป NucleoSpin® Plant (MACHEREY-NAGEL) ซึ่งมีขั้นตอนโดยย่อ คือ บดตัวอย่างพืช 0.1 กรัมในไนโตรเจนเหลว จากนั้นทำลายเซลล์ด้วย cell lysis buffer แยกเศษเซลล์ออกโดยใช้ NucleoSpin® Plant column จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างมาตกตะกอนดีเอ็นเอและนำไปผ่าน NucleoSpin® Plant column ที่ทำหน้าที่จับจำเพาะดีเอ็นเอไว้บนแผ่น membrane filter ของ column ล้าง column ด้วย wash buffer เพื่อให้ดีเอ็นเอที่ได้มีความบริสุทธิ์ จากนั้นทำการชะสารละลายดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ออกจาก column ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมจากชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป

การเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอโดยตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้

ตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตด้วยวิธี Spectrophotometer และวัดการเรืองแสงของดีเอ็นเอที่จับตัวกับเอธิเดียมโบไมด์หลังจากแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีส ทดสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดแต่ละวิธีด้วยการทำ AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) โดยใช้ดีเอ็นเอเริ่มต้นที่มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร นำไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดได้แก่ EcoRI และ MseI และเชื่อมต่อชิ้นดี

เอ็นเอที่ตัดได้เข้ากับ adaptor (EcoRI adaptor และ MseI adaptor) ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยปฏิกิริยา PCR 2 ขั้นตอน ตามวิธีของ Vos และคณะ (1995) และใช้ไพรเมอร์ แสดงดังตาราง 1

ตาราง 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำ AFLP

ไพเมอร์	ลำดับเบส
EcoRI adaptor	5′ –CTC GTA GAC TGC GTA CC- 3′
	3′–CAT CTG ACG CAT GGT TAA -5′
MseI adaptor	5′ –GAC GAT GAG TCC TGA G- 3′
	3′–TAC TCA GGA CTC AT-5′
EcoRI + A preamplification	5′ – GAC TGC GTA CCA ATT CA – 3′
MseI + C preamplification	5′ – GAT GAG TCC TGA GTA AC – 3′
EcoRI + ACC	5′ – GAC TGC GTA CCA ATT CACC – 3′
MseI + CAA	5′ – GAT GAG TCC TGA GTA ACAA – 3′

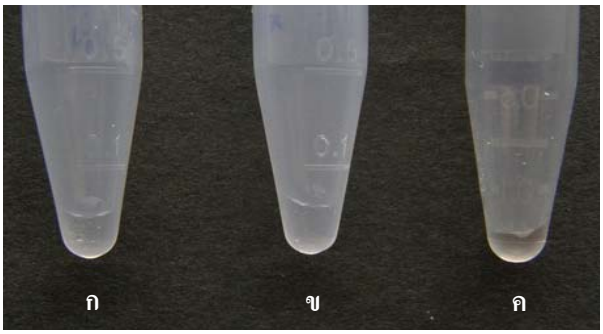
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองสกัดดีเอ็นเอและเปรียบเทียบผลการสกัดดีเอ็นเอจากทั้ง 3 วิธีดังกล่าวโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสในอะกาโรสเจลนั้น พบว่าดีเอ็นเอที่ได้จากวิธีการสกัดของ Lim และคณะ (1997) เมื่อนำมาตรวจสอบผลโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสในอะกาโรสเจลแล้ว ไม่พบแถบดีเอ็นเอ รวมทั้งสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ภายหลังจากการสกัดพบว่ามีสีเหลือง น้ำตาล (รูป 1ค และรูป 2ค) การสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีดังกล่าว อาจไม่เหมาะสมสำหรับการนำมาสกัดตัวอย่างกล้วยไม้ที่นำมาศึกษา เนื่องจากได้ดีเอ็นเอปริมาณน้อย ไม่สามารถเห็นแถบดีเอ็นเอภายหลังจากการตรวจสอบผลโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสในอะกาโรสเจล และอาจมีการปนเปื้อนของสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) หรือสารพวกโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่มีอยู่ในพืช (Lim *et al*., 1997) ทั้งนี้พบว่าสารละลาย extraction buffer ที่ใช้ในการสกัดของวิธี Lim และคณะ มีความแตกต่างจาก extraction buffer วิธี Doyle และ Doyle โดยมีความแตกต่างคือ ไม่มีสาร CTAB เป็นองค์ประกอบ ทั้งนี้สาร CTAB มีความสามารถในการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับโปรตีนและสารโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งสามารถช่วยในการกำจัดสารโพลีแซคคาไรด์ที่มีปริมาณมากในพืชออกไปได้ ดังนั้นในการทดลองต่อมาจึงไม่นำวิธีการสกัดของ Lim มาเปรียบเทียบในการทดลอง

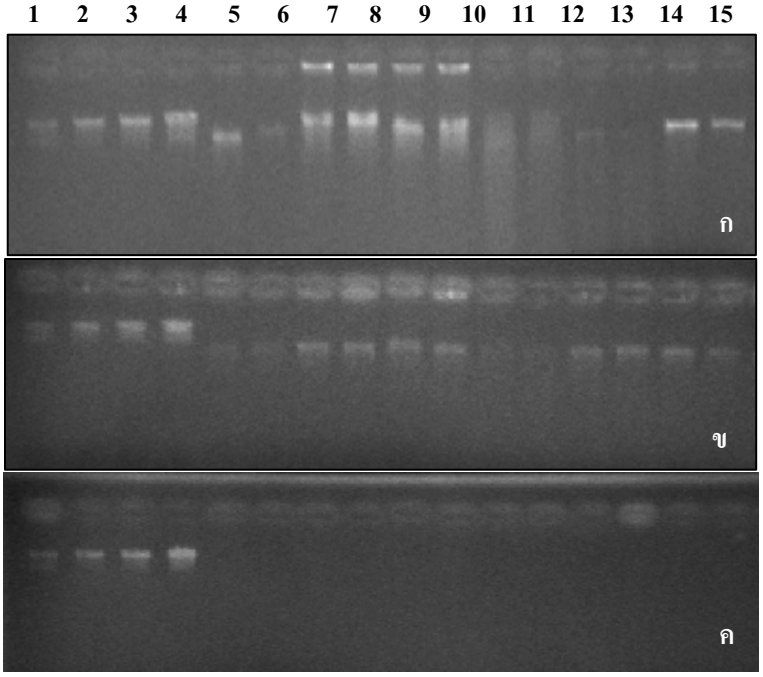
จากการสกัดดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลช้างโดยวิธี Doyle และ Doyle (1987) ได้สารละลายดีเอ็นเอใสและไม่มีสี (รูป 1ก) เมื่อตรวจสอบผลโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสในอะกาโรสเจล โดยแบ่งกลุ่มแถบดีเอ็นเอเป็นตัวอย่างกล้วยไม้ช้าง (lane 5-10) เขาแกะ (lane 11-12) ไอยเรศ (lane 13-16) (รูป 2ก)

พบว่า ปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ในกลุ่มกล้วยไม้ช้าง (lane 5-10) นั้นมีปริมาณสูง เนื่องจากแถบดีเอ็นเอที่สังเกตได้มีความเข้มมาก (high yield) ส่วนดีเอ็นเอที่ได้การสกัดจากกล้วยไม้ในกลุ่มเขาแกะ (lane 11-12) พบว่ามีคุณภาพไม่ดี เนื่องมาจากดีเอ็นเอมีการแตกหัก ทำให้เห็นผลการตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสในอะกาโรสเจลเป็นปื้น สำหรับกล้วยไม้ในกลุ่มของไอยเรศ (lane 13-16) พบว่า มีบางตัวอย่างที่ได้ปริมาณดีเอ็นเอมาก คุณภาพดี ดีเอ็นเอไม่แตกหัก แต่บางตัวอย่าง (lane 13-14) ได้ปริมาณดีเอ็นเอน้อย อาจเนื่องจากตัวอย่างมาจากแหล่งที่แตกต่างกัน และชนิดของเนื้อเยื่อ มีองค์ประกอบของเส้นใยมาก ทำให้ในขั้นตอนการบดตัวอย่างทำได้ยาก มีผลทำให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอที่ต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Sharma และคณะ (2003) ที่แสดงให้เห็นว่าในการสกัดดีเอ็นเอจากใบของอินทผลัม (*Phoenix dactylifera*) จะได้ปริมาณดีเอ็นเอน้อย และคุณภาพต่ำ เนื่องจากใบของอินทผลัมมีเส้นใยสูง ทำให้ยากต่อการบด โดยสรุปวิธีการสกัดดีเอ็นเอของ Doyle และ Doyle (1987) มีความเหมาะสมสำหรับสกัดดีเอ็นเอจากกลุ่มตัวอย่างกล้วยไม้บางชนิด (species) หากเป็นชนิด (species) ที่เหมาะสมจะทำให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอที่มาก มีคุณภาพดี และเป็นวิธีที่ง่าย ราคาถูก ใช้เวลาการสกัดไม่มากนัก

การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป NucleoSpin® Plant พบว่าการใช้ชุดสกัด NucleoSpin® Plant มีข้อดีคือ ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดี ไม่แตกหัก ได้สารละลายดีเอ็นเอที่ใสและไม่มีสี (รูป 1ข) การใช้วิธี NucleoSpin® Plant จึงเป็นวิธีที่ดีหากต้องการดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดี เนื่องจากสามารถกำจัดสารปนเปื้อนจำพวกโปรตีน สารทุติยภูมิ (secondary metabolite) และสารพวกโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่มีอยู่มากในพืช ออกไปได้ นอกจากนี้ปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้วิธี NucleoSpin® Plant จะมีปริมาณที่ค่อนข้างใกล้เคียงกัน สังเกตจากความเข้มของแถบที่ได้จากการตรวจสอบผลโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสในอะกาโรสเจล (รูป 2ข) ยกเว้นในกรณีของกลุ่มเขาแกะ ทั้งนี้อาจเนื่องจากลักษณะเฉพาะของกล้วยไม้กลุ่มเขาแกะ ที่อาจมีสารจำเพาะบางอย่างที่มีผลต่อการสกัดดีเอ็นเอ ทำให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอค่อนข้างน้อย จึงควรปรับหาวิธีที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอจากกล้วยไม้กลุ่มเขาแกะ ในกรณีที่ต้องการปริมาณดีเอ็นเอในการทดลองปริมาณมาก



รูป 1 (ก-ค) ลักษณะสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีการ (ก) Doyle และ Doyle (1987) (ข) วิธีสกัดโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป NucleoSpin® Plant (ค) และ วิธีการสกัดของ Lim และคณะ (1997)



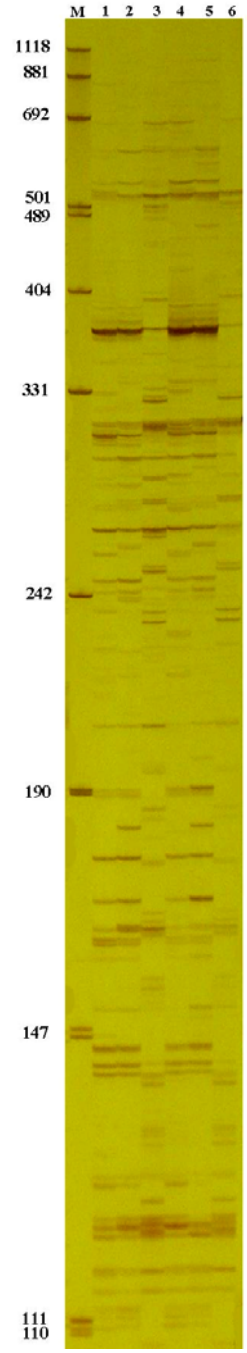
รูป 2 (ก-ค) ผลจากการตรวจสอบผลโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสในอะกาโรสเจล (ก) เป็นวิธีการสกัดดีเอ็นเอวิธีของ Doyle และ Doyle (1987) (ข) วิธีการสกัดดีเอ็นเอวิธีของ NucleoSpin® Plant และ (ค) วิธีการสกัดดีเอ็นเอวิธีของ Lim และคณะ (1997) Lane 1-4 เป็นตัวอย่างดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นได้แก่ λ 25 ng, λ 50 ng, λ 75 ng, และ λ 100 ng ตามลำดับ Lane 5-6 ช้างกระ Lane 7-8 ช้างเผือก Lane 9-10 ช้างแดง Lane 11-12 เขาแกะ Lane 13-14 ไอยเรศ และ Lane 15-16 ไอยเรศดำ

การวัดคุณภาพของดีเอ็นเอโดยปกติสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เทคนิค spectrophotometer เนื่องจากดีเอ็นเอสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (OD_{260}) ได้ การตรวจสอบคุณภาพของสารละลายดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ทำได้โดยเปรียบเทียบค่า OD_{260} และ OD_{280} ค่าอัตราส่วน OD_{260}/OD_{280} ที่อยู่ในช่วง 1.8-2.0 บ่งบอกถึงความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ จากตาราง 2 ดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดโดยวิธี NucleoSpin® Plant ค่าอัตราส่วน OD_{260}/OD_{280} มีค่าใกล้เคียง 1.8 แสดงว่าดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป มีความบริสุทธิ์ สามารถแยกสารปนเปื้อนอื่นๆ ออกจากสารละลายดีเอ็นเอได้ดี ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดโดยวิธี Doyle และ Doyle ค่าอัตราส่วน OD_{260}/OD_{280} มีค่าต่ำกว่า 1.8 เล็กน้อย บ่งบอกว่าสารละลายดีเอ็นเอที่ได้อาจมีการปนเปื้อนของสารกลุ่มโปรตีนและฟีนอลบางส่วน นอกจากนี้ผลการวัดค่าการดูดกลืนแสง สามารถคำนวณเป็นค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอดังแสดงในตาราง 2 พบว่าปริมาณดีเอ็นที่สกัดได้มีปริมาณใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตอาจไม่สอดคล้องกับผลการตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสในอะกาโรสเจล โดยตรง ทั้งนี้ในการสกัดดีเอ็นเอ หากมีอาร์เอ็นเอ สาร CTAB หรือสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) อื่นๆ ปนเปื้อนในสารละลายดีเอ็นเอบางส่วน อาจไปบดบังการดูดกลืนแสงของโมเลกุลดีเอ็นเอ ทำให้มีผลรบกวนต่อค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ วิธีนี้จึงไม่เหมาะสำหรับการวัดดีเอ็นเอที่มีปริมาณน้อยๆ (น้อยกว่า 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เนื่องจากค่าที่ได้อาจไม่น่าเชื่อถือ ดังนั้นในการทดลองที่ต้องการความแม่นยำสูง ๆ จึงมีการประยุกต์ใช้ fluorometric data มาใช้ในการวัดปริมาณดีเอ็นเอแทนวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตโดยใช้ Spectrophotometer (Drabkova *et al*., 2002)

ตาราง 2 แสดงผลค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตโดยใช้ Spectrophotometer

ตัวอย่างกล้วยไม้ที่สกัดดีเอ็นเอ	วิธี Doyle และ Doyle		วิธี NucleoSpin® Plant	
	260/280	ความเข้มข้น(ng/µl*)	260/280	ความเข้มข้น(ng/µl*)
ช้างกระ (*R. gigantea*)	1.55	3350	1.62	2262.5
ช้างแดง (*R. gigantea* var. *rubrum*)	1.59	2887.5	1.66	2387.5
ช้างเผือก (*R. gigantea* var. *harrisonianum*)	1.65	2575	1.75	2575
เขาแกะ (*R. coelestis*)	1.48	2712.5	1.58	2450
ไอยเรศ (*R. retusa*)	1.69	1912.5	1.78	2337.5
ไอยเรศดำ (*R.* sp.)	1.57	3050	1.74	2625
ไอยเรศดำในสภาพปลอดเชื้อ	1.50	2325	1.72	2500

* ng/µl คือ นาโนกรัมต่อไมโครลิตร



รูป 3 ผลการทำ AFLP เปรียบเทียบระหว่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีการต่าง ๆ กัน โดยใช้คู่ไพรเมอร์ E-ACC และ M-CAA; lane M คือ pUC Mix Marker,8 เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานสำหรับใช้เปรียบเทียบเพื่อบอกขนาดตำแหน่งต่าง ๆ ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ Lane 1-3 แสดงผล AFLP ของดีเอ็นเอที่สกัดโดยวิธีของ Doyle และ Doyle Lane 4-6 แสดงผล AFLP ของดีเอ็นเอที่สกัดโดยวิธี NucleoSpin® Plant

แนวทางในการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ประการหนึ่ง คือการนำดีเอ็นเอที่ได้ มาทดสอบโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลโดยวิธี AFLP จากการทดลองพบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดจากวิธีของ Doyle และ Doyle (1987) และ วิธีของ NucleoSpin® Plant เกิดแถบดีเอ็นเอที่ถูกนำมาแยกบน 6% denaturing polyacrylamide gel มีความคมชัด ดังแสดงในรูป 3 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้นั้นมีคุณภาพดี เนื่องจากวิธีการทำ AFLP นั้น เป็นวิธีที่มีความไวต่อคุณภาพดีเอ็นเอสูง (high sensitivity for DNA quality) ดีเอ็นเอที่นำมาใช้นั้น ต้องมีคุณภาพดี (Vos *et al*.,1995) หากดีเอ็นเอที่สกัดได้คุณภาพไม่ดี มีการปนเปื้อนของตัวยับยั้งเอนไซม์ต่าง ๆ (Inhibitor) จะไม่สามารถให้ผลทดสอบด้วยวิธี AFLP ได้ เนื่องจากเอนไซม์ตัดจำเพาะ (EcoRI และ MseI) ไม่สามารถทำงานได้ ดังนั้นการทำเครื่องหมายโมเลกุลโดยวิธี AFLP จึงสามารถใช้เป็นวิธีที่สามารถยืนยันความมีคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้ดังตัวอย่างที่มีรายงานไว้แล้ว (Sheoherd *et al*., 2002; Geuna *et al*., 2004)

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่า วิธีการที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอกล้วยไม้สกุลช้างคือวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ดัดแปลงจากวิธีของ Doyle และ Doyle (1987) ซึ่งให้ผลดีและไม่แตกต่างจากวิธีสกัดโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปของ NucleoSpin® Plant อีกทั้งยังเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก สารเคมีสามารถเตรียมได้เองในห้องปฏิบัติการ และใช้เวลาสกัดไม่มากนัก

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการดำเนินการวิจัย ทำให้การศึกษาวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2545). จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Doyle, J., and Doyle, J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh Leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, *19*, 11–15.

Drabkova, L., Kirscher, J. and Vleck C. (2002). Comparison of seven DNA extraction and amplification protocols in historical herbarium specimens of Juncaceae. *Plant Molecular Biology Reporter*, *20*, 161-175.

Geuna, F., Maitti, C., Digiuni, S. and Banfi, R. (2004). A method for extracting genomic DNA suitable for medium-throughput applications from plant tissues rich in contaminants. *Plant Molecular Biology Reporter*, *22*, 87a-87f.

Lim, S.H., Liew, C.F., Lim, C.N., Lee, Y.H. and Goh, C.J. (1997). A simple and efficient method of DNA isolation from orchid species and hybrids. *Biologia Plant*, *41*(2), 313-316.

Porebski, S., Bailey, L.G., and Baum, B.R. (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*, *15*, 8-15.

Sharma, R.m Mahla, H.R., Mohapata, T., Bhargava, S.C. and Sharma, M.M. (2003). Isolation plant genomic DNA without liquid nitrogen. Plant Molecular *Biology Reporter*, *21*, 43-50.

Sheoherd, M., Cross, M., Stokoe, R. L., Scott, L. J. and Jones, M. E. (2002). Hight-throughput DNA extraction from forest trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, *20*, 425a-425j.

Smith, J.S.C. and Smith, O.S. (1992). Fingerprinting crop varieties. *Adv. Agron*, *47*, 85-140.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, van de Lee, M., Hornes, M., Frijters, Pot, A., Peleman. J., Kuiper, M. and Zabeau. M., (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, *23*, 4407-4414.