

วิธีสกัดดีเอ็นเอจากมันสำปะหลังที่รวดเร็ว ประหยัด และปราศจากตัวทำละลายอินทรีย์อันตราย A Rapid, Economical and Hazardous Organic Solvent Free Method for DNA Extraction from Cassava

จีราพร แก่นทรัพย์^{1,*} ธนาวัต คำชู² วิภาวี ชันโรจน์¹ สุภาวดี ง่อเหิรณ¹

สุวลักษณ์ อะมะวัลย์² ประพิศ วงเทียม³

Jeeraporn Kansup^{1,*} Tanavadee Kumchoo² Vipavee Chanroj¹ Suphawadee Ngorian¹

Suwaluk Amawan² Prapit Wongtiem³

Received 21 Nov 2020/Revised 1 Feb 2021/Accepted 2 Mar 2021

ABSTRACT

The extraction of good quality DNA from leaves of cassava is a complicated process due to the presence of interfering substances such as polyphenols and polysaccharides that affect the quality of DNA. In hexadecyltrimethylammonium bromide or CTAB method which is widely used for DNA extraction, hazardous organic solvents such as phenol and chloroform are required to remove these interfering substances. The whole process does take approximately 130 minutes making it unsuitable for extracting large number of DNA samples. The objective of this research was to develop a DNA extraction method from cassava leaves which is rapid, free of harmful organic solvents, does not use liquid nitrogen, as well as cost and time effective. The DNA extraction method developed in this research was based on sodium dodecyl sulfate/sodium chloride or SDS/NaCl method. The SDS/NaCl+PVP method yielded DNA amount in the range of 1,431.4 - 1,510.3 g per 1g of leaf sample with absorption ratios A_{260}/A_{280} of 1.74 - 1.90. Agarose gel electrophoresis showed the intact, sharp and clear DNA bands with little degradation. The extracted DNA could be used in restriction analysis and as template in polymerase chain reaction (PCR) using many types of primer including housekeeping gene, universal, SCAR, EST and SSR primers in both of single and multiplex PCR. It indicated that the DNA extracted by SDS/NaCl+PVP method had purity, good quality and was suitable for molecular analyses such as restriction digestion and PCR amplification. The whole process of DNA extraction using SDS/NaCl+PVP method took about 48 minutes.

Keywords: DNA extraction, cassava, interfering substance, sodium dodecyl sulfate (SDS), polyvinylpyrrolidone (PVP)

¹ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

¹ Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, A.Thanyaburi, Pathumthani, 12110

² ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง กรมวิชาการเกษตร อ.เมืองระยอง จ.ระยอง 21150

² Rayong Field Crops Research Center, Department of Agriculture, A.MuangRayong, Rayong, 21150

³ สำนักผู้เชี่ยวชาญ กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

³ Expert Office, Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok, 10900

* Corresponding author: jkansupthdoa@gmail.com

บทคัดย่อ

การสกัดดีเอ็นเอจากใบมันสำปะหลังให้ได้คุณภาพดีมีขั้นตอนที่ยากซับซ้อน เนื่องจากมีสารรบกวน ได้แก่ โพลีฟีนอล และโพลีแซคคาไรด์ ที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพของดีเอ็นเอ การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี hexadecyltrimethylammonium bromide หรือ CTAB ที่นิยมใช้โดยทั่วไป มีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์อันตรายต่าง ๆ เช่น ฟีนอล คลอโรฟอร์ม เพื่อกำจัดสารรบกวน และมีหลายขั้นตอนทำให้ใช้เวลานานประมาณ 130 นาที จึงไม่เหมาะกับการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างจำนวนมาก งานวิจัยนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากใบมันสำปะหลังที่สะดวกรวดเร็ว ปราศจากตัวทำละลายอินทรีย์อันตราย ไม่จำเป็นต้องใช้ไนโตรเจนเหลว ประหยัดค่าใช้จ่ายและเวลา วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่พัฒนาขึ้นนี้มีพื้นฐานจากวิธี sodium dodecyl sulfate/sodium chloride หรือ SDS/NaCl วิธี SDS/NaCl+PVP ให้ปริมาณดีเอ็นเอในช่วง 1,431.4 – 1,510.3 ไมโครกรัม/ตัวอย่างใบ 1 กรัม และมีอัตราส่วนการดูดกลืนแสง A_{260}/A_{280} อยู่ในช่วง 1.74 - 1.90 อะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิสแสดงให้เห็นแถบดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ และคมชัดโดยมีการย่อยสลายของดีเอ็นเอเพียงเล็กน้อย ดีเอ็นเอที่สกัดได้สามารถใช้ในการวิเคราะห์กับเอนไซม์ตัดจำเพาะ และใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (พีซีอาร์) โดยใช้ไพรเมอร์ต่าง ๆ ได้แก่ ไพรเมอร์ของยีนเจ้าบ้าน ยูนีเวอร์แซลไพรเมอร์ รวมถึงไพรเมอร์ชนิดสการ์ (SCAR) อีสที (EST) และเอสเอสอาร์ (SSR) ทั้งแบบไพรเมอร์คู่เดียว (single PCR) และแบบไพรเมอร์หลายคู่ในหนึ่งปฏิกิริยา (multiplex PCR) ได้แสดงถึงดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี SDS/NaCl+PVP มีความบริสุทธิ์ คุณภาพดี และเหมาะสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ระดับโมเลกุล เช่น การย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ กระบวนการสกัดดีเอ็นเอนี้ใช้เวลาประมาณ 48 นาที

คำสำคัญ: การสกัดดีเอ็นเอ, มันสำปะหลัง, สารรบกวน, โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS), โพลีไวนิลไพโรลิโดน (PVP)

บทนำ

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz.) เป็นพืชอาหารหลัก และเป็นแหล่งแป้งอันดับสองของโลกรองจากข้าวโพด การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ เป็นกลยุทธ์สำคัญที่ช่วยสนับสนุนความมั่นคงทางอาหารและเกษตรกรรมที่ยั่งยืน (Hautea and Escaler, 2004) ซึ่งเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพต่าง ๆ เช่น การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกพันธุ์พืช (marker-assisted selection, MAS) การวินิจฉัยระดับโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม ซึ่งมีขั้นตอนพื้นฐานที่สำคัญ ได้แก่ การสกัดดีเอ็นเอที่มีคุณภาพ สำหรับนำไปใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหรือพีซีอาร์ การสกัดดีเอ็นเอจากใบมันสำปะหลังให้ได้คุณภาพดีมีความยาก เนื่องจากในมันสำปะหลังมีสารรบกวน ได้แก่ โพลีฟีนอล และโพลีแซคคาไรด์ในปริมาณสูง (Sharma *et al.*, 2008) ทำให้ในขั้นตอนการบดตัวอย่างพืชเพื่อสกัดดีเอ็นเอ สารประกอบฟีนอลิกจะถูกออกซิไดซ์ และจับกับกรดนิวคลีอิกและโปรตีนแบบย้อนกลับไม่ได้ กลายเป็นวุ้นเชิงซ้อน (gelatinous complex) และทำให้ดีเอ็นเอเป็นสีน้ำตาล (Sahu *et al.*, 2012) สำหรับโพลีแซคคาไรด์จะตกตะกอนร่วมกับดีเอ็นเอในขั้นตอนเติมแอลกอฮอล์ ทำให้ปนเปื้อนไปกับดีเอ็นเอและเกิดเป็นสารละลายดีเอ็นเอที่มีความหนืดสูง (Do and Adams, 1991) การปนเปื้อนของสารรบกวนเหล่านี้ทำให้ความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอ็นเอลดลง และขัดขวางการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ต่าง ๆ ต่อดีเอ็นเอ เช่น การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์โพลีเมอเรส การย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ หรือการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โพลีเมอเรสหรือเอนโดนิวคลีเอส (Khanuja *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1997)

วิธีการสกัดดีเอ็นเอแบบดั้งเดิมที่ใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับสิ่งมีชีวิตเกือบทั้งหมด มีการใช้สารลดแรงตึงผิวประจุบวก (cationic detergent) ได้แก่ CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) ตามด้วย ฟีนอล-คลอโรฟอร์ม เพื่อแยกโปรตีนออกจากกรดนิวคลีอิก

การตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยแอลกอฮอล์ การล้างก้อนดีเอ็นเอ (DNA pellet) และการทำให้แห้งวิธีการนี้เรียกว่าวิธี CTAB (Murray and Thompson, 1980) วิธี CTAB ไม่เพียงแต่มีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์อันตรายที่เป็นพิษต่อระบบประสาท ทางเดินหายใจและผิวหนัง แต่ยังมีหลายขั้นตอนทำให้ใช้เวลานาน จึงไม่เหมาะกับการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่มีจำนวนมาก วิธีการสกัดดีเอ็นเอแบบรวดเร็วโดยไม่ใช้ CTAB ถูกเสนอโดย Dellaporta *et al.* (1983) ดัดแปลงโดย Edwards *et al.* (1991) และ Kotchoni and Gachomo (2009) หลักการของวิธีการนี้ได้แก่ การบดเชิงกลร่วมกับสารละลายบัฟเฟอร์สกัดดีเอ็นเอที่มี SDS 0.5 - 2% เป็นส่วนประกอบ โดย SDS มีหน้าที่ในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มนิวเคลียส เพื่อปลดปล่อยดีเอ็นเอออกมาละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ หลังจากนั้นดีเอ็นเอจะถูกทำให้แยกออกมาโดยขั้นตอนปั่นเหวี่ยงให้เกิดการตกตะกอน โดยโพลีแซคคาไรด์และโปรตีนส่วนใหญ่จะจับตัวแน่นกับ SDS ที่ไม่ละลายน้ำ และตกตะกอนในระหว่างการปั่นเหวี่ยงครั้งแรก ซึ่งดีเอ็นเออยู่ในน้ำใสส่วนบน (supernatant) น้ำใสส่วนบนดังกล่าว จะถูกย้ายไปยังหลอดใหม่ และดีเอ็นเอจะถูกทำให้ตกตะกอนด้วย isopropanol อย่างไรก็ตาม จนถึงปัจจุบัน ยังไม่มีรายงานการสกัดดีเอ็นเอจากมันสำปะหลังโดยใช้วิธี SDS/NaCl หรือวิธี SDS/NaCl+PVP

วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากมันสำปะหลังที่มีรายงานส่วนใหญ่ เป็นการสกัดที่ใช้สาร CTAB เป็นพื้นฐาน (CTAB-based) เช่น รายงานของ Devi *et al.* (2013); Osen *et al.* (2017) และ Sharma *et al.* (2008) โดยมีความแตกต่างกันที่มีการเพิ่มเติมหรือเพิ่มปริมาณสารบางชนิด เช่น PVP, NaCl และ EDTA เป็นต้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อการศึกษาเปรียบเทียบการสกัดดีเอ็นเอจากมันสำปะหลัง 3 วิธี ได้แก่ วิธี CTAB วิธี SDS/NaCl และวิธี SDS/NaCl+PVP ซึ่งเพิ่ม PVP ในสารละลายบัฟเฟอร์สกัดดีเอ็นเอชนิด SDS/NaCl เพื่อพัฒนาวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากมันสำปะหลังให้สะดวกรวดเร็ว ปราศจากตัวทำละลายอินทรีย์อันตราย ประหยัดค่าใช้จ่าย และเวลา

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสกัดดีเอ็นเอจากมันสำปะหลังด้วยวิธี SDS/NaCl + PVP, วิธี SDS/NaCl และวิธี CTAB

เปรียบเทียบการสกัดดีเอ็นเอ 3 วิธี โดยใช้ตัวอย่างมันสำปะหลัง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ CMR 62-51-01, CMR 62-49-03 และ CMR 62-29-09 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์ให้มันสำปะหลังจากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง กรมวิชาการเกษตร

1.1 การสกัดดีเอ็นเอจากมันสำปะหลังโดยด้วยวิธี SDS/NaCl + PVP โดยดัดแปลงจากวิธีของ Edwards *et al.* (1991) และวิธีของ Kotchoni and Gachomo (2009) ได้เพิ่ม PVP ในสารละลายบัฟเฟอร์สกัดดีเอ็นเอ และมีขั้นตอนดังนี้

1.1.1 ตัดมันสำปะหลังประมาณ 0.07 กรัม มาใส่ในโกร่ง เติมสารละลายบัฟเฟอร์สกัดดีเอ็นเอ (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5% (w/v) SDS, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8.0, 2% (w/v) PVP) ปริมาณ 400 ไมโครลิตร บดตัวอย่างให้ละเอียดด้วยโกร่ง เป็นเวลา 15 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้น เติมสารละลายบัฟเฟอร์สกัดดีเอ็นเออีก 200 ไมโครลิตร บดตัวอย่างจนเนียนละเอียดและดูดสารที่บด 400 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดขนาดบรรจุ 1.5 มล. แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 นาที และดูดน้ำใสส่วนบน (supernatant) 300 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดใหม่ขนาดบรรจุ 1.5 มล.

1.1.2 เติม isopropanol ที่แช่เย็นปริมาณ 300 ไมโครลิตร และผสมเบา ๆ จากนั้น วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ (DNA precipitation) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที และเทน้ำใสส่วนบนทิ้ง

1.1.3 เติม 70% (v/v) ethanol 500 ไมโครลิตร เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ (DNA pellet) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที และเทน้ำใสส่วนบนทิ้งด้วยความระมัดระวัง เพื่อไม่ให้ตะกอนดีเอ็นเอตกหล่นออกไป ดูดน้ำส่วนที่เหลือออกให้หมด และผึ่งดีเอ็นเอให้แห้ง

1.1.4 เติมน้ำเปล่าที่ไม่มีนิวคลีเอส (nuclease-free water) 120 ไมโครลิตร ลงในหลอดเพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอซึ่งมีโพลีแซคคาไรด์ปะปนอยู่ด้วย ดีเอ็นเอจะละลายในน้ำ แต่โพลีแซคคาไรด์ไม่ละลายน้ำ จากนั้นทำการตกตะกอนโพลีแซคคาไรด์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที และดูดน้ำในส่วนบนที่มีดีเอ็นเอละลายอยู่ในหลอดใหม่ขนาดบรรจุ 1.5 มล. นำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพและวัดความเข้มข้นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ Biodrop (UK) แล้วเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20°C. สำหรับใช้ในการศึกษาวิจัยต่อไป

1.2 การสกัดดีเอ็นเอจากใบมันสำปะหลังด้วยวิธี SDS/NaCl (วิธีเปรียบเทียบ) นำใบมันสำปะหลังประมาณ 0.07 กรัม ใช้สารละลายบัฟเฟอร์สกัดดีเอ็นเอชนิด SDS/NaCl ที่ไม่มีส่วนประกอบของ PVP (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5% (w/v) SDS, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8.0) และดำเนินการตามข้อ 1.1

1.3 การสกัดดีเอ็นเอจากใบมันสำปะหลังด้วยวิธี CTAB (วิธีเปรียบเทียบ) ปรับจากวิธีการสกัดดีเอ็นเอในพืชอันดับ (order) Zingiberales โดยใช้ CTAB (Devi *et al.*, 2013) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1.3.1 ตัดใบมันสำปะหลังประมาณ 1 กรัม มาใส่ในโกร่ง ทำการบดพร้อมกับไนโตรเจนเหลว จนละเอียดเป็นผงแป้ง แล้วตักตัวอย่างที่บดได้ใส่หลอดขนาดบรรจุ 15 มล. เติมสารละลายบัฟเฟอร์สกัดดีเอ็นเอชนิด CTAB (2% (w/v) CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8.0, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 4% (w/v) PVP ซึ่งเติม mercaptoethanol ในอัตราส่วน 500 : 1 (ปริมาณ 7 มล.) และบ่มที่อุณหภูมิ 65°C. เป็นเวลา 30 นาที ก่อนใช้งาน จากนั้นนำมาผสมกับผงแป้งให้เข้ากัน ที่อุณหภูมิ 65°C. เป็นเวลา 30 นาที โดยเขย่าทุก ๆ 10 นาที แล้วนำมาตั้งพักไว้ที่อุณหภูมิห้อง

1.3.2 เติม chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) 7 มล. ผสมให้เข้ากัน โดยการกลั่นเหลวไปมาเบา ๆ หรือใช้เครื่อง shaker เบา ๆ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ดูดน้ำในส่วนบน 5 มล. ใส่ในหลอดใหม่ แล้วเติม

isopropanol ที่แช่เย็น 3 มล. (0.6 เท่าของสารละลายดีเอ็นเอ) และกลั่นเหลวไปมาเบา ๆ จากนั้นบ่มที่ -20°C. หรือแช่ในน้ำแข็ง 30 นาที ภายใต้นี้จะเห็นตะกอนดีเอ็นเอเป็นเส้นสีขาวใส

1.3.3 เกี่ยวเส้นดีเอ็นเอขึ้นมา (hook) ใส่หลอดขนาดบรรจุ 1.5 มล. ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย washing solution (70% (v/v) ethanol, 10 mM ammonium acetate) 400 ไมโครลิตร 2 ครั้ง และล้างด้วย 70% (v/v) ethanol ที่แช่เย็น 500 ไมโครลิตร อีก 2 ครั้ง จากนั้นผึ่งดีเอ็นเอให้แห้งในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 65°C. เป็นเวลา 20 นาที

1.3.4 ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE 300 ไมโครลิตร และเติม RNase A (10 มก./มล.) 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65°C. เป็นเวลา 10 นาที ในกรณีที่สารละลายดีเอ็นเอมีความหนืดให้ใส่ TE เพิ่มเติมจนไม่มีความหนืด ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ใช้ TE ในการละลายดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี CTAB ตัวอย่างละ 720 ไมโครลิตร จากนั้นนำดีเอ็นเอมาตรวจสอบคุณภาพและวัดความเข้มข้นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ Biodrop (UK) แล้วเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20°C. สำหรับใช้ในการศึกษาวิจัยต่อไป

2. การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ

ทำการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ 2 วิธี ได้แก่ 1) การวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) โดยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ Biodrop (UK) ซึ่งเป็นการวัดปริมาณการดูดกลืนแสงของกรดนิวคลีอิกและโปรตีนที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร และ 2) การแยกแถบดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้เจลอะกาโรส 1% และทำอิเล็กโตรโฟรีซิส เปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาด ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ แล้วนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอพร้อมบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel-Doc UV Transilluminator (Bio-Rad Laboratories, USA)

3. การตรวจสอบความใช้ได้ของดีเอ็นเอในการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI แบบ FastDigest™ (Thermo Scientific, USA) ในปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัม, 1X FastDigest™ Buffer,

EcoRI FastDigest™ enzyme 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาณให้ครบด้วยน้ำ นำสารที่ผสมแล้วไปปั่นที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที ต่อด้วยการปั่นที่อุณหภูมิ 65 °C 10 นาที จากนั้น ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลอะกาโรส 1%

4. การตรวจสอบความใช้ได้ของดีเอ็นเอในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบ single PCR และแบบ multiplex PCR

ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ในงานวิจัยนี้มี จำนวน 8 ไพรเมอร์ ได้แก่ rbcLa, ITS (ITS2-S2F/ITS4), RME1, NS158, SSRY28, NS169, EST-R และ EST-K (Table 1) rbcL เป็นยีนเจ้าบ้านที่แปลรหัสเป็นโปรตีนหน่วยย่อยของเอนไซม์ ribulose biphosphate carboxylase oxygenase (RUBISCO) สำหรับ ITS เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ระหว่างปลาย 3' กับปลาย 5' ของยีนกำหนดการสร้างหน่วยย่อยของไรโบโซมและถูกใช้เป็นยูนิเวอร์แซลไพรเมอร์ เครื่องหมายดีเอ็นเอ RME1, NS158, SSRY28, NS169, EST-R และ EST-K มีรายงานว่า มีความเกี่ยวข้องกับความ

ต้านทานโรคใบด่างมันสำปะหลัง หรือเกี่ยวข้องกับยีนที่ตอบสนองต่อเชื้อสาเหตุของโรคใบด่างมันสำปะหลัง และมีการนำมาใช้ในการตรวจสอบจีโนมไทป์เพื่อช่วยคัดเลือกพันธุ์มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่าง (จิราพร และคณะ, 2563; Carmo *et al.*, 2015) การทำ single PCR เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์เพียง 1 คู่ งานวิจัยนี้ใช้ไพรเมอร์ rbcLa, ITS (ITS2-S2F/ITS4), EST-R และ RME1 ของแต่ละคู่ในการทำ single PCR โดยใช้ Taq DNA Polymerase, recombinant (Thermo Scientific, USA) ซึ่งรายละเอียดส่วนประกอบของสารต่าง ๆ และอุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยาตามรายงานของ จิราพร และคณะ (2563) และแสดง Table 1

สำหรับการทำ multiplex PCR เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ตั้งแต่ 2 คู่ ขึ้นไป งานวิจัยนี้ ใช้ไพรเมอร์เครื่องหมายดีเอ็นเอ EST-K ร่วมกับ NS158 (2 คู่) และเครื่องหมาย SSRY28 ร่วมกับ NS169 (2 คู่) ส่วนประกอบของสารในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม, 1X Taq buffer with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2 mM สำหรับ dNTP แต่ละชนิด,

Table 1 List and sequence of the primers used in single and multiplex PCR

Primer name	Sequence (5' – 3')	Annealing temperature (°C)
rbcLa (Kress <i>et al.</i> , 2009; Levin, 2003)	F : ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC R : GTAAATCAAGTCCACCRCG	60
ITS (White <i>et al.</i> , 1990; Yao <i>et al.</i> , 2010)	ITS2-S2F : ATGCGATACTTGGTGTGAAT ITS4 : TCCTCCGCTTATTGATATGC	60
RME1 (Fregene <i>et al.</i> , 2006)	F : ATGTTAATGTAATGAAAGAGC R : AGAAGAGGGTAGGAGTTATGT	56
NS158 (Fregene <i>et al.</i> , 2006)	F : GTGCGAAATGGAAATCAATG R : TGAAATAGTGATACATGCAAAAGGA	55
SSRY28 (Akano <i>et al.</i> , 2002)	F : TTGACATGAGTGATATTTTCTTGAG R : GCTGCGTGCAAACTAAAT	55
NS169 (Okogbenin <i>et al.</i> , 2012)	F : GTGCGAAATGGAAATCAATG R : GCCTTCTCAGCATATGGAGC	55
EST-R (Jeeraporn <i>et al.</i> , 2020)	F : TGAGAAGGGAAATCGCAGGA R : GAGGACTTCAACCATGCCAT	55
EST-K (Jeeraporn <i>et al.</i> , 2020)	F : ACTTGCTCATGGCCATGCTC R : CAGAGCCTTGTCTGAAGAAG	55

0.2 M forward primer1, 0.2 M forward primer2, 0.2 M reverse primer1, 0.2 M reverse primer2, 1.5 mM MgCl₂, Taq DNA Polymerase 1.5 U ปรับปริมาตรให้ครบด้วยน้ำ จากนั้น นำสารที่ผสมแล้วเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยตั้งโปรแกรม อุณหภูมิ Pre-denaturation 94 °C. 5 นาที จำนวน 1 รอบ และตั้งรอบให้เครื่องทำงาน 3 ขั้นตอน ดังนี้ Denaturation 94 °C. 40 วินาที, Annealing 55 °C. 40 วินาที, Extension 72 °C. 30 - 60 วินาที จำนวน 40 รอบ ตามด้วยขั้นตอน Final extension 72 °C. 5 นาที อีก 1 รอบ ตรวจวิเคราะห์ผลด้วยอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลอะกาโรส 2 %

5. การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี SDS/NaCl + PVP ในมันสำปะหลังลูกผสม จำนวน 60 สายพันธุ์

เนื่องจาก ต้องการทดสอบการสกัดดีเอ็นเอ ด้วยวิธี SDS/NaCl+PVP กับตัวอย่างจำนวนมาก จึงทำการสกัดดีเอ็นเอจากใบของมันสำปะหลัง ลูกผสมเพื่อบริโภคร กลุ่ม CMRE62 ที่เกิดจากการผสมแบบปิด (cross pollination) และกลุ่ม OMRE62 ที่เกิดจากการผสมแบบเปิด (open pollination) รวมทั้งสิ้น 60 สายพันธุ์ ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์ใบมันสำปะหลังจากศูนย์วิจัยพืชไร่ ระยอง จากนั้น ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง และอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซิส

6. การทดสอบการกำจัด RNA ด้วย RNase A ในสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี SDS/NaCl และวิธี SDS/NaCl+PVP

นำดีเอ็นเอ 2 ไมโครกรัม มาเติม RNase A (2 มก./มล.) 0.3 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 °C. เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น ตรวจสอบแถบ ดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลอะกาโรส 1 %

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี SDS/NaCl+PVP เปรียบเทียบกับวิธี CTAB และวิธี SDS/NaCl

ความเข้มข้นดีเอ็นเอที่วัดจากเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ Biodrop (UK) พบว่า

ดีเอ็นเอที่สกัดจากวิธี CTAB วิธี SDS/NaCl และวิธี SDS/NaCl+PVP มีค่าเฉลี่ยความเข้มข้น 1.924, 0.485, 0.859 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ตามลำดับ (Table 2) และมีปริมาณผลผลิตดีเอ็นเอจากวิธี CTAB และวิธี SDS/NaCl+PVP เฉลี่ย 1,385.5 และ 1,473.1 ไมโครกรัมต่อใบมันสำปะหลัง 1 กรัม ตามลำดับ ขณะที่วิธี SDS/NaCl ให้ผลผลิตดีเอ็นเอต่ำกว่า 2 วิธี ดังกล่าว โดยมีค่าเฉลี่ยที่ 830.9 ไมโครกรัมต่อใบมันสำปะหลัง 1 กรัม (Table 2) อัตราส่วน A_{260}/A_{280} ซึ่งระบุความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี CTAB วิธี SDS/NaCl และวิธี SDS/NaCl+PVP มีค่าเฉลี่ย 1.822, 1.836 และ 1.820 ตามลำดับ (Table 2) แสดงถึงดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทั้ง 3 วิธี มีความบริสุทธิ์หรือคุณภาพดี มีการปนเปื้อนของโปรตีนและโพลีแซคคาไรด์ในระดับต่ำ เนื่องจากดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีนั้น ต้องมีค่า A_{260}/A_{280} อยู่ในช่วง 1.7-2.0 (Maniatis et al., 1982)

การประเมินคุณภาพของดีเอ็นเอโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี CTAB มีแถบดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ (intact) คมชัด (sharp and clear) อยู่เหนือแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 10,000 bp และไม่มีส่วนของดีเอ็นเอที่ย่อยสลาย (Figure 1 Lane 1-3) ส่วนวิธี SDS/NaCl+PVP ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่สมบูรณ์และคมชัดเช่นเดียวกัน แม้ว่าพบการย่อยสลายของดีเอ็นเอบ้างเพียงเล็กน้อย (Figure 1 Lane 7-9) แสดงให้เห็นว่า ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี CTAB และวิธี SDS/NaCl+PVP มีคุณภาพสูง ขณะที่ดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี SDS/NaCl มีแถบดีเอ็นเอที่อยู่เหนือแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 10,000 bp จางกว่าวิธี CTAB และวิธี SDS/NaCl+PVP แสดงถึงการมีดีเอ็นเอน้อยกว่า (Figure 1 Lane 4-6) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวัดปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นอกจากนี้ พบว่า การย่อยสลายของดีเอ็นเอมากกว่าวิธี CTAB และวิธี SDS/NaCl+PVP ดังปรากฏเป็นแถบกว้างในช่วง 500-750 bp (Figure 1 Lane 4-6) สำหรับแถบที่ปรากฏ ณ ตำแหน่งประมาณ 250 bp ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี SDS/NaCl และวิธี SDS/NaCl+PVP คือ RNA (Figure 1 Lane 4-9) เนื่องจาก

Table 2 Yield and purity of genomic DNA isolated from leaves of three different cassava lines using three different extraction methods

DNA extraction method	Cassava line	Weight of leaves for DNA extraction (g)	Volume of TE or ddH ₂ O to dissolve DNA (l)	DNA conc. quantified by using spectrophotometer (g/ul)	DNA yield (g/g of sample)	Purity (A_{260}/A_{280})
CTAB	CMR 62-51-01	1	720	1.511	1,087.9	1.886
	CMR 62-49-03	1	720	1.978	1,424.2	1.839
	CMR 62-29-09	1	720	2.284	1,644.5	1.740
	Average			1.924	1,385.5	1.822
SDS/NaCl	CMR 62-51-01	0.07	120	0.513	879.4	1.872
	CMR 62-49-03	0.07	120	0.453	776.6	1.883
	CMR 62-29-09	0.07	120	0.488	836.6	1.752
	Average			0.485	830.9	1.836
SDS/NaCl + PVP	CMR 62-51-01	0.07	120	0.835	1,431.4	1.902
	CMR 62-49-03	0.07	120	0.881	1,510.3	1.817
	CMR 62-29-09	0.07	120	0.862	1,477.7	1.741
	Average			0.859	1,473.1	1.820

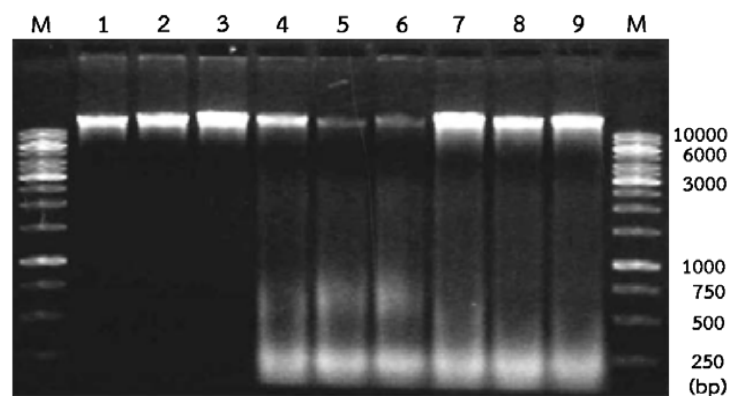


Figure 1 Electrophoresis of genomic DNA extracted from leaves of different cassava lines using CTAB (1 - 3), SDS/NaCl (4 - 6) and SDS/NaCl+PVP (7 - 9) method. Lane M = 1 kb DNA Ladder, Lane 1, 4, 7 = CMR 62-51-01, Lane 2, 5, 8 = CMR 62-49-03, Lane 3, 6, 9 = CMR 62-29-09

การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี SDS/NaCl และวิธี SDS/NaCl+PVP ไม่มีขั้นตอนการกำจัด RNA ด้วย RNase A ดังเช่นวิธี CTAB

2. การตรวจสอบความใช้ได้ของดีเอ็นเอในการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ผลจากการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีต่าง ๆ จากข้อ 1 ไปย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* เป็นเวลา 30 นาที จากนั้น ตรวจสอบแถบ

ดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี CTAB วิธี SDS/NaCl และวิธี SDS/NaCl+PVP ถูกย่อยและปรากฏเป็นหลายแถบในช่วง 1,500 – 10,000 bp เช่นเดียวกัน (Figure 2) แม้ว่าดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี SDS/NaCl จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ ณ ตำแหน่งประมาณ 10,000 bp ที่จางกว่าอีก 2 วิธี ซึ่งอาจมีสาเหตุจากวิธี SDS/NaCl สกัดได้ดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ (แถบดีเอ็นเอที่อยู่เหนือแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

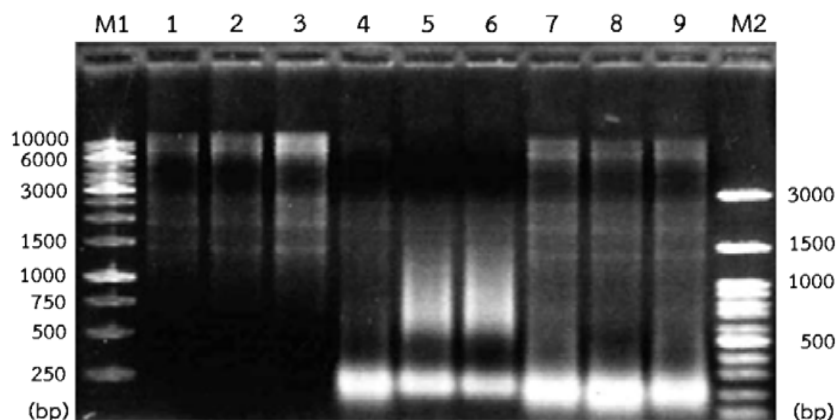


Figure 2 Analysis of DNA digested with restriction enzyme EcoRI and separated by 1% agarose gel electrophoresis. DNA was extracted from leaves of different cassava lines using CTAB (1 - 3), SDS/NaCl (4 - 6) and SDS/NaCl+PVP (7 - 9) method. Lane M1 = 1 kb DNA Ladder, Lane 1, 4, 7 = CMR 62-51-01, Lane 2, 5, 8 = CMR 62-49-03, Lane 3, 6, 9 = CMR 62-29-09, Lane M2 = 100 bp DNA Ladder

ขนาด 10,000 bp) ปริมาณน้อยกว่าอีก 2 วิธี ดังปรากฏใน Figure 1 ผลการตรวจสอบความใช้ได้ของดีเอ็นเอในการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ตัดจำเพาะ แสดงให้เห็นว่า ดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี SDS/NaCl+PVP มีความบริสุทธิ์และคุณภาพดีเพียงพอ และสามารถทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ตัดจำเพาะได้เช่นเดียวกับดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี CTAB

3. การตรวจสอบความใช้ได้ของดีเอ็นเอในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบ single PCR และแบบ multiplex PCR

การทำ single PCR ด้วยไพรเมอร์ของยีนเจ้าบ้าน *rbcLa* และยูนีเวอร์แซลไพรเมอร์ (ITS2-S2F/ITS4) พบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี SDS/NaCl+PVP สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้เช่นเดียวกับดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี CTAB และวิธี SDS/NaCl (Figure 3) โดยในไพรเมอร์ *rbcLa* ทุกตัวอย่างปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดเดียวกันประมาณ 600 bp (Figure 3A) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Parvathy *et al.* (2015) ที่ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ *rbcLa* ในตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากแป้งมันสำปะหลัง (cassava starch) และปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 600 bp เช่นเดียวกัน สำหรับในไพรเมอร์ ITS (ITS2-S2F/ITS4) ทุกตัวอย่าง ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดเดียวกันประมาณ 400 bp (Figure 3B) สอดคล้องกับ

รายงานของ Yao *et al.* (2010) ที่ระบุว่า ความยาวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ ITS2 ในพืชใบเลี้ยงคู่ มีขนาดอยู่ในช่วง 100 – 700 bp

การทำ single PCR ด้วยไพรเมอร์เครื่องหมายดีเอ็นเอ EST-R และ RME1 พบว่า ดีเอ็นเอจากวิธี SDS/NaCl+PVP สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ เช่นเดียวกับดีเอ็นเอจากวิธี CTAB และวิธี SDS/NaCl (Figure 4A และ 4B) โดยมีแถบดีเอ็นเอตำแหน่งตรงกับ positive control ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏในตัวอย่างมันสำปะหลังพันธุ์ TME3 ซึ่งต้านทานโรคใบด่างที่มีรายงานการปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 และ 700 bp ในเครื่องหมาย EST-R และ RME1 ตามลำดับ (จิราพรและคณะ, 2563; Carmo *et al.*, 2015) สำหรับการทำ multiplex PCR พบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทั้ง 3 วิธี ปรากฏแถบดีเอ็นเอเช่นเดียวกันในแต่ละตัวอย่าง โดยเมื่อใช้ไพรเมอร์เครื่องหมาย EST-K ร่วมกับ NS158 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอบริเวณ 600 และ 200 bp (Figure 4C) เมื่อใช้ไพรเมอร์เครื่องหมาย NS169 ร่วมกับ SSRY28 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอบริเวณ 300 และ 200 bp (Figure 4D) แสดงถึงดีเอ็นเอที่สกัดได้จากทั้ง 3 วิธีนี้มีความบริสุทธิ์ และมีคุณภาพดีเพียงพอในการใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ได้ Edwards *et al.* (1991) พบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดจากพืช *Brassica napus*

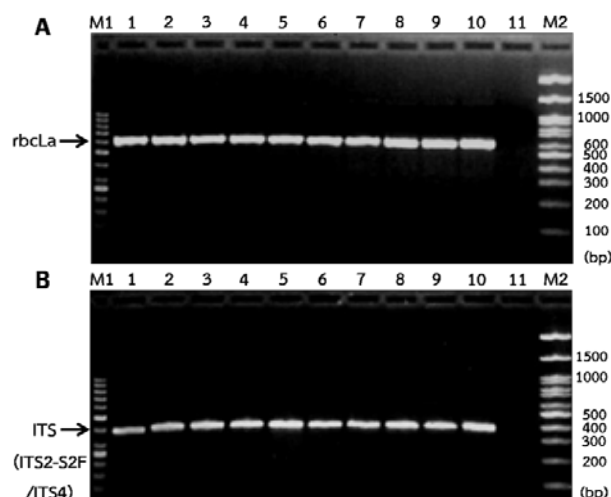


Figure 3 Single PCR amplification using primer rbcLa (A) and ITS (ITS2-S2F/ITS4) (B) separated by 2% agarose gel electrophoresis. DNA was extracted from leaves of different cassava lines using CTAB (1 - 3), SDS/NaCl (4 - 6) and SDS/NaCl+PVP (7 - 9) method. Lane M1 = 50 bp DNA Ladder, Lane 1, 4, 7 = CMR 62-51-01, Lane 2, 5, 8 = CMR 62-49-03, Lane 3, 6, 9 = CMR 62-29-09, Lane 10 = TME3 (DNA was extracted from leaf using CTAB method in the study of Jeeraporn et al. (2020) and used as a positive control), Lane 11 = ddH₂O (negative control), Lane M2 = 100 bp DNA Ladder

ด้วยวิธี SDS/NaCl สามารถนำมาตรวจสอบชิ้นส่วนของยีน β -glucuronidase (GUS) ที่มีการถ่ายยีนในพืชดังกล่าวโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ได้ และ Kotchoni and Gachomo (2009) รายงานว่า ดีเอ็นเอที่สกัดจากพืชต้นแบบ *Arabidopsis thaliana* ด้วยวิธี SDS/NaCl สามารถนำมาตรวจสอบชิ้นส่วนของ T-DNA ในพืช *Arabidopsis thaliana* พันธุ์กลาย และชิ้นส่วนของยีนเป้าหมายที่ถูกทำให้ผิดปกติไม่สามารถแสดงออกหรือยีนนี้ออกเอด (gene knockout) โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ได้เช่นกัน อย่างไรก็ตาม แม้ว่าดีเอ็นเอจากใบมันสำปะหลังที่สกัดด้วยวิธี SDS/NaCl จะสามารถทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ตัดจำเพาะ และเอนไซม์โพลีเมอเรสได้ แต่ดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี SDS/NaCl ได้ปริมาณน้อยกว่า และมีการย่อยสลายมากกว่าวิธี SDS/NaCl+PVP โดยมีสาเหตุจากสารละลายบัฟเฟอร์สกัดดีเอ็นเอชนิด SDS/NaCl ไม่มีส่วนประกอบของ PVP ที่มีคุณสมบัติในการกำจัดสารประกอบฟีนอลิก ซึ่งในขั้นตอนการבודตัวอย่างพืชเพื่อสกัดดีเอ็นเอ สารประกอบฟีนอลิก จะถูกออกซิไดซ์และจับกับกรดนิวคลีอิกและโปรตีน ส่งผลทำให้

ดีเอ็นเอเป็นสีน้ำตาล (Sahu et al., 2012) อีกทั้งกระตุ้นให้เกิดการย่อยสลายของดีเอ็นเอ (DNA degradation) อีกด้วย (John. 1992) การปนเปื้อนของสารรบกวน เช่น โพลีฟีนอล และโพลีแซคคาไรด์ จะขัดขวางกิจกรรม (activity) ของเอนไซม์ในปฏิกิริยาต่าง ๆ ที่มีต่อดีเอ็นเอ (Do and Adams, 1991; Porebski et al., 1997)

4. การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี SDS/NaCl + PVP ในมันสำปะหลังลูกผสม จำนวน 60 สายพันธุ์

เนื่องจากต้องการทดสอบการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี SDS/NaCl+PVP กับตัวอย่างจำนวนมาก จึงทำการสกัดดีเอ็นเอจากใบของมันสำปะหลังลูกผสมเพื่อบริโภครุ่น CMRE62 และกลุ่ม OMRE62 รวมทั้งสิ้น 60 สายพันธุ์ ผลการทดลองพบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีค่าเฉลี่ยความเข้มข้น 0.980 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร อัตราส่วน A_{260}/A_{280} มีค่าเฉลี่ย 1.826 แสดงถึงประสิทธิภาพของการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี SDS/NaCl+PVP ทำให้ได้ดีเอ็นเอปริมาณมาก มีความบริสุทธิ์ และคุณภาพดี ผลการแยกแถบดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจล

อิเล็กโทรโฟรีซิส ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ และคมชัดอยู่เหนือแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 10,000 bp ดัง (Figure 5)

จากผลการทดลองทั้งหมดข้างต้น แสดงให้เห็นว่า วิธี SDS/NaCl+PVP สามารถสกัด ดีเอ็นเอได้ปริมาณมากและมีความบริสุทธิ์ คุณภาพ

ใกล้เคียงกับวิธี CTAB นอกจากนี้ ดีเอ็นเอที่สกัด ได้สามารถนำไปใช้ในปฏิกิริยาการย่อยด้วยเอนไซม์ ตัดจำเพาะและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค พีซีอาร์ได้เช่นเดียวกับวิธี CTAB ซึ่งวิธี SDS/NaCl+PVP มีข้อดี คือ (1) ไม่ต้องใช้ตัวทำละลาย อินทรีย์อันตราย ทำให้ปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงานและ

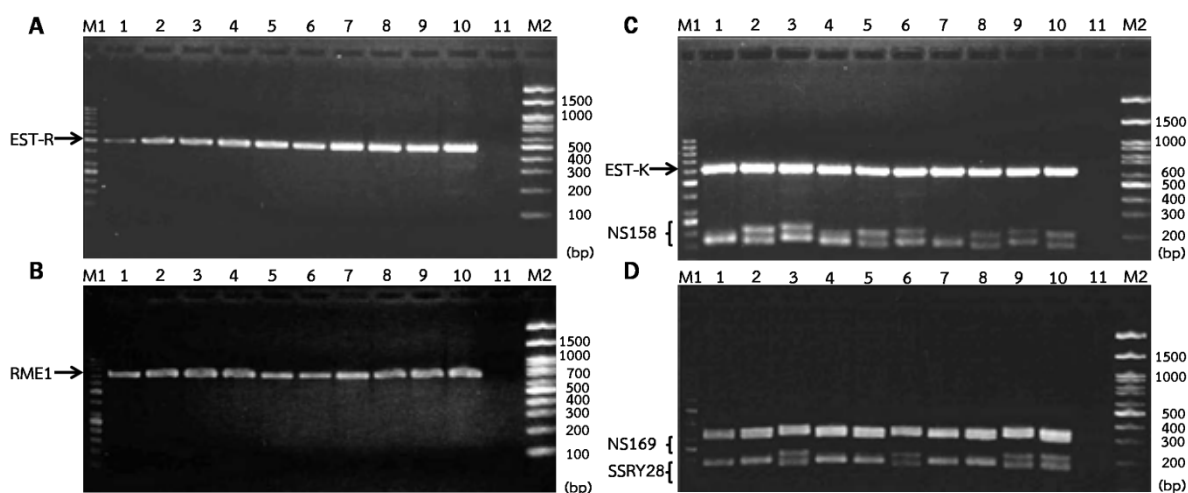


Figure 4 Single and multiplex PCR amplification using primer EST-R (A), RME1 (B), EST-K with NS158 (C) and NS169 with SSRY28 (D) separated by 2% agarose gel electrophoresis. DNA was extracted from leaves of different cassava lines using CTAB (1 - 3), SDS/NaCl (4 - 6) and SDS/NaCl+PVP (7 - 9) method. Lane M1 = 50 bp DNA Ladder, Lane 1, 4, 7 = CMR 62-51-01, Lane 2, 5, 8 = CMR 62-49-03, Lane 3, 6, 9 = CMR 62-29-09, Lane 10 = TME3 (positive control), Lane 11 = ddH₂O (negative control), Lane M2 = 100 bp DNA Ladder

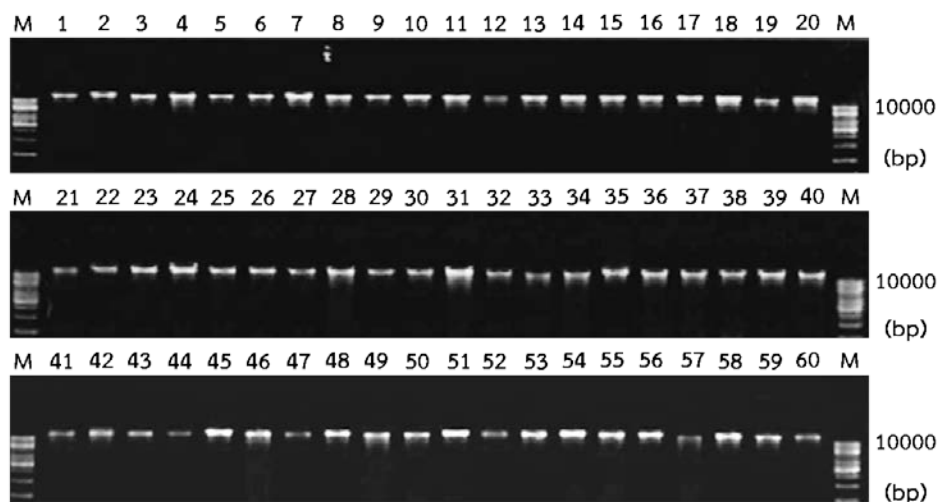


Figure 5 Electrophoresis of genomic DNA extracted from leaves of different cassava lines for consumption using SDS/NaCl+PVP method. Lane M = 1 kb DNA Ladder, Lane 1-15, 51-60 = Hybrids generated by cross pollination (group CMRE 62), Lane 16-50 = Hybrids generated by open pollination (group OMRE 62)

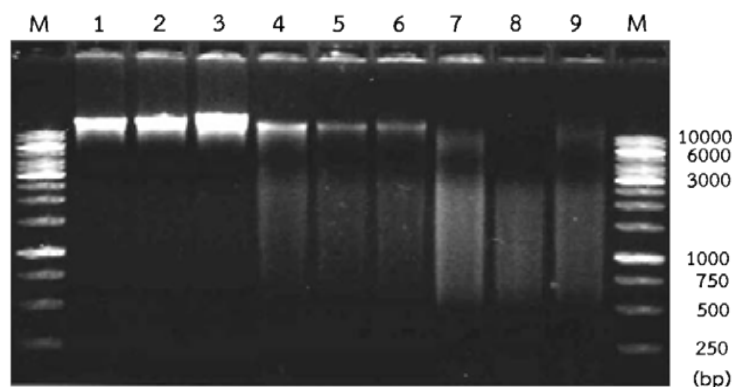


Figure 6 Electrophoresis of DNA extracted from leaves of different cassava lines using CTAB (1 - 3), SDS/NaCl (4 - 6) and SDS/NaCl+PVP (7 - 9) method, and treated with RNase A. Lane M = 1 kb DNA Ladder, Lane 1, 4, 7 = CMR 62-51-01, Lane 2, 5, 8 = CMR 62-49-03, Lane 3, 6, 9 = CMR 62-29-09

เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (2) สามารถสกัดดีเอ็นเอได้จำนวนตัวอย่างมากกว่าวิธี CTAB ในระยะเวลาที่เท่ากัน (3) ประหยัดค่าใช้จ่าย (ค่าสารเคมีและค่าวัสดุวิทยาศาสตร์ลดลงประมาณ 37 และ 75% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี CTAB) และ (4) ไม่ต้องใช้ไนโตรเจนเหลวในการבודตัวอย่าง แต่วิธี SDS/NaCl+PVP มีข้อจำกัด คือ การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี SDS/NaCl+PVP มีการปนเปื้อนของ RNA เล็กน้อยดังปรากฏใน Figure 1 เนื่องจากไม่มีขั้นตอนการกำจัด RNA โดยใช้ RNase A ดังเช่นวิธี CTAB ที่มีขั้นตอนการกำจัด RNA ในช่วงท้าย

แม้ว่าจะมีการปนเปื้อนของ RNA ในดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี SDS/NaCl+PVP แต่ไม่ส่งผลกระทบต่อการศึกษาในระดับโมเลกุลเกี่ยวกับการย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ หรือการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์โพลีเมอเรส ดัง Figure 2, 3 และ 4 สอดคล้องกับรายงานของ Edwards *et al.* (1991) และ Kotchoni and Gachomo (2009) ที่สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี SDS/NaCl โดยไม่มีขั้นตอนการกำจัด RNA เช่นเดียวกัน แต่สามารถใช้ดีเอ็นเอดังกล่าว ตรวจสอบจีโนมของพืชด้วยเทคนิคพีซีอาร์ได้

อย่างไรก็ตาม คณะผู้วิจัยได้ทดลองนำดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี SDS/NaCl และวิธี SDS/NaCl+PVP ไปทำการกำจัด RNA ด้วย RNase A พบว่า RNA ที่ปนเปื้อนถูกกำจัดไป แต่ดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี SDS/NaCl+PVP สูญหายไป (loss)

ด้วย ขณะที่ดีเอ็นเอจากวิธี SDS/NaCl หายไปเพียงเล็กน้อยและยังปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน (Figure 6) Dona and Houseley (2014) รายงานว่า ดีเอ็นเอสูญหายไปเกิดจากการจับกันระหว่าง RNase A กับดีเอ็นเอ สร้างเป็น RNase A-DNA complex ที่มีความเสถียร และ RNase A-DNA complex กับโมเลกุลอื่น ๆ ถูกชะออกไปในขั้นตอนการทำความสะอาดดีเอ็นเอ (purifying step)

ซึ่งคณะผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่า อาจเป็นไปได้ว่า PVP ไปช่วยส่งเสริมการจับกันระหว่าง RNase A กับ DNA เกิดการสร้างเป็น RNase A-DNA complex ขึ้นมา การที่มี PVP ในสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธี SDS/NaCl+PVP อาจทำให้ RNase A จับกับดีเอ็นเอได้มากขึ้น จึงส่งผลให้ดีเอ็นเอสูญหายไป (loss) มากกว่าวิธี SDS/NaCl ซึ่งสมมุติฐานนี้ต้องการพิสูจน์ต่อไปสำหรับวิธี CTAB นั้น PVP จะถูกกำจัดออกไปในขั้นตอนแยกชั้นด้วยคลอโรฟอร์ม (Jadhav *et al.*, 2015) จึงไม่ส่งผลต่อการจับกันระหว่าง RNase A กับดีเอ็นเอในขั้นตอนการใส่ RNase A ในสารละลายดีเอ็นเอเพื่อกำจัด RNA ที่ดำเนินการช่วงท้าย

สรุปผลการทดลอง

การสกัดดีเอ็นเอจากใบมันสำปะหลังด้วยวิธี SDS/NaCl+PVP ที่พัฒนาขึ้นจากงานวิจัยนี้ทำให้สามารถสกัดดีเอ็นเอได้รวดเร็วขึ้น ลดการใช้

ตัวทำละลายอินทรีย์อันตราย ซึ่งดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธีนี้มีสภาพสมบูรณ์ คุณภาพสูง และปริมาณมาก ใกล้เคียงกับวิธี CTAB สามารถนำไปใช้วิเคราะห์ระดับโมเลกุลได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ รศ.ดร.ประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต และ พชช. ชนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่กรุณาเป็นที่ปรึกษาและให้คำแนะนำในการเขียนรายงานผลงานวิจัย และขอขอบคุณ ข้าราชการ พนักงานราชการ พนักงานอัตราจ้าง ของสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ และ ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง กรมวิชาการเกษตร ที่กรุณาให้การสนับสนุนและความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ทำให้การทดลองดำเนินไปได้เป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

จิราพร แก่นทรัพย์ สุวลักษณ์ อะมะวัลย์ ประพิศ วงเทียม อรุโณทัย ชาววา สุภาวดี จ้อยเหรียญ ดนัย นาคประเสริฐ และ จินณจาร์ หาญเศรษฐสุข. 2563. การใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการคัดเลือกพันธุ์ มันสำปะหลังต้านทานโรคใบด่าง Cassava Mosaic Disease. *ว.วิชาการเกษตร*. 38(1): 68-79.

Akano, A.O., A.G.O. Dixon, C. Mba, E. Barrera and M. Fregene. 2002. Genetic mapping of a dominant gene conferring resistance to cassava mosaic disease. *Theor. Appl. Genetics*. 105: 521-525.

Caldern-Corts, N., M. Quesada, H. Cano Camacho and G. Zavala-Pramo. 2010. A simple and rapid method for DNA isolation from xylophagous insects. *Int. J. Mol. Sci.* 11(12): 5056-5064.

Carmo, C.D., M.S. Silva, G.A.F. Oliveira and E.J. Oliveira. 2015. Molecular-assisted selection for resistance to cassava mosaic disease in *Manihot esculenta* Crantz. *Sci. Agric.* 72(6): 520-527.

Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.

Devi, K.D., K. Punyarani, N.S. Singh, et al. 2013. An efficient protocol for total DNA extraction from the members of order Zingiberales suitable for diverse PCR based downstream applications. *Springer Plus*. 2: 669.

Do, N. and R.P. Adams. 1991. A simple technique for removing plant polysaccharide contaminants from DNA. *Biotechniques*. 10(2): 162-168.

Dona, F and J. Houseley. 2014. Unexpected DNA loss mediated by the DNA binding activity of ribonuclease A. *PLoS One*. 9(12): e115008.

Edwards, K., C. Johnstone and C. Thompson. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* 19: 1349.

Fregene, M., N. Morante, T. Snchez, et al. 2006. Molecular markers for introgression of useful traits from wild *Manihot* relatives of cassava, marker-assisted selection (MAS) of disease and root quality traits. *J. Root Crops*. 32: 1-31.

Hautea, R.A. and M. Escaler. 2004. Plant biotechnology in Asia. *Ag Bio Forum*. 7(1): 2-8.

Jadhav, K.P., R.V. Ranjani and N. Senthil. 2015. Chemistry of plant genomic DNA extraction protocol. *BIOINFOLET*. 12(3A): 543-548.

John, M.E. 1992. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acids Res.* 20(9): 2381.

Khanuja, S.P., A.K. Shasany, M. Darokar, et al. 1999. Rapid Isolation of DNA from dry and fresh samples of plants

- producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. *Plant Mol. Biol. Rep.* 17: 74.
- Kim, C.S., C.H. Lee, J.S. Shin, Y.S. Chung and N.I. Hyung. 1997. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. *Nucleic Acids Res.* 25(5): 1085–1086.
- Kotchoni, S.O. and E.W. Gachomo. 2009. A rapid and hazardous reagent free protocol for genomic DNA extraction suitable for genetic studies in plants. *Mol. Biol. Rep.* 36: 1633–1636.
- Kress, W.J., D.L. Erickson, F.A. Jones, N.G. Swenson, R. Perez, O. Sanjur and E. Bermingham. 2009. Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. *PNAS.* 106 (44): 18621–18626.
- Levin, R.A., W.L. Wagner, P.C. Hoch, M. Nepokroeff, J.C. Pires, E.A. Zimmer and K.J. Sytsma. 2003. Family-level relationships of Onagraceae based on chloroplast *rbcL* and *ndhF* data. *Am. J. Bot.* 90(1): 107–115.
- Maniatis, T., J. Sambrook and E.F. Fritsch. 1982. Molecular cloning, pp. 76–85. *In: A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Murray, M.G. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 19: 4321–4325.
- Okogbenin, E., C.N. Egesi, B. Olasanmi, *et al.* 2012. Molecular marker analysis and validation of resistance to cassava mosaic disease in elite cassava genotypes in Nigeria. *Crop Sci.* 52(6): 2576–2586.
- Osen, G., E.N. Nyaboga and N. Amugune. 2017. Rapid and efficient isolation of high quality DNA from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) suitable for PCR based downstream applications. *Ann. Res. Rev. Biol.* 12(2): 1–10.
- Parvathy, V.A., V.P. Swetha, T.E. Sheeja and B. Sasikumar. 2015. Detection of plant-based adulterants in turmeric powder using DNA barcoding. *Pharm. Biol.* 53(12): 1774–1779.
- Porebski, S., L.G. Bailey and B.R. Baum. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol. Biol. Rep.* 15: 8–15.
- Sahu, S.K., M. Thangaraj and K. Kathiresan. 2012. DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol. *ISRN Mol. Biol.* 2012: 205049.
- Sharma, K., A.K. Mishra and R.S. Misra. 2008. A simple and efficient method for extraction of genomic DNA from tropical tuber crops. *Afr. J. Biotechnol.* 7: 1018–1022.
- White, T.J., T.D. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315–322. *In: Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White eds. PCR protocols, a guide to methods and applications.* Academic Press, San Diego, California.
- Yao, H., J. Song, C. Liu, K. Luo, J. Han, Y. Li, X. Pang, H. Xu, Y. Zhu, P. Xiao and S. Chen. 2010. Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. *PLoS One.* 5(10): e13102.