บทที่ 3

ผลการทดลอง

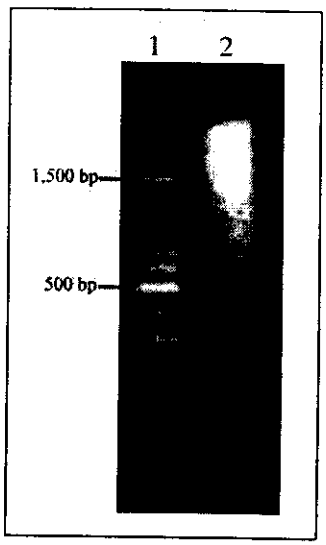
1. การเตรียมโครโมโซมอลดีเอ็นเอ

ในการสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบปาล์มน้ำมันจะใช้วิธี CTAB method โดยมีวัตถุประสงค์เบื้องต้นเพื่อต้องการประหยัดและสกัดให้ได้ดีเอ็นเอมากๆ แต่ปรากฏว่าวิธีการนี้จะต้องใช้ตัวอย่างในการสกัดปริมาณมากแต่ปริมาณโครโมโซมอลดีเอ็นเอที่ได้ออกมาไม่มากเท่าที่ควรและเป็นดีเอ็นเอที่สกปรกจึงต้องเพิ่มขั้นตอนการทำความสะอาดดีเอ็นเอ ทำให้ได้ปริมาณสุทธิลดลง อีกทั้งใช้เวลาในการสกัดนาน และในขั้นตอนของการสกัดยังต้องมีการใช้สารที่มีพิษต่อร่างกายและสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงได้เปลี่ยนไปสกัดด้วย DNeasy Plant Mini Kit ของ QIAGEN ซึ่งแม้จะมีราคาค่อนข้างสูง แต่ก็สามารถแก้ปัญหาดังกล่าวข้างต้นได้

2. การคัดเลือกไมโครแซตเทลไลท์ดีเอ็นเอ

2.1 การเตรียมดีเอ็นเอสำหรับทำห้องสมุดดีเอ็นเอ

ได้นำโครโมโซมอลดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันทั้งสาม (ดูรา, พิสิเฟอรา และ เทเนอรา) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด คือ *Rsa*I, *Alu*I และ *Hae*III ก็จะได้ดีเอ็นเอที่มีขนาดเหมาะสมนำมาเชื่อมกับ adapter และเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ จะเห็นว่าดีเอ็นเอที่ได้จะมีขนาดตั้งแต่ 200 bp ถึงมากกว่า 1,500 bp ดังแสดงในภาพประกอบ 2



ภาพประกอบ 2 ผลการตัดโครโมโซมอล ดีเอ็นเอ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa*I, *Alu*I และ *Hae*III

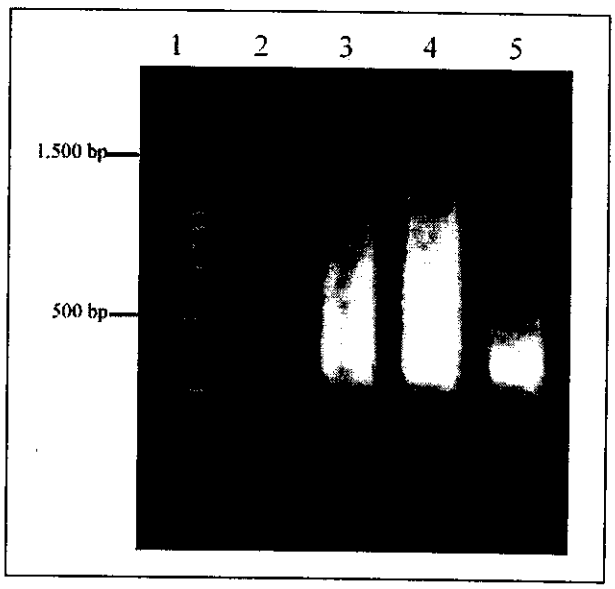
Figure 2 Gel electrophoresis of chromosomal DNA were cut with *Rsa*I, *Alu*I and *Hae*III

lane1 : marker 100 bp

lane2 : cut chromosomal DNA

2.2 การคัดเลือกไมโครแซทเทลไลท์โดยใช้ Streptavidin magnetic beads

ใช้ streptavidin magnetic bead คัดเลือกดีเอ็นเอที่เป็นไมโครแซทเทลไลท์ชนิด $(CA)_{15}$ และ $(GA)_{15}$ เมื่อทำการชะดีเอ็นเอที่ถูกไฮบริไดซ์ระหว่าง oligonucleotide ที่เชื่อม magnetic bead กับ ดีเอ็นเอในขั้นตอนที่แล้ว ก็จะได้ดีเอ็นเอที่คาดว่าน่าจะมีลำดับเป็นไมโครแซทเทลไลท์ โดยสามารถเห็นได้เมื่อนำดีเอ็นเอเหล่านั้นไปทำพีซีอาร์ พบว่าดีเอ็นเอที่ได้จากการคัดเลือกด้วย $(CA)_{15}$ มีขนาดตั้งแต่ 300 bp ถึงประมาณ 1,500 bp ดังแสดงในภาพประกอบ 3 และดีเอ็นเอที่ได้จากการคัดเลือกด้วย $(GA)_{15}$ ที่อุณหภูมิห้องมีขนาดตั้งแต่ 200 – 850 bp และที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส มีขนาดตั้งแต่ 300 bp ถึงมากกว่า 1,500 bp ดังแสดงในภาพประกอบ 4



ภาพประกอบ 3 ผลการทำพีซีอาร์จากการทำ substractive hybridization ชนิด $(CA)_{15}$

Figure 3 Electrophoresis of PCR products from substractive hybridization $(CA)_{15}$

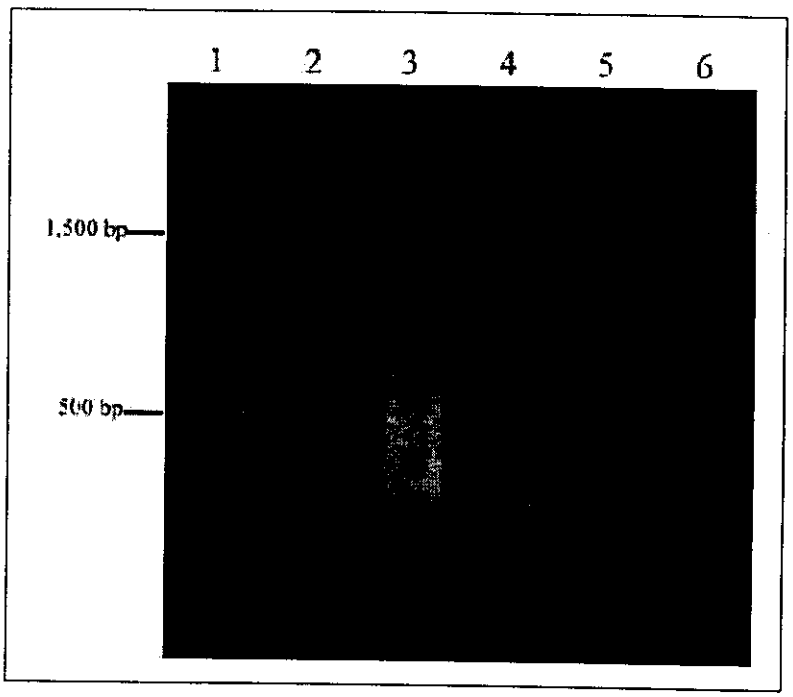
lane1 : marker 100 bp

lane2 : control

lane3 : PCR products from starter DNA 5 microliter

lane4 : PCR products from starter DNA 10 microliter

lane5 : PCR products from starter DNA eluted second time 5 microliter



ภาพประกอบ 4 ผลการทำพีซีอาร์จากการทำ substractive hybridization ชนิด $(GA)_{15}$

Figure 4 Electrophoresis of PCR products from substractive hybridization $(GA)_{15}$

lane1 : marker 100 bp

lane2 : PCR products from starter DNA 5 microliter and hybridize at 65 °C

lane3 : PCR products from starter DNA 10 microliter and hybridize at 65 °C

lane4 : control

lane5 : PCR products from starter DNA 5 microliter and hybridize at room temperature

lane6 : PCR products from starter DNA 10 microliter and hybridize at room temperature

2.3 การโคลนไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ

เมื่อทำการเชื่อมดีเอ็นเอที่ถูกคัดเลือกมากับดีเอ็นเอพาหะ pGEM®-T Easy เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* Top 10F′ พบว่ามี *E. coli* เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โคลนที่ได้จากการคัดเลือกด้วย $(CA)_{15}$ มีจำนวน 198 โคลน และจำนวนโคลนที่ได้จากการคัดเลือกด้วย $(GA)_{15}$ มีจำนวน 319 โคลน ดังแสดงในตาราง 2 และทำการคัดเลือกเฉพาะ โคลนที่มีดีเอ็นเอขนาดต่างๆ อยู่ พบว่าโคลนที่ได้จากการคัดเลือกด้วย $(GA)_{15}$ ที่มีดีเอ็นเอแทรกอยู่มีจำนวน 280 โคลน ดังแสดงในตาราง 2

ตาราง 2 จำนวนโคลนที่ได้จากการคัดเลือกไมโครแซตเทลไลท์ในขั้นตอนต่างๆ

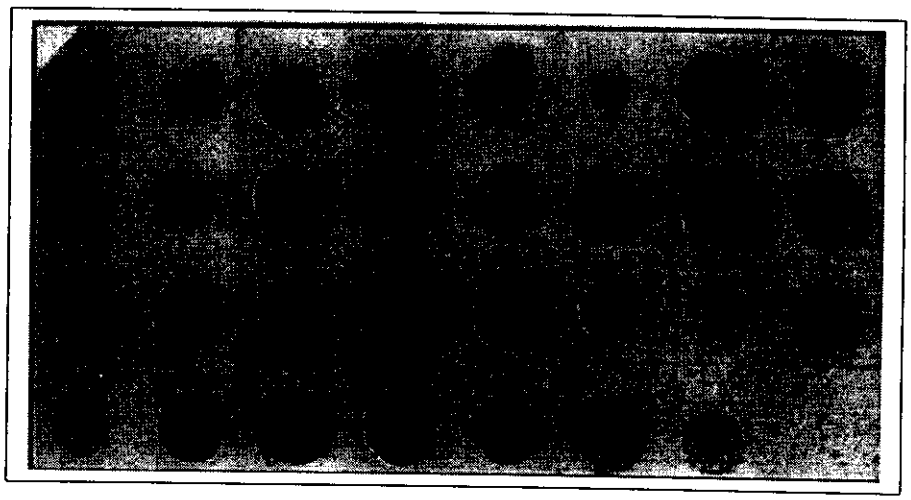
Table 2 Number of clones for microsatellite enrichment in each step

	Number of Clones	
	(CA) repeat	(GA) repeat
1. clone ligate with vector	198	319
2. inserted clone	198	280
3. positive clones of hybridization	34	23
4. sequencing	24	8
5. microsatellite sequence	7	3
6. design primer	3	2

2.4 การตรวจหาพลาสมิดที่มีไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอด้วยวิธี dot blot hybridization

นำโคลนที่มีดีเอ็นเอปาล์มน้ำมันที่เชื่อมกับดีเอ็นเอพาหะมาทำการคัดเลือกอีกครั้งโดยนำมาทำ dot blot hybridization ซึ่งดีเอ็นเอที่เป็นไมโครแซตเทลไลท์ถูกจับด้วยดีเอ็นเอตรวจจับที่มีลำดับเป็นไมโครแซทเทลไลท์ จากปฏิกิริยาจะปรากฏเป็นสีม่วงขึ้น

มา โคลนที่ได้จากการคัดเลือกด้วย $(CA)_{15}$ ที่ให้ผลบวกมีจำนวน 34 โคลน ดังแสดงในภาพประกอบ 5 – 9 และตาราง 2 โคลนที่ได้จากการคัดเลือกด้วย $(GA)_{15}$ จะให้ผลบวกจำนวน 23 โคลน ดังแสดงในภาพประกอบ 10 - 16 และตาราง 2

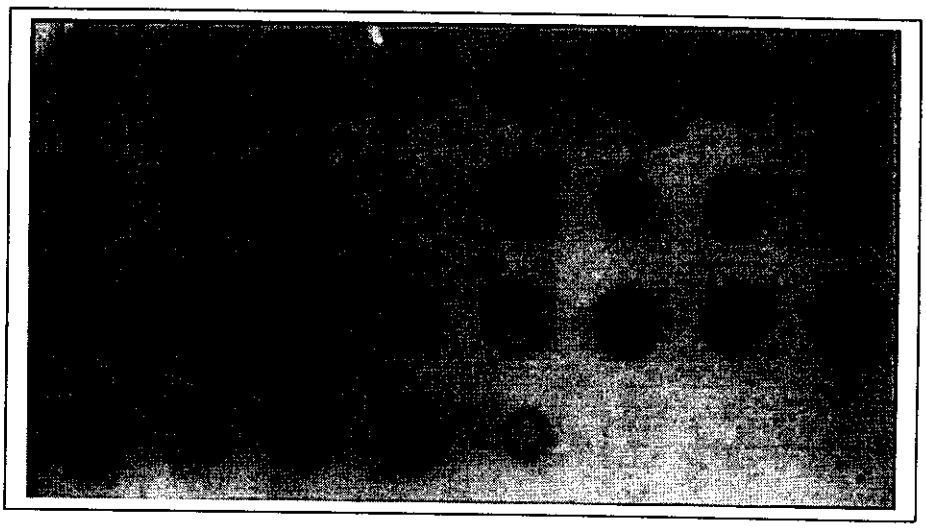


1	2	3	4	5	6	7	8
9	10	11	12	13	14	15	16
17	18	19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30	(-)	

ภาพประกอบ 5 ผลการทำ dot blot hybridization ด้วย $(CA)_{15}$ โคลนที่ 1-30

Figure 5 result of dot blot hybridization by $(CA)_{15}$ clone no. 1-30

(-) คือ negative control



31	32	33	34	35	36	37	38
39	40	41	42	43	44	45	46
47	48	49	50	51	52	53	54
55	56	57	58	59			

ภาพประกอบ 6 ผลการทำ dot blot hybridization ด้วย $(CA)_{15}$ โคลนที่ 31-59

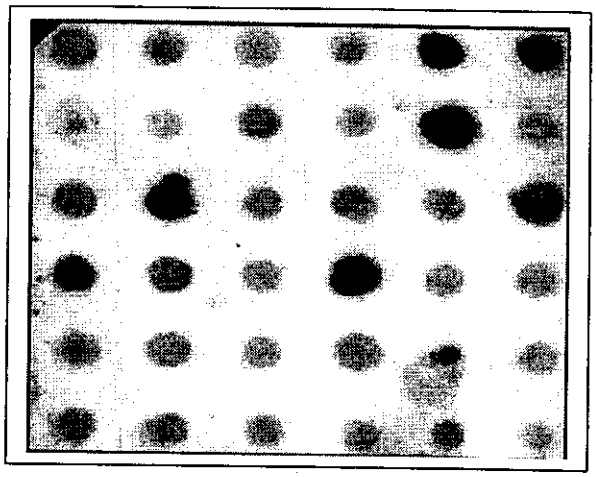
Figure 6 result of dot blot hybridization by $(CA)_{15}$ clone no. 31-59

60	61	62	63	64	65
66	67	68	69	70	71
72	73	74	75	76	77
78	79	80	81	82	83
84	85	86	87	88	89
90	91	92	(-)	(-)	(-)

ภาพประกอบ 7 ผลการทำ dot blot hybridization ด้วย $(CA)_{15}$ โคลนที่ 60-92

Figure 7 result of dot blot hybridization by $(CA)_{15}$ clone no. 60-92

(-) คือ negative control

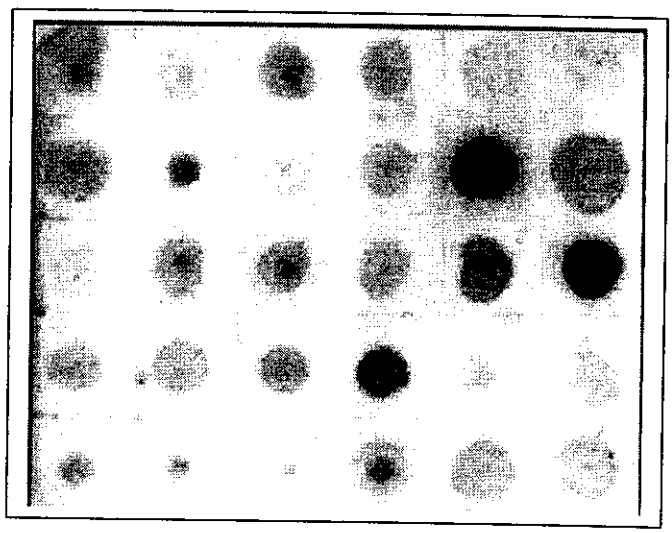


93	94	95	96	97	98
99	100	101	102	103	104
105	106	107	108	109	110
111	112	113	114	115	116
117	118	119	120	121	122
123	124	125	(-)	(-)	(-)

ภาพประกอบ 8 ผลการทำ dot blot hybridization ด้วย $(CA)_{15}$ โคลนที่ 93-125

Figure 8 result of dot blot hybridization by $(CA)_{15}$ clone no. 93-125

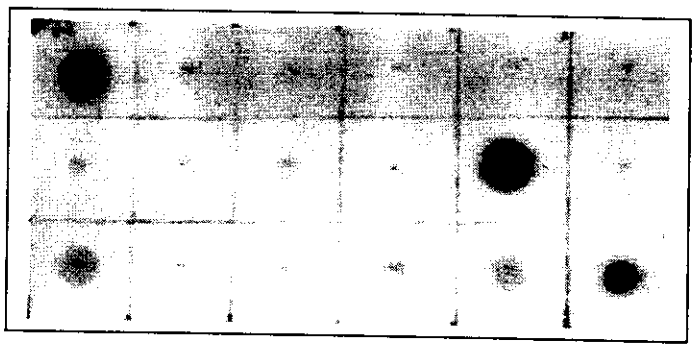
(-) คือ negative control



126	127	128	129	130	131
132	133	134	135	136	137
138	139	140	141	142	143
144	145	146	147	148	149
150	151	152	153	154	155

ภาพประกอบ 9 ผลการทำ dot blot hybridization ด้วย $(CA)_{15}$ โคลนที่ 126-155

Figure 9 result of dot blot hybridization by $(CA)_{15}$ clone no. 126-155



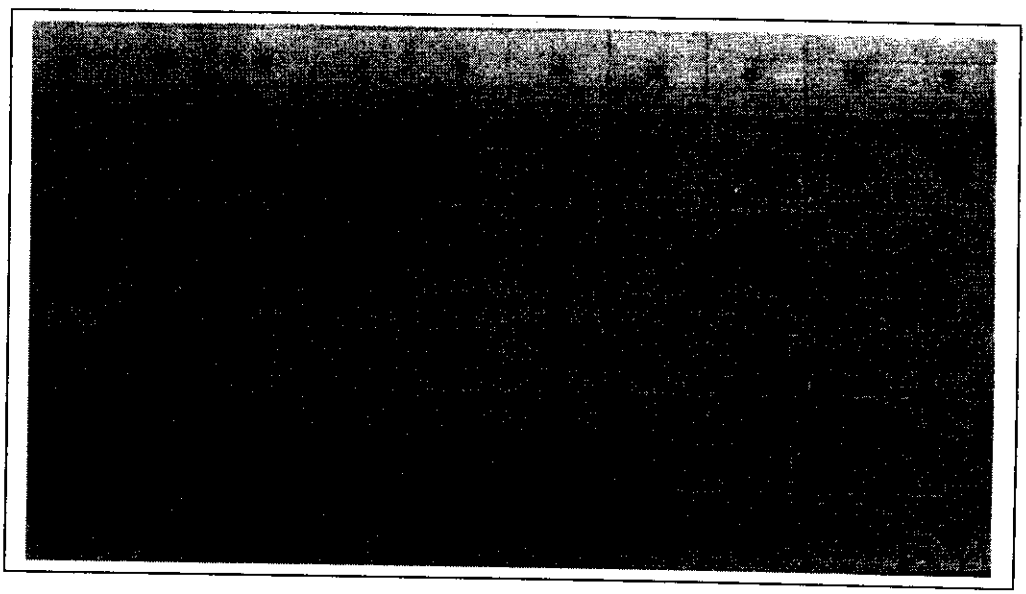
1	2	3	11	13	15
16	18	19	20	21	22
23	24	25	(-)	(-)	(+)

ภาพประกอบ 10 ผลการทำ dot blot hybridization ด้วย $(GA)_{15}$ โคลนที่ 1-25

Figure 10 result of dot blot hybridization by $(GA)_{15}$ clone no. 1-25

(-) คือ negative control

(+) คือ positive control



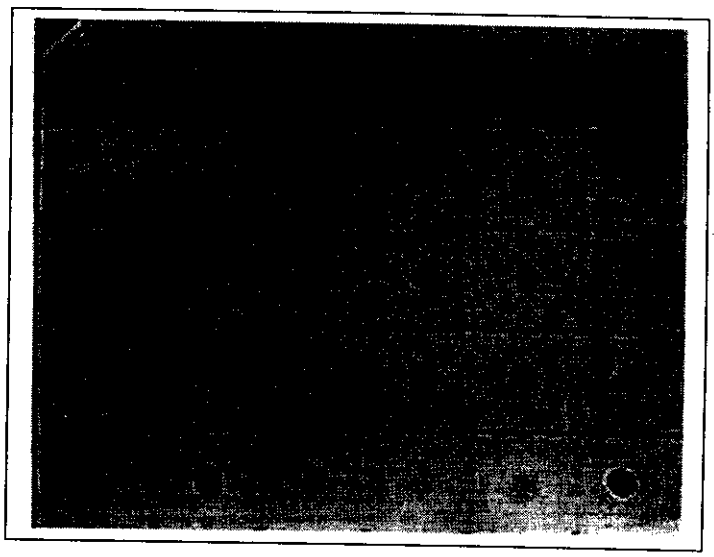
29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
39	42	43	44	45	46	47	48	49	50
51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
61	62	63	64	65	68	69	70	71	72
73	74	75	76	77	78	79	80	81	82
83	84	85		1	21	(-)	(-)	(+)	(+)

ภาพประกอบ 11 ผลการทำ dot blot hybridization ด้วย $(GA)_{15}$ โคลนที่ 29-85

Figure 11 result of dot blot hybridization by $(GA)_{15}$ clone no. 29-85

(-) คือ negative control

(+) คือ positive control



86	89	90	91	92	94
95	96	97	98	99	100
101	102	103	104	105	106
107	108	109	110	111	112
113	114	115	(-)	(-)	(+)

ภาพประกอบ 12 ผลการทำ dot blot hybridization ด้วย $(GA)_{15}$ โคลนที่ 86-115

Figure 12 result of dot blot hybridization by $(GA)_{15}$ clone no. 86-115

(-) คือ negative control

(+) คือ positive control

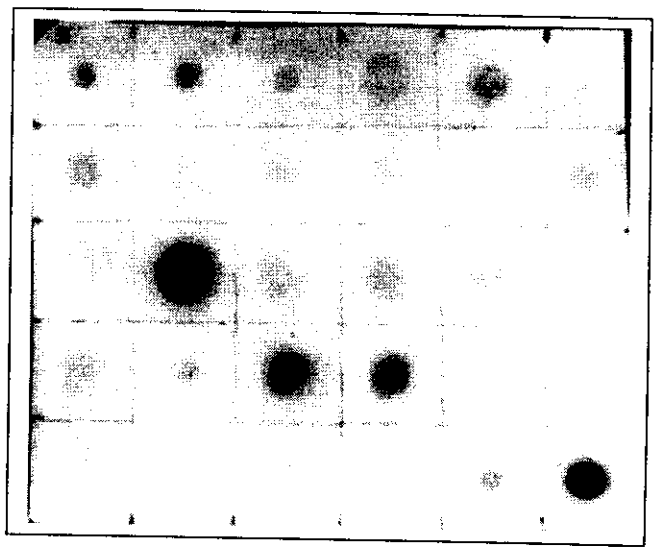
118	119	120	121	122	123
124	125	126	129	130	131
133	135	136	137	138	139
133	135	136	137	138	139
140	141	142	143	(-)	(+)

ภาพประกอบ 13 ผลการทำ dot blot hybridization ด้วย $(GA)_{15}$ โคลนที่ 118-143

Figure 13 result of dot blot hybridization by $(GA)_{15}$ clone no. 118-143

(-) คือ negative control

(+) คือ positive control



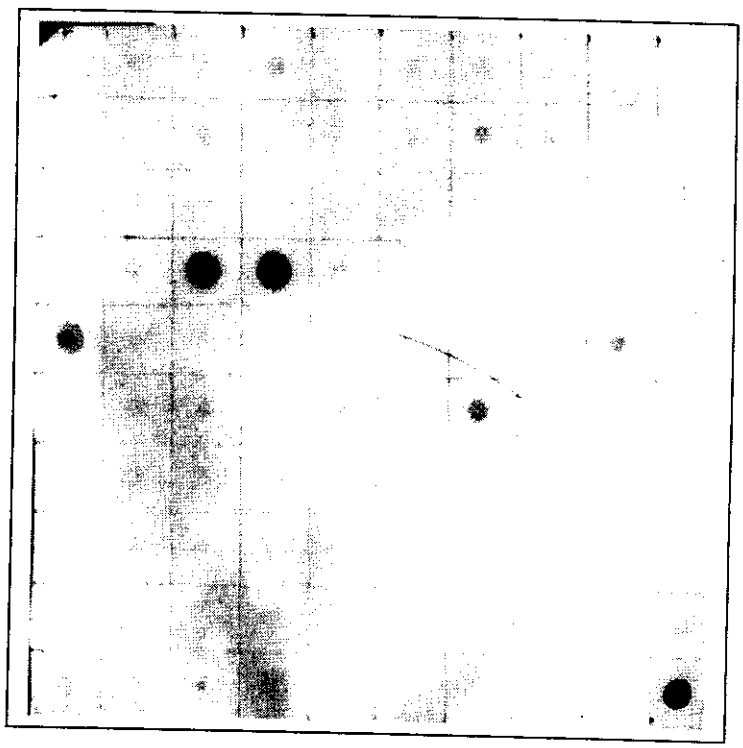
144	145	146	147	148	149
150	151	152	154	155	156
157	158	159	160	161	162
164	165	166	167	168	169
170	171	172	173	(-)	(+)

ภาพประกอบ 14 ผลการทำ dot blot hybridization ด้วย $(GA)_{15}$ โคลนที่ 144-173

Figure 14 result of dot blot hybridization by $(GA)_{15}$ clone no. 144-173

(-) คือ negative control

(+) คือ positive control



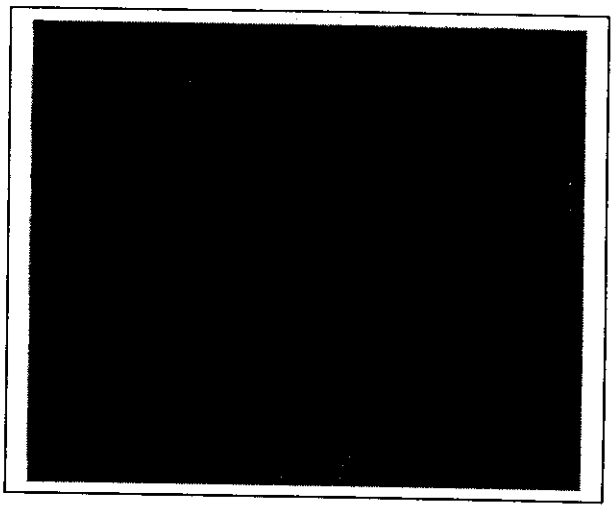
174	175	176	177	178	179	180	181	182	183
184	185	186	187	188	189	190	191	192	193
194	195	196	197	198	199	200	201	202	203
204	205	206	207	208	209	210	211	212	213
214	215	216	218	221	222	225	226	229	230
232	233	234	235	236	237	238	239	242	243
244	245	246	248	249	250	251	252	253	254
255	256	257	258	259	260	261	262	263	264
265	266	267	268	269	270	271	272	273	274
275	276	277	278	279	280	281	282	(-)	(+)

ภาพประกอบ 15 ผลการทำ dot blot hybridization ด้วย $(GA)_{15}$ โคลนที่ 174-282

Figure 15 result of dot blot hybridization by $(GA)_{15}$ clone no. 174-282

(-) คือ negative control

(+) คือ positive control



283	284	285	286	287	288	289
290	291	292	293	294	295	296
297	298	299	300	301	302	303
304	305	306	307	308	309	310
311	312	313	314	315	316	317
318	319	(-)	(-)	(+)	(+)	

ภาพประกอบ 16 ผลการทำ dot blot hybridization ด้วย $(GA)_{15}$ โคลนที่ 283-319

Figure 16 result of dot blot hybridization by $(GA)_{15}$ clone no. 283-319

(-) คือ negative control

(+) คือ positive control

2.5 การหาและวิเคราะห์ลำดับเบส

โคลนที่ให้ผลบวกนำมาหาลำดับเบสโดยใช้ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kits ในเครื่อง Biosystems 377 sequencer (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) พบว่า มีการหาลำดับเบสที่ได้จากการคัดเลือกด้วย $(CA)_{15}$ จำนวน 24 โคลน และลำดับเบสที่ได้จากการคัดเลือกด้วย $(GA)_{15}$ จำนวน 8 โคลน ดังแสดงในตาราง 3 แต่มีบางลำดับเบสที่ซ้ำกันและบางโคลนไม่สามารถหาลำดับเบสได้สรุปแล้วลำดับเบสที่ได้จากการคัดเลือกด้วย $(CA)_{15}$ จำนวน 18 โคลน และ $(GA)_{15}$ จำนวน 3 โคลน ดังแสดงในตาราง 2

ตาราง 3 ผลของการหาลำดับเบสจาก positive clones

result of sequencing from positive clones

Clone	Sequence
007n	CCATTGGATGGGCTTCCTTCCAGATCCAAAGGCATGGGTTGAT GGTGCCAATAAGAAAAGCATTGCGACTTCTCATGTGAACACC GTAAGTTGAGTTCGAAGAGTCCTTCTGAAATAAGGCACCTCTT CAACCCAACTTTGATGTCCACATGACTTTTTCTCATCAAATGG AGTGTGAGAAATTGAGAGGAGGTGTGAGATGAGGTGTGAGTG GGTGTNAAATGCTT
012n	CCTCTGTGGATCATCCACACAGCTCCTAAACTAGAGTGGTCAA TCCCATCTTCACACACGCACCGACAAGTCAAGTACTTGACCAC ACCCAGCAGCCTTCCATCATTGAATTAGAAATTCAGGTAGTCC AGTGCCTAAGTGCAGTGAGTTGCTTGCAAGTCACCGTGACGGT CTCAGGTCGGAGGGACATTTATACCCATATCCCATCGGAGCAA ATTTTGAT
015n	GGGAAGAGTTTGGAATGAGCGATGACTCCTCGACGTGCACCC CTATTTATATTGCACGTAGGGGTGCAAACCAAGCATCTCACAC

ตาราง 3 (ต่อ)

Clone	Sequence
	CCACTCACACCTCATCTCACACCTTCTCTCAATTTCTCACACTC CATTTGGTGAGAAAAATCCATGTGGACATCAATGTTAGGTTGA AGAGGTGCCTTATTTCAGAAGGACTCTCCAAACAAAACTTACG GTGTTCACATGAGAAGTCGCAATGCTTCTCTTATTGGTGCCAT CAACCCATGCCTTTGGATCTGGAAGGAAGCCCATCCAATGG
017n	CTGCTCTAAGCTTCCCAATATATATGCTACTGTACAACTTCTAT CACACACACACCGAACATTTTGGTCTTTTACGTAAACATGGCC CTTCTTCTTTGCCACTAAATCCAGTCTAATAGTAGGGACTGAA AAACTCCAATCATGGTTGACTCGTGCTGCATAAAAAGGAAAA GAATGGT
018n	ACACCGGTGGTGGAGGCGAATGCACCGGTGGTGGAGGCGAAT GCACCGGTGGTGGAGGAGATGCTAGTGGTGGTGGTGGTGAGT GGACTGGAGGTGGCGGAGATTGGACCACTGGTGGGGGTGGTG AGTGAACTGGAGGAGGTGGCGAGAAGACGGGTGGCGGTGGT GAGTGGACCGGTGGAGGTGGTGGTGAGTGAACAACAATTGCT GGGGGTGGTGAG
020n	ACTGTGTCTCTGCTTGTGTGTGGTGTGTTTGTTTGCAGCTGTTT AATAACGGTGGGAGTGCCACCTTGTTGCCGAGTTGAAACTCG GAACCTCTACTCAGCTGGTGAGGACTGGGAGGGGACGTTTCA TGTGTTTTGCATGTATGAAAGTTTGCTGTTCTCTCTTTGTGGTC ATCTCGTGTTCTTGATTGCTTACTTAAATTGCTCGATGTCTGAT GAAATTTCTGCTTGGACGATAACAATCATCGTTCATCCGGGGG TGTTTTTGCTATGATCCACGTGCTTGGTTCAATAATTTGGTGAT GACTTGGTTAGG

ตาราง 3 (ต่อ)

Clone	Sequence
021n	AAGCATCTCACACCCACTCACACCTCATCTCACACCTCCTCTC AATTTCTCACACTCCATTTGATGAGAAAAAGTCATGTGGACAT CAAAGTCGGGTTGAAGAGGTGCCTTATTGCAGAAGGACTCTTC GATATTAACTTACGGTGTTCACATGAGAAGTCGCAATGCTTCC CTTATTGGCGCCATCAACCCATGCCTTTGGATCTGGAAGAAAG CCCATCCAATGG
022n	CCATTGGATGGGCTTCCTTTCAGATCCAAAGGCATGGGTTGAT GGCGCCAATAAGAGAAGCATTGCAACTTCTCATGTGAACACC ATAAGTTGAGTTCGGAGAGTCCTTCTGAAATAAGGCACCTCTT CAACCCAACTTTGATGTCCACATGGATTTCTCTCATCAAATGG AGTGTGAGAAATTAAGAGGAGGCATGAGATGAGGTGTGAGTG GGTGTGAGATGCTTGGTTTGCACCCCTACGTGCAATAT
026n	AAGCATCTCACACCCACTCACACCTCATCTCACACCTCCTCTC AATTTCTCACACTCCATTTGATGAGAAAAAGTCATGTGGACAT CAAAGTCGGGTTGAAGAGGTGCCTTATTGCAGAAGGACTCTTC GATATTAACTTACGGTGTTCACATGAGAAGTCGCAATGCTTCC CTTATTGGCGCCATCAACCCATGCCTTTGGATCTGGAAGAAAG CCCATCCAATGG
027n	ATCGTCTATGTTAAGATGGACGGCCGCACGCACGCACACATTA AAAAACCTAAAAAGGAAGGAAAGTACATGGCTTAGTTTTGTA TCTTTAATTGCTGGTTAACATGATGTTCACATAACCTGACGGG AGG
032n	CCATTGGATGGGCTTCCTTCCAGATCCAAAGGCATGGGTTGAT GGTGCCAATAGGAGAAGCATTGCGACTTCACATGTGAACACC

ตาราง 3 (ต่อ)

Clone	Sequence
	GTAAGTTGAGTTCGAAGAGTCCTTCTGCAATAAGGTGCCTCTT CAACCCAACTTTGATATCCAAATGGCTTTTTCTCATCAAATGG AGTGTGAGAAATTGAGAGGATGCATGAGATGAGGTGTGAGTG GGTGTGAGATGCTTGGTTTGCACCCCTACGTGCAATATAAATA GGGGTGCACGCCAAGGAGTCATTGCTTA
036n	GGGAAGAGTTTGGAATGAGCGATGACTCCTCGACGTGCACCC CTATTTATATTGCACGTAGGGGTGCAAACCAAGCATCTCACAC CCACTCACACCTCATCTCACACCTTCTCTCAATTTCTCACACTC CATTTGGTGAGAAAAATCCATGTGGACATCAATGTTAGGTTGA AGAGGTGCCTTATTTCAGAAGGACTCTCCAAACAAAACTTACG GTGTTCACATGAGAAGTCGCAATGCTTCTCTTATTGGTGCCAT CAACCCATGCCTTTGGATCTGGAAGGAAGCCCATCCAATGG
086n	ACGTGCGCATACACACACACACACACACTCACTCACTCACTCA CTTACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCACTCA CTCACTCACACTCAAACACAAGCACAAGCACACACACGCACG CACACACACTCACACTCAAACACAAGCACACACACCCACCGC TGCAAAACGTGAGGCGAAAGCAAAAACGACCAGGAATGAGG AAACACAG
087n	ACGCGGGGGTGCGCGTGCGTGAGTGAATGAGTGAATGAGTGA TTCGGAAAACAAGAGATTGATTGGAGGTGCGACTGAGAGAGA GAGAGAGAGAGAGAGAGAGGGAGAGGGAGTTGAGCAAAGAG ATCTATTTGATAGGAAG
091n	CCTTGGCTCATCCCTGAAGCATCTCTTCAAATGCAATGGGAGA TCAAGTGGTACAAGGTCTCTCTTTCTCTCTCTCTCTCACTCA

ตาราง 3 (ต่อ)

Clone	Sequence
	CACGCATACGCACACACACACACGCGCGCGCGCACGCAGTCA CACACACACACCCACACTCACTCACTGCTGCATGGTGCAAGG GTAGCGTTCTTGTTAGAAATCCCACTCTGCCAGTGGATGGTAA CCCCGACCATTCCTTGT
092	ACAGACGTAACTACACGAGCACACGCACATACGCTCATACAC ATGTATTTTACCCACATGCTCTCTCTCTCTCTCTCACTTATA AAGACCCACATACAGACATACACACGCACTTATATACGCGTG GGAGCGCTCACATTCACACACCACACACACACATTCACACAC CACACACACATTCACACACCACACACGCATAC
103n	ACAGGACAGCTCATGAACAAAAGCAACAGGCACAACAACAC ACACAAGCACCTTAGTAATTGCAGCCACACCAACAGACTAAC CCTCAAGCATACAGGGCAGCACATGAACAAACAAAACAGACA CAGCAACACATGCAAGCACCTTGATAACTTTAGCCCACGCCCA CTGGCAATCACACAAACTGACATGCATACAGGGCAGGGCATG AACAACTCACTCACAACAACACAGTTATNATAGCACACAACA TACACAACACTCTNAAG
136n	CTGCATTGGCAAATGAAGGAGAAGATTAAAACAAACTAAAGG AGGTGAAATTTTCACTCATACATCTGGCAAAATAAAAACTACT GTAATACTTGCCTCATAGGGGTAATCCATCTTCCTCATAACGT TATATGCTTTCCATGGAGGCTCCATGATCTGACAACATAACAT GTGAATAATATGAGATAATCAAAAAATGCAAAATGTAAGAAT ACATAATCCGGCATGCTTCATACTGTAACTTATGGCTTGCACA CGCACATGCACACCCGCACCAACACCCACACCCGCAACCATG CTCCCCTGCCCAATCATGTGCCACGCACATGT

ตาราง 3 (ต่อ)

Clone	Sequence
1C(1)	CCAGTTTGGGCTTCGAAAATCCGGTGTTTGGCTTCCAAGTTCG ATTTGTGGCTGTTTCTGATATCGATGTTTCTTTGTGTTATTGTTT GTTTGTCTGTTTCTGTTGCTCTCTTCTCTTCTCTTCTCTTTCTGT CTCTCTCTCTNTTCTNTTNNTGTCTCTCNCTCTCTCTCNCTCTCT CTCTCTCT
2C(21)	CTGTGGGGCGACGATGGCTGTGTTGCTGTCTCTCTCTCTCTCTT TCTCTCTCTGTTTCTGTGTTTGTTTCGGTCCCTCTTTCTCTCTCT CTCCCCCCCTCTCTCTCTGTTTCTGTGTTTGTTTCAGTCTCTCTC TCTCTCTTTCTCTCTCTGTTTCTGTCTTT
3C(54)	ACAGACGTAGCTACACGAGCACACGCACATACGCTCATACAC ATGTATTTTACCCACATGCTCTCTCTCTCTCTCACTTATAAA GACCCACATACAGACATACACACGCACTTATATACGCGTGGG AGCGCTCACATTCACACACCACACACACACATTCACACACCAC ACACACATTCACACACCACACACGCATAC

2.6 การออกแบบไพรเมอร์

จากการวิเคราะห์ลำดับเบสพบว่ามีลำดับเบสที่เหมาะสมจะนำไปศึกษาต่อ โดยโคลนที่ได้จากการคัดเลือกด้วย $(CA)_{15}$ มีจำนวน 3 โคลน โคลนที่ได้จากการคัดเลือกด้วย $(GA)_{15}$ มีจำนวน 2 โคลน มีความเหมาะสมที่จะใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ ดังแสดงใน ตาราง 4

ตาราง 4 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ออกแบบในไมโครแซทเทลไลท์ชนิดต่างๆ

Table 4 Primer designation and their sequences for oligonucleotides designed for microsatellite Study

Type of Microsatellite	Clone	Primer	Sequence $5' \rightarrow 3'$
$(CA)_n$ repeat	086n	MJT-1	Data not show but report in manuscript
		MJT-2	Data not show but report in manuscript
	087n	MJT-3	Data not show but report in manuscript
		MJT-4	Data not show but report in manuscript
	091n	MJT-5	Data not show but report in manuscript
		MJT-6	Data not show but report in manuscript
$(GA)_n$ repeat	1C(1)	T:CT-1	Data not show but report in manuscript
		840	Data not show but report in manuscript
		T:CT-1	Data not show but report in manuscript
		841	Data not show but report in manuscript
		T:CT-1	Data not show but report in manuscript
		842	Data not show but report in manuscript
	2C(21)	T:CT-2	Data not show but report in manuscript
		T:CT-3	Data not show but report in manuscript

3. การศึกษา polymorphism ของปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์

เมื่อนำไพรเมอร์ที่ออกแบบมาทดสอบกับปาล์มพันธุ์ต่างๆ พบว่าไพรเมอร์ MJT-1 และ MJT-2 เท่านั้นที่สามารถบอกความแตกต่างของแต่ละพันธุ์ เมื่อนำไพรเมอร์ไปเพิ่มจำนวน ดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน จะได้ดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายตั้งแต่ 200 bp ถึง 1,500 bp ซึ่งมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอทั้งหมด 12 แถบ ในที่นี้พบแถบที่เป็น

polymorphic DNA จำนวน 9 แถบ และ monomorphic DNA 3 แถบ แถบน่าสนใจมีขนาด 200 bp (CA1) และ 400 bp (CA2) พบว่าสามารถใช้แยกปาล์มน้ำมันคู่ผสม 105 และ 116 ออกจากกันดังภาพประกอบ 17 และตาราง 5

4. การศึกษา polymorphism ของปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิค EPIC

จากการนำไพรเมอร์ของยีนทั้ง 3 ชนิด คือ ยีน Alcohol dehydrogenase, ยีน Calmodulin และ ยีน Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase มาใช้เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมัน พบว่ามีเพียงไพรเมอร์ชนิดเดียวที่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ปาล์มน้ำมัน คือ ไพรเมอร์ CAMXIF/R ซึ่งมีการสังเคราะห์ทั้งหมด 13 แถบ มีขนาดอยู่ในช่วง 200 bp ถึง 1,500 bp พบ polymorphic DNA จำนวน 11 แถบ และ monomorphic DNA จำนวน 2 แถบ และแถบที่สนใจที่จะนำมาบอกความแตกต่างในแต่ละพันธุ์คือแถบขนาด 300 bp (CAM1) และ 500 bp (CAM2) พบว่าสามารถใช้แยกปาล์มน้ำมันคู่ผสม 105 และ 116 ออกจากกันดังภาพประกอบ 18 และตาราง 5

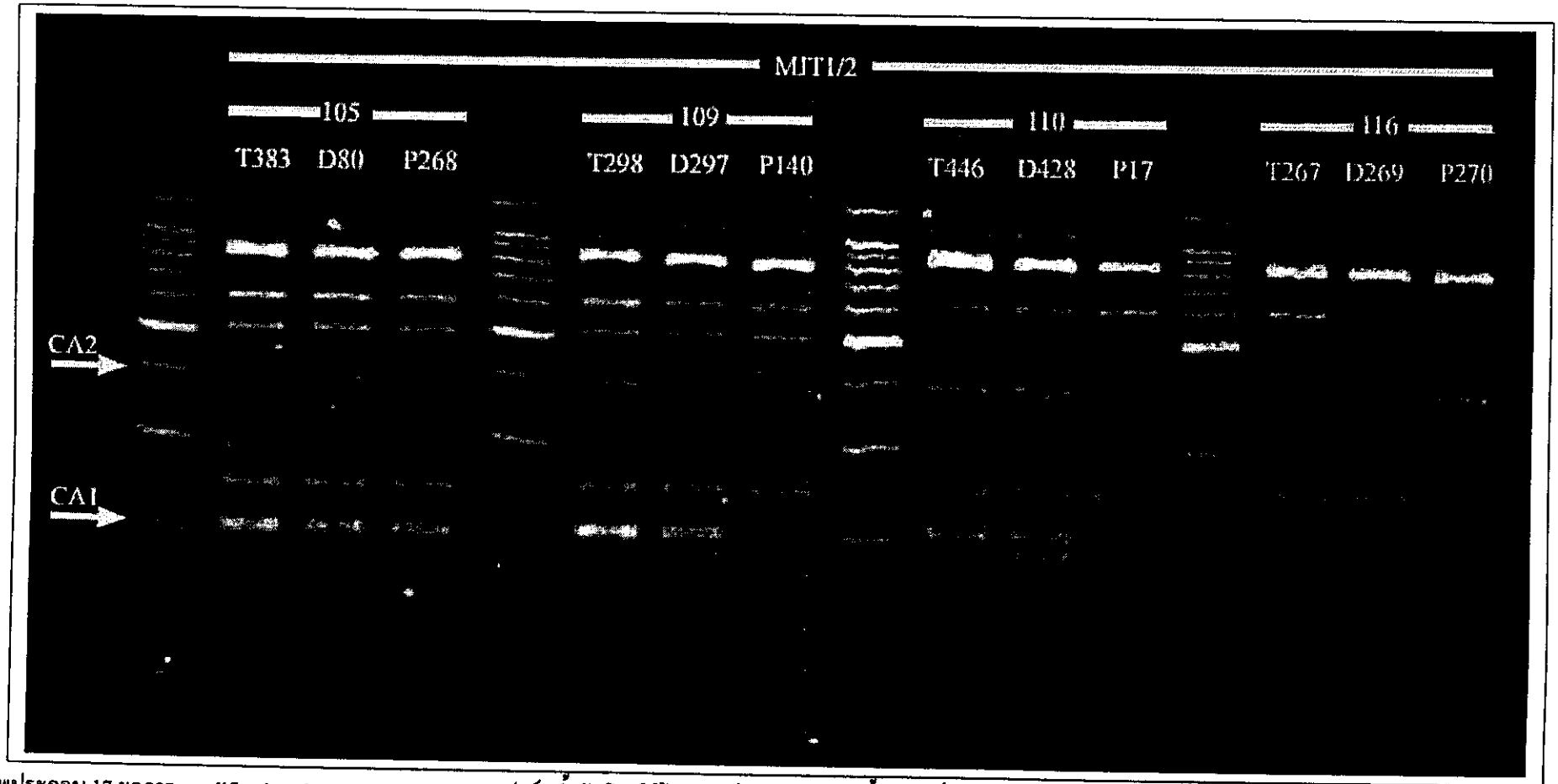
5. การศึกษา polymorphism ของปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิค RAPD

ใช้เทคนิค RAPD แยกความแตกต่างของปาล์มน้ำมันพันธุ์ต่างๆ โดยได้ทดลองใช้ชุดไพรเมอร์จำนวน 27 ชนิด พบว่าไพรเมอร์จำนวน 13 ชนิด ไม่สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ และไพรเมอร์อีก 14 ชนิด สามารถเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้ โดยเมื่อนำมาทดสอบกับปาล์มน้ำมัน พบว่ามีเพียงไพรเมอร์ชนิดเดียวที่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างพันธุ์ปาล์มน้ำมันได้คือ UBC731 ซึ่งสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ทั้งสิ้น 5 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 600 bp ถึง มากกว่า 1,500 bp มีบริเวณที่เป็น polymorphic DNA จำนวน 3 แถบ และบริเวณที่เป็น monomorphic DNA จำนวน 2 แถบ แต่มีบริเวณที่สนใจที่จะนำมาแยกถึงความแตกต่างของปาล์มน้ำมันแต่ละพันธุ์ ซึ่งมีขนาด 1,000 bp (RAP1) และ 1,250 bp (RAP2) พบว่าสามารถใช้แยกปาล์มน้ำมันคู่ผสม 105 และ 110 ออกจากกันดังภาพประกอบ 19 และตาราง 5

ตาราง 5 แบบแผนที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ 3 ชนิด ที่สามารถแยกความแตกต่างของปาล์มน้ำมันบางคู่ผสมได้

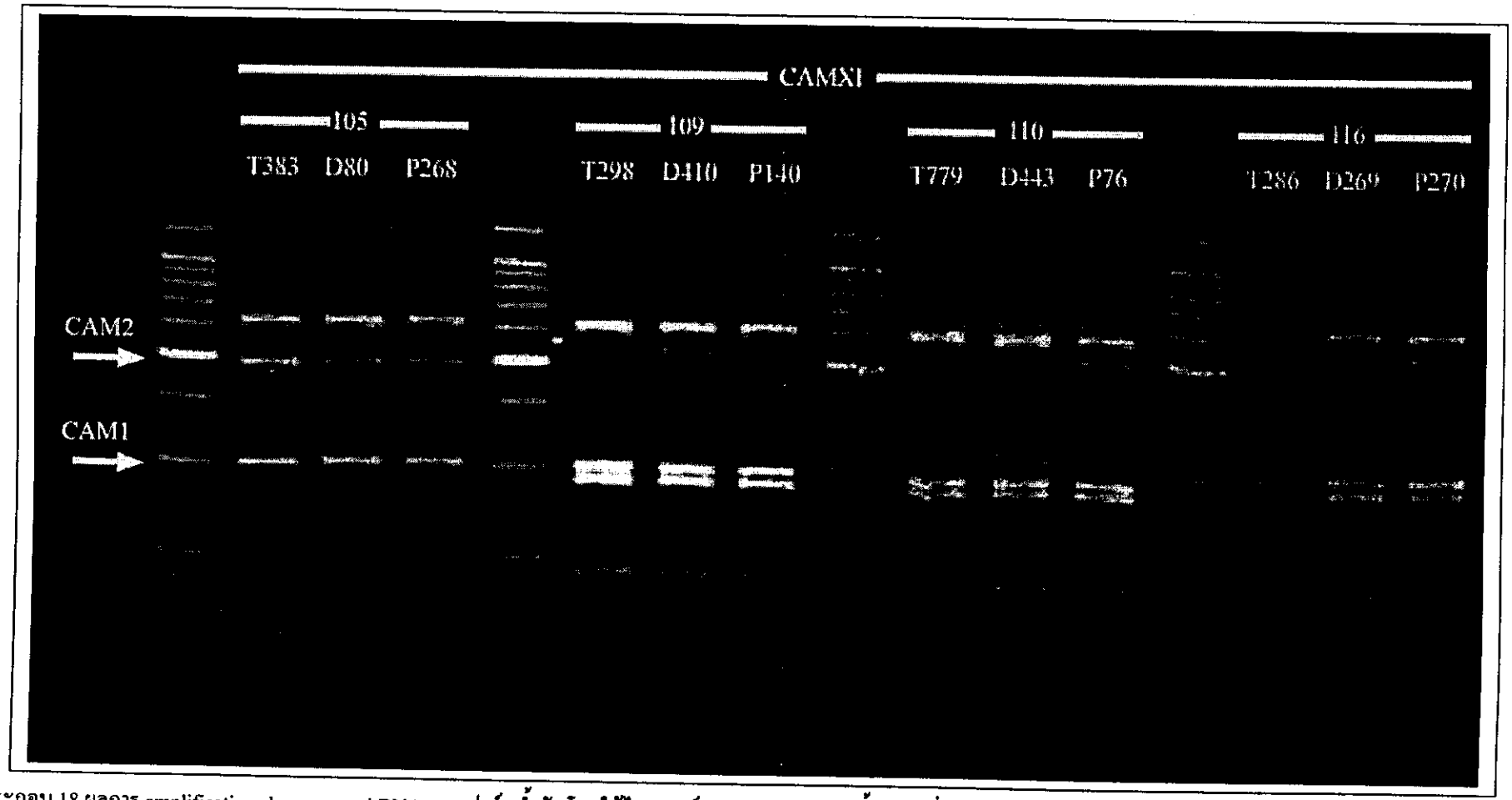
Table 5 Result of amplification by three primers

Primer Set	Number of Amplified Fragments			
	Total Bands	Monomorphic DNA Bands	Polymorphic DNA Bands	Cross that can be identified
MJT1/2	12	3	9	105, 116
CAMXIF/R	13	2	11	105, 116
UBC731	5	2	3	105, 110



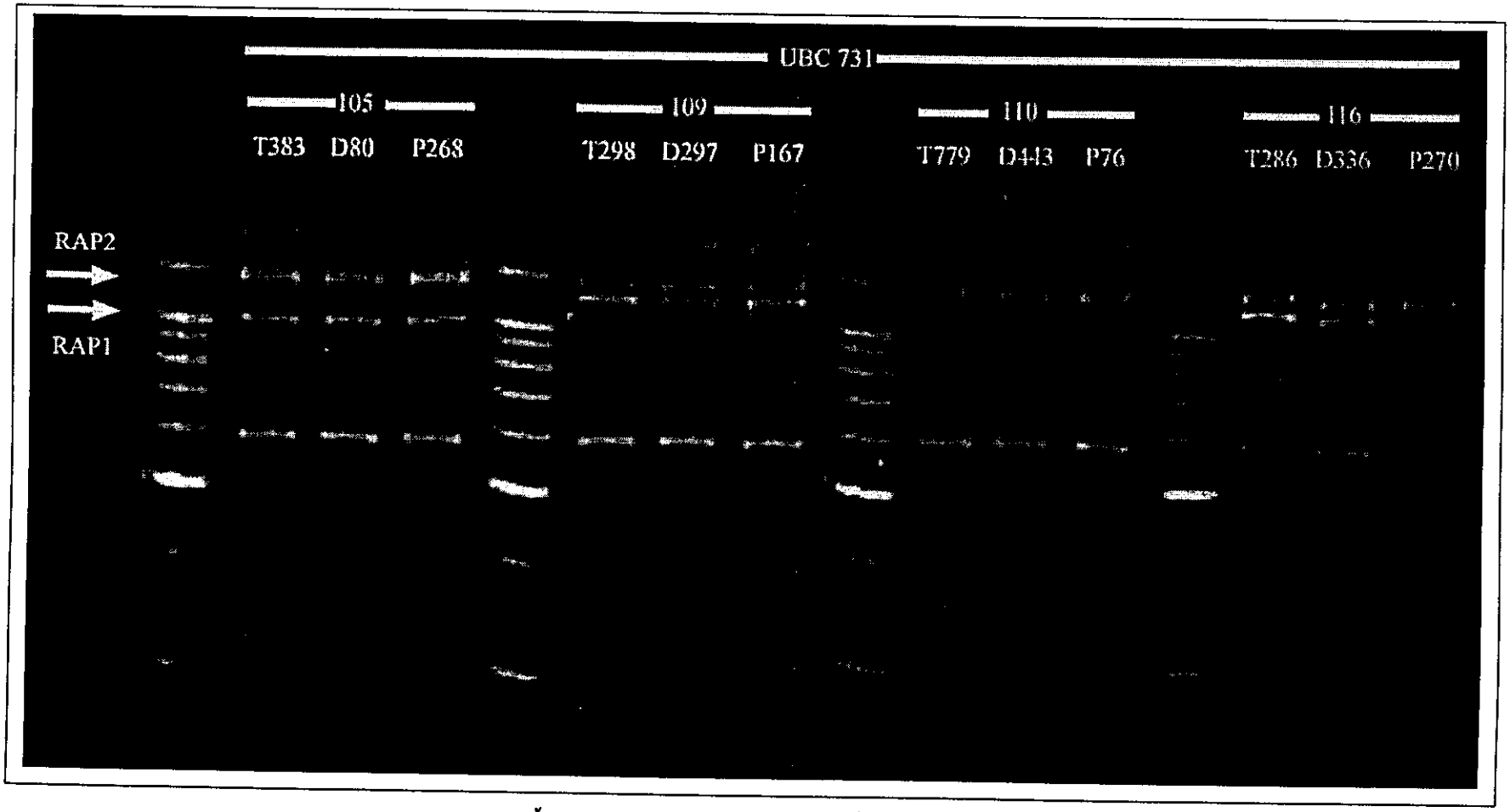
ภาพประกอบ 17 ผลการ amplification chromosomal DNA ของ ปาล์มน้ำมันโดยใช้ไพรเมอร์ MJT1/2 ลูกศรชี้บริเวณที่เกิด polymorphic และสามารถนำมาแยกความแตกต่างของปาล์มน้ำมัน

Figure 17 PCR amplified patterns by MJT1/2 primer in oil palm. The arrows indicate the position of polymorphic marker



ภาพประกอบ 18 ผลการ amplification chromosomal DNA ของ ปาล์มน้ำมัน โดยใช้ไพรเมอร์ CAMXIF/R ลูกศรชี้บริเวณที่เกิด polymorphic และสามารถนำมาแยกความแตกต่างของปาล์มน้ำมัน

Figure 18 PCR amplified patterns by CAMXIF/R primer in oil palm. The arrows indicate the position of polymorphic marker



ภาพประกอบ 19 ผลการ amplification chromosomal DNA ของ ปาล์มน้ำมันโดยใช้ไพรเมอร์ UBC731 ลูกศรชี้บริเวณที่เกิด polymorphic และสามารถนำมาแยกความแตกต่างของปาล์มน้ำมัน

Figure 19 PCR amplified patterns by UBC731 primer in oil palm. The arrows indicate the position of polymorphic marker