การประยุกต์เทคนิคแฮตอาร์เอพีดีเพื่อตรวจสอบการกลายในถั่วเขียว

Applied HAT-RAPD Technique for Detection of Mutation in Mung Bean

จาตุรงค์ สัมฤทธิ์[1], **ธีระชัย ธนานันต์**[1] **และ นฤมล ธนานันต์**[2]*

Jaturong Sumrith, Theerachai Thanananta and Narumol Thanananta[2]*

[1]*ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ปทุมธานี 12120;* [2]*คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์ ปทุมธานี 13180*

[1]*Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Rangsit Campus, Pathum Thani 12120;* [2]*Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under Royal Patronage, Pathum Thani 13180*

**Corresponding author: narumolpla@yahoo.com*

บทคัดย่อ

ถั่วเขียว [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] เป็นพืชตระกูลถั่วชนิดที่นิยมใช้ประกอบเป็นอาหารทั้งหวานคาว มีถิ่นกำเนิดในประเทศอินเดีย สามารถเพาะปลูกได้แทบทุกฤดูกาล แต่ปลูกได้ดีในช่วงฤดูฝน นักปรับปรุงพันธุ์ในประเทศไทยได้ปรับปรุงพันธุ์ถั่วเขียวอย่างต่อเนื่อง โดยปัจจุบันพันธุ์ที่นิยมปลูกคือพันธุ์กำแพงแสน 2 ซึ่งมีคุณลักษณะคือ ให้ผลผลิตสูงและต้านทานโรคใบจุด ดังนั้นจึงได้นำเมล็ดถั่วเขียวพันธุ์นี้มาทดลองฉายรังสีแกมมาที่ระดับ 200, 400, 500, 600, 700 และ 800 เกรย์ แล้วเพาะปลูก เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของวิธีการตรวจสอบการกลายโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลชนิดแฮตอาร์เอพีดี จากการศึกษาพบว่าเมล็ดถั่วเขียวที่ได้รับรังสีแกมมาเมื่อเพาะปลูก 7 วัน มีค่า LD_{50} ที่ 678.43 เกรย์ และเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีพบว่าเมล็ดถั่วเขียวที่ได้รับรังสีแกมมา 400 เกรย์ ให้ความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอมากที่สุด (ให้ค่าใกล้เคียงกับค่า LD_{30}) ซึ่งเป็นระดับรังสีแกมมาที่ก่อให้เกิดการกลายสูงสุด แสดงให้เห็นว่าเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีสามารถตรวจสอบการกลายในถั่วเขียวได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถประยุกต์ใช้กับการตรวจสอบการกลายในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยและการปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการกระตุ้นให้เกิดการกลาย

ABSTRACT

Mung bean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] is a legume used as a kind of food and dessert. It is native to the Indian subcontinent and can be grown during the three times a year, but prefered the late rainy season is strongly recommended. Thai breeders have been breeding in mung bean continuously. Today, the growing popularity of breed is Khampang Saen 2 (KPS2) which features a variety of high yield and resistance to leaf spot. Therefore, the mung bean seed also tested and irradiated at 200, 400, 500, 600, 700 and 800 Gy and then grown to check the efficiency of the mutant effect by using HAT-RAPD technique. In this study found that mung bean have been grown for 7 days, gamma radiation on the LD_{50} is 678.43 Gy and HAT-RAPD technique show that mung bean at 400 Gy of gamma radiation have differences in DNA fingerprinting (A value close to LD_{30}) was the gamma radiation levels that cause the most mutation. This suggests that HAT-RAPD technique can determine the efficiency of mutation in mung bean and applied to detect mutation in the other organisms. This is especially useful for research and breeding methods to induce.

คำสำคัญ: เขียว, แฮตอาร์เอพีดี, การกลาย

Keywords: mung bean, HAT-RAPD, mutation

บทนำ

ถั่วเขียวเป็นพืชที่นิยมปลูกในพื้นที่บริเวณเอเชียกลางและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Shanmugasundaram, 1988) โดยถั่วเขียวเป็นพืชอายุสั้น ใช้น้ำน้อยกว่าพืชไร่อื่นหลายชนิด สามารถใช้ในระบบปลูกพืช เช่น ทดแทนข้าวนาปรัง ปลูกก่อนข้าวโพดในพื้นที่ประสบภัยแล้ง ใช้ปลูกก่อนหรือหลังการทำนาหรือทำไร่ เพื่อตัดวงจรการระบาดของศัตรูพืช ช่วยบำรุงรักษาความอุดมสมบูรณ์ของดิน ตรึงไนโตรเจนได้ดี สามารถใช้เป็นปุ๋ยพืชสดเพราะให้ปริมาณไนโตรเจนสูง ถั่วเขียวใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตแป้งวุ้นเส้น เพาะถั่วงอก และประกอบอาหารอื่นๆ ปริมาณความต้องการใช้ผลิตภัณฑ์ถั่วเขียวในประเทศ และการส่งออกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี (กรมวิชาการเกษตร, 2552)

นอกจากนี้ถั่วเขียวยังสามารถนำมาผลิตเป็นยาได้ เช่น ยาที่มีฤทธิ์ต่อต้านมะเร็ง (Soucek *et al*., 2006) ยาที่มีฤทธิ์ต่อต้าน angiotensin I-converting enzyme (ACE) (Li *et al*., 2006) และ ยาที่เป็นแอนตี้ออกซิแดนท์ (Randhir and Shetty, 2007)

การกลายอาจเกิดขึ้นได้จากรังสีก่อการกลายหรือจากสารก่อการกลาย สารที่นิยมใช้กันมากคือ ethylnitrosourea และ ethylmethanesulfonate ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับนิวคลีโอไทด์ และเป็นสาเหตุให้ลำดับนิวคลีโอไทด์เปลี่ยนแปลงไป โดยอาจมีการขาดหายไป การเพิ่มจำนวน หรือ การเปลี่ยนชนิดของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ การกลายที่เกิดจากสารก่อกลายมักจะจำกัดอยู่เฉพาะ 1-2 นิวคลีโอไทด์ต่อตำแหน่งการกลาย ซึ่งจัดเป็นการกลายในระดับยีน (กนกพร และคณะ, 2554)

จึงเป็นที่มาของวัตถุประสงค์ในงานวิจัยครั้งนี้ เพื่อศึกษาความแตกต่างกันของดีเอ็นเอในถั่วเขียวพันธุ์กำแพงแสน 2 ที่ได้รับการฉายรังสีในระดับที่แตกต่างกัน เพื่อจะใช้เป็นข้อมูลว่าถั่วเขียวที่ได้รับการฉายรังสีจะมีการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอ โดยสามารถนำข้อมูลเหล่านี้ไปใช้กับพืชไร่อื่นๆ ที่ต้องการเปลี่ยนแปลงดีเอ็นเอเพื่อให้ได้ปริมาณผลผลิตเพิ่มขึ้นต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. **พันธุ์ถั่วเขียว**

ตัวอย่างพืชที่ใช้คือถั่วเขียวพันธุ์กำแพงแสน 2 [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] ที่ได้รับการฉายรังสีแกมมาที่ระดับ 0, 200, 400, 500, 600, 700 และ 800 เกรย์ (Gy, Gray)

2. **การสกัดดีเอ็นเอ**

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของถั่วเขียวด้วยวิธีประยุกต์จาก Agrawal และคณะ แล้วตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) ในเจลอะกาโรส (agarose gel) 0.8 เปอร์เซ็นต์ (Sambrook *et al*., 1989)

3. **การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอาร์เอพีดี**

มี 2 ขั้นตอน คือ (1) การตรวจหาไพรเมอร์แบบสุ่มที่ตอบสนองต่อปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยรวมดีเอ็นเอถั่วเขียว 7 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างเดียวกัน และ (2) การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยคัดเลือกไพรเมอร์ 16 ชนิด ที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเออย่างชัดเจนมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอโมกและพุดแต่ละตัวอย่าง โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม (ng) ในบัฟเฟอร์ 1 เท่า (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.4 และ 0.25 mM $MgCl_2$) ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) ชนิดละ 200 ไมโครโมลาร์ (μM) ไพรเมอร์แบบสุ่ม 250 นาโนโมลาร์ (nM) และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Invitrogen™ life technology, Brazil) 1 ยูนิต (unit) โดยไพรเมอร์แบบสุ่มที่ใช้ 72 ชนิด มีขนาด 12 นิวคลีโอไทด์ คือไพรเมอร์ 6 ชุด (A2, B2, C2, D2, E2 และ F2) จาก Wako Company (Japan)

ปฏิกิริยาพีซีอาร์มี 3 ขั้นตอน คือ (1) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ (2) บ่มที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 46 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 40 รอบ และ (3) บ่มที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยแต่ละตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่น่าเชื่อถือยิ่งขึ้น (นฤมล, 2555)

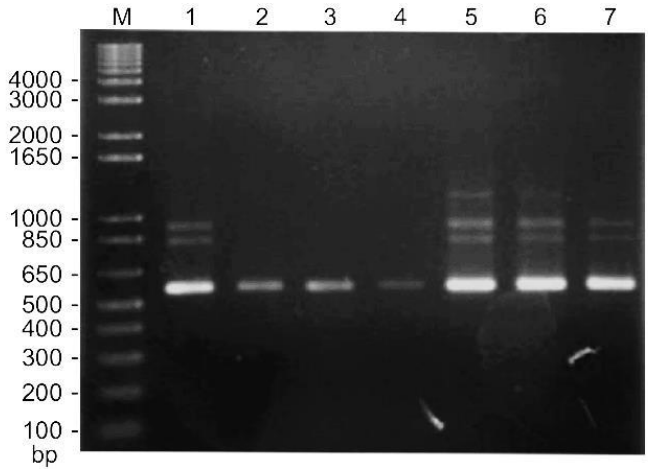
4. **การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ**

เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอถั่วเขียว ที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี และเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมด นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป NTSYS-pc รุ่น 2.0 ในเครื่องคอมพิวเตอร์ โดยเลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) (Rohlf, 2002)

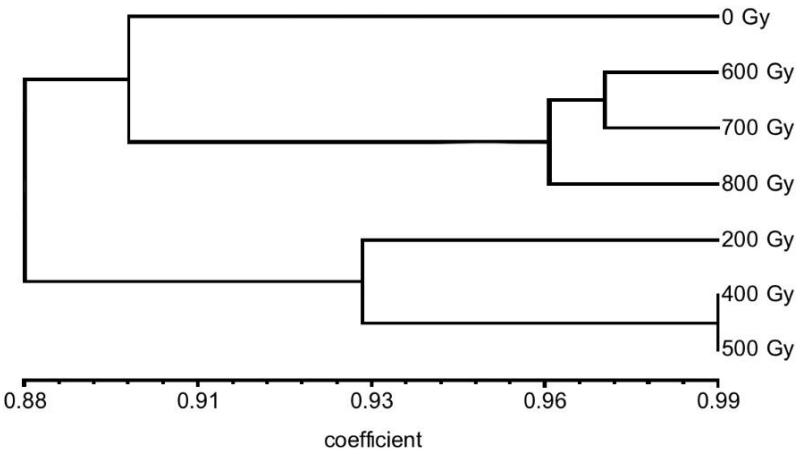
ผลการทดลองและวิจารณ์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอรวมของถั่วเขียวฉายรังสีด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 72 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ 16 ชนิด หรือคิดเป็น 22.2 เปอร์เซ็นต์ ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างชัดเจนมาตรวจสอบกับดีเอ็นเอของถั่วเขียวทั้ง 7 ชนิด ปรากฏว่ามีแถบดีเอ็นเอรวมทั้งสิ้น 91 แถบ ซึ่งมีขนาดประมาณ 300-2,000 คู่เบส โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่มีรูปแบบแตกต่างกันมากที่สุด แสดงดังรูปที่ 1

เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.0 จัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA คำนวณค่าดัชนีความเหมือน (similarity index) และแสดงผลในรูปแผนภูมิความสัมพันธ์ (dendrogram) พบว่าสามารถแบ่งถั่วเขียวที่ได้รับการฉายรังสีออกได้ 2 กลุ่ม (รูปที่ 2) คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่ ถั่วเขียวที่ได้รับการฉายรังสี 0, 600, 700 และ 800 เกรย์ โดยมีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.89-0.99 และกลุ่มที่ 2 ได้แก่ ถั่วเขียวที่ได้รับการฉายรังสี 200, 400 และ 500 เกรย์ โดยมีค่าดัชนีความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.93-0.99 มีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ภายในกลุ่มระหว่าง 0.88-0.99 เฉลี่ย 0.94 (รูปที่ 3)



รูปที่ 1 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีโดยใช้ไพรเมอร์ B32 [M คือดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen™ Life Technology, USA), 1-7 คือ 0, 200, 400, 500, 600, 700 และ800 เกรย์ ตามลำดับ]



รูปที่ 2 แผนภูมิความสัมพันธ์ของถั่วเขียวฉายรังสีที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี

	control	200 Gy	400 Gy	500 Gy	600 Gy	700 Gy	800 Gy
control	1.00						
200 Gy	0.87	1.00					
400 Gy	0.88	0.93	1.00				
500 Gy	0.87	0.93	0.99	1.00			
600 Gy	0.90	0.87	0.92	0.91	1.00		
700 Gy	0.91	0.89	0.90	0.88	0.97	1.00	
800 Gy	0.88	0.86	0.88	0.86	0.96	0.96	1.00

รูปที่ 3 ค่าดัชนีความเหมือนของถั่วเขียวฉายรังสีที่ได้จากเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี

สรุปผลการทดลอง

การตรวจสอบการกลายของถั่วเขียวฉายรังสีทั้ง 7 ระดับ ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่ม 16 ชนิด พบว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างกัน ทำให้สามารถจำแนกระดับการกลายในถั่วเขียวฉายรังสี ดังนั้นจึงสามารถนำเทคนิคแฮตอาร์เอพีดีมาประยุกต์ใช้ตรวจสอบการกลายได้

เอกสารอ้างอิง

กนกพร บุญศิริชัย, การตรวจสอบการกลาย. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา : http://www. tint.or.th/nkc/nkc5003/ nkc5003l.html. 28 กันยายน 2554.

กรมวิชาการเกษตร. ถั่วเขียว. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา : http://it.doa.go.th/vichakan/news.php ?newsid=33. 18 กันยายน 2554.

นฤมล ธนานันต์, วิภาวรรณ ประสิทธิ์ และธีระชัย ธนานันต์, การจำแนกข้าวพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 และพันธุ์ปรับปรุงจากพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ด้วยเทคนิคแฮตอาร์เอพีดี, Thai J. Sci. Tech. 2555;1:169-179.

Agrawal, G.K., Pandey, R.N. and Agrawal, V.P., Isolation of DNA from *Choerospondias asillaris* leaves, Biotech. Biodiv. Lett. 1992; 2:19-24.

Li, G. H., Wan, J. Z., Le, G. W., Shi, Y. H., Novel angiotensin - converting enzyme inhibitory peptides isolated from alcalase hydrolysate of mung bean protein. Journal of Peptide Science 2006; 12:509-514.

Randhir, R., Lin, Y. T., Shetty, K., Stimulation of phenolics, antioxidant and antimicrobial activities in dark germinated mung bean sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. Process Biochemistry. 2004; 39:637-647.

Rohlf, F.J., 2002, NTSYpc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Applied Biostatistics, Inc., New York.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989.

Shanmugasundaram, S., Proc. 2nd International Symposiumon Mung bean. Asian Vegetable Research and Development Centre, Taiwan. Publ. 1988; 730:88-304.

Soucek, J., Skvor, J., Pouckova, P., Matougek, J., Slavik, T., Matousek, J., Mung bean sprouts (*Phaseolus aureus*) nuclease and its biological and antitumor effects. *Neoplasma*. 2006; 53:402-409.