การประยุกต์ใช้เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ร่วมกับการวัดเชิงสี สำหรับพัฒนาการจำแนกความแตกต่างระหว่างข้าวหอมและไม่หอม

ปริญญานิพนธ์

ของ

อมรเทพ ถาน้อย

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

กรกฎาคม 2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การประยุกต์ใช้เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ร่วมกับการวัดเชิงสี สำหรับพัฒนาการจำแนกความแตกต่างระหว่างข้าวหอมและไม่หอม

บทคัดย่อ

ของ

อมรเทพ ถาน้อย

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
กรกฎาคม 2561

อมรเทพ ถาน้อย. (2561). *การประยุกต์ใช้เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ร่วมกับการวัดเชิงสีสำหรับพัฒนาการจำแนกความแตกต่างระหว่างข้าวหอมและไม่หอม*. ปริญญานิพนธ์ กศ.ม. (เคมี). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์: อาจารย์ ดร. ศิริขวัญ พลประทีป.

ข้าวหอม (Fragrant rice) เป็นที่นิยมในหลายประเทศโดยเฉพาะข้าวหอมมะลิของไทย ปัจจุบันปัญหาการปลอมปนข้าวเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้คุณภาพและความน่าเชื่อถือของข้าวหอมของประเทศไทยลดต่ำลง ข้าวหอมสามารถตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมได้ด้วยยีน *badh2* โดยในข้าวหอมเกิดการขาดหายไปของ 8 คู่เบสในยีน *badh2* ส่งผลให้เกิดการสังเคราะห์สาร 2-Acetyl-1-pyrroline (2-AP) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้ข้าวเกิดกลิ่นหอม ในงานวิจัยนี้จึงใช้เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ซึ่งเป็นเทคนิคที่เพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายภายใต้สภาวะอุณหภูมิคงที่ มาใช้ในการจำแนกความแตกต่างของข้าวหอมและไม่หอมร่วมกับการวัดเชิงสีของลิวโคคริสตัลไวโอเลต โดยงานวิจัยนี้ได้ออกแบบไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *badh2* และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา LAMP พบว่าสภาวะที่ใช้ในการแยกความแตกต่างของข้าวหอมและไม่หอม คือ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที โดยเทคนิค LAMP สามารถตรวจสอบยีน *badh2* ในข้าวไม่หอมได้ตั้งแต่ 10 copies/reaction ซึ่งมีความไวในการตรวจสอบมากกว่าเทคนิคพีซีอาร์ ถึง 1,000 เท่า จากการศึกษาความจำเพาะของเทคนิค LAMP ในการตรวจสอบข้าวหอมและไม่หอม 11 สายพันธุ์ พบว่าสามารถจำแนกความแตกต่างของข้าวหอมและไม่หอมได้อย่างจำเพาะ มากไปกว่านั้นการตรวจสอบยีน *badh2* ด้วยเทคนิค LAMP สามารถตรวจสอบการปลอมปนของข้าวไม่หอมในข้าวหอมได้ตั้งแต่ 5% ขึ้นไป การใช้เทคนิคการวัดเชิงสีลิวโคคริสตัลไวโอเลตในการตรวจสอบผล LAMP พบว่าความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ที่เหมาะสมในการเตรียมสารละลายลิวโคคริสตัลไวโอเลต คือ 80 มิลลิโมลาร์ มีความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 582 นาโนเมตร เมื่อนำสารละลายลิวโคคริสตัลมาผสมกับผลผลิต LAMP ที่ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบจากข้าวไม่หอม พบว่าสารละลายเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีม่วง แสดงให้เห็นว่าการวัดเชิงสีลิวโคคริสตัลไวโอเลตเป็นเทคนิคที่ง่ายและรวดเร็วในการตรวจสอบผล LAMP งานวิจัยนี้ประสบผลสำเร็จในการตรวจสอบข้าวหอมโดยใช้เทคนิค LAMP ร่วมกับเทคนิคการวัดเชิงสีของ LCV ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบเพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการขนาดเล็กหรือออกตรวจนอกสนามได้

APPLICATION OF LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP) COMBINED WITH COLORIMETRIC DETECTION FOR THE DEVELOPMENT OF FRAGRANT AND NON-FRAGRANT RICE DISCRIMINATION

AN ABSTRACT

BY

AMORNTHEP THANOY

Presented in Partial Fulfillment of Requirements for the

Master of Education Degree in Chemistry

at Srinakharinwirot University

July 2018

Amornthep Thanoy. (2018). *Application of Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) Combined with Colorimetric Detection for the Development of Fragrant and Non-Fragrant Rice Discrimination.* Master's thesis, M.Ed. (Chemistry). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor: Dr. Sirikwan Ponprateep.

Fragrant rice is a popular variety grown in many countries, especially Hommali rice from Thailand. At present, there had been a contamination of non-fragrant rice with fragrant rice, which influenced in the quality and reliability of Thai fragrant rice. Fragrant rice can be detected by genetic traits by the *badh2* gene. In fragrant rice, deletion of eight base pairs in the *badh2* gene and affected the synthesis of 2-acetyl-1-pyrroline (2-AP), which provided the aroma in fragrant rice. In this study, the Loop-mediate isothermal amplification (LAMP) technique was used to amplify target DNA under isothermal conditions to discriminate of fragrant and non-fragrant rice combined with leucocrystal violet (LCV) colorimetric technique. The gene specific primers were designed based on *badh2* gene and studied optimal conditions for the LAMP reaction. The results showed that the conditions distinguished between fragrant and non-fragrant rice for 65°C for sixty minutes. The LAMP technique could detect the *badh2* gene from ten copies/reaction. The sensitivity of LAMP was one thousand times higher than PCR. Based on the specificity of the LAMP technique, the results showed that this LAMP technique could distinguish between the eleven varieties of rice consisted of fragrant and non-fragrant rice. In addition, LAMP assays could detect up to 5% contamination of non-fragrant rice with fragrant rice. Moreover, leucocrystal violet was used to detect LAMP products. The results showed that the optimal concentration of Na_2SO_3 of LCV solution was 80 mM and the λ max for detection was 582 nm. The incubation of leucocrystal violet and LAMP product of non-fragrant rice showed that the solution changed from colorless to purple. It was shown that the LAMP reaction combined with LCV colorimetric technique was a rapid and easy technique to determine LAMP products. This research was successful in developing the detection for discriminating between fragrant rice using LAMP techniques combined with LCV colorimetric technique. It could be developed as a test kit for use in small-laboratory or fieldwork.

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การประยุกต์ใช้เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ร่วมกับการวัดเชิงสี
สำหรับพัฒนาการจำแนกความแตกต่างระหว่างข้าวหอมและไม่หอม

ของ

อมรเทพ ถาน้อย

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)
วันที่...16.. เดือน...กรกฎาคม...พ.ศ. 2561

อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษา
(อาจารย์ ดร.ศิริขวัญ พลประทีป)

คณะกรรมการสอบปากเปล่า

.....ประธาน
(ดร.เปรมฤทัย สุพรรณกูล)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร.ศิริขวัญ พลประทีป)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะดา จิตรดั้งประเสริฐ)

งานวิจัยนี้ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัย

จาก

เงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2559 (ส่วนเพิ่มเติม สกอ. สัญญาเลขที่ 124/2559)

สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.)

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับความกรุณา ความช่วยเหลือ และความแนะนำอย่างดียิ่งจาก อาจารย์ ดร.ศิริขวัญ พลประทีป อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ ผู้ที่คอยให้ความรู้ และแนวทางในด้านต่างๆ ทั้งด้านความรู้ วิทยาการ ตลอดจนคำแนะนำต่างๆ ผู้วิจัยมีความซาบซึ้งและกราบขอบพระคุณ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ธิปชัย วัฒนวิจารณ์ และคณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นอันเป็นประโยชน์แก่ผู้วิจัย ซึ่งมีส่วนช่วยให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.เปรมฤทัย สุพรรณกูล ที่ให้ความกรุณาในการเป็นประธานในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ และผู้ช่วยศาตราจารย์ ดร.ปิยะดา จิตรตั้งประเสริฐ ให้ความกรุณาในการเป็นกรรมการในการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำต่างๆ เพื่อให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ เงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2559 และ สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) ที่ได้กรุณาให้งบประมาณในการจัดทำปริญญานิพนธ์และในงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำการทดลอง อุปกรณ์ เครื่องมือ ตลอดจนสารเคมีต่างๆ ให้ข้าพเจ้าได้ใช้ตลอดระยะเวลาทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ และขอบพระคุณ กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ที่ได้เอื้อเฟื้อตัวอย่างข้าวทั้ง 11 สายพันธุ์ สำหรับใช้ในงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณพี่ๆ ห้องปฏิบัติการเคมี15-821 คณะวิทยาศาสตร์ และกัลยาณมิตรทุกๆท่าน ที่ได้ให้กำลังใจ ความช่วยเหลือและคำแนะนำอย่างดีแก่ผู้วิจัยเสมอมา

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และสมาชิกครอบครัวทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและอนุเคราะห์สนับสนุนทางด้านการศึกษา ตลอดจนให้กำลังใจ และเป็นแรงผลักดันให้ข้าพเจ้ามีความเพียรพยายามในการทำปริญญานิพนธ์สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอระลึกถึงคุณพระศรีรัตนตรัยและผลประโยชน์อันเกิดจากปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ทั้งหมดจงสำเร็จแก่ บิดา มารดา สมาชิกครอบครัวของข้าพเจ้า ตลอดจนอาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ และคณาจารย์ทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทความรู้แก่ผู้จัย

อมรเทพ ถาน้อย

สารบัญ

บทที่		หน้า
1	**บทนำ**	1
	ภูมิหลัง	1
	ความมุ่งหมายของงานวิจัย	3
	ความสำคัญของการวิจัย	4
	ขอบเขตของการวิจัย	4
2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	5
	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับข้าวหอม	5
	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเทคนิคการตรวจสอบคุณภาพข้าวหอม	9
	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเทคนิค LAMP	11
	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเทคนิควิธีการวิเคราะห์ DNA ที่เพิ่มขยายด้วยเทคนิค LAMP	17
3	**วิธีดำเนินการวิจัย**	24
	เครื่องมือและอุปกรณ์	24
	สารเคมี	25
	ออกแบบไพร์เมอร์สำหรับเทคนิค LAMP ที่จำเพาะต่อยีน *badh2* ในการแยกความแตกต่างระหว่างข้าวหอมและไม่หอม	26
	เตรียมรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีน *badh2* จากข้าวหอมเพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุม	26
	การระบุความแตกต่างของข้าวหอมและไม่หอมโดยใช้ยีน *badh2* ด้วยเทคนิค LAMP	28
	การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเทคนิค LAMP	28
	การทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมสำหรับเทคนิค LAMP	28

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
3	**วิธีดำเนินการวิจัย**	24
	ศึกษาความไวของเทคนิค LAMP ในการระบุความแตกต่างของข้าวไม่หอมด้วยยีน *badh2*	29
	เทคนิค LAMP ในการจำแนกความแตกต่างของข้าวหอมและไม่หอมในข้าวสายพันธุ์ต่างๆ ด้วยยีน *badh2*	30
	การตรวจสอบการปลอมปนของข้าวไม่หอมโดยใช้เทคนิค LAMP	31
	การวิเคราะห์ผลของเทคนิค LAMP ด้วยเทคนิคเชิงสีของลิวโคคริสตัลไวโอเลต	31
	การพัฒนาชุดทดสอบต้นแบบอย่างง่ายเพื่อจำแนกข้าวหอมและไม่หอมด้วยเทคนิค LAMP	33
4	**ผลการวิเคราะห์ข้อมูล**	34
	เตรียมรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีน *badh2* จากข้าวหอมเพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุม	34
	การระบุความแตกต่างของข้าวหอมและไม่หอมโดยใช้ยีน *badh2* ด้วยเทคนิคLAMP	35
	การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเทคนิค LAMP	36
	การทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมสำหรับเทคนิค LAMP	37
	ศึกษาความไวของเทคนิค LAMP ในการระบุความแตกต่างของข้าวไม่หอมด้วยยีน *badh2*	38
	เทคนิค LAMP ในการจำแนกความแตกต่างของข้าวหอมและไม่หอมในข้าวสายพันธุ์ต่างๆ ด้วยยีน *badh2*	41
	การตรวจสอบการปลอมปนของข้าวไม่หอมโดยใช้เทคนิค LAMP	43
	การวิเคราะห์ผลของเทคนิค LAMP ด้วยเทคนิคเชิงสีของลิวโคคริสตัลไวโอเลต	44
	การพัฒนาชุดทดสอบต้นแบบอย่างง่ายเพื่อจำแนกข้าวหอมและไม่หอมด้วยเทคนิค LAMP	44

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
5 สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	51
บรรณานุกรม	55
ภาคผนวก	60
ภาคผนวก ก สารเคมีที่ใช้	61
ภาคผนวก ข การคำนวณจำนวน Copies พลาสมิดชุดควบคุม	63
ภาคผนวก ค ค่าสเปกตรัมของการตรวจวัดด้วยวิธี Spectroscopy ที่ช่วงความยาวคลื่น UV-Visible	65
ประวัติย่อผู้วิจัย	69

บัญชีตาราง

ตาราง		หน้า
1	ตัวอย่างการตรวจสอบคุณภาพข้าวหอมทางเคมี.....	10
2	วิธีการตรวจสอบปริมาณ DNA ที่เพิ่มขยายด้วยเทคนิค LAMP.....	22
3	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่ใช้ในเทคนิค LAMP.....	26
4	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่ใช้ในเทคนิค PCR.....	27
5	ค่าการดูดกลืนแสงและค่าความยาวคลื่นช่วง 350-750 nm ของสารละลาย LCV ที่ความเข้มข้นของโซเดียมซัลไฟต์ช่วง 20-80 mM.....	66
6	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 582 nm ของสารละลาย LCV ทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอมาตรฐาน 0-100 ng/reaction.....	68
7	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 582 nm ของสารละลาย LCV ทำปฏิกิริยากับ LAMP product.....	68

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ		หน้า
1	แสดงโครงสร้างของ 2-acetyl-1-pyrroline (2-AP).....	6
2	แสดงวิถีการสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline (2-AP).....	7
3	แสดงโครงสร้างและตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีน *badh2* เปรียบเทียบระหว่างข้าวหอมและข้าวไม่หอม.....	8
4	แสดงการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส.....	11
5	แสดงตำแหน่งของไพร์เมอร์ที่จำเพาะของเทคนิค LAMP ทั้ง 4 เส้น.....	13
6	แสดงผลการทดลองหลังทดสอบด้วยเทคนิค LAMP ด้วย Magnesium pyrophosphate.....	13
7	ขั้นตอนเริ่มต้นในการสร้าง dumbbell-sharped DNA structureเพื่อใช้เป็น template ในขั้นตอนของ LAMP cycle.....	15
8	ขั้นตอนเริ่มต้นในการสังเคราะห์ DNA แบบหมุนวนต่อเนื่อง (Cycle amplification) ในเทคนิค LAMP.....	16
9	แสดงผลิตภัณฑ์จากเทคนิค LAMP เมื่อวิเคราะห์ด้วย Gel Electrophoresis.....	18
10	แสดงการเกิดการเรืองแสงของ Calcein หลังเกิดปฏิกิริยา LAMP.....	19
11	แสดงการเกิดการเปลี่ยนสีของ LCV เมื่อทำเทคนิคกับ DNA สายคู่.....	21
12	แสดงผลการทำเทคนิค PCR ของข้าว.....	34
13	แสดงผลการทำเทคนิค PCR ของโคโลนีแบคทีเรียที่ทำการทรานฟอร์มรีคอม-บิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์.....	35
14	แสดงผลการทำเทคนิค LAMP ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดกลุ่มควบคุม.....	36
15	แสดงผลการทำเทคนิค LAMP ที่อุณหภูมิต่างๆ.....	37
16	แสดงผลการทำเทคนิค LAMP ที่เวลาต่างๆ.....	38
17	แสดงผลความไวของเทคนิค LAMP ในการระบุความแตกต่างของข้าวไม่หอมด้วยยีน *badh2* โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด.....	39
18	แสดงผลความไวของเทคนิค Real-time PCR ในการระบุความแตกต่างของข้าวไม่หอมด้วยยีน *badh2* โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด.....	40

บัญชีภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบ		หน้า
19	แสดงผลความไวของเทคนิค LAMP ในการระบุความแตกต่างของข้าวไม่หอมด้วยยีน *badh2* โดยใช้ DNA ของข้าวกข31	41
20	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าว 11 สายพันธุ์	42
21	แสดงผลความจำเพาะของเทคนิค LAMP ในการแยกความแตกต่างของข้าว 11 สายพันธุ์ และรีคอมบิแนนท์พลาสมิดชุดควบคุม	43
22	แสดงผลการตรวจสอบการปลอมปนของข้าวด้วยเทคนิค LAMP	44
23	แสดงผลความเข้มข้นสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ ($NaSO_3$) ความเข้มข้น 20-80 mM ที่ทำปฏิกิริยากับ CV	45
24	แสดงผลการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย LCV กับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ความเข้มข้น เป็น 0-100 ng/μL	46
25	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 582 nm กับสารละลาย LCV กับดีเอ็นเอมาตรฐาน ที่ความเข้มข้นเป็น 0-100 ng/reaction	47
26	แสดงผลของการศึกษาการวัดเชิงสีของลิวโคคริสตัลไวโอเลตในการตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากเทคนิค LAMP	48
27	แสดงผลของการศึกษาการวัดเชิงสีของลิวโคคริสตัลไวโอเลตร่วมกับเทคนิคเทคนิค LAMP	49
28	กราฟแผนภูมิแท่งความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 582 nm กับสารละลาย LCV ในการตรวจสอบความแตกต่างของข้าวหอมและไม่หอม	50

บทที่ 1
บทนำ

ภูมิหลัง

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญชนิดหนึ่งของโลก โดยเฉพาะข้าวหอม (Fragrant rice) จัดเป็นข้าวที่คนทั่วโลกรู้จักและเป็นที่นิยมบริโภค ทำให้มีราคาค่อนข้างสูง โดยข้าวหอมที่มีคุณภาพและมีชื่อเสียง มีปริมาณการค้าขายมากที่สุดในโลกคือ ข้าวบาสมาติของอินเดียและข้าวหอมมะลิของไทย (เกษม สุนทราจารย์. 2556) เนื่องจากคุณภาพของความหอมของข้าวถือเป็นเอกลักษณ์ที่โดดเด่น จึงสามารถสร้างมูลค่าให้กับประเทศของผู้ส่งออก ข้าวหอมมะลิจึงเป็นข้าวที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจไทยเป็นอย่างมาก (แสงนวล ทองเพียร. 2548) เนื่องด้วยข้าวหอมมะลิมีราคาสูงกว่าข้าวสายพันธุ์อื่น จึงเกิดปัญหาการปลอมปนโดยการผสมข้าวเกรดต่ำเพื่อเพิ่มมูลค่าของข้าว ทำให้คุณภาพและความน่าเชื่อถือของข้าวหอมมะลิของประเทศไทยลดต่ำลง ผู้บริโภคไม่เลือกซื้อข้าวหอมมะลิส่งออกจากประเทศไทย (สำนักงานมาตรฐานสินค้า. 2555) อีกทั้งคุณภาพของข้าวหอมลดลงอันเนื่องมาจากการกลายพันธุ์ของข้าวหอม รวมถึงการปนของพันธุ์ข้าวจากการเพาะปลูกจึงทำให้ข้าวมีความหอมลดลง ทำให้ข้าวหอมไม่ได้มาตรฐาน (ธานี ศรีวงศ์ชัย. 2553) การตรวจสอบคุณภาพของข้าวหอมมะลิจึงเป็นสิ่งที่สำคัญที่จะทำให้ผู้บริโภคเกิดความมั่นใจและเชื่อถือคุณภาพข้าวจากไทยมากยิ่งขึ้น ดังนั้นจึงมีมาตรการตรวจสอบตัวอย่างข้าวหอมมะลิของไทยทั้งในขั้นตอนในโรงสีข้าวและตรวจสอบคุณภาพข้าวก่อนการส่งออก (สำนักงานมาตรฐานสินค้า. 2550) นอกจากนั้นการตรวจสอบคุณภาพข้าวหอมมะลิยังเป็นประโยชน์ในด้านการรักษาคุณภาพของพันธุ์ข้าวอีกทั้งการรักษาคุณภาพของพันธุ์พืชให้มีคุณภาพดีและคงกลิ่นหอมไว้อีกด้วย (เกษม สุนทราจารย์. 2556)

จากการสำรวจข้าวหอมพบว่าสารประกอบที่ตรวจพบและเป็นที่รู้จักกันดีในข้าวหอมคือ 2-acetyl-1-pyrroline (2-AP) พบได้ทุกส่วนของข้าว ยกเว้นราก ในขณะที่ข้าวไม่หอมพบสารประเภทนี้ในจำนวนที่น้อย (Buttery; et al. 1983; Widjaja; et al. 1996) ดังนั้นการตรวจสอบข้าวหอมที่นิยมในปัจจุบันนั้น คือ การตรวจสอบคุณภาพข้าวหอมโดยวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณ 2-AP โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโทรกราฟีที่เป็นที่นิยมในการวิเคราะห์ อาจใช้ Solid-phase microextraction SPME, automate headspace gas chromatography, headspace absorptive extraction (HSSE/GS/ME) (Grimm; et al. 2001; Sriseaka; et al. 2006) ซึ่ง

วิธีการวิเคราะห์เหล่านี้เป็นวิธีที่น่าเชื่อถือและมีความแม่นยำสูง แต่จำเป็นต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญที่มีความเชี่ยวชาญในเครื่องมือ และอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพง อีกทั้งเวลาในการตรวจวิเคราะห์ใช้เวลาค่อนข้างนานในการตรวจวิเคราะห์ข้าวหอม

การตรวจสอบข้าวหอมนั้นนอกจากการวิเคราะห์ปริมาณ 2-AP แล้วยังสามารถตรวจสอบได้ด้วยการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรม (DNA) (สำนักงานมาตรฐานสินค้า. 2550) โดยจากการศึกษาลักษณะพันธุกรรมของข้าวพบว่า การสังเคราะห์สาร 2-AP ที่เป็นสารให้ความหอมของข้าวนั้นเกิดจากความผิดปกติของยีน *badh2* (Lorieux; et al. 1996) ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ betain aminoaldehyde dehydrogenase (BADH) ทำให้เกิดการสะสมของ 2-AP ในข้าวหอม โดยปกติแล้วยีน *badh2* ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์เอนไซม์ BADH เพื่อเปลี่ยนสาร γ-aminobutyraldehyde (GaBald) เป็นสารผลิตภัณฑ์ที่ชื่อว่า γ-aminobutyric acid (GABA) (Buttery; et al. 2008) ซึ่งในกระบวนการนี้เกิดขึ้นในข้าวไม่หอม ในขณะที่ข้าวหอมเอนไซม์นี้เกิดผ่าเหล่าทำให้ไม่สามารถเปลี่ยน GaBald ไปเป็น GABA ได้ จึงถูกเมตาบอไลท์ไปเป็น 2-AP ซึ่งเป็นสารที่ส่งผลให้ข้าวเกิดกลิ่นหอม (Bradbury; et al. 2005)

ในข้าวจะพบยีน *badh* อยู่สองไอโซฟอร์ม คือ *badh1* และ *badh2* โดยมีโครงสร้างและหน้าที่ของยีนที่คล้ายกัน แต่ยีน *badh2* จะส่งผลต่อความหอมของข้าวที่มากกว่ายีน *badh1* (Amarawathi; et al. 2008) ในข้าวหอมพบว่ามีความผิดปกติของยีน *badh2* คือพบการหายไปของนิวคลีโอไทด์ 8 คู่เบส ที่บริเวณแอกซอนคู่ที่ 7 (Bradbury; et al. 2005) จึงทำให้เกิดความผิดปกติของลำดับเบสส่งผลให้เอนไซม์ BADH ที่ผลิตออกมาไม่สมบูรณ์ (Niu; et al. 2008; Vanavichit; et al. 2008)

การตรวจสอบข้าวหอมนั้นสามารถตรวจสอบได้จากลักษณะทางพันธุกรรมโดยใช้การแยกคุณสมบัติที่จำเพาะของยีน ยกตัวอย่างเช่น เทคนิค Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) , Random Amplification (Loriex; et al. 1996) หรือ การใช้เทคนิค PCR (เกษม สุนทราจารย์. 2556) แต่เทคนิคดังกล่าวยังต้องใช้เวลาในการตรวจสอบค่อนข้างนานประมาน 3-4 ชั่วโมง และจำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีคุณภาพสูง อีกทั้งยังมีราคาที่ค่อนข้างแพง เช่น เครื่อง PCR machine ทำให้ไม่สามารถนำเทคนิคดังกล่าวไปใช้ในห้องปฏิบัติการเล็ก และ ออกภาคสนามได้ (Parida; et al. 2008) ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงสนใจที่พัฒนาเทคนิคและวิธีการตรวจสอบที่ง่ายและรวดเร็วต่อการจำแนกข้าวหอมและไม่หอม โดยอาศัยเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้หลักการของการเพิ่มขยายชิ้นส่วนของดีเอ็นเอโดยอาศัยไพร์เมอร์ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สนใจ

ซึ่งใช้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาลูกโซ่ในสภาวะอุณหภูมิเดียว (Notomi; et al. 2000) เทคนิคนี้ใช้เวลาตรวจสอบผล 1 ชั่วโมงเท่านั้น มีความจำเพาะและมีความว่องไวที่สูง อีกทั้งสามารถนำไปปรับประยุกต์ใช้และร่วมกับเทคนิคอื่น ๆ ในการตรวจสอบผลการวิเคราะห์ เช่น การตรวจสอบใช้อิเล็ก-โทรโฟรีซิส การใช้การเรืองแสงของฟลูออเรสเซน การใช้เทคนิคเชิงสี (Zhang et al., 2014) เข้ามาร่วมตรวจสอบด้วย ซึ่งจะทำให้มีความสะดวกและรวดเร็วในการตรวจสอบ นอกจากนี้พบว่าในปัจจุบันเทคนิค LAMP ยังเป็นที่นิยมในการนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจวิเคราะห์หลายด้าน เช่น ตรวจสอบแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* ในกุ้ง (Prompamorn; et al. 2011) การตรวจสอบจุลินทรีย์ *Salmonella* ในอาหาร (Li; et al. 2016) การตรวจสอบแบคทีเรีย *Candidatus liberibacter asiaticus* ในกลุ่มพืชสกุลส้ม (Rigano; et al. 2014) การตรวจสอบไวรัส Ebola (Patricia; et al. 2017)

ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะนำเทคนิค LAMP มาประยุกต์ใช้ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างข้าวหอมและไม่หอม โดยเบื้องต้นได้ทำการศึกษาลำดับเบสของยีน *badh1* และ *badh2* จากข้าวหอมและไม่หอม เพื่อนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นทำการออกแบบไพร์เมอร์สำหรับเทคนิค LAMP ให้มีความจำเพาะต่อยีน *badh2* เพื่อแยกความแตกต่างของข้าวหอมและไม่หอม ทำการศึกษาความจำเพาะของไพร์เมอร์ สภาวะที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาและความไวในการเกิดปฏิกิริยา โดยทางคณะผู้วิจัยมีความสนใจที่จะใช้เทคนิค LAMP ร่วมกับการวัดเชิงสีของลิวโคคริสตัลไวโอเล็ต ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างข้าวหอมและไม่หอมเพื่อให้ได้วิธีการตรวจสอบที่ง่าย รวดเร็วและน่าเชื่อถือ อีกทั้งสามารถนำไปพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบภาคสนามต่อไป

ความมุ่งหมายงานวิจัย

1. สามารถระบุความแตกต่างของข้าวหอมและไม่หอมด้วยยีน *badh2* โดยใช้เทคนิค LAMP

2. สามารถพัฒนาชุดตรวจสอบข้าวหอมอย่างง่ายที่มีความถูกต้องและรวดเร็วในการวิเคราะห์ผล LAMP ร่วมกับเทคนิคการวัดเชิงสี

ความสำคัญของงานวิจัย

การจำแนกข้าวหอมและไม่หอมด้วยเทคนิค LAMP เป็นเทคนิคที่น่าเชื่อถือ มีความจำเพาะและมีความไวสูง สามารถนำเทคนิคนี้มาพัฒนาร่วมกับการวัดเชิงสี ทำให้สามารถตรวจสอบผลได้อย่างรวดเร็ว มีประสิทธิภาพ ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือราคาแพง สามารถตรวจสอบได้ในห้องปฏิบัติการขนาดเล็กและใช้ในออกตรวจภาพสนามได้ ซึ่งงานวิจัยชิ้นนี้จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการสร้างชุดตรวจสอบคุณภาพข้าวหอมได้ ทำให้ง่ายสำหรับคนทั่วไปในการทดสอบ อีกทั้งสามารถประยุกต์ใช้ในการตรวจการปลอมปนของข้าวไม่หอมได้

ขอบเขตงานวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้นำเทคนิค LAMP ร่วมกับการวัดเชิงสีของลิวโคคริสตัลไวโอเลต ในการออกแบบและพัฒนาการจำแนกความแตกต่างระหว่างข้าวหอมและไม่หอมที่มีคุณภาพและรวดเร็ว โดยขอบเขตงานวิจัยแบ่งออกเป็นหัวข้อดังนี้

1. ออกแบบไพร์เมอร์สำหรับเทคนิค LAMP ที่จำเพาะต่อยีน *badh2* ในการแยกความแตกต่างระหว่างข้าวหอมและไม่หอม
2. เตรียมรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีน *badh2* จากข้าวหอม เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุม
3. ศึกษาการระบุความแตกต่างของข้าวหอมและไม่หอมโดยใช้ยีน *badh2* ด้วยเทคนิค LAMP
4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค LAMP ในการระบุความแตกต่างของยีน *badh2* ข้าวหอม ได้แก่ อุณหภูมิ และ เวลา
5. ศึกษาความไวของเทคนิค LAMP ในการระบุความแตกต่างของข้าวไม่หอมด้วยยีน *badh2*
6. ศึกษาเทคนิค LAMP ในการจำแนกความแตกต่างของข้าวหอมและไม่หอม ในสายพันธุ์ต่างๆ ด้วยยีน *badh2*
7. ศึกษาการตรวจสอบการปลอมปนของข้าวไม่หอมด้วยเทคนิค LAMP
8. ศึกษาการวิเคราะห์ผลของเทคนิค LAMP ด้วยการวัดเชิงสีของลิวโคคริสตัลไวโอเลต
9. พัฒนาชุดทดสอบต้นแบบอย่างง่ายเพื่อจำแนกข้าวหอมและไม่หอมได้ด้วยเทคนิค LAMP

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในงานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ร่วมกับเทคนิคการวัดเชิงสีสำหรับพัฒนาการจำแนกความแตกต่างระหว่างข้าวหอมและไม่หอม โดยผู้วิจัยได้จัดทำเอกสารและงานวิจัยที่เป็นฐานงานวิจัย ซึ่งได้นำเสนอความรู้ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยตามลำดับต่อไปนี้

1. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับข้าวหอม
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเทคนิคการตรวจสอบคุณภาพข้าวหอม
3. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเทคนิค LAMP
4. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวกับข้องเทคนิควิธีการวิเคราะห์ DNA ที่เพิ่มขยายด้วยเทคนิค LAMP

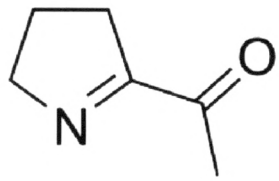
1. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับข้าวหอม

1.1 ลักษณะของข้าวหอม

ข้าวหอม (*Oryza sativa L.*) เป็นพืชที่ปลูกเพื่อบริโภคกันอย่างแพร่หลายในโลก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทยที่ได้มีการปลูกข้าวหอมทั่วทุกภาค โดยพบข้าวหอมที่ปลูกในประเทศไทยมากกว่า 202 สายพันธุ์ ข้าวหอมมีลักษณะที่แตกต่างกันออกไปตามแต่ละสายพันธุ์ เช่น สีของใบ รูปร่าง เมล็ด ขนาด สีของเปลือก ระยะเวลาในการเก็บเกี่ยว ปริมาณอะไมโลส อะไมโลเพกติน แต่มีเอกลักษณ์ที่สำคัญที่เหมือนกันคือความหอมเฉพาะตัวของข้าวหอมที่เกิดจากสารหอมระเหย 2-AP (งามชื่น คงเสรี. 2547; แสงทอง นวลเพียร. 2548)

1.2 สารให้ความหอมในข้าว

ความหอมของข้าวเกิดขึ้นจากการผสมผสานจากสารหอมระเหยหลายชนิด การรวมตัวของสารหอมระเหยหลายชนิดนี้ทำให้ข้าวแต่ละชนิดมีกลิ่นหอมเฉพาะตัว ถึงแม้ว่าความหอมของข้าวเกิดจากสารหอมระเหยหลายชนิดแต่สารที่ให้ความหอมหลักของข้าว คือ 2-AP ซึ่งถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1983 โดยสารนี้ค้นพบได้ในทุกส่วนของต้นข้าวยกเว้นส่วนของราก (Buttery; et al. 1983; Widjaja; et al. 1996 ; Bryant; McClung. 2011)



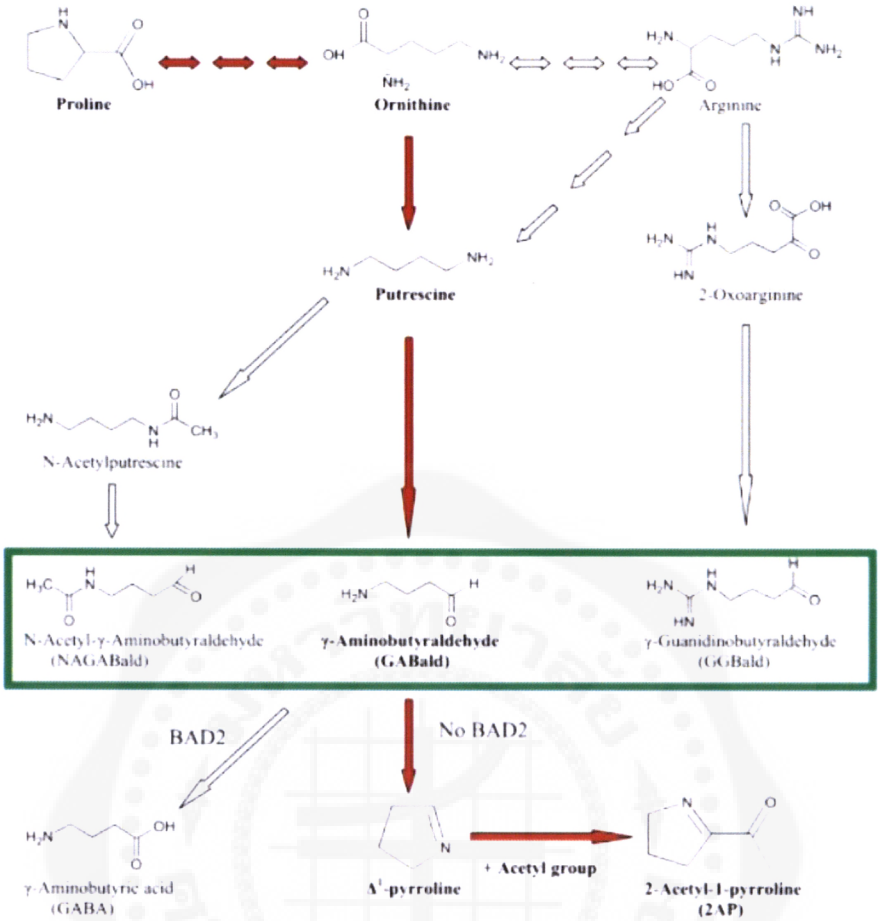
ภาพประกอบ 1 แสดงโครงสร้างของ 2-acetyl-1-pyrroline (2-AP)

ที่มา: Bradbury; et al. (2008). Inactive of an aminoaldehyde dehydrogenase is responsible for fragrant in rice. *Plant Molecular Biology*. 68: 439-449.

สาร 2-AP เป็นสารที่ให้ความหอมหลักของข้าว มีชื่อเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า 5-acetyl-3,4-dihydro-2H-pyrrole มีสูตรโมเลกุลคือ C_6H_9NO สารประกอบดังกล่าวมีโครงสร้างวงแหวน (heterocyclic) จัดอยู่ในกลุ่มของสารจำพวก pyrrole โดยเป็นวงห้าเหลี่ยมที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบในวง มีพันธะคู่ระหว่างไนโตรเจนและคาร์บอน 1 คู่ และมีหมู่ acetyl เกาะอยู่กับคาร์บอนในตำแหน่งที่ 2 ของวง (ภาพประกอบ 1) โดยสมบัติทางกายภาพของสารหอมระเหย 2-AP คือมีความเป็นเบสเล็กน้อย เป็นของเหลวใสไม่มีสี เก็บไว้จะเป็นสีแดงหรือน้ำตาลเข้ม ระเหยได้ง่ายและไม่เสถียรเมื่อเป็นสารบริสุทธิ์ (Buttery; et al. 1982)

1.3 การสังเคราะห์สาร 2-acetyl-1-pyroline (2-AP)

ปัจจุบันได้มีการศึกษาสารหอมระเหยที่ให้ความหอมในข้าวอย่างแพร่หลาย จากการศึกษาพบว่าสาร 2-AP เกิดการสังเคราะห์จากสารตั้งต้น กรดอะมิโน proline แต่กระบวนการการสังเคราะห์ยังไม่ทราบเป็นที่แน่ชัด แต่สามารถอธิบายได้อย่างคร่าวๆได้โดยเกิดการสังเคราะห์ 2-AP ในวัฏจักร polyamine pathway (Yoshihashi; et al. 2002; Vanavichit; et al. 2005) โดยจากกระบวนการดังกล่าวเริ่มจาก กรดอะมิโน proline ถูกเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโน ornithine จนกระทั่งเปลี่ยนเป็นสาร GaBald จากนั้นเอนไซม์ *badh2* จะเปลี่ยน GaBald ไปเป็น GABA ตามลำดับ ซึ่งกระบวนการนี้จะเกิดขึ้นในข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอม (Buttery; et al. 2008) แต่ในข้าวหอมเกิดการกลายพันธุ์ของยีนทำให้ไม่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ *badh2* ได้จึงไม่สามารถเปลี่ยนสาร GaBald ไปเป็น GABA ได้ จึงทำให้เกิดการสะสม GaBald มากจนเกินไป จึงเปลี่ยนไปเป็นสาร 1-pyrroline และถูกเมทาบอไลต์เป็น 2-AP ซึ่งเป็นสารที่ให้กลิ่นหอม (ภาพประกอบ 2)



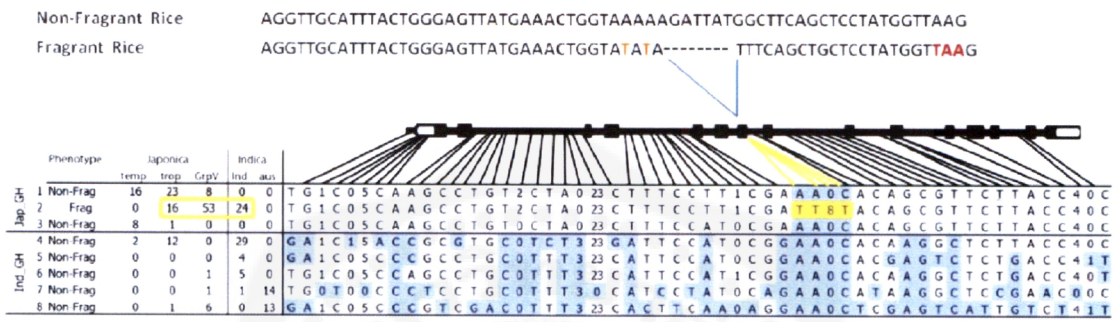
ภาพประกอบ 2 แสดงวิถีการสังเคราะห์ 2-acetyl-1-pyrroline (2-AP)

ที่มา: Bradbury; et al. (2008). Inactive of an aminoaldehyde dehydrogenase is responsible for fragrant in rice. *Plant Molecular Biology*. 68: 439-449.

1.4 ยีนสร้างความหอม

การศึกษายีนที่ควบคุมลักษณะความหอมในข้าวเริ่มขึ้นตั้งแต่ปี พ.ศ. 2535 โดยได้มีการรายงานการวางตำแหน่งยีนความหอมของข้าวเป็นครั้งแรกโดย (Ahn; et al. 1992) พบว่าลักษณะความหอมของข้าวถูกควบคุมโดยยีนด้อย (Recessive gene) บนตำแหน่งโครโมโซมคู่ที่ 8 โดยใกล้ชิดกับเครื่องหมายโมเลกุล RFLP clone RG28 ต่อมาได้มีการรายงานการควบคุมตำแหน่งยีนที่ควบคุมลักษณะความหอม โดยลักษณะความหอมถูกควบคุมโดยยีน *badh2* ซึ่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 8 และนอกจากนั้นยังพบว่ายีน *badh1* ก็ยังทำหน้าที่ควบคุมความหอมเช่นกัน แต่ลักษณะความหอมของข้าวนั้นเกิดจากการแสดงของยีน *badh2* มากกว่ายีน *badh1* (Lorieux; et al.

1996; Bradbury; et al. 2005a; Wanchana; et al. 2005; Chen; et al. 2006; Amarawathi; et al. 2008) โครงสร้างและหน้าที่ของยีน *badh2* เป็นยีนที่ควบคุมลักษณะความหอมของข้าว โดยมีความยาวของนิวคลีโอไทด์ประมาณ 5,800 คู่ เบส ซึ่งประกอบด้วย 15 เอกซอน และ 14 อินทรอน ซึ่งยีนดังกล่าวสามารถสังเคราะห์กรดอะมิโน 503 โมเลกุล ส่งผลให้เกิดการสร้างเอนไซม์ BADH ที่มีความสมบูรณ์ (Bradbury; et al. 2005a; Chen; et al. 2008; Shi; et al. 2008)



ภาพประกอบ 3 แสดงโครงสร้างและตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีน *badh2* เปรียบเทียบระหว่างข้าวหอมและข้าวไม่หอม โดยพบการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์จำนวน 8 นิวคลีโอไทด์ในข้าวหอม

ที่มา: Riabroy; et al. (2013). Fragrance Gene and Molecular Basis of Fragrant Rice. *Thai J. Genet.* 6(2): 93-114.

ข้าวหอมเกิดจากการที่ยีน *badh2* เกิดการกลายพันธุ์เป็นยีนด้อย ซึ่งเกิดการขาดหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 8 นิวคลีโอไทด์ (8 bp deletion) บริเวณ exon คู่ที่ 7 ทำให้เกิดการหยุดแปลรหัสก่อนกำหนด (premature stop codon) (ภาพประกอบ 3) เกิดการสังเคราะห์กรดอะมิโนเพียง 251ตัว จึงไม่สามารถสร้างเอนไซม์ BADH ที่สมบูรณ์ได้ จึงทำให้ไม่เกิดการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็น GABA จึงทำให้ข้าวที่ได้มีกลิ่นหอม (Wanchana; et. al. 2005; Bradbury; et al. 2005a)

2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเทคนิคการตรวจสอบคุณภาพข้าวหอม

2.1 เทคนิคการตรวจสอบคุณภาพข้าวหอมทางกายภาพ

การตรวจสอบข้าวหอมทางกายภาพเป็นเทคนิคในการจำแนกชนิดข้าวโดยวิธีการตรวจสอบด้วยสายตาเป็นหลัก ซึ่งต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญและผู้มีประสบการณ์ในการประเมินข้าวในแต่ละลักษณะ โดยลักษณะของข้าวในการตรวจสอบตามมาตรฐานสินค้าข้าวของกระทรวงพาณิชย์สามารถประเมินได้ 4 ลักษณะ ประกอบด้วย

1. พื้นข้าว คือ การประเมินจากชั้นของเมล็ดข้าว โดยจำแนกและประเมินได้จากความยาวของเมล็ดข้าว

2. ส่วนผสม คือ การประเมินประเภทของข้าวแต่ละชนิดที่ผสมอยู่ในข้าวที่จะตรวจสอบ โดยจำแนกได้จากข้าวเต็มเมล็ด ข้าวหักที่ผสมกัน

3. ข้าวและสิ่งที่อาจปนได้ คือ การประเมินโดยใช้หลายลักษณะประกอบกัน เช่น การประเมินความเข้มของแสง จากข้าวเมล็ดเหลือง หรือ การประเมินโดยใช้ความแตกต่างของรูปร่างจากลักษณะ เมล็ดลีบ เมล็ดพืชจากชนิดอื่น และ ข้าวเปลือก

4. ระดับการสี คือ ประเมินจากลักษณะการสีข้าว โดยจำแนกจากการขัดสีของรำข้าว

2.1.1 ข้อจำกัด

เทคนิคการตรวจสอบคุณภาพข้าวหอมด้วยวิธีการทางกายภาพดังกล่าวเป็นเทคนิคที่ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในระดับสูง อีกทั้งการตรวจสอบแต่ละลักษณะใช้เวลารวมค่อนข้างนาน รวมไปถึงข้อจำกัดในการตรวจสอบอาจมีสิ่งเจือปนอื่นได้

2.2 เทคนิคการตรวจสอบคุณภาพข้าวหอมทางเคมี

ปัจจุบันการตรวจสอบคุณภาพข้าวหอมด้วยวิธีการตรวจสอบสารเคมีที่มีอยู่ในข้าวหอมเป็นไปอย่างแพร่หลายและได้มีการพัฒนาวิธีการต่างๆ เพื่อตรวจสอบคุณภาพของข้าวหอม โดยในการตรวจสอบคุณภาพของข้าวหอมทางเคมีสามารถตรวจสอบได้จากปริมาณ อะมิโลสของข้าว โดยข้าวหอมต้องมีปริมาณอะมิโลสอยู่ระหว่าง 12-19 % ซึ่งเป็นการตรวจสอบทางด้านคุณภาพทางเคมีที่สามารถบ่งบอกถึงลักษณะของข้าวได้ (กัญญา เชื้อพันธุ์. 2547) หรือ การตรวจสอบสารหอมระเหย 2-AP ที่ให้ความหอมในข้าว (Buttery; et al. 1983) โดยการตรวจสอบคุณภาพข้าวหอมทางเคมีมีหลายวิธีการในการตรวจสอบ ซึ่งสามารถสรุปได้ดังตาราง 1

ตาราง 1 ตัวอย่างการตรวจสอบคุณภาพข้าวหอมทางเคมี

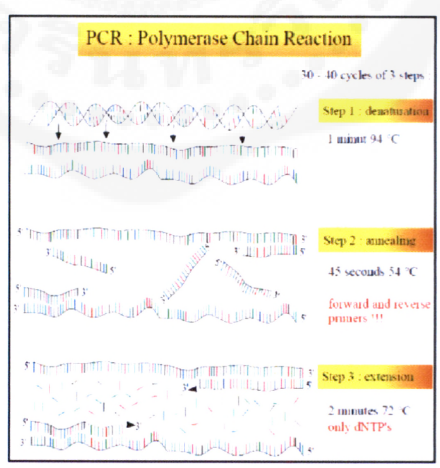
เทคนิคการตรวจสอบ	วิธีการตรวจสอบ	ข้อดี	ข้อจำกัด
1. Near infrared spectroscopy (NIR)	ตรวจสอบปริมาณอะมิโลสในข้าวหอม โดยใช้เครื่อง NIR เพื่อทำนายปริมาณอะมิโลส	- ตรวจสอบปริมาณอะมิโลสได้รวดเร็ว และแม่นยำ	- การวิเคราะห์ค่อนข้างซับซ้อน - เครื่องมือที่ใช้ราคาแพง - ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์
2. Gas chromatography		- เทคนิคที่มีความเหมาะสมกับการตรวจวัดสารที่ระเหยได้ - แม่นยำและมีความถูกต้องสูง	- เครื่องมือที่ใช้ราคาแพง - ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ - ไม่สามารถตรวจสอบตัวอย่างข้าวที่ถูกทิ้งเป็นระยะเวลานานได้ เนื่องจาก สาร 2-AP เป็นสารที่ระเหยได้ ซึ่งอาจทำให้ผลการทดลองคลาดเคลื่อน
2.1 Gas chromatography	2.1 ตรวจสอบโดยสกัดสารหอมระเหย 2-AP แล้วนำไปตรวจสอบหาปริมาณ 2-AP ด้วยเครื่อง GC		
2.2 Automate headspace gas chromatography (HG-GC)	2.2 ตรวจสอบหาปริมาณ 2-AP โดยได้มีการประยุกต์การสกัดในสภาวะแก๊สซึ่งใช้การวิเคราะห์ตัวอย่างจากเมล็ดข้าวโดยตรงโดยไม่ต้องสกัดสารหอมระเหยจากข้าว		
2.3 Solid phase micro extraction (SPME-GC)	2.3 การตรวจสอบหาปริมาณ 2-AP โดยนำไปประยุกต์ใช้การสกัดสารระเหยจาก headspace ของข้าวหอมโดยใช้ตัวดูดซับ จากนั้นทำให้สารระเหยออกจากตัวดูดซับ		

2.3 เทคนิคการตรวจสอบคุณภาพข้าวหอมด้วยลักษณะทางพันธุกรรม

การตรวจสอบข้าวหอมได้ถูกพัฒนามาใช้การตรวจสอบได้โดยใช้ลักษณะทางพันธุกรรม โดยอาศัยความแตกต่างทางพันธุกรรมของข้าวหอมและไม่หอม โดยข้าวหอมเกิดการขาดหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์ในยีน *badh2* จำนวน 8 คู่เบส (Bradbury; et al. 2005a) จากความแตกต่างลักษณะทางพันธุกรรมดังกล่าวจึงสามารถใช้ในการแยกความแตกต่างของข้าวหอมและไม่หอมได้ โดยวิธีการตรวจสอบที่แพร่หลายในการจำแนกความแตกต่างระหว่างข้าวหอมและไม่หอมคือเทคนิคลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR)

2.3.1 ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่พลีเมอเรสหรือพีซีอาร์ (PCR) เป็นเทคนิคในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอนเอเป้าหมาย (target DNA) ภายในเวลาที่รวดเร็ว โดยอาศัยการจำลองตัวของสายดีเอ็นเอ (DNA replication) ซึ่งจะใช้เครื่อง PCR machine เป็นตัวช่วยในการเพิ่มขยายชิ้นส่วนดีเอ็นเอ พีซีอาร์เป็นเทคนิคที่มีความสำคัญสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานด้านชีวโมเลกุล และพันธุ-วิศวกรรมได้อย่างแพร่หลาย เช่น การเพิ่มขยายปริมาณยีน การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน โดยข้อดีของเทคนิคดังกล่าวคือเป็นเทคนิคที่สามารถเพิ่มขยายชิ้นส่วน DNA ได้อย่างจำเพาะและเจาะจง (ภาพประกอบ 4)



ภาพประกอบ 4 แสดงการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

ที่มา: Bartlett. J. M. S, Stirling.D. (2003). A short history of the polymerase chain reaction. PCR protocols.384-4: 3.

2.3.2 ข้อจำกัด

เทคนิคพีซีอาร์ต้องมีการศึกษาลำดับเบสและออกแบบไพร์เมอร์สำหรับยีนที่ต้องการที่จะศึกษา และเทคนิคดังกล่าวจำเป็นที่จะต้องใช้เครื่อง PCR machine ที่มีราคาค่อนข้างแพง อีกทั้งต้องมีผู้เชี่ยวชาญในการตรวจสอบด้วยเทคนิคดังกล่าว รวมไปจนถึงการใช้ระยะเวลาในการตรวจสอบที่นาน

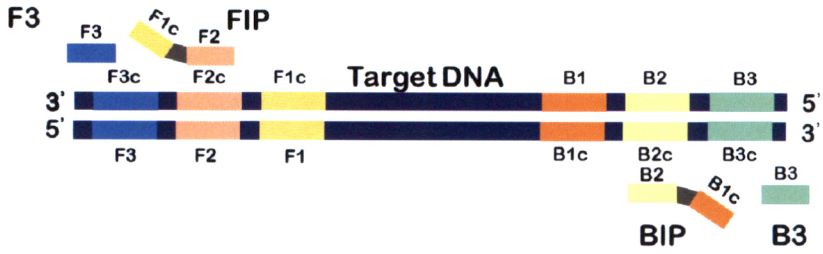
3. เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเทคนิค LAMP

3.1 เทคนิค LAMP

เทคนิค LAMP เป็นเทคนิคที่อาศัยหลักการเพิ่มขยายปริมาณ DNA เป้าหมาย (DNA target) โดยใช้ระยะเวลาในการเพิ่มขยายประมาณ 1 ชั่วโมง เทคนิคนี้ถูกพัฒนาขึ้นโดยนักวิจัยชาวญี่ปุ่นชื่อ Tsugunori Notomi และคณะในปี 2000 ซึ่งสามารถแก้ปัญหาสำคัญของเทคนิค PCR ได้ โดยเทคนิค LAMP ไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาสูง ซึ่งเทคนิค LAMP สามารถนำไปใช้ในการเพิ่มขยายยีน (amplification) ได้ถึง 10^9 เท่าของปริมาณยีนเดิม อีกทั้งยังใช้ในสภาวะอุณหภูมิเดียว คือ 60 – 65 ^{o}C (Notomi. 2000) และมีความจำเพาะที่สูง โดยไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง เช่นเครื่อง Polymerase Chain Reaction (PCR) ซึ่งทำให้เทคนิคนี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างแพร่หลาย

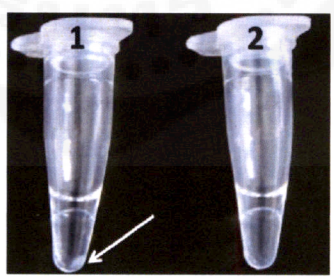
3.2 หลักการของเทคนิค LAMP

หลักการพื้นฐานของเทคนิค LAMP จะทำการเพิ่มขยายยีนโดยใช้ไพร์เมอร์อย่างน้อย 4 เส้น ที่มีความจำเพาะกับ 6 บริเวณยีนเป้าหมาย (target DNA) โดยประกอบด้วย inner primer 2 เส้นได้แก่ Forward inner primer (FIP) และ Backward inner primer (BIP) และ outer primer 2 เส้น ได้แก่ Forward outer primer (F3) และ Backward outer primer (B3) (ภาพประกอบ 5)



ภาพประกอบ 5 แสดงตำแหน่งของไพร์เมอร์ที่จำเพาะของเทคนิค LAMP ทั้ง 4 เส้น ที่ออกแบบให้จดจำกับยีนเป้าหมายทั้ง 6 ตำแหน่งคือ F1, F2, F3, B1, B2 และ B3

การเพิ่มขยายยีนนั้นเกิดขึ้นโดยอุณหภูมิคงที่โดยใช้เอนไซม์ *Bst* DNA polymerase ซึ่งทำให้เกิดปฏิกิริยา strand displacement ที่สมบูรณ์ ซึ่งทำให้ DNA แยกเป็นสายเดี่ยวได้โดยไม่ต้องใช้อุณหภูมิสูง นอกจากนั้นยังสามารถตรวจสอบการเพิ่มขยายยีนไปพร้อมกับการเกิดปฏิกิริยาในเทคนิค LAMP เนื่องจากในกระบวนการสังเคราะห์ DNA ของ LAMP นั้นเกิดการเติม dNTPs เข้าทางปลายด้าน 3' OH ทำให้เกิดการปลดปล่อย pyrophosphate ions (PPi) ซึ่ง PPi จะจับเข้ากับแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) ที่เป็นส่วนผสมของสารละลาย เกิดเป็นตะกอนของสีขาว ของ magnesium pyrophosphate ที่ไม่ละลายน้ำ ทำให้สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า (ภาพประกอบ 6) (Mori; et al. 2001; Nagamine; et al. 2002)



ภาพประกอบ 6 แสดงผลการทดลองหลังทดสอบด้วยผลิตภัณฑ์ LAMP ด้วย Magnesium pyrophosphate ด้านซ้ายเกิดตะกอนสีขาว ด้านขวาแสดงเห็นหลอดที่ให้สารละลายใสไม่มีสี

ที่มา: Li; et al. (2016). A novel visual loop -mediated isothermal amplification assay targeting gene62181533 for the detection of Salmonella spp. In foods. *Food Control.* 60: 230-236

3.3 กลไกการทำงานของ LAMP

กลไกการทำงานของ LAMP ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนได้แก่

1. ขั้นตอนเริ่มต้น (Starting structure producing step)

1.1 ที่อุณหภูมิ 65 องศาสเซลเซียส เกิดการจับกันของ DNA ของสายคู่ (double stranded DNA) และ DNA บางส่วนเกิดการคลายตัวกลายเป็นสายเดี่ยว (single stranded DNA) ตลอดเวลาจึงทำให้ FIP จับกับเบสคู่สมบริเวณเป้าหมาย จากนั้น DNA polymerase เริ่มกระบวนการสังเคราะห์โดยการแยกสาย single stranded สายเก่าออกไปและสังเคราะห์ DNA สายใหม่ขึ้นมา

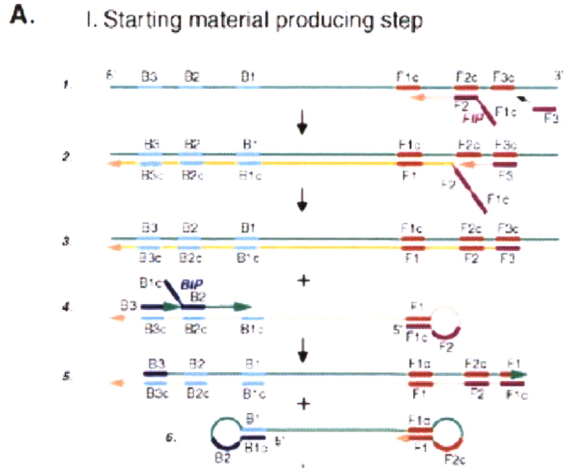
1.2 จากนั้น F3 ที่เป็น outer primer จะเข้าจับกับเบสคู่สมบริเวณ F3c ซึ่งอยู่บริเวณด้านนอกของ FIP แล้วเกิดการสังเคราะห์ DNA สายใหม่ โดยอาศัยคุณสมบัติของเอนไซม์ DNA polymerase ที่สามารถเกิดการ strand displacement และเกิดการปลดปล่อย DNA สายที่ถูกสังเคราะห์ด้วย FIP primer ออกมาเป็นสายเดี่ยว (single strand)

1.3 เกิดการสังเคราะห์ DNA จาก F3 primer ทำให้ได้ Double strand ที่เป็นเบสคู่สมกับ DNA template

1.4 DNA ที่เกิดจากการสังเคราะห์ด้วย FIP primer มีโครงสร้างเป็น stem loop เนื่องจากบริเวณปลาย 5' บริเวณ F1c และ F1 เป็นเบสคู่สมกัน เกิดการสร้าง loop ขึ้น จากนั้น BIP primer จะเข้าจับและเกิดการสังเคราะห์ DNA เส้นใหม่ขึ้น

1.5 B3 primer ที่เป็น outer primer เข้าจับกับบริเวณคู่สม B3c และเริ่มการสังเคราะห์ DNA สายใหม่และปลดปล่อย DNA ที่ถูกสร้างขึ้นด้วย BIP primer ออกมาเป็นสายเดี่ยว

1.6 DNA ถูกสร้างขึ้นด้วย BIP primer ที่ถูกปลดปล่อยออกเป็นสายเดี่ยว (single strand) จะมีโครงสร้างเป็น loop ทั้งสองด้าน โดยมีลักษณะเป็นคล้ายดัมเบล (dumbbell-shaped DNA structure) ซึ่งเกิดจากด้าน Forward บริเวณ F1c และ F1 เป็นเบสคู่สมกัน และด้าน Backward B1c และ B1 เบสคู่สมกันจึงเกิดการสร้าง loop บริเวณปลายสายทั้งสองด้าน ดังภาพประกอบ 7

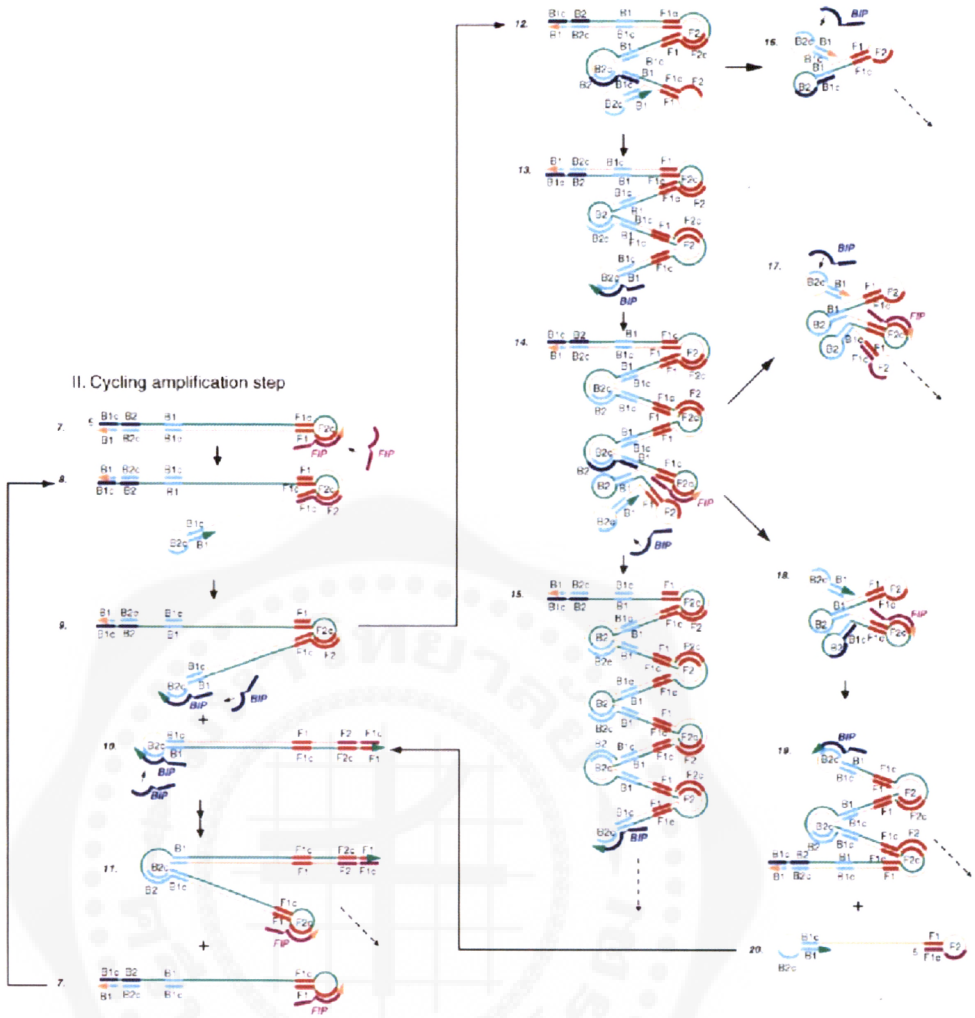


ภาพประกอบ 7 ขั้นตอนเริ่มต้นในการสร้าง dumbbell-sharped DNA structure เพื่อใช้เป็น template ในขั้นตอนของ LAMP cycle

ที่มา: Notomi; et al. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acid Research*. 28(12): e63

2. ขั้นตอน Cycle amplification

เกิดกระบวนการ self-primed DNA synthesis โดยจะเกิดขึ้นบริเวณปลาย loop forward ก่อนโดย F1 เกิดการสังเคราะห์ DNA ไปเรื่อยๆ จนถึงบริเวณ B1c ในขณะเดียวกัน FIP primer เข้าจับกับบริเวณ F2c ที่ loop forward จากนั้นสังเคราะห์ DNA สายใหม่ เกิดการปลดปล่อย DNA ที่เกิดการสังเคราะห์จาก F1 ทำให้เกิดเป็น stem loop ที่ปลาย 3' เนื่องจาก B1c และ B1 เป็นเบสคู่สมกัน จากนั้น B1 บริเวณ loop ปลายด้าน 3' สังเคราะห์ DNA โดยใช้ self-structure ของ template จึงทำให้เกิดการปลดปล่อยของ DNA ที่สังเคราะห์จาก FIP primer เกิดขึ้น ซึ่งทำให้ได้โครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายดัมเบล ซึ่งจะเกิดการ cycle amplification ด้าน backward ขึ้นได้ ซึ่งทำให้ BIP primer เข้าจับบริเวณ B2c แล้วเกิดการสังเคราะห์ขึ้นอย่างต่อเนื่อง จนเกิดปฏิกิริยาเป็นลูกโซ่ ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยาจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีหลายขนาดต่างกันที่ประกอบด้วยยีนเป้าหมายที่ต้องการ ดังภาพประกอบ 8



ภาพประกอบ 8 ขั้นตอนเริ่มต้นในการสังเคราะห์ DNA แบบหมุนวนต่อเนื่อง (Cycle amplification) ในเทคนิค LAMP

ที่มา: Notomi; et al. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acid Research*. 28(12): e63

3.4 ข้อดีของเทคนิค LAMP (ศรัญญา ปลาอ่อน. 2556)

1. ประสิทธิภาพในการเพิ่มขยายยีนสูงภายใต้สภาวะอุณภูมิเดียวคือ 60-65 องศาเซลเซียส ซึ่งมีความไวในการตรวจสอบสูงโดยมีความไวมากกว่าเทคนิค PCR ประมาณ 10 – 100 เท่า สามารถตรวจสอบได้แม้ว่ามีปริมาณ DNA ปริมาณน้อยเพียง 6 copies

2. เทคนิค LAMP มีความจำเพาะสูงเพราะต้องใช้ primer 4 เส้น เพื่อใช้ในบริเวณ specific sites 6 ตำแหน่ง ดังนั้นสามารถลด background จากการเพิ่มขยายยีนที่ไม่จำเพาะได้

3. เป็นเทคนิคที่ทำได้ง่ายโดยใช้เครื่องมือพื้นฐานได้ เช่น heat block หรือ water bath

4. การตรวจวัดผลการตรวจสอบสามารถทำได้ง่าย ไม่ยุ่งยาก อีกทั้งสามารถเลือกวิธีการตรวจสอบได้หลายวิธี

5. สามารถใช้เทคนิค reverse transcription ได้โดยสามารถเพิ่มขยายยีนจาก RNA ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

3.4 ข้อเสียของเทคนิค LAMP

1. ออกแบบไพร์เมอร์ค่อนข้างยาก เนื่องจากไพร์เมอร์ต้องมีความจำเพาะเจาะจงต่อตำแหน่งที่จำเพาะถึง 6 ตำแหน่งของบริเวณยีนเป้าหมาย อีกทั้งต้องคำนึงระยะห่างของตำแหน่งไพร์เมอร์เพื่อที่จะสามารถเกิด Loop ที่ใช้ในการเพิ่มขยายจำนวนยีนได้

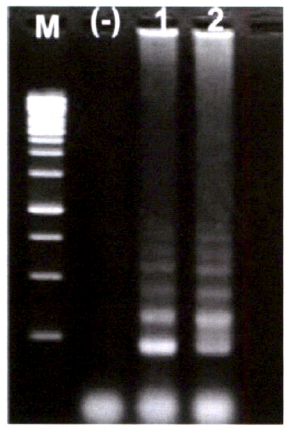
2. มีการใช้ไพร์เมอร์ที่มีปริมาณมากกว่าปกติ โดยเฉพาะ Primer BIP และ FIP

4. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเทคนิควิธีการวิเคราะห์ DNA ที่เพิ่มขยายด้วยเทคนิค LAMP

เมื่อทำการเพิ่มปริมาณ DNA ที่ต้องการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LAMP ทำให้ได้ DNA ที่เพิ่มขยายเป็นจำนวนมาก สามารถตรวจสอบ DNA ที่เพิ่มขยายด้วยเทคนิค LAMP (LAMP product) ได้หลากหลายวิธี ดังต่อไปนี้

4.1 การวิเคราะห์ DNA ที่เพิ่มขยายด้วยเทคนิค LAMP ด้วย Gel Electrophoresis

เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Gel Electrophoresis) เป็นวิธีการทดสอบ DNA ที่เพิ่มขยายจากเทคนิค LAMP เป็นวิธีตรวจสอบโดยตรง (Notomi. 2000) เทคนิคดังกล่าวใช้หลักการแยกขนาดของ DNA โดยอาศัยประจุของ DNA ในการแยกบนสนามไฟฟ้า DNA ถูกย้อมด้วยเอทิเดียมโบร์ไมด์ (Ethidium bromide) จากนั้นทำการแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้นอะกาโรส (Agarose gel) ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จะให้ แถบ DNA ที่มีหลายขนาด (ภาพประกอบ 9) เนื่องจากกระบวนการ Cycling amplification ทำให้ได้ DNA ที่เพิ่มขยาย มีขนาดต่างกัน ต่างจาก PCR ที่เห็นเพียง 1 แถบ



ภาพประกอบ 9 แสดงผลิตภัณฑ์จากเทคนิค LAMP เมื่อวิเคราะห์ด้วย Gel Electrophoresis

(M) คือ ladder ขนาด 1-kb, (-) คือ ผลลบ (Negative result), 1 และ 2 คือ ผลบวก (Positive result)

ที่มา: Zhang; et al. (2014). Brief review of monitoring methods for Loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biosensor and Bioelectronic*. 61: 491-499

4.1.1 ข้อดี

เป็นเทคนิคที่ง่ายต่อการตรวจสอบ สามารถเห็นผลการตรวจสอบได้ชัดเจน อีกทั้งมีความว่องไวในการตรวจสอบที่สูง

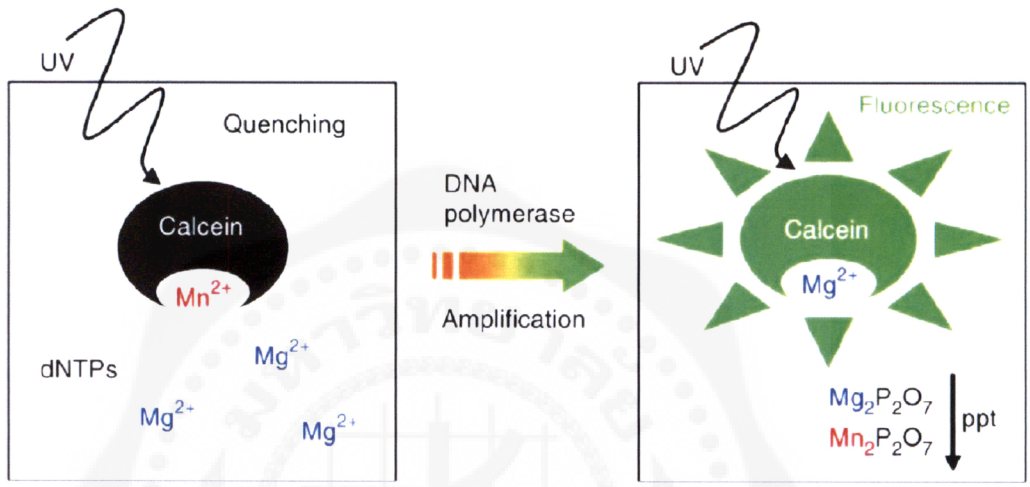
4.1.2 ข้อจำกัด

เทคนิคดังกล่าวเป็นเทคนิคที่ตรวจสอบหลังเกิดปฏิกิริยา LAMP ซึ่งอาจต้องใช้เวลาในการเตรียมผลิตภัณฑ์ และใช้เวลาค่อนข้างนานในการใช้ Gel Electrophoresis อีกทั้งต้องใช้อุปกรณ์และเครื่องมือในการตรวจสอบและเสี่ยงต่อการปนเปื้อน (Contaminate)

4.2 การวิเคราะห์ DNA ที่เพิ่มขยายด้วยเทคนิค LAMP ด้วยการเรืองแสงของ Calcein

การตรวจสอบ DNA ที่เพิ่มขยายด้วยเทคนิค LAMP ด้วยการเรืองแสงของ Calcein เป็นการตรวจสอบโดยการเติม Calcein ลงไปในสารละลายก่อนการเกิดปฏิกิริยา LAMP Calcein จะจับกับแมงกานีสไอออนก่อนการเกิดปฏิกิริยาในขั้นนี้จะเกิดการเรืองแสงสีส้ม และเมื่อ

เกิดปฏิกิริยา Calcein จะปลดปล่อยแมงกานีสไอออนออกมาจากนั้นจะจับกับแมกนีเซียมไอออนแทน ส่วนแมงกานีสไอออนทำปฏิกิริยากับ pyrophosphate เกิดเป็นตะกอนเกิดขึ้น เมื่อนำสารละลายหลังการเกิดเทคนิค LAMP มาตรวจสอบโดยให้แสง UV Calcein จะเกิดการเรืองแสงเป็นแสงสีเขียว (Tomita; et al. 2008) ดังภาพประกอบ 10



ภาพประกอบ 10 แสดงการเกิดการเรืองแสงของ Calcein หลังเกิดปฏิกิริยา LAMP

ที่มา: Zhang; et al. (2014). Brief review of monitoring methods for Loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biosensor and Bioelectronic*. 61: 491-499

4.2.1 ข้อดี

เป็นเทคนิคที่ง่ายต่อการตรวจสอบ เกิดการปนเปื้อนได้ยากเนื่องจากเกิดปฏิกิริยาไปพร้อมกับเทคนิค LAMP

4.2.2 ข้อจำกัด

เทคนิคดังกล่าวเป็นเทคนิคที่มีความว่องไวต่ำกว่าการใช้ Gel Electrophoresis อีกทั้งง่ายต่อการเกิดความคลาดเคลื่อน รวมไปถึง Calcein และ $MnCl_2$ มีผลต่อการยับยั้งการเกิด LAMP reaction ในบางขั้นตอน

4.3 การวิเคราะห์ DNA ที่เพิ่มขยายด้วยเทคนิค LAMP โดยการเปลี่ยนสีของ Hydroxyl naphthol blue (HNB)

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ LAMP (LAMP product) โดยการเปลี่ยนสีของ Hydroxyl naphthol blue (HNB) เป็นการตรวจสอบโดยการเติม HNB ลงไปในสารละลายผสมก่อนการเกิดเทคนิค LAMP โดย HNB เป็นอินดิเคเตอร์ในการตรวจสอบปริมาณไอออนของ Mg^{2+} เมื่อมีปริมาณ Mg^{2+} มาก สารละลายที่มีส่วนผสมของ HNB จะมีสีม่วง แต่เมื่อเทคนิค LAMP เกิดขึ้น จะมีปริมาณ pyrophosphate เพิ่มมากขึ้น pyrophosphate สามารถทำปฏิกิริยากับ Mg^{2+} ได้เกิดเป็นตะกอน ทำให้สารละลายผสมมีปริมาณ Mg^{2+} ลดลง จึงทำให้ HNB เปลี่ยนเป็นสารละลายสีฟ้าได้ (Motoki; et al. 2009; Zhang; et al. 2014)

4.3.1 ข้อดี

เทคนิคดังกล่าว สามารถเห็นผลการตรวจสอบได้ด้วยตาเปล่า เกิดการปนเปื้อนได้ยากเนื่องจากเกิดปฏิกิริยาไปพร้อมกับเทคนิค LAMP และง่ายในการตรวจสอบ

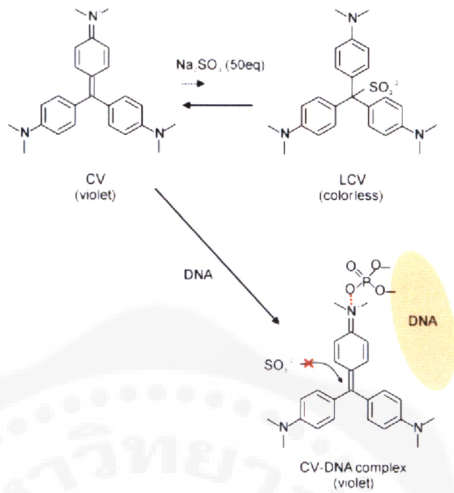
4.3.2 ข้อจำกัด

สีที่สังเกตได้ค่อนข้างที่จะยาก อีกทั้งการทดสอบดังกล่าวเป็นการทดสอบปริมาณ Mg^{2+} ที่ลดลง ไม่ได้ตรวจสอบปริมาณ DNA ที่เพิ่มขยายจากเทคนิค LAMP อาจส่งผลให้เกิดข้อผิดพลาดจากการตรวจสอบได้

4.4 การวิเคราะห์ DNA ที่เพิ่มขยายด้วยเทคนิค LAMP โดยการเปลี่ยนสีของลิวโค-คริสตัลไวโอเลต

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ LAMP โดยการเปลี่ยนสีของ Leucocrystal violet (LCV) โดยในการทดสอบต้องเตรียมสารละลาย Crystal violet (CV) ผสมกับโซเดียมซัลไฟต์ลงไป (Na_2SO_3) ในปริมาณที่มากเกินพอ ทำให้ CV ที่เป็นสารละลายสีม่วง เปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ LCV ซึ่งเป็นสารละลายใสไม่มีสี โดยสารประกอบทั้งสองอยู่ในสภาวะสมดุล ในการทดสอบเทคนิค LAMP สามารถทดสอบได้โดยการเติม LCV ที่เป็นสารละลายไม่มีสี ลงในสารละลายผสมก่อนการเกิดเทคนิค LAMP เพื่อตรวจสอบปฏิกิริยาโดยการเปลี่ยนสี เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นเกิดการผลิตจำนวน DNA เพิ่มมากขึ้น CV สามารถทำปฏิกิริยากับ DNA ได้ ทำให้ในสารละลายความเข้มข้นของ CV ลดลง ส่งผลให้เกิดสมดุลทำให้เกิดการเปลี่ยนรูป LCV ไปเป็น CV มากขึ้น ซึ่งสามารถตรวจสอบการ

เกิดเทคนิค LAMP ได้ โดยหากเกิดปฏิกิริยาจะส่งผลให้สารละลายเปลี่ยนจากสารละลายใสไม่มีสี เป็นสารละลายสีม่วง (Shigehiko; et al. 2014) ดังภาพประกอบ 11



ภาพประกอบ 11 แสดงการเกิดการเปลี่ยนสีของ LCV เมื่อทำปฏิกิริยากับ DNA สายคู่

ที่มา: Shigehiko; et al. (2014). Method for colorimetric detection of double-stranded nucleic acid using leuco triphenylmetane dyes. *Analytical Biochemistry*. 473: 28-33

4.4.1 ข้อดี

เทคนิคดังกล่าวเป็นเทคนิคที่ตรวจสอบได้โดยตรงเพราะทำปฏิกิริยาโดยตรงกับ DNA ง่ายในการตรวจสอบ สามารถเห็นผลการตรวจสอบได้ด้วยตาเปล่า เกิดการปนเปื้อนได้ยาก เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาไปพร้อมกับเทคนิค LAMP

4.4.2 ข้อจำกัด

เนื่องจากสามารถเกิดปฏิกิริยาได้กับ Double strand DNA ได้ทุกลำดับเบส ดังนั้นอาจทำให้ไม่เกิดความจำเพาะเจาะจงกับ DNA ที่ต้องการตรวจสอบได้

จากการศึกษาวิธีการตรวจสอบปริมาณ DNA ที่เพิ่มขยายด้วยเทคนิค LAMP สามารถสรุปวิธีการต่าง ๆ ได้ตามตาราง 2

ตาราง 2 วิธีการตรวจสอบปริมาณ DNA ที่เพิ่มขยายด้วยเทคนิค LAMP

เทคนิค	การตรวจสอบ	ข้อดี	ข้อจำกัด
1. Gel Electrophoresis	หลักการแยกขนาดของ DNA โดยอาศัยประจุของ DNA ในสนามไฟฟ้า บนแผ่นวุ้นอะกาโรส (Agarose gel)	- ง่ายต่อการตรวจสอบ - เห็นผลการตรวจสอบได้ชัดเจน	- ตรวจสอบหลังเกิดเทคนิค LAMP - ใช้เวลานานในการเตรียม Gel - ใช้อุปกรณ์และเครื่องมือในการตรวจสอบ
2. การเรืองแสงของ Calcien	Calcein จับกับ Mn^{2+} ก่อนการเกิดปฏิกิริยาในขั้นนี้จะเกิดการเรืองแสงสีส้ม และเมื่อเกิดปฏิกิริยา Calcein จะปลดปล่อย Mn^{2+}ออกมา จากนั้นจะจับกับ Mg^{2+}แทน เกิดการเรืองแสงเป็นสีเขียว	- ง่ายต่อการตรวจสอบ - เกิดการปนเปื้อนได้ยากเนื่องจากเกิดปฏิกิริยาไปพร้อมกับเทคนิค LAMP	- ว่องไวต่ำกว่าการใช้ Gel Electrophoresis - Calcein และ $MnCl_2$ มีผลต่อการยับยั้งการเกิด LAMP reaction ในบางขั้นตอน
3. การเปลี่ยนสีของ HNB	HNB เป็นอินดิเคเตอร์ในการตรวจสอบปริมาณไอออนของ Mg^{2+} เมื่อมีปริมาณ Mg^{2+} มาก HNB จะมีสีม่วง แต่เมื่อเทคนิค LAMP เกิดขึ้น จะมีปริมาณ pyrophosphate เพิ่มมากขึ้น pyrophosphate สามารถทำปฏิกิริยากับ Mg^{2+} ได้เกิดเป็นตะกอน ทำให้สารละลายผสมมีปริมาณ Mg^{2+} ลดลง	- ง่ายต่อการตรวจสอบ - เห็นผลการตรวจสอบได้ด้วยตาเปล่า - ปนเปื้อนได้ยากเนื่องจากเกิดปฏิกิริยาไปพร้อมกับเทคนิค LAMP	- สีที่สังเกตได้ค่อนข้างที่จะยาก - ไม่ได้ตรวจสอบปริมาณ DNA ที่เพิ่มขยายจากเทคนิค LAMP อาจเกิดข้อผิดพลาดจากการตรวจสอบได้

ตาราง 2 (ต่อ)

เทคนิค	การตรวจสอบ	ข้อดี	ข้อจำกัด
	จึงทำให้ HNB เปลี่ยนเป็นสารละลายสีฟ้า		
3. การเปลี่ยนสีของลิวโค-คริสตัลไวโอ-เลต	LCV ซึ่งเป็นสารละลายใสไม่มีสี เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้นเกิดการผลิตจำนวน DNA เพิ่มมากขึ้น CV สามารถทำปฏิกิริยากับ DNA ได้ ทำให้ในสารละลายความเข้มข้นของ CV ลดลงสารละลายเปลี่ยนจากสารละลายใสไม่มีสีเป็นสารละลายสีม่วง	- ง่ายต่อการตรวจสอบด้วยตาเปล่า - เกิดการปนเปื้อนได้ยากเนื่องจากเกิดปฏิกิริยาไปพร้อมกับเทคนิค LAMP และทำปฏิกิริยากับ DNA ที่เพิ่มขยาย	- ไม่เกิดความจำเพาะเจาะจงกับ DNA ที่ต้องการตรวจสอบได้

จากการศึกษาทางผู้วิจัยได้มีความสนใจที่จะนำการวัดเชิงสีของลิวโคคริสตัลไวโอเลตมาใช้ในการตรวจสอบ LAMP product และใช้เทคนิคดังกล่าวพัฒนาการจำแนกความแตกต่างระหว่างข้าวหอมและไม่หอมต่อไป

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

ในงานวิจัยการประยุกต์ใช้เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ร่วมกับการวัดเชิงสีสำหรับพัฒนาการจำแนกความแตกต่างระหว่างข้าวหอมและไม่หอม ผู้ทำการวิจัยได้ดำเนินการตามขั้นตอนดังนี้

1. ออกแบบไพร์เมอร์สำหรับเทคนิค LAMP ที่จำเพาะต่อยีน *badh2* ในการแยกความแตกต่างระหว่างข้าวหอมและไม่หอม
2. เตรียมรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีน *badh2* จากข้าวหอม เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุม
3. การระบุความแตกต่างของข้าวหอมและไม่หอมโดยใช้ยีน *badh2* ด้วยเทคนิค LAMP
4. การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเทคนิค LAMP
5. การทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมสำหรับเทคนิค LAMP
6. ศึกษาความไวของเทคนิค LAMP ในการระบุความแตกต่างของข้าวไม่หอมด้วยยีน *badh2*
7. เทคนิค LAMP ในการจำแนกความแตกต่างของข้าวหอมและไม่หอมในข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ ด้วยยีน *badh2*
8. การตรวจสอบการปลอมปนของข้าวไม่หอมโดยใช้เทคนิค LAMP
9. การวิเคราะห์ผลของเทคนิค LAMP ด้วยเทคนิคเชิงสีของลิวโคคริสตัลไวโอเลต
10. การพัฒนาชุดทดสอบต้นแบบอย่างง่ายเพื่อจำแนกข้าวหอมและไม่หอมด้วยเทคนิค LAMP

1. เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่อง Gel Electrophoresis ยี่ห้อ MyRun รุ่น IMR-303 ประเทศจีน
2. เครื่อง UV spectrophotometer ยี่ห้อ MAPADA รุ่น UV-1200 ประเทศจีน
3. เครื่อง Centrifuge แบบความคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Hettish รุ่น UNIVERSAL320R ประเทศเยอรมัน
4. เครื่อง Incubate shaker ยี่ห้อ ZHICHEN รุ่น ZHWY-100H ประเทศจีน
5. เครื่อง Thermal cycle ยี่ห้อ BIO-RAD รุ่น T-100^{TM} ประเทศสิงคโปร์

6. เครื่อง Larmina flow ยี่ห้อ Microtech รุ่น V-3T-0811 ประเทศสหรัฐอเมริกา
7. เครื่องให้ความร้อน ยี่ห้อ Benchmark Scientific รุ่น BSH200 ประเทศจีน
8. ไมโครเวฟ ยี่ห้อ Sharp รุ่น R-220 ประเทศไทย
9. เครื่อง UV-lamp ยี่ห้อ Major science รุ่น MUVB-111 ประเทศสหรัฐอเมริกา
10. เครื่อง UV/Vis spectrophotometer รุ่น Hitachi Spectrophotometer Model U2900 Double Beam Spectrophotometer ประเทศไทย
11. ไมโครปิเปต ยี่ห้อ BRAND ประเทศเยอรมัน
12. ทิปดูดสาร ยี่ห้อ AxyGen ประเทศสหรัฐอเมริกา
13. หลอด Microcentrifuge ขนาด 1.5 mL ยี่ห้อ AxyGen ประเทศสหรัฐอเมริกา
14. หลอด Microcentrifuge ขนาด 0.6 mL ยี่ห้อ AxyGen ประเทศสหรัฐอเมริกา
15. โกร่งบดสาร

2. สารเคมี

1. เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII NEB ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. ชุด Plant Genomic DNA Extraction kit, Favorgen, Biotech Corp ประเทศไต้หวัน
3. ชุด Plasmid Extraction kit, Favorgen, Biotech Corp ประเทศไต้หวัน
4. ชุด Gel/PCR Purification kit, Favorgen, Biotech Corp ประเทศไต้หวัน
5. ชุด RBC Tag DNA Polymerase kit, RBC Bioscience ประเทศไต้หวัน
6. ชุด TA vector RBC Cloning Vector kit, RBC Bioscience ประเทศไต้หวัน
7. ยาปฏิชีวนะ Ampicillin, Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา
8. DNA gel strain, Invitrogen ประเทศสหรัฐอเมริกา
9. โซเดียมซัลไฟต์ (Na_2SO_3), Ajax Finechem ประเทศออสเตรเลีย
10. Tris-HCl Buffer, USB ประเทศสหรัฐอเมริกา
11. Crystal violet, Loba chemie ประเทศสหรัฐอเมริกา
12. อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani Broth (LB)
13. TBE (Tris Borate EDTA)
14. 6X Loading dry

15. ตัวอย่างข้าวทั้ง 11 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวหอมมะลิ105, ข้าวหอมปทุม, ข้าวกข31, ข้าวกข41, ข้าวกข 49, ข้าวไรซ์เบอรี่, ข้าวเฉียงพัทลุง, ข้าวสังข์หยดพัทลุง, ข้าวเล็บนกปัตตานี, ข้าวชัยนาท1 และ ข้าวชัยนาท80

3. วิธีดำเนินการทดลอง

1. ออกแบบไพร์เมอร์สำหรับเทคนิค LAMP ที่จำเพาะต่อยีน *badh2* ในการแยกความแตกต่างระหว่างข้าวหอมและไม่หอม

ศึกษาและเปรียบเทียบความแตกต่างของยีน *badh1* (GenBank accession no. EU566870.1) และ *badh2* (GenBank accession no. EU770321.1) จากทั้งข้าวหอมและไม่หอม จากนั้นได้ออกแบบไพร์เมอร์ตามคู่มือการออกแบบไพร์เมอร์สำหรับ LAMP (Eiken Chemical. n.d.) ที่มีความจำเพาะในการตรวจสอบยีน *badh2* และสามารถแยกความแตกต่างได้ทั้งในข้าวหอมและไม่หอม โดยลำดับเบสของไพร์เมอร์แสดงดังตาราง 3

ตาราง 3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่ใช้ในเทคนิค LAMP

ชนิดของไพร์เมอร์	ลำดับสารพันธุกรรม (DNA sequence 5' – 3')
BADH2F3	CACCCTGGTGTAGACAAGGTAC
BADH2B3	ACAGAAATTTGGAAACAAACCTTAAC
BADH2FIP	GAAAACATAAACCATGTATTGAGAGGATTTTCCTCCTGTAATCATGT ATACCCCAT
BADH2BIP	GGAGTTATGAAACTGGGTAATTTTATAGGAGCAGCTGAAGCCAT

2. เตรียมรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีน *badh2* จากข้าวหอม เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุม

2.1 การเพิ่มปริมาณยีน *badh2* จากข้าวหอมด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

ทำการสกัด DNA ของข้าวโดยใช้ ข้าวหอมมะลิ (KDML105) เป็นตัวอย่างของข้าวหอม จากนั้นสกัด genomic ด้วยชุดสกัด Plant Genomic DNA Extraction kit (Favogen, Biotech-

Corp) ทำการเพิ่มปริมาณยีน *badh2* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ ดังตาราง 4 ปฏิกิริยาพีซีอาร์เท่ากับ 200 µL ปฏิกิริยารวมประกอบไปด้วย 1X Reaction Buffer, 0.1mM dNTP mix, 1.25 unit RBC *Taq* Polymerase, template 70 µL, 0.2 mM forward primer F10, 0.2 mM reverse primer R10 และความเข้มข้นของ Template 50 ng/reaction

ตาราง 4 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่ใช้ในเทคนิค PCR (ภัทรพร และ คณะ. 2557)

ชนิดของไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
forward primer F10	5′ ACTGCAGGAACTATCCTCTC 3′
forward primer F20	5′ ACTGGTAAAAAGATTATGGC 3′
reverse primer R10	5′ TCTTGCATCCTGCTCGTCTG 3′

เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยานำมาตรวจสอบผลด้วย agarose gel electrophoresis เมื่อปรากฏแถบของดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย Gel/PCR Purification kit จากนั้นนำยีน *badh2* ที่ทำให้บริสุทธิ์มาทำการตรวจวัดความเข้มข้นของ PCR product ที่สกัดได้เพื่อเตรียมนำเข้าสู่ TA clone vector

2.2 การผลิตรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีน *badh2*

นำยีน *badh2* ที่ผลิตจากข้าวหอม (KDML105) ทำการเชื่อมต่อเข้าสู่ TA cloning vector โดยใช้ชุดคิท TA vector RBC Cloning Vector kit (RBC, Taiwan) ปฏิบัติตามวิธีการในคู่มือ จากนั้นทำการทรานฟอร์มเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ XL-1Blue และคัดเลือกแบคทีเรียที่มี recombinant plasmid ของยีน *badh2* โดยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar plate ซึ่งมี Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl -D-Galactopyranoside (X-gal) และยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินเป็นส่วนประกอบ จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีแบคทีเรียที่มีสีขาวมาทำการยืนยัน รีคอมบิแนนท์พลาสมิด โดยการทำ PCR ปฏิกิริยาพีซีอาร์เท่ากับ 12.5 µL ปฏิกิริยารวมประกอบไปด้วย 1X Reaction Buffer, 0.1mM dNTP mix, 1.25 unit RBC *Taq* Polymerase, template 70 µL, 0.2 mM forward primer F10 และ 0.2 mM reverse primer R10 จากนั้นทำปฏิกิริยาเพิ่มจำนวน DNA 35 รอบ และนำไปตรวจสอบผลโดย Gel electrophoresis และนำแบคทีเรียโคลนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด มาทำการเลี้ยงใน

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ผสมกับยาปฏิชีวนะแอมพิซิลินข้ามคืนในเครื่องเขย่าสารที่อุณหภูมิ 37 °C ที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้นำมาสกัดพลาสมิดด้วยชุด Plasmid extraction kit แล้วนำพลาสมิดที่สกัดได้ยืนยันว่ามียีน *badh2* โดยทำการตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*dIII restriction enzyme เพื่อตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วน DNA ที่ทำการแทรกในพลาสมิด จากนั้นเก็บรีคอมบิแนนท์พลาสมิด badh2KDML_TA plasmid ไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกระทั่งใช้

3. การระบุความแตกต่างของข้าวหอมและไม่หอมโดยใช้ยีน *badh2* ด้วยเทคนิค LAMP

การระบุความแตกต่างของข้าวหอมสามารถระบุด้วยยีน *badh2* ด้วยเทคนิค LAMP โดยทำการเตรียม Master Mix 12.5 µL ซึ่งประกอบด้วย 1X Isothermal buffer, 0.4mM dNTP, 0.8 µM FIP primer, 0.8 µM BIP primer, 0.1 µM F3 primer, 0.1 µM B3 primer จากนั้นเติมรีคอมบิ-แนนท์พลาสมิด badh2KDML_TA plasmid ที่มียีนของข้าวหอมและ badh2RB_TA plasmid ที่มียีนของข้าวไม่หอม (จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ได้มีการสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีน *badh2* ของข้าวไรซ์เบอร์รี่) เป็น Template โดยใช้ความเข้มข้นสุดท้าย 20 ng/reaction ทำการผสมสารให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที บ่มสารตัวอย่างในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม *Bst* polymerase บ่มที่อุณหภูมิ 65.0 °C เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นทำการตรวจสอบผลด้วยเทคนิค Gel electrophoresis โดยใช้ 1.5% agarose gel ความต่างศักย์ 120 โวลต์ เวลา 20 นาที

4. การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเทคนิค LAMP

ทำการทดสอบด้วยเทคนิค LAMP โดยใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *badh2* ของข้าวไม่หอม โดยใช้ badh2RB_TA plasmid เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและทำปฏิกิริยาตามสภาวะในข้อที่ 3. โดยใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาต่างกัน ได้แก่ 59.0 °C, 61.0 °C, 63.0 °C, 65.0 °C และ 67.0 °C เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเปรียบเทียบผลด้วยเทคนิค Gel electrophoresis โดยใช้ 1.5 % agarose gel ความต่างศักย์ 120 โวลต์ เวลา 20 นาที

5. การทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมสำหรับเทคนิค LAMP

ทำการทดสอบด้วยเทคนิค LAMP โดยใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *badh2* ของข้าวไม่หอมโดยใช้ badh2RB_TA plasmid เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและทำปฏิกิริยาตามสภาวะในข้อที่

3. และทำปฏิกิริยาอุณหภูมิ 65.0 °C เป็นเวลา 30, 60 และ 90 นาที จากนั้นเปรียบเทียบผลด้วยเทคนิค Gel electrophoresis โดยใช้ 1.5 % agarose gel ความต่างศักย์ 120 โวลต์ เวลา 20 นาที

6. ศึกษาความไวของเทคนิค LAMP ในการระบุความแตกต่างของข้าวไม่หอมด้วยยีน *badh2*

6.1 ศึกษาความไวของเทคนิค LAMP กับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีน *badh2* ของข้าวไม่หอม

เตรียมความเข้มข้นของ badh2RB_TA plasmid 10 ng/µL คำนวณหาจำนวน copies ของพลาสมิด (วิธีการคำนวณอยู่ในภาคผนวก ข) จากนั้นทำการเจือจางแบบ 10 เท่าด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10 – 10^9 copies/reaction นำพลาสมิดที่เจือจางความเข้มข้นมาเป็น Template ในการทดสอบด้วยเทคนิค LAMP โดยใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยาดังข้อ 3. และทำการตรวจสอบผลด้วยเทคนิค Gel electrophoresis โดยใช้ 1.5 % agarose gel ความต่างศักย์ 120 โวลต์ เวลา 20 นาที

6.2 ศึกษาความไวของเทคนิค Real-time PCR กับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีน *badh2* ของข้าวไม่หอม

เตรียมความเข้มข้นของ badh2RB_TA plasmid 10 ng/µL คำนวณหาจำนวน copies ของพลาสมิด (วิธีการคำนวณอยู่ในภาคผนวก ข) จากนั้นทำการเจือจางแบบ 10 เท่าด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10 – 10^9 copies/reaction นำพลาสมิดที่เจือจางความเข้มข้นมาเป็น Template โดยใช้สารละลายปฏิกิริยาพีซีอาร์เท่ากับ 10 µL ประกอบด้วยสารผสมดังนี้ 1X QPCR Green Master Mix LROx, 1X (Biotechrabbit), 0.1 mM forward primer F20 primer และ 0.1 mM reward primer R10 (ตาราง 4) ทดสอบด้วยปฏิกิริยา Real-time PCR และนำ PCR product มาตรวจสอบผลด้วยเทคนิค Gel electrophoresis โดยใช้ 1.5 % agarose gel ความต่างศักย์ 120 โวลต์ เวลา 20 นาที

6.3 ศึกษาความไวของเทคนิค LAMP กับ genomic DNA ของข้าวไม่หอม

เตรียมสารละลาย DNA ของข้าวกข31 มาใช้เป็น Template โดยเตรียมจากการสกัด DNA โดยใช้ชุดคิท Plant Genomic DNA Extraction (Favorgen, Taiwan) สกัด DNA จากพืชโดยปฏิบัติตามคู่มือ ดังนี้ เติม FAPG 1 Buffer 400 µL และ RNase 8 µl ลงในตัวอย่างจากนั้นเขย่า

ให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร และนำตัวอย่างไปบ่มที่ 65 °C เป็นเวลา 10 นาที โดยพลิกคว่ำหงายไปมา 2 – 3 ครั้งขณะบ่ม ในขณะเดียวกันเตรียมตัวชะและนำไปบ่มพร้อมกันก่อนการใช้งาน เติม FAPG 2 Buffer 130 µL ลงในหลอดตัวอย่าง เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร จากนั้นนำไปบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที นำ Filter Column ใส่ลงใน Collection tube ขนาด 2 mL แล้วจึงนำสารผสมในหลอดตัวอย่างใส่ลงใน Filter Column จากนั้นนำปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทิ้ง Filter Column แล้วนำสารละลายใสใส่ลงในหลอด microcentrifuge tube เติม FAPG 3 Buffer จำนวน 1.5 เท่าของสารละลายใส ลงในหลอดตัวอย่างผสมด้วยเครื่องเขย่าสารจากนั้นเตรียม FAPG Column ใส่ใน Collection tube ขนาด 2 mL นำสารที่ผสมไว้ 750 µL เติมลงใน FAPG Column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ทิ้งสารละลายที่อยู่ในหลอด Collection tube เติมสารผสมที่เหลืออยู่ลงใน FAPG Column ทำซ้ำจนสารละลายผสมหมด เติม W1 Buffer ปริมาตร 500 µL ลงในคอลัมน์ ทำการปั่นเหวี่ยง 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเติม Wash Buffer ปริมาตร 500 µL ลงในคอลัมน์ ทำการปั่นเหวี่ยง 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที จึงทิ้งสารละลายที่เหลืออยู่ในหลอด นำ FAPG Column ใส่ใน Collection tube ดังเดิมและทำการปั่นเหวี่ยง 13,000 rpm เป็นเวลา 3นาที นำ FAPG Column ที่ปั่นเหวี่ยงจนแห้งแล้วใส่ลงใน miceocentrifuge tube 1.5 µL จากนั้นเติมตัวชะ ที่บ่มไว้ที่ 65 °C ปริมาณ 50-200 µL ลงในตรงกลางคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที และทำการปั่นเหวี่ยง 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที สารที่ได้ออกมาจะเป็นตัวอย่าง DNA ของข้าว ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C สารสกัดตัวอย่างของข้าวทำการตรวจสอบ genomic DNA ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis และวัดความเข้มข้นของ DNA ด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 nm โดยคำนวณความเข้มข้นคือ ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1 มีปริมาณ DNA เท่ากับ 50 ng/µL จากนั้นเตรียมความเข้มข้นของ DNA ให้มีความเข้นข้นสุดท้ายต่างๆ ดังนี้ 6.3, 12.5, 25, 50 และ 100 ng/reaction ในการทดสอบด้วยเทคนิค LAMP โดยใช้สภาวะในการทำปฏิกิริยาดังข้อ 3. และตรวจสอบผลิตภัณฑ์ LAMP ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis โดยใช้ 1.5 % agarose gel ความต่างศักย์ 120 โวลต์ เวลา 20 นาที

7. เทคนิค LAMP ในการจำแนกความแตกต่างของข้าวหอมและไม่หอมในข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ ด้วยยีน *badh2*

7.1 การสกัดสารพันธุกรรม (genomic DNA) จากเมล็ดข้าว

ทำให้โกร่งปลอดเชื้อด้วยเอทานอลแล้วรนไฟ จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็น บดข้าวทั้ง 11 สายพันธุ์ (ได้รับความอนุเคราะห์จาก กรมการข้าว กระทรวงเกษตรและสหกรณ์) ได้แก่ ข้าวหอม-

มะลิ 105 (KDML105), ข้าวหอมปทุม, ข้าวกข31, ข้าวกข41, ข้าวกข49, ข้าวไรซ์เบอร์รี่, ข้าวเฉียง-พัทลุง, ข้าวสังข์หยดพัทลุง, ข้าวเล็บนกปัตตานี, ข้าวชัยนาท1 และ ข้าวชัยนาท80 จนละเอียด จากนั้นใส่ลงใน microcentrifuge tube ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดคิท Plant Genomic DNA Extraction (Favorgen, Taiwan) สกัด DNA จากพืช ปฏิบัติตามคู่มือตามหัวข้อ 6.2 เมื่อได้สารละลาย DNA ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C สารสกัดตัวอย่างของข้าวทำการตรวจสอบ genomic DNA ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis และวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer

7.2 ศึกษาความจำเพาะของเทคนิค LAMP

นำสารสกัด genomic DNA ของข้าวตัวอย่างทั้งข้าวหอมและไม่หอม 11 สายพันธุ์ มาทดสอบด้วยเทคนิค LAMP โดยใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *badh2* ของข้าวไม่หอม ที่ความเข้มข้นของ genomic DNA ของข้าวแต่ละชนิดเท่ากับ 100 ng/reaction โดยใช้สภาวะดังข้อ 3. โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65.0 °C เวลา 60 นาที จากนั้นตรวจสอบผลด้วยเทคนิค Gel electrophoresis

8. การตรวจสอบการปลอมปนของข้าวไม่หอมโดยใช้เทคนิค LAMP

เตรียมข้าวหอม (ข้าวหอมมะลิ105) และข้าวไม่หอม (ข้าวกข31) นำมาบดโดยละเอียด จากนั้นทำการผสมข้าวหอมและข้าวไม่หอมที่บดละเอียดแล้วโดยมีอัตราส่วนของข้าวกข31 ในข้าวหอมมะลิ105 ตั้งแต่ 0%, 5%, 10%, 20%, 40% และ 100% จากนั้นนำส่วนผสมของข้าวดังกล่าวมาสกัด DNA เพื่อทำเป็น Template โดยใช้ความเข้มข้น 100 ng/reaction และทดสอบด้วยเทคนิค LAMP ด้วยสภาวะดังข้อ 3 จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ LAMP ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis โดยใช้ 1.5 % agarose gel ความต่างศักย์ 120 โวลต์ เวลา 20 นาที

9. การวิเคราะห์ผลของเทคนิค LAMP ด้วยการวัดเชิงสีของลิวโคคริสตัลไวโอเลต

9.1 ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ ($NaSO_3$) ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับคริสตัลไวโอเลต

การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโซเดียมซัลไฟต์นั้น ทำได้โดยการเตรียมสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 20, 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 mM ปิเปตสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ที่ความเข้มข้นต่างๆ 10 µL ผสมกับสารละลาย CV ที่ความเข้มข้น

5 mM ปริมาตร 0.5 µL จากนั้นปิเปต Tris-HCl pH 8.8 ที่ความเข้มข้น 200 mM ปริมาตร 10 µL ลงในสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ทั้ง 8 หลอด ปรับปริมาตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน (Deionized water หรือ DI water) จนปริมาตร 50 µL สังเกตสีของสารละลาย บันทึกภาพ และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 350-750 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrophotometer นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟแสดงสเปกตรัมเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงในแต่ละความเข้มข้นของโซเดียมซัลไฟต์ เพื่อหาสภาวะที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ต่ำที่สุดมาใช้ในการทดลองในขั้นตอนต่อไป

9.2 ผลของความเข้มข้นของดีเอ็นเอในการทำปฏิกิริยากับสารละลายลิวโค-คริสตัลไวโอเลต (LCV)

เตรียมสารละลาย LCV โดยเตรียมจากสารละลายผสม 100 µL ประกอบด้วย 200 mM Tris-HCl pH 8.8 20 µL, 5 mM CV 1 µL และ 80 mM โซเดียมซัลไฟต์ 20 µL ปรับปริมาตรด้วย DI water จนปริมาตร 100 µL และทำการเตรียมดีเอ็นเอมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ng/reaction จากนั้นผสมสารละลาย LCV 50 µL กับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ 50 µL สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย บันทึกภาพ และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นช่วง 400-700 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟแสดงสเปกตรัมเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงในแต่ละความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐาน จากนั้นเลือกค่าความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด (λ max) มาใช้ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารผสม LCV กับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ng/reaction อีกครั้งด้วยเครื่อง UV-Vis Spectrophotometer โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ จากนั้นนำผลที่ได้ไปหาค่าเฉลี่ย และสร้างกราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย LCV กับดีเอ็นเอมาตราฐานในความเข้มข้นต่างๆ

9.3 การตรวจสอบผล LAMP ร่วมกับการวัดเชิงสี LCV

เตรียมสารละลาย LCV ซึ่งประกอบด้วย 100 µL ประกอบด้วย 200 mM Tris-HCl pH 8.8 20 µL, 5 mM CV 1.0 µL และ 80 mM โซเดียมซัลไฟต์ 20 µL ปรับปริมาตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน (Deionized water หรือ DI water) จนปริมาตร 100 µL นำไปทดสอบ LAMP product ที่เพิ่มขยายปริมาณ DNA โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดชุดควบคุมเป็น Template โดยเตรียมความเข้มข้นของพลาสมิดให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ $10 - 10^9$ copies/reaction และทดสอบด้วยเทคนิค LAMP สภาวะดังข้อ 3. จากนั้นผสม LAMP product กับสารละลาย LCV ในอัตราส่วน 1 : 1

สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีสารละลายด้วยตาเปล่า โดยหลอดที่เกิดปฏิกิริยาการเพิ่มขยายจำนวนปริมาณ DNA จะเกิดสีม่วงขึ้น ทำการบันทึกภาพ

10. การพัฒนาชุดทดสอบต้นแบบอย่างง่ายเพื่อจำแนกข้าวหอมและไม่หอมด้วยเทคนิค LAMP

10.1 การสกัดข้าวอย่างง่าย

บดจมูกข้าวที่ต้องการจะตรวจสอบด้วยโกร่งบดสาร ชั่งจมูกข้าวที่บดแล้ว 0.1 กรัม เติมสารละลาย NaOH 150 µL เติม DI water 300 µL จากนั้นนำไปต้มน้ำที่อุณหภูมิ 98 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดูดส่วนสารละลายใส่ใน microcentrifuge tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนใส 3 µL นำไปเป็น Template ที่ใช้ในเทคนิค LAMP ต่อไป

10.2 การทดสอบเทคนิค LAMP ในการแยกความแตกต่างระหว่างข้าวหอมและไม่หอม

ทำการเตรียมสารละลาย Mixture A ซึ่งประกอบด้วย 1X Isothermal buffer, 0.4 mM dNTP, 0.8 µM FIP primer, 0.8 µM BIP primer, 0.1 µM F3 primer, 0.1 µM B3 primer จากนั้นเติม DNA template ของข้าวที่ต้องการตรวจสอบโดยในการทดลองนี้ใช้ DNA ของข้าวหอมและไม่หอมจากการสกัดด้วยชุดคิท DNA ของข้าวหอมและไม่หอมจากการสกัดอย่างง่าย และรีคอมบิแนนท์พลาสมิดชุดควาบคุม โดยใช้ความเข้มข้นของ DNA ของข้าวจากการสกัดโดยใช้ชุดคิท 50 ng/reaction, จากการสกัดอย่างง่ายปริมาณ 3 µL และรีคอมบิแนท์พลาสมิด badh2KDML_TA plasmid และ badh2RB_TA plasmid 20 ng/reaction ทดสอบด้วยเทคนิค LAMP สภาวะดังข้อ 3. โดยใช้ Dry bath เป็นอุปกรณ์ควบคุมอุณหภูมิในทุกขั้นตอน นำ LAMP product ไปตรวจสอบผลด้วยเทคนิค Gel electrophoresis และเทคนิคการวัดเชิงสี LCV โดยเทคนิคการวัดเชิงสี LCV นำ LAMP product มาผสมกับสารละลาย Mixture B โดยเตรียมสารละลาย 100 µL ประกอบด้วย 200 mM Tris-HCl pH 8.8 20 µL, 5 mM CV 1.0 µL และ 80 mM โซเดียมซัลไฟต์ 20 µL ปรับปริมาตรด้วย DI water จนปริมาตร 100 µL จากนั้นผสมผลิตภัณฑ์ LAMP และ สารละลาย Mixture B ในอัตราส่วน 1 : 1 สังเกตการเปลี่ยนแปลงของสีสารละลายด้วยตาเปล่า โดยหลอดที่เกิดปฏิกิริยาการเพิ่มขยายจำนวนปริมาณ DNA จะเกิดสีม่วงขึ้น และตรวจสอบด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 582 nm

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. เตรียมรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีน *badh2* จากข้าวหอม เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุม

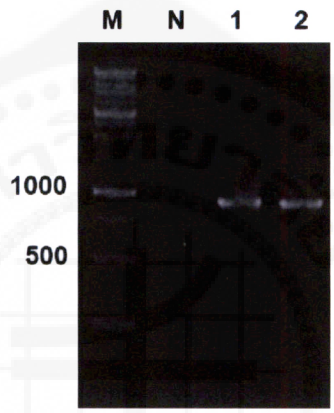
1.1 การเพิ่มปริมาณยีน *badh2* จากข้าวหอมด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

จากการเพิ่มขยายปริมาณยีนด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *badh2* ในการเพิ่มขยายยีนของข้าวหอม จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) มาวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค Gel electrophoresis ทำให้ได้ขนาดยีนที่ต้องการที่มีความยาวเท่ากับ 910 คู่เบส (ภาพประกอบ 12) จากนั้นทำ PCR product ให้มีความบริสุทธิ์เพื่อเตรียมนำเข้าสู่ TA cloning vector

ภาพประกอบ 12 แสดงผลการทำเทคนิค PCR ของข้าว; Lane M: Molecular marker 1kb; Lane1: ข้าวหอมมะลิ

1.2 ตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีน *badh2*

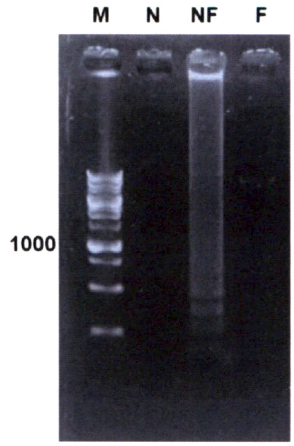
นำโคโลนีแบคทีเรียที่ถูกทรานฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์มาเป็น Template เพื่อตรวจสอบยีน *badh2* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *badh2* ในการเพิ่มขยายยีน และนำ PCR product มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis ผลการทดลองพบว่าโคโลนีที่เลือกมาแถบที่ 1 และ 2 สามารถเพิ่มขยายยีน *badh2* ได้ แสดงว่าประสบความสำเร็จในการเตรียมรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีน badh2KDML_TA plasmid (ภาพประกอบ 13)



ภาพประกอบ 13 แสดงผลการทำเทคนิค PCR ของโคโลนีแบคทีเรียที่ทำการทรานฟอร์มรีคอม-บิแนนท์พลาสมิดเข้าสู่เซลล์; Lane M: Molecular marker 100bp; Lane N: Negative control; Lane 1-2: โคโลนีแบคทีเรียที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด

2. การระบุความแตกต่างของข้าวหอมและไม่หอมโดยใช้ยีน *badh2* ด้วยเทคนิค LAMP

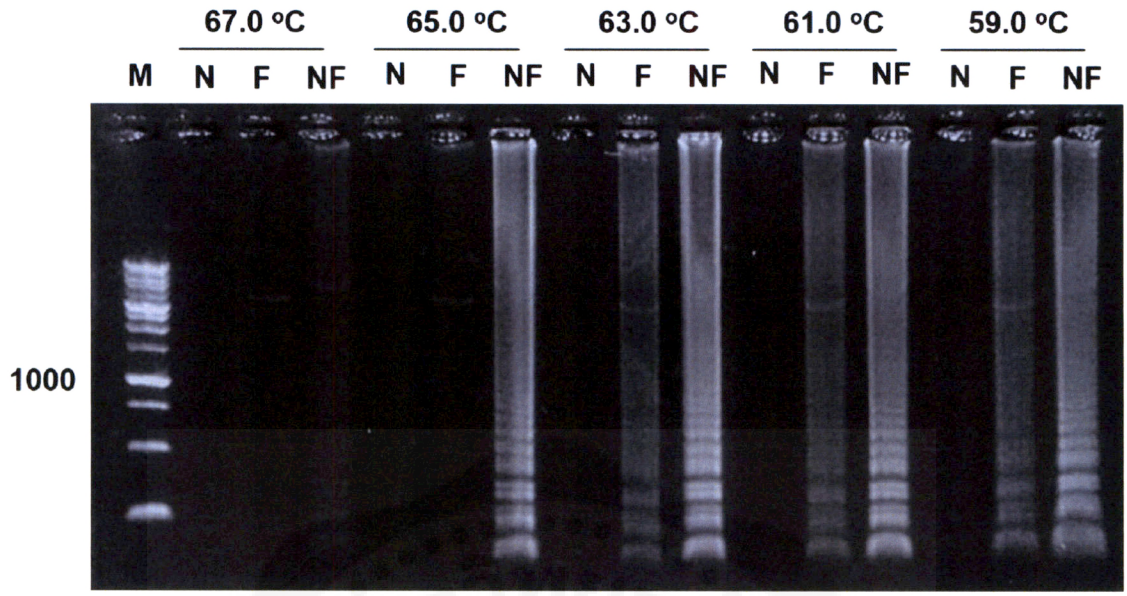
จากการตรวจสอบยีน *badh2* ด้วยเทคนิค LAMP โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิด badh2KDML_TA plasmid และ badh2RB_TA plasmid จากนั้นทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ของเทคนิค LAMP (LAMP product) ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis ผลการทดลองพบว่า รีคอมบิ-แนนท์พลาสมิดที่มียีนข้าวไม่หอม (NF) ให้ผลบวก คือสามารถเพิ่มขยายจำนวน DNA ได้โดยมีลักษณะเป็น ladder pattern ในขณะที่รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนข้าวหอม (F) ให้ผลลบ คือไม่สามารถเพิ่มขยายจำนวน DNA ได้ (ภาพประกอบ 14) ดังนั้นจึงนำพลาสมิด badh2KDML_TA plasmid และ badh2RB_TA plasmid ใช้เป็นกลุ่มควบคุมในการแยกความแตกต่างของข้าวหอมและไม่หอมด้วยเทคนิค LAMP ต่อไป



ภาพประกอบ 14 แสดงผลการทำเทคนิค LAMP ของรีคอมบิแนนท์พลาสมิดกลุ่มควบคุม; Lane M: Molecular marker 1kb; Lane N: Negative control; Lane NF: รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนของข้าวไม่หอม (badh2RB_TA plasmid); Lane F: รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนของข้าวหอม (badh2KDML_TA plasmid)

3. การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเทคนิค LAMP

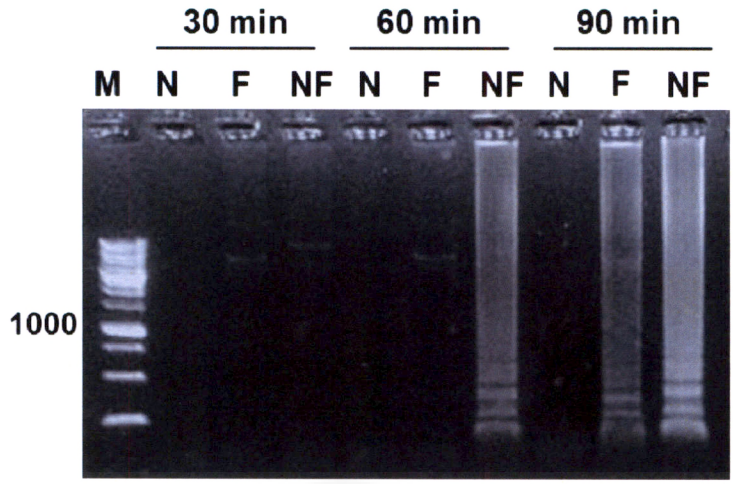
จากการทดสอบเทคนิค LAMP โดยใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *badh2* ของข้าวไม่หอม และทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่างกัน ได้แก่ 59.0 °C, 61.0 °C, 63.0 °C, 65.0 °C และ 67.0 °C เป็นเวลา 60 นาที เมื่อตรวจด้วยเทคนิค Gel electrophoresis พบว่าที่อุณหภูมิ 59.0 °C, 61.0 °C และ 63.0 °C เกิดการเพิ่มขยายปริมาณ DNA จากเทคนิค LAMP ทั้งข้าวหอมและไม่หอม จึงไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวหอมและไม่หอมได้ สาเหตุเนื่องจากที่อุณหภูมิต่ำ ไพร์เมอร์มีโอกาสจับกับ DNA แบบไม่จำเพาะเจาะจง จึงเกิดการเพิ่มขยายปริมาณ DNA ในขณะที่อุณหภูมิ 67.0 °C สามารถเพิ่มขยายปริมาณ DNA ของข้าวไม่หอมได้ แต่ลักษณะของ ladder pattern ไม่ชัดเจน ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำเทคนิค LAMP คือ 65.0 °C เนื่องจากสามารถแยกความแตกต่างของข้าวหอมและไม่หอมได้อย่างชัดเจน อีกทั้งยังให้ผลการเกิด ladder pattern ของข้าวไม่หอมได้ชัดเจนที่สุด (ภาพประกอบ 15) ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงได้เลือกอุณหภูมิที่ 65.0 °C ในการทำการทดลองด้วยเทคนิค LAMP ต่อไป



ภาพประกอบ 15 แสดงผลการทำเทคนิค LAMP ที่อุณหภูมิต่างๆ; Lane M: Molecular marker 1kb; Lane N: Negative control; Lane F: รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนของข้าวหอม (badh2KDML_TA plasmid); Lane NF: รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนของข้าวไม่หอม (badh2RB_TA plasmid)

4. การทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมสำหรับเทคนิค LAMP

จากการทดสอบเทคนิค LAMP โดยใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน *badh2* ของข้าวไม่หอม และทำปฏิกิริยาที่เวลาต่างกัน ได้แก่ 30, 60 และ 90 นาที ที่อุณหภูมิ 65.0 °C เมื่อตรวจด้วยเทคนิค Gel electrophoresis พบว่าที่เวลา 30 นาที ไม่ปรากฏแถบ DNA จากการเพิ่มขยาย DNA ในขณะที่เวลา 90 นาที เทคนิค LAMP สามารถเพิ่มขยายปริมาณ DNA ได้ทั้งข้าวหอมและไม่หอม ซึ่งไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ สำหรับเวลาในการทำเทคนิค LAMP ที่ 60 นาที สามารถแยกความแตกต่างของข้าวหอมและไม่หอมได้อย่างชัดเจน (ภาพประกอบ 16) ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงได้เลือกเวลา 60 นาที มาใช้ในการทำการทดลองด้วยเทคนิค LAMP ต่อไป

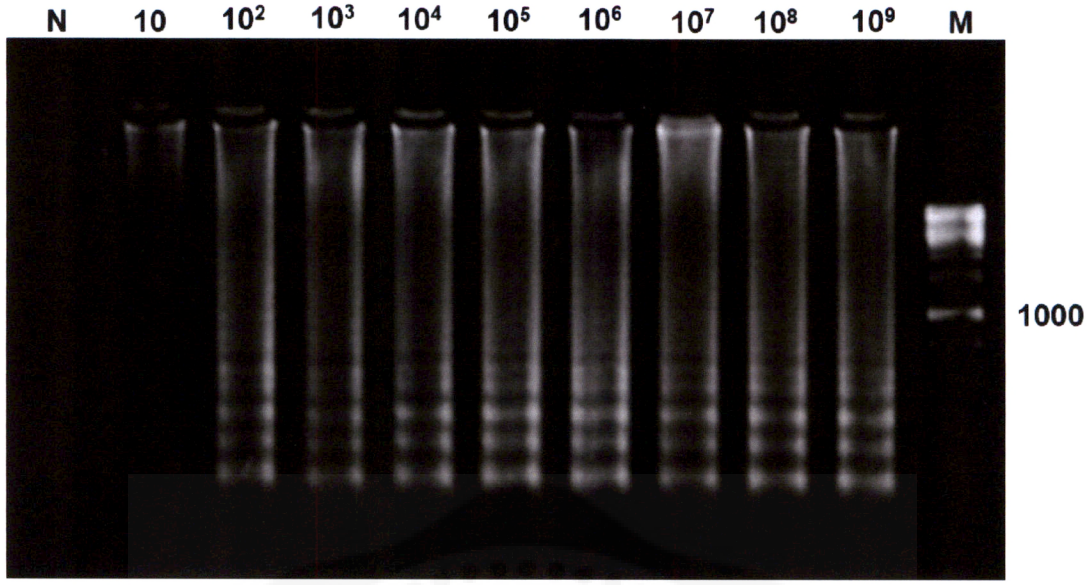


ภาพประกอบ 16 แสดงผลการทำเทคนิค LAMP ที่เวลาต่างๆ; Lane M: Molecular marker 1kb; Lane N: Negative control; Lane F: รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนของข้าวหอม (badh2KDML_TA plasmid); Lane NF: รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนของข้าวไม่หอม (badh2RB_TA plasmid)

5. ศึกษาความไวของเทคนิค LAMP ในการระบุความแตกต่างของข้าวไม่หอมด้วยยีน *badh2*

5.1 ศึกษาความไวของเทคนิค LAMP กับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีน *badh2* ของข้าวไม่หอม

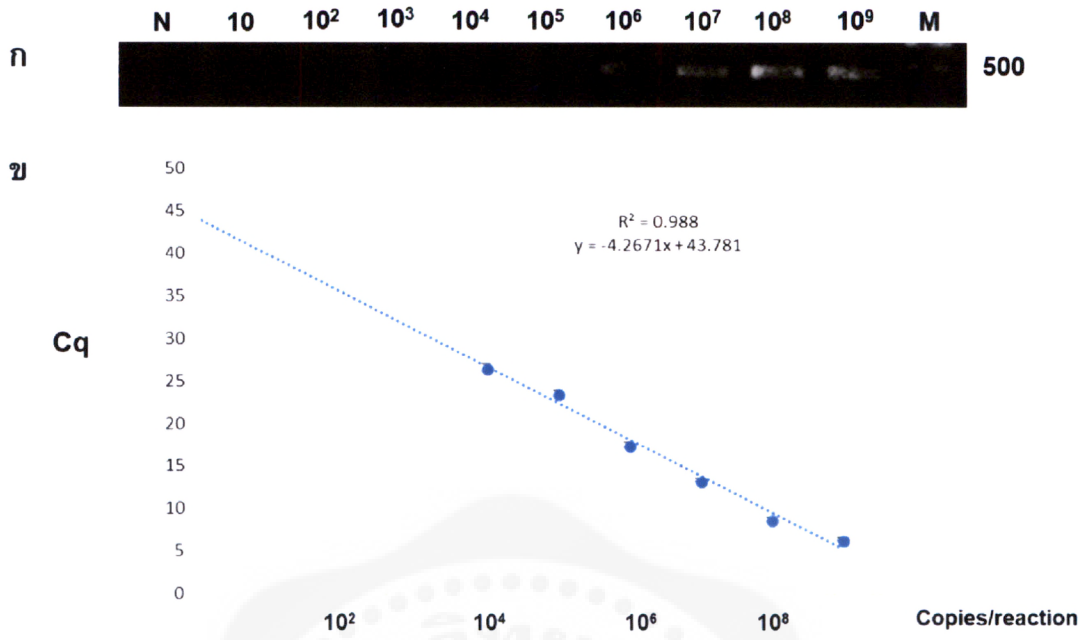
จากการศึกษาความไวของเทคนิค LAMP ในการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีน *badh2* ของข้าวไม่หอม คือ badh2RB_TA plasmid โดยเตรียมความเข้มข้นของพลาสมิดในการทดลองตั้งแต่ 10 – 10^9 copies/reaction และนำ LAMP product มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Gel-electrophoresis ผลการทดลองพบลักษณะของแถบ DNA ladder จากการเพิ่มขยายด้วยเทคนิค LAMP ตั้งแต่ที่ 10 ถึง 10^9 copies/reaction แสดงให้เห็นว่าเทคนิค LAMP สามารถตรวจสอบยีน *badh2* ได้ตั้งแต่ 10 copies/reaction ขึ้นไป (ภาพประกอบ 17)



ภาพประกอบ 17 แสดงผลความไวของเทคนิค LAMP ในการระบุความแตกต่างของข้าวไม่หอมด้วยยีน *badh2* โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดเป็น Template; Lane M: Molecular marker 1kb; Lane N: Negative control; Lane 10 – 10^9: รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนของข้าวไม่หอมความเข้มข้น 10 – 10^9 copies/reaction

5.2 ศึกษาความไวของเทคนิค Real-time PCR กับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีน *badh2* ของข้าวไม่หอม

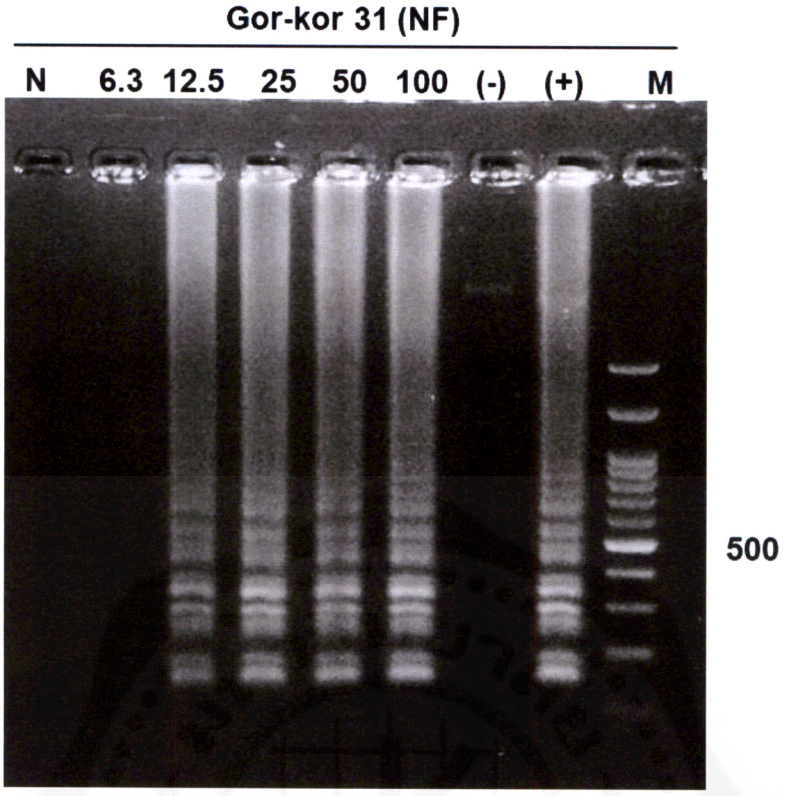
จากการศึกษาความไวของเทคนิค Real-time PCR ในการตรวจสอบรีคอมบิแนนท์-พลาสมิดที่มียีน *badh2* ของข้าวที่ไม่หอม โดยเตรียมความเข้มข้นของพลาสมิด badh2RB_TA plasmid ในการทดลองตั้งแต่ 10 – 10^9 copies/reaction ผลการทดลองพบว่าเทคนิค Real-time PCR สามารถตรวจสอบ DNA ได้ 10^4 copies/reaction (ภาพประกอบ 19 ก) เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ของค่า Cq และปริมาณรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ใช้ในการทดลองพบว่า เมื่อความเข้มข้นของพลาสมิดมีปริมาณเพิ่มขึ้น ค่า Cq จะลดต่ำลง (ภาพประกอบ 19 ข) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสามารถเพิ่มขยายปริมาณ DNA ได้ในจำนวนรอบที่ต่ำ คือเมื่อปริมาณใช้ Template มาก จะทำให้สามารถเพิ่มขยายปริมาณ DNA ได้ดี



ภาพประกอบ 19 แสดงผลความไวของเทคนิค Real-time PCR ในการระบุความแตกต่างของข้าวไม่หอมด้วยยีน *badh2* โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดเป็น Template เมื่อตรวจสอบผลโดยใช้ เทคนิค Gel electrophoresis (ก) และ เมื่อสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Cq และ ปริมาณรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (ข); Lane M: Molecular marker; Lane N: Negative control; Lane 10-10^9: รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนของข้าวไม่หอมความเข้มข้น 10-10^9 copies/reaction

5.3 ศึกษาความไวของเทคนิค LAMP กับ DNA ของข้าวไม่หอม

จากการศึกษาความไวของเทคนิค LAMP โดยเตรียมความเข้มข้นของ genomic DNA จากข้าวกข31 (ข้าวไม่หอม) ตั้งแต่ความเข้มข้น 6.3-100 ng/reaction ผลการทดลองพบว่าที่ความเข้มข้น 12.5-100 ng พบลักษณะของ DNA ladder ในขณะที่ ความเข้มข้น 6.3 ng ไม่พบการเพิ่มขยายของ DNA ซึ่งแสดงว่าเทคนิค LAMP สามารถตรวจสอบความเข้มข้น DNA ได้ตั้งแต่ 12.5 ng/reaction (ภาพประกอบ 18)



ภาพประกอบ 18 แสดงผลความไวของเทคนิค LAMP ในการระบุความแตกต่างของข้าวไม่หอมด้วยยีน *badh2* ของโดยใช้ DNA ของข้าวกข31 เป็น Template; Lane M: Molecular marker 100bp; Lane N: Negative control; Lane 6.3-100: ความเข้มข้นของดีเอ็นเอข้าวกข 31 ความเข้มข้น 6.3 – 100 ng/reaction; Lane F: รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนของข้าวหอม (badh2KDML_TA plasmid); Lane NF: รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนของข้าวไม่หอม (badh2RB_TA plasmid)

6. เทคนิค LAMP ในการจำแนกความแตกต่างของข้าวหอมและไม่หอมในข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ ด้วยยีน *badh2*

6.1 ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างข้าวสายพันธุ์ต่าง ๆ

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างข้าว 11 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบเพื่อจำแนกความแตกต่างของข้าวหอมและไม่หอมนั้นพบว่า ข้าว 2 สายพันธุ์ได้แก่ ข้าวหอมมะลิ105 (KDML105) และข้าวหอมปทุม (Pathumthani) พบการขาดหายไปของ 8 คู่เบสบริเวณยีน *badh2* ซึ่งแสดงให้เห็นว่าข้าว 2 สายพันธุ์นี้เป็นข้าวหอม ขณะที่อีก 9 สายพันธุ์ ได้แก่ ข้าวไรซ์เบอร์รี่, ข้าวกข31, ข้าวกข41, ข้าวกข49, ข้าวเฉียงพัทลุง, ข้าวสังข์หยดพัทลุง, ข้าวเล็บนกปัตตานี,

ข้าวชัยนาท1 และ ข้าวชัยนาท80 ไม่พบการขาดหายไปของลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าข้าวทั้ง 9 สายพันธุ์เป็นข้าวไม่หอม (ภาพประกอบ 20)

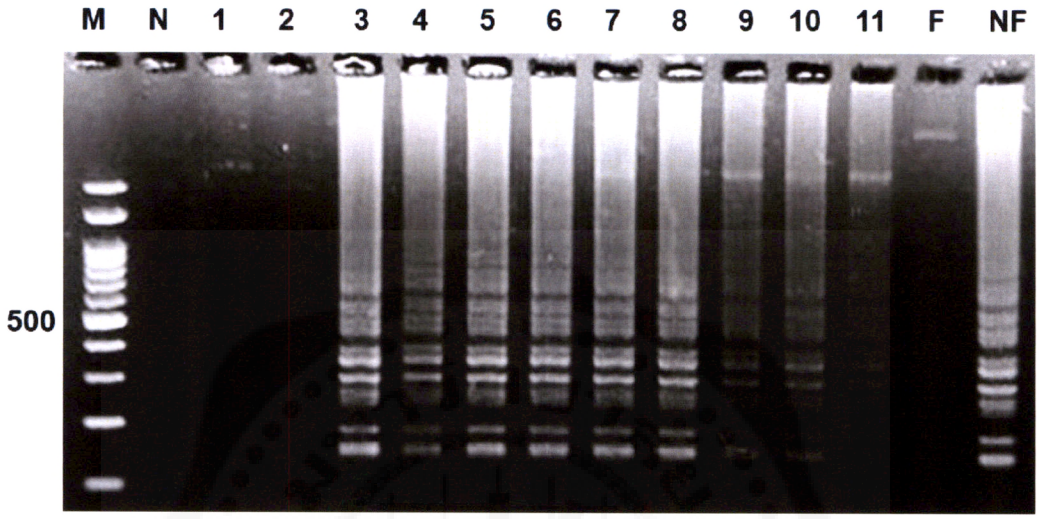
```
Riceberry              TAATCATGTATACCCCATCAATGGAAATGATATTCCTCTCAATACATGGTTTATGTTTTC   415
Gorkor41               TAATCATGTATACCCCATCAATGGAAATGATATTCCTCTCAATACATGGTTTATGTTTTC   388
ChengPhutthalung       TAATCATGTATACCCCATCAATGGAAATGATATTCCTCTCAATACATGGTTTATGTTTTC   390
Gorkor49               TAATCATGTATACCCCATCAATGGAAATGATATTCCTCTCAATACATGGTTTATGTTTTC   387
Chainat1               TAATCATGTATACCCCATCAATGGAAATGATATTCCTCTCAATACATGGTTTATGTTTTC   382
LebnokPattani          TAATCATGTATACCCCATCAATGGAAATGATATTCCTCTCAATACATGGTTTATGTTTTC   381
Chainat80              TAATCATGTATACCCCATCAATGGAAATGATATTCCTCTCAATACATGGTTTATGTTTTC   380
SangyodPhatthalung     TAATCATGTATACCCCATCAATGGAAATGATATTCCTCTCAATACATGGTTTATGTTTTC   376
Gorkor31               TAATCATGTATACCCCATCAATGGAAATGATATTCCTCTCAATACATGGTTTATGTTTTC   420
KDML105                TAATCATGTATACCCCATCAATGGAAATGATATTCCTCTCAATACATGGTTTATGTTTTC   409
Pathumthani            TAATCATGTATACCCCATCAATGGAAATGATATTCCTCTCAATACATGGTTTATGTTTTC   420
                       ************************************************************

Riceberry              TGTTAGGTTGCATTTACTGGGAGTTATGAAACTGGTAAAAAGATTATGGCTTCAGCTGCT   475
Gorkor41               TGTTAGGTTGCATTTACTGGGAGTTATGAAACTGGTAAAAAGATTATGGCTTCAGCTGCT   448
ChengPhutthalung       TGTTAGGTTGCATTTACTGGGAGTTATGAAACTGGTAAAAAGATTATGGCTTCAGCTGCT   450
Gorkor49               TGTTAGGTTGCATTTACTGGGAGTTATGAAACTGGTAAAAAGATTATGGCTTCAGCTGCT   447
Chainat1               TGTTAGGTTGCATTTACTGGGAGTTATGAAACTGGTAAAAAGATTATGGCTTCAGCTGCT   442
LebnokPattani          TGTTAGGTTGCATTTACTGGGAGTTATGAAACTGGTAAAAAGATTATGGCTTCAGCTGCT   441
Chainat80              TGTTAGGTTGCATTTACTGGGAGTTATGAAACTGGTAAAAAGATTATGGCTTCAGCTGCT   440
SangyodPhatthalung     TGTTAGGTTGCATTTACTGGGAGTTATGAAACTGGTAAAAAGATTATGGCTTCAGCTGCT   436
Gorkor31               TGTTAGGTTGCATTTACTGGGAGTTATGAAACTGGTAAAAAGATTATGGCTTCAGCTGCT   480
KDML105                TGTTAGGTTGCATTTACTGGGAGTTATGAAACTGGTATATA--------TTTCAGCTGCT   461
Pathumthani            TGTTAGGTTGCATTTACTGGGAGTTATGAAACTGGTATATA--------TTTCAGCTGCT   472
                       ********************************** * *         **********

Riceberry              CCTATGGTTAAGGTTTGTTTCCAAATTTCTGTGGATATTTTTTGTTCTCTTTCTACTAAC   535
Gorkor41               CCTATGGTTAAGGTTTGTTTCCAAATTTCTGTGGATATTTTTTGTTCTCTTTCTACTAAC   508
ChengPhutthalung       CCTATGGTTAAGGTTTGTTTCCAAATTTCTGTGGATATTTTTTGTTCTCTTTCTACTAAC   510
Gorkor49               CCTATGGTTAAGGTTTGTTTCCAAATTTCTGTGGATATTTTTTGTTCTCTTTCTACTAAC   507
Chainat1               CCTATGGTTAAGGTTTGTTTCCAAATTTCTGTGGATATTTTTTGTTCTCTTTCTACTAAC   502
LebnokPattani          CCTATGGTTAAGGTTTGTTTCCAAATTTCTGTGGATATTTTTTGTTCTCTTTCTACTAAC   501
Chainat80              CCTATGGTTAAGGTTTGTTTCCAAATTTCTGTGGATATTTTTTGTTCTCTTTCTACTAAC   500
SangyodPhatthalung     CCTATGGTTAAGGTTTGTTTCCAAATTTCTGTGGATATTTTTTGTTCTCTTTCTACTAAC   496
Gorkor31               CCTATGGTTAAGGTTTGTTTCCAAATTTCTGTGGATATTTTTTGTTCTCTTTCTACTAAC   540
KDML105                CCTATGGTTAAGGTTTGTTTCCAAATTTCTGTGGATATTTTTTGTTCTCTTTCTACTAAC   521
Pathumthani            CCTATGGTTAAGGTTTGTTTCCAAATTTCTGTGGATATTTTTTGTTCTCTTTCTACTAAC   532
                       ************************************************************
```

ภาพประกอบ 20 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของข้าว 11 สายพันธุ์ที่ใช้ในการจำแนกความแตกต่างของข้าวหอมและไม่หอม

6.2 ศึกษาความจำเพาะของเทคนิค LAMP

จากการศึกษาความจำเพาะของเทคนิค LAMP โดยใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีน *badh2* ในการจำแนกความแตกต่างระหว่างข้าวหอมและไม่หอมของข้าวทั้ง 11 สายพันธุ์ และตรวจสอบผลด้วยเทคนิค Gel electrophoresis พบว่าเทคนิค LAMP ไม่สามารถเพิ่มขยายปริมาณ DNA ของข้าวหอม ได้แก่ ข้าวหอมมะลิ และ ข้าวหอมปทุม รวมถึงรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนของข้าวหอม (ภาพประกอบ 21 lane 1-2 และ lane F) แต่สามารถเพิ่มขยายปริมาณ DNA ของข้าวไม่หอมทั้ง 9 สายพันธุ์ได้แก่ ข้าวไรซ์เบอร์รี่, ข้าวกข31, ข้าวกข41, ข้าวกข49, ข้าวเฉียงพัทลุง,

ข้าวสังข์หยดพัทลุง, ข้าวเล็บนกปัตตานี, ข้าวชัยนาท1 และ ข้าวชัยนาท 80 รวมถึงรีคอมบิแนนท์-พลาสมิดที่มียีนของข้าวไม่หอม (ภาพประกอบ 21 lane 3-11 และ lane NF) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเทคนิค LAMP สามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวหอมและไม่หอมได้

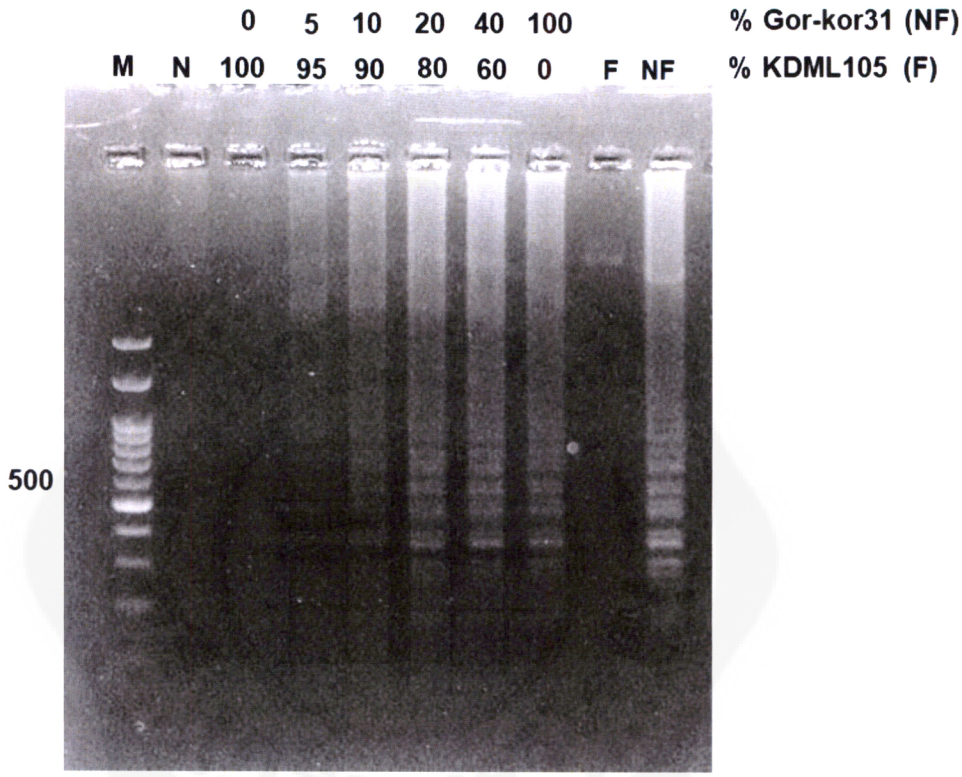


ภาพประกอบ 21 แสดงผลความจำเพาะของเทคนิค LAMP ในการแยกความแตกต่างของข้าว 11 สายพันธุ์ และรีคอมบิแนนท์พลาสมิดชุดควบคุม; Lane M: Molecular marker 100bp; Lane N: Negative control; Lane 1: ข้าวหอมมะลิ 105; Lane 2: ข้าวหอมปทุม; Lane 3: ข้าวกข31; Lane 4: ข้าวกข41; Lane 5: ข้าวกข49; Lane 6: ข้าวไรซ์เบอร์รี่; Lane 7: ข้าวสังข์หยดพัทลุง; Lane 8: ข้าวเฉียงพัทลุง; Lane 9: ข้าวเล็บนกปัตตานี; Lane 10: ข้าวชัยนาท1; Lane 1: ข้าวชัยนาท80; Lane F: รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนของข้าวหอม (badh2KDML_TA plasmid); Lane N: รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนของข้าวไม่หอม (badh2RB_TA plasmid)

7. การตรวจสอบการปลอมปนของข้าวไม่หอมโดยใช้เทคนิค LAMP

จากการตรวจสอบการปลอมปนของข้าวไม่หอมในข้าวหอม โดยทำการผสมระหว่างข้าวหอมและไม่หอม โดยมีอัตราส่วนในการปลอมปนได้แก่ 0%, 5%, 10%, 20%, 40% และ 100% และทำการตรวจสอบการปลอมปนด้วยเทคนิค LAMP โดยตรวจสอบผลด้วยเทคนิค Gel-electrophoresis ผลการทดลองพบว่า เทคนิค LAMP สามารถเพิ่มขยายปริมาณ DNA ของข้าวกข 31 ซึ่งเป็นข้าวไม่หอมได้ ในขณะที่เทคนิค LAMP ไม่สามารถเพิ่มขยายปริมาณ DNA ของข้าวหอม

มะลิ105 ซึ่งเป็นข้าวหอม เมื่อทำการทดลองเทคนิค LAMP พบว่า สามารถเพิ่มขยายปริมาณ DNA ได้เมื่อทดลองกับ DNA ของข้าวที่มีการปลอมปนตั้งแต่ 5%, 10%, 20%, 40% และ 100% โดยแถบ DNA จากการเพิ่มขยายปริมาณ DNA มีความเข้มขึ้นเมื่อปริมาณการปลอมปนมากยิ่งขึ้น ซึ่งเทคนิค LAMP สามารถตรวจสอบการปลอมปนในข้าวหอมได้ต่ำที่สุดที่ 5% ของการปลอมปน (ภาพประกอบ 22)



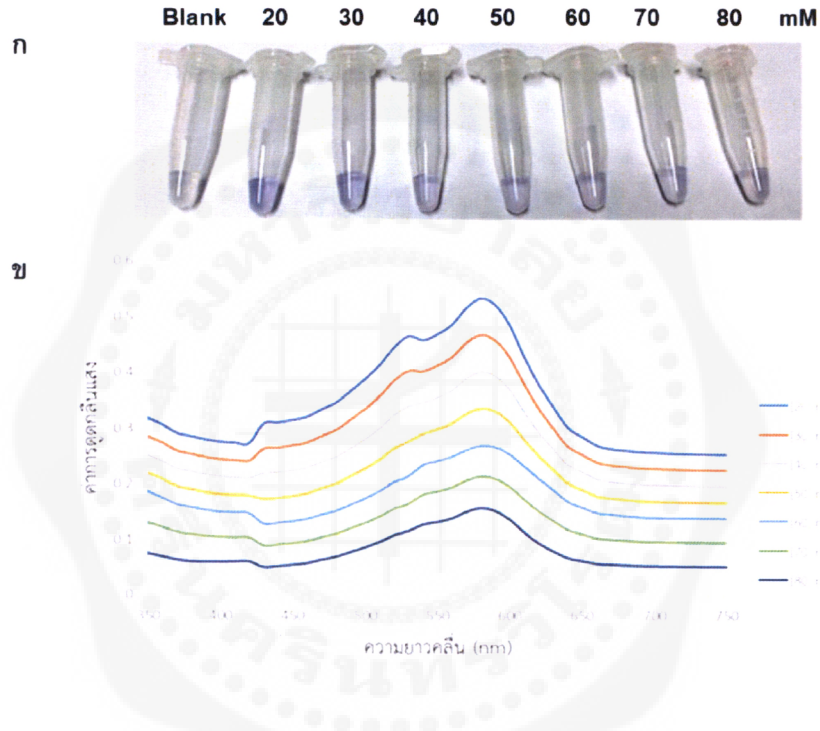
ภาพประกอบ 22 แสดงผลการตรวจสอบการปลอมปนของข้าวด้วยเทคนิค LAMP; Lane M: Molecular marker 100 bp; Lane N: Negative control; Lane 100-0: แสดงอัตราส่วนของข้าวหอมและไม่หอมตั้งแต่ 0 – 100%; Lane F: รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนของข้าวหอม (badh2KDML_TA plasmid); Lane NF: รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนของข้าวไม่หอม (badh2RB_TA plasmid)

8. การวิเคราะห์ผลของเทคนิค LAMP ด้วยเทคนิคเชิงสีของลิวโคคริสตัลไวโอเลต

8.1 ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ ($NaSO_3$) ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยากับคริสตัลไวโอเลต

การศึกษาหาความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ (Na_2SO_3) ในการทำปฏิกิริยากับสารละลาย CV เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่นำมาใช้ในการเตรียม LCV จากการ

ทดลองพบว่าสารละลาย Na_2SO_3 ที่ความเข้มข้น 80 mM เมื่อทำปฏิกิริยากับ CV จะเกิดเป็นสารละลายที่ให้สีใกล้เคียงกับน้ำ เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า (ภาพประกอบ 23 ก) และเมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 350-750 nm พบว่าสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ที่ความเข้มข้น 80 mM เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลาย CV ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่มีค่าเข้าใกล้ 0 มากที่สุด (ภาพประกอบ 23 ข) แสดงว่าสีของสารละลายมีค่าใกล้เคียงกับ Blank ดังนั้นจึงนำสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ความเข้มข้น 80 mM มาใช้ในการทดลองในขั้นตอนต่อไป

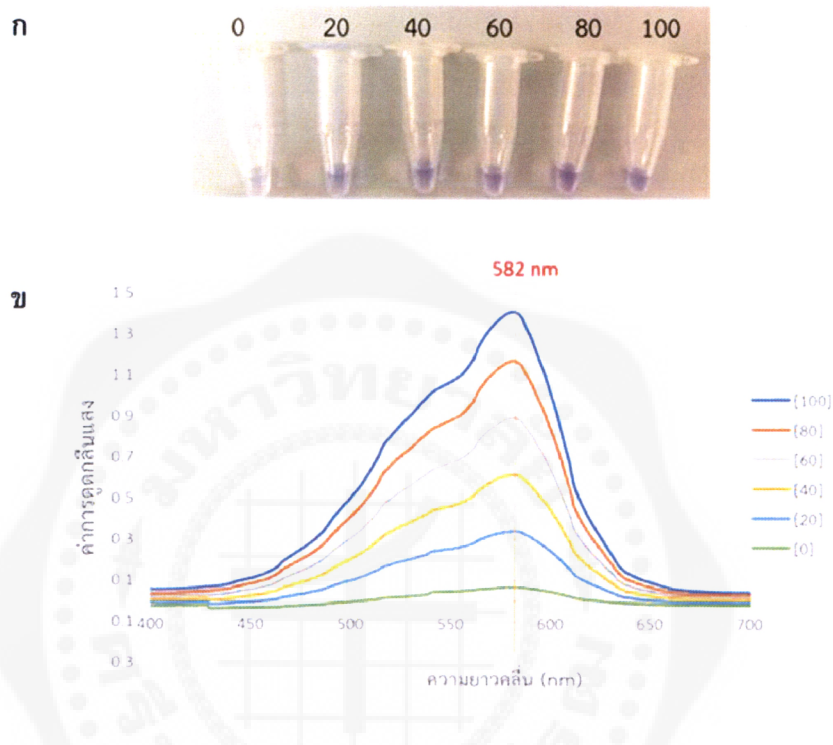


ภาพประกอบ 23 แสดงผลความเข้มข้นสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ ($NaSO_3$) ความเข้มข้น 20–80 mM ที่ทำปฏิกิริยากับ CV เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า (ก) และ เมื่อสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย LCV ที่ช่วงความยาวคลื่น 350-700 nm (ข)

8.2 ผลของความเข้มข้นของดีเอ็นเอในการทำปฏิกิริยากับสารละลายลิวโคคริสตัล-ไวโอเลต (LCV)

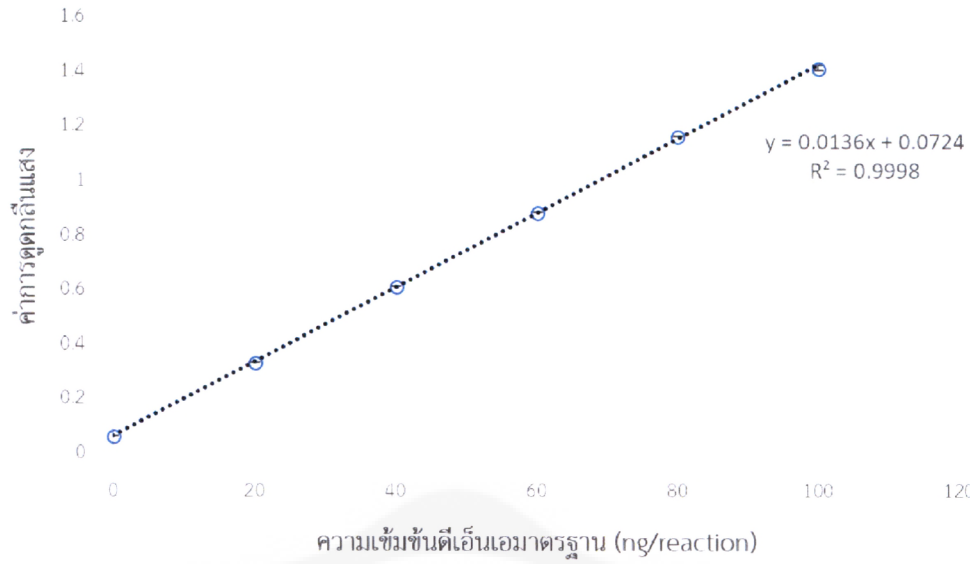
การศึกษาความสัมพันธ์ดีเอ็นเอมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0-100 ng/reaction กับการเปลี่ยนสีของสารละลาย LCV พบว่าเมื่อความเข้มข้นของดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นจะสังเกตเห็นได้ว่าสีของสารละลาย LCV จะเข้มขึ้นเมื่อมองดูด้วยตาเปล่า (ภาพประกอบ 24ก) เมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 400-700 สังเกตเห็นได้ว่าสารละลายผสมมีค่าความยาวคลื่นที่มีค่าการ

ดูดกลืนแสงสูงที่สุด (λ max) ที่ 582 nm และเมื่อความเข้มข้นของดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นค่าการดูดกลืนแสงจะเพิ่มขึ้นตามลำดับ (ภาพประกอบ 24ข) ดังนั้นจึงเลือกค่าความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด 582 nm มาใช้ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย LCV



ภาพประกอบ 24 แสดงผลการเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย LCV กับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0-100 ng/reaction เมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า (ก) และ เมื่อสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสเปกตรัมค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาระหว่างสารละลาย LCV กับดีเอ็นเอมาตรฐาน ที่ช่วงความยาวคลื่น 400-700 nm (ข)

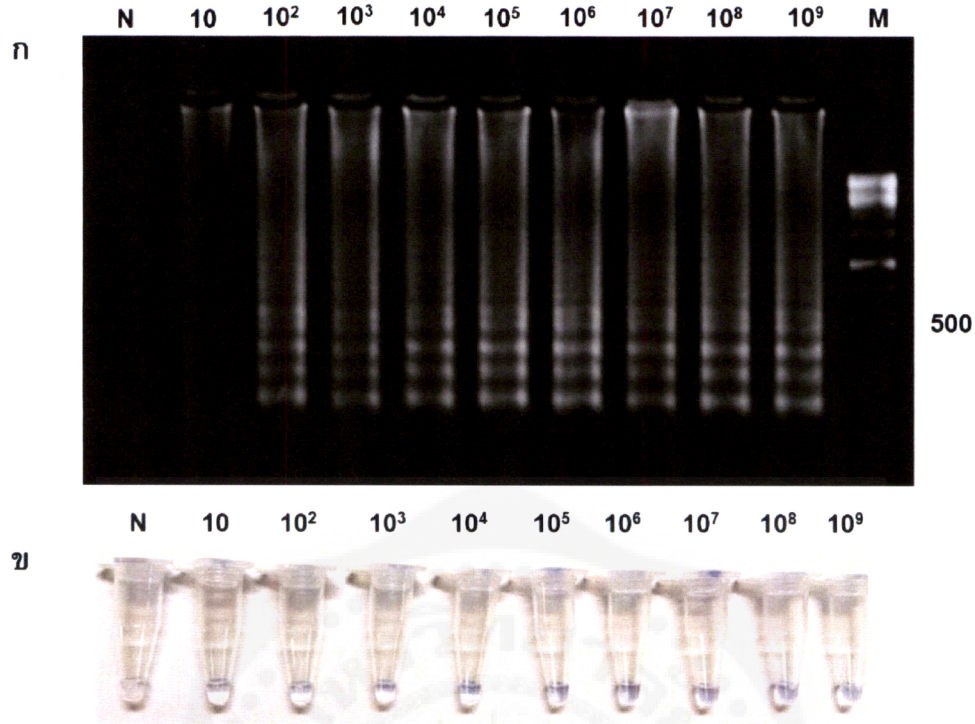
จากนั้นเลือกค่าความยาวคลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด (λ max) คือ 582 nm นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงของสารละลายผสม LCV กับดีเอ็นเอมาตรฐานในความเข้มข้นต่างๆ พบว่ากราฟมาตรฐานค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย LCV จะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐาน กล่าวคือ เมื่อความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐานมากขึ้น ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 582 nm จะเพิ่มขึ้นตามลำดับ (ภาพประกอบ 25)



ภาพประกอบ 25 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 582 nm กับสารละลาย LCV กับดีเอ็นเอมาตรฐาน ที่ความเข้มข้นเป็น 0-100 ng/reaction

8.3 การตรวจสอบผลเทคนิค LAMP ร่วมกับการวัดเชิงสี LCV

ในการทดลองเทคนิค LAMP โดยใช้รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนของข้าวไม่หอมเป็น Template ตรวจสอบ LAMP product โดยใช้เทคนิค Gel electrophoresis (ภาพประกอบ 26 ก) และเทคนิคการวัดเชิงสีของ LCV (ภาพประกอบ 26 ข) พบว่าการวัดเชิงสีสามารถตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากเทคนิค LAMP ได้ โดยหากมี LAMP product จะเปลี่ยนจากสารละลายใสเป็นสารละลายสีม่วง และจะมีสีม่วงเข้มมากขึ้นเมื่อมี LAMP product ในปริมาณที่มากขึ้น

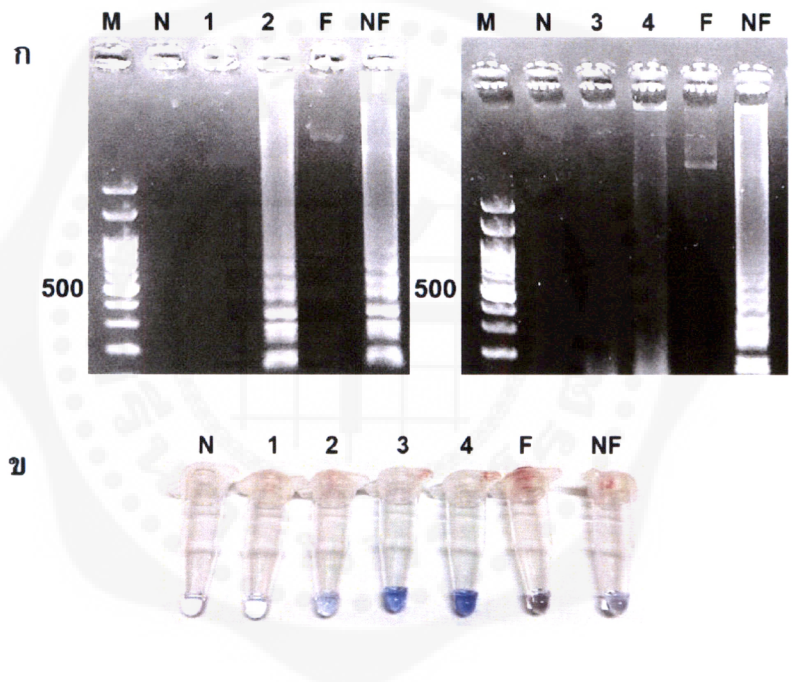


ภาพประกอบ 26 แสดงผลของการศึกษาการวัดเชิงสีของลิวโคดริสตัลไวโอเลตในการตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากเทคนิค LAMP ตรวจสอบด้วยเทคนิค Gel electrophoresis (ก) ผลิตภัณฑ์จากเทคนิค LAMP ตรวจสอบด้วยเทคนิคการวัดเชิงสี LCV (ข); Lane M: Molecular marker 100bp; Lane N: Negative control; Lane 10 – 10^9: รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนของข้าวไม่หอมความเข้มข้น 10 – 10^9 copies/reaction

9. การพัฒนาชุดทดสอบต้นแบบอย่างง่ายเพื่อจำแนกข้าวหอมและไม่หอมด้วยเทคนิค LAMP

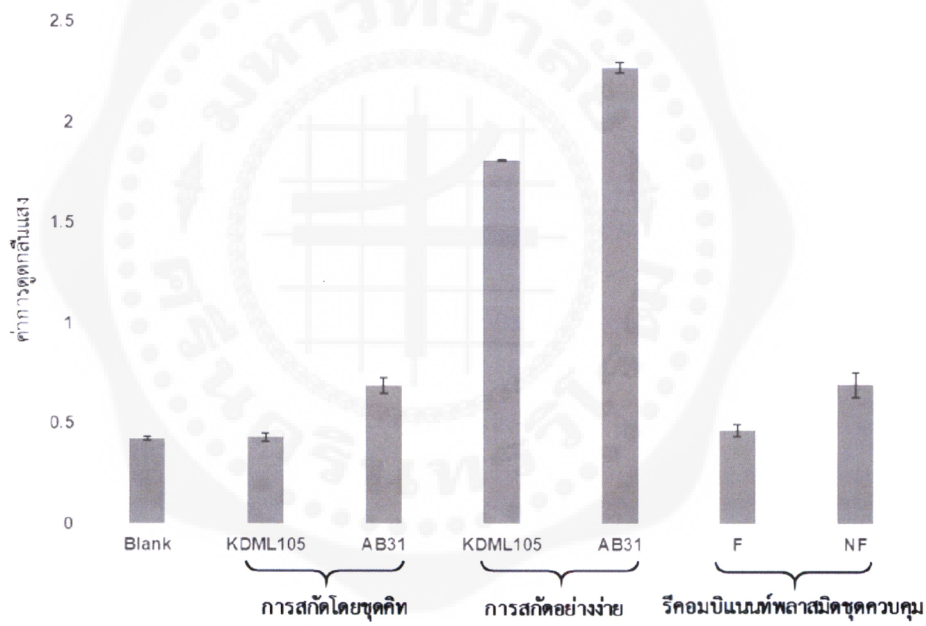
การพัฒนาชุดทดสอบต้นแบบอย่างง่ายเพื่อจำแนกข้าวหอมและไม่หอมนั้นได้ประยุกต์การวัดเชิงสี LCV ร่วมกับการทำเทคนิค LAMP ในการทดลองนั้นได้ใช้ genomic DNA จากข้าวหอม (ข้าวหอมมะลิ105) และข้าวไม่หอม (ข้าวกข31) จากการสกัดจากชุดคิท และจากการสกัดอย่างง่าย รวมทั้งรีคอมบิแนนท์พลาสมิดชุดควบคุม เพื่อใช้เป็น Template สำหรับเทคนิค LAMP โดยใช้เครื่อง Dry bath เป็นตัวควบคุมอุณหภูมิ ผลการทดลองพบว่าการสกัด genomic DNA อย่างง่ายสำหรับนำมาใช้เป็น DNA ต้นแบบในเทคนิค LAMP สามารถเพิ่มขยายปริมาณ DNA ของข้าวกข31 ได้แต่ได้ปริมาณที่น้อย ในขณะที่การสกัด genomic DNA ด้วยชุดคิท สามารถเพิ่มขยายปริมาณ DNA ใน

ข้าวไม่หอม (กข31) โดยมีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนข้าวไม่หอมเป็นกลุ่มควบคุมได้โดยจะปรากฏ ladder pattern สำหรับรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนข้าวหอมไม่ปรากฏแถบ DNA (ภาพประกอบ 27 ก) และเมื่อนำ LAMP product ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเชิงสี LCV พบว่าสารละลายที่มี LAMP product เมื่อผสมกับสารละลาย LCV จะให้สารละลายสีม่วงที่เข้มกว่าสารละลายที่ไม่เกิดปฏิกิริยา LAMP กับ LCV เมื่อมองด้วยตาเปล่า แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้เมื่อใช้ Template จากการสกัดข้าวอย่างง่าย (ภาพประกอบ 27 ข) อาจเนื่องจากปริมาณ DNA ที่ใช้เริ่มต้นในเทคนิค LAMP มีปริมาณที่มาก แต่มีคุณภาพต่ำ เนื่องจากดีเอ็นเอถูกย่อยสลายและมีสารปนเปื้อนมาก จึงทำให้ต้องใช้ปริมาณ DNA ที่มากเพื่อให้เกิดปฏิกิริยา LAMP ในข้าวไม่หอม



ภาพประกอบ 27 แสดงผลของการศึกษาการวัดเชิงสีของลิวโคดริสตัลไวโอเลตร่วมกับเทคนิค LAMP ตรวจสอบด้วยเทคนิค Gel electrophoresis (ก) ผลิตภัณฑ์จากเทคนิค LAMP ตรวจสอบด้วยเทคนิคการวัดเชิงสี LCV (ข); Lane M: Molecular marker; Lane N: Negative control; Lane 1: ข้าวหอมมะลิสกัดจากชุดคิท; Lane 2: ข้าวกข31 สกัด จากชุดคิท; Lane 3: ข้าวหอมมะลิจากการสกัดอย่างง่าย; Lane 4: ข้าวกข31 จากการสกัดอย่างง่าย; Lane F: รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนของข้าวหอม (badh2KDML_TA plasmid); Lane NF: รีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนของข้าวไม่หอม (badh2RB_TA plasmid)

เมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 582 nm พบว่าสารละลายผสมระหว่าง LCV กับ Blank มีค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.427 สารละลายผสมระหว่าง LCV กับ ผลิตภัณฑ์ LAMP ของข้าวหอมมะลิ105 จากการสกัดโดยใช้ชุดคิท และรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนของข้าวหอม มีค่าการดูดกลืนแสงใกล้เคียงกับสารละลาย Blank โดยมีค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.434 และ 0.467 ตามลำดับ ในส่วนข้าวกข31 จากการสกัดโดยใช้ชุดคิท และรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนของข้าวไม่หอมค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.690 และ 0.696 ขณะที่ข้าวหอมมะลิ105 และข้าวกข31 จากการสกัดอย่างง่ายมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.810 และ 2.272 (ภาพประกอบ 28) ซึ่งไม่สามารถแยกได้ด้วยตาเปล่าเนื่องมาจากปริมาณ Template เริ่มต้นที่ใช้ในเทคนิค LAMP มีปริมาณมาก แต่ดีเอ็นเอมีคุณภาพที่ต่ำเนื่องจากดีเอ็นเอถูกย่อยสลายและมีสารปนเปื้อนมาก



ภาพประกอบ 28 กราฟแผนภูมิแท่งความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 582 nm กับสารละลาย LCV ในการตรวจสอบความแตกต่างของข้าวหอมและไม่หอม

บทที่ 5
สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การแยกความแตกต่างระหว่างข้าวหอมและไม่หอม ในงานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการผลิตรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีน *badh2* ของข้าวหอม คือ badh2KDML_TA plasmid และได้ใช้พลาสมิดที่มียีน *badh2* ของข้าวไม่หอมจากงานวิจัยก่อนหน้านี้คือ badh2RB_TA plasmid เพื่อเป็นชุดควบคุม จากนั้นทำการออกแบบไพร์เมอร์ที่ใช้ในเทคนิค LAMP 4 เส้น โดยการออกแบบไพร์เมอร์ในการแยกความแตกต่างของข้าวหอมและไม่หอมนั้นต้องคำนึงถึงความแตกต่างของยีน *badh1* และ *badh2* เนื่องจากทั้ง 2 ยีนเป็นไอโซฟอร์ม ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกัน นอกจากนี้ยีน *badh* ยังมีโครงสร้างและหน้าที่คล้ายกัน อีกทั้งยังต้องคำนึงความแตกต่างของยีน *badh2* ของข้าวหอมและไม่หอม โดยความแตกต่างของยีน *badh2* ระหว่างข้าวหอมและไม่หอมมีความแตกต่างกันเพียงแค่ 8 คู่เบส แต่ในการออกแบบไพร์เมอร์ LAMP ต้องออกแบบไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะ 6 ตำแหน่งที่แตกต่างกัน เนื่องจากมีความแตกต่างกันเพียงแค่ 8 คู่เบสระหว่างข้าวหอมและไม่หอม ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงออกแบบไพร์เมอร์ที่มีตำแหน่งความจำเพาะที่แตกต่างกันเพียง 1 ตำแหน่งเท่านั้นในการแยกความแตกต่างระหว่างข้าวหอมและไม่หอม

การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำเทคนิค LAMP มีการทดลองที่อุณหภูมิต่างกัน ได้แก่ 59.0 °C, 61.0 °C, 63.0 °C, 65.0 °C และ 67.0 °C พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 65.0 °C และการหาเวลาที่เหมาะสมในการทำเทคนิค LAMP ได้มีการทดลองที่เวลาแตกต่างกัน ได้แก่ 30, 60 และ 90 นาที พบว่าเวลาที่เหมาะสมในการทำเทคนิค LAMP คือ 60 นาที เนื่องจากเกิดแถบ DNA ของ LAMP product ชัดเจนที่สุด และสามารถแยกความแตกต่างระหว่างข้าวหอมและไม่หอมได้อย่างชัดเจน สอดคล้องกับงานวิจัยของพรมภมรและคณะ (Prompamorn; et al. 2011) ที่ได้ตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio parahaemolyticus* ในกุ้งโดยใช้เทคนิค LAMP พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ 65 °C และ 90 นาที และงานวิจัยของเชียวหยานและคณะ (Xiaoyan; et al. 2010) ที่ได้ตรวจสอบดีเอ็นเอของเมล็ดถั่วเหลืองโดยใช้เทคนิค LAMP พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 60 – 65 °C และเวลาที่ในการตรวจสอบเร็วที่สุดคือ 40 นาที

ในการศึกษาความไวของเทคนิค LAMP ในการระบุความแตกต่างของข้าวไม่หอมด้วยยีน *badh2* เทคนิค LAMP สามารถตรวจสอบรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีน *badh2* ของข้าวไม่หอมได้ตั้งแต่ 10 copies/reaction ในขณะที่เทคนิค Real-time PCR สามารถตรวจสอบคอมบิแนนท์-พลาสมิดที่มียีน *badh2* ของข้าวไม่หอมได้ 10^4 copies/reaction ซึ่งพบว่าเทคนิค LAMP มีความไว

ในการตรวจสอบมากกว่าเทคนิค Real-time PCR 1,000 เท่า และเทคนิค LAMP สามารถตรวจสอบความเข้มข้น DNA template ของข้าวไม่หอมได้ตั้งแต่ 12.5 ng/reaction สอดคล้องกับงานวิจัยของดิงแกงค์และคณะ (Dinggang; et al. 2014) ที่ได้เพิ่มขยายปริมาณ DNA ของยีน *cry1Ac* ในอ้อยด้วยเทคนิค LAMP และ PCR พบว่าเทคนิค LAMP มีความว่องไวในการตรวจสอบและเพิ่มขยายปริมาณยีน *cry1Ac* ได้ว่องไวกว่าเทคนิค PCR ถึง 10 เท่า เช่นเดียวกับงานวิจัยของจินจิและคณะ (Jinji; et al. 2014) ที่ได้ใช้เทคนิค Real-time Fluorescence LAMP และ PCR ในตรวจสอบการติดเชื้อของ *Fusarium mangiferae* ในมะม่วง พบว่าเทคนิค Real-time Fluorescence LAMP มีความว่องไวในการตรวจสอบมากกว่า เทคนิค PCR ถึง 100 เท่า

การหาความจำเพาะของเทคนิค LAMP ในการตรวจสอบข้าวหอมและไม่หอมในงานวิจัยในครั้งนี้ พบว่ามีความจำเพาะที่สูง เนื่องจากสามารถแยกความแตกต่างของข้าวหอมและไม่หอมทั้ง 11 สายพันธุ์ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอ-ไทด์ (DNA sequencing) และผล Alignment ของข้าวหอมและไม่หอมข้าวทั้ง 11 สายพันธุ์ สอดคล้องกับงานวิจัยในด้านอื่นๆ ที่พบว่าเทคนิค LAMP มีความจำเพาะและมีความถูกต้องที่สูง เช่น การตรวจสอบจุลินทรีย์ *Salmonella* ในอาหาร (Li; et al. 2016) การตรวจสอบไวรัส *Ebola* (Patricia; et al. 2017) และ การตรวจสอบการติดเชื้อ *Candidatus Liberibacter solanacearum* ในพืชกลุ่ม Potato และ Psyllids (Aravind; et al, 2012) เป็นต้น

ในส่วนของการตรวจสอบการปลอมปนของข้าวไม่หอมนั้น มาตรฐานของข้าวหอมมะลิไทยของสำนักงานมาตรฐานสินค้าการเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้กำหนดมาตรฐานการส่งออกของข้าวหอมมะลิ ต้องมีความบริสุทธิ์ไม่น้อยกว่า 92% (สำนักงานมาตรฐานสินค้าการเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2560) ซึ่งเทคนิค LAMP สามารถตรวจสอบการปลอมปนของข้าวไม่หอมในข้าวหอมตั้งแต่ 5% ขึ้นไป ซึ่งสามารถตรวจสอบการปลอมปนได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากเทคนิค LAMP โดยทั่วไปตรวจสอบผลด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel Electrophoresis) เทคนิคดังกล่าวเป็นเทคนิคที่จำเพาะในการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ LAMP แต่เทคนิคดังกล่าวใช้เวลาในการตรวจสอบ 20-30 นาที อีกทั้งมีความยุ่งยากในการเตรียมอุปกรณ์ในการตรวจสอบ (Zhang; et al. 2014) ในงานวิจัยนี้ได้การพัฒนาการวัดเชิงสีของ LCV ร่วมในการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ LAMP ถ้าหากเทคนิค LAMP สามารถเพิ่มขยายปริมาณ DNA ได้จะทำให้เกิดปฏิกิริยาระหว่าง DNA และ LCV ซึ่งเปลี่ยนจากสารละลายใสไม่มีสีกลายเป็นสารละลายสีม่วง ผลการทดลองได้หาความเข้มข้นของสารละลาย Na_2SO_3 เหมาะสมในการเตรียมสารละลาย LCV โดยความเข้มข้นของสารละลาย Na_2SO_3 ที่เหมาะสมคือ 80 mM และค่าความยาว

คลื่นที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด (λ max) เท่ากับ 582 nm ในขณะที่งานวิจัยของชิเกฮิโกะ และคณะ (Shigehiko; et al. 2014) พบว่าความเข้มข้นของ Na_2SO_3 ที่เหมาะสมคือ 60 mM และค่าความยาวคลื่นค่าการดูดกลืนแสงสูงที่สุด (λ max) คือ 592 nm การวัดเชิงสีของ LCV เป็นเทคนิคที่สะดวกและรวดเร็วในการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ LAMP โดยใช้เวลาเพียง 5 นาที สามารถตรวจสอบได้ด้วยตาเปล่า ไม่ต้องใช้อุปกรณ์ในการช่วยตรวจสอบทั้งเครื่องกำเนิดแสงอุลตราไวโอโลต เครื่องถ่ายรูปเจล ช่วยประหยัดเวลา และง่ายต่อการตรวจสอบ หลีกเลี่ยงอันตรายจากสารเคมี เช่น Ethidium bromide และแสงอุลตร้าไวโอเลตจากการรัน Gel Electrophoresis อีกทั้งการเปลี่ยนสีของ LCV ในการตรวจสอบ LAMP product สามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงได้ชัดเจนมากกว่าการเปลี่ยนสีของ HNB และการเรืองแสงของ Calcien (Jizhao; et al 2016) ได้มีงานวิจัยหลายงานวิจัยที่ได้ใช้การวิเคราะห์สีของ LCV ร่วมกับการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ LAMP เช่น การตรวจสอบแบคทีเรีย *Neisseria meningitidis* ใน Cerebrospinal Fluid (Dokyung; et al. 2016) และ การตรวจสอบไวรัส Zika (Jizhao; et al 2016) เป็นต้น

ในการพัฒนาชุดตรวจสอบอย่างง่ายในการจำแนกความแตกต่างของข้าวหอมและไม่หอมด้วยเทคนิค LAMP ร่วมกับเทคนิคการวัดเชิงสีของ LCV ผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้ DNA ของข้าวหอมและไม่หอมจากการสกัดด้วยชุดคิท และรีคอมบิแนนท์พลาสมิดชุดควบคุมเป็น Template สามารถแยกความแตกต่างจากได้ระหว่างข้าวหอมและไม่หอมอย่างชัดเจน และสามารถแยกความแตกต่างได้ด้วยตาเปล่าโดยการสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย LCV เมื่อทำปฏิกิริยากับ LAMP product แต่เมื่อใช้ DNA ของข้าวจากการสกัดอย่างง่ายเป็น Template ไม่สามารถแยกแยะความแตกต่างของสีได้ เนื่องจากปริมาณ DNA ที่ใช้เป็น Template เริ่มต้นมีปริมาณที่มาก สาเหตุที่ใช้ปริมาณ DNA เริ่มต้นในปริมาณที่มากเนื่องจาก จากการทดลองถ้าใช้ปริมาณ DNA จากการสกัดอย่างง่ายในปริมาณต่ำ จะไม่สามารถเพิ่มขยายปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค LAMP ได้ และเมื่อเปรียบเทียบ DNA จากวิธีการสกัดจากชุดคิท และการสกัดอย่างง่ายพบว่า DNA จากวิธีการสกัดอย่างง่ายมีคุณภาพที่ต่ำ เกิด DNA degradation เนื่องจากการใช้ NaOH สกัดและต้มที่อุณหภูมิสูงเป็นเวลาที่นาน

การพัฒนาเทคนิค LAMP ร่วมกับการวัดเชิงสี LCV ในการพัฒนาชุดตรวจสอบอย่างง่ายในการจำแนกความแตกต่างของข้าวหอมและไม่หอมในงานวิจัยนี้สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างข้าวหอมและไม่หอมได้อย่างชัดเจน โดยเทคนิค LAMP มีความไวที่มากกว่าเทคนิค PCR ประมาณ 1,000 เท่า และสามารถทำปฏิกิริยาได้เพียงขั้นตอนเดียวที่สภาวะอุณหภูมิเดียวที่คงที่ (Notomi; et al. 2006) โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง เช่น PCR machine อีกทั้งงานวิจัยชิ้นนี้

ประสบผลสำเร็จในการพัฒนาการวัดเชิงสีของ LCV ในการตรวจสอบ LAMP product ซึ่งสามารถทดแทนการตรวจสอบโดยใช้เทคนิค Gel electrophoresis ได้ ซึ่งสามารถตรวจสอบและจำแนกความแตกต่างของข้าวหอมและไม่หอมรวมถึงการปลอมปนของข้าวไม่หอมได้ในห้องปฏิบัติการขนาดเล็กและใช้ในการตรวจสอบภาคสนามได้อย่างมีประสิทธิภาพ

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

เกษม สุนทราจารย์; และคนอื่นๆ. (2556). การตรวจสอบยีนควบคุมความหอมของข้าว ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบเวลาจริง. *ประชุมวิชาการข้าวและพืชเมืองหนาวประจำปี 2556*. 13-25.

งามชื่อ คงเสรี; และคนอื่นๆ. (2547). *คุณภาพและการตรวจสอบข้าวหอมมะลิไทย*. กรุงเทพฯ: พิมพ์ลักษณ์. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ธานี ศรีวงชัย. (2553). ปัจจัยที่มีผลต่อความหอมของข้าวในมุมของการผลิตข้าว. สืบค้นเมื่อวันที่ 1 เมษายน 2560, จาก http://www.corsat.agr.ku.ac.th/index.php/news/1-2010-12-25-08-26-45/99-2016-04-29-02-57-34.

มาตราฐานสินค้าการเกษตร. (2560, 8 กันยายน). *ราชกิจจานุเบกษา*. เล่ม 134 ตอนพิเศษ 221ง. 1-33.

ภัทรพร สืบสะอาด; สุชาดา เอียจะบก; และ สุนารี ชังอินทร์. (2557). *การตรวจสอบข้าวที่ไม่มีกลิ่นหอมโดยเทคนิคพีซีอาร์*. กรุงเทพฯ: คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. ถ่ายเอกสาร.

ศรัญญา ปลาอ่อน. (2556). *การพัฒนาเทคนิค loop mediated isothermal amplification (LAMP)ในการตรวจวินิจฉัย inflectious myonecrosis virus (IMNV) และ vibrio alginolyticus ในกุ้งขาว Penaeus vannamei*. วิทยานิพนธ์ วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ). กรุงเทพฯ : บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ถ่ายเอกสาร.

สำนักงานมาตรฐานสินค้า. (2550). การควบคุมมาตรฐานสินค้าส่งออกข้าวหอมมะลิไทย.สืบค้นเมื่อวันที่ 6 กุมภาพันธ์ 2560, จาก http://ocs.dft.go.th/%E0%B9%80%E0%B8%AD%E0%B8%81%E0 %B8%AA%E0%B8%B2%E0%B8%A3%E0%B9%80%E0%B8%9C%E0%B8%A2%E0%B9%81%E0%B8%9E%E0%B8%A3/tabid/434/Default.aspx.

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. (2555). ข้าวหอมมะลิไทยปลอมปน. สืบค้นเมื่อวันที่ 6 กุมภาพันธ์ 2560, จาก http://www.acfs.go.th/read_news.php?id=9430&ntype=09.

สุกัญญา วงศ์พรชัย; และคนอื่นๆ. (2547). *การพัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณสารหอมในข้าว*. สำนักงานสนับสนุนการวิจัย.

แสงนวล ทองเพียร. (2548). *พันธุ์ข้าวหอมและมาตรฐานข้าวหอมไทย* . สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

A Guide to LAMP primer designing. (n.d.). Eiken chemical. Retrieved Febuary, 2016, from http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/primer.html.

Amarawathi, Y.; et al. (2008). Mapping of quantitative trait loci for basmati quality traits in rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular Breeding*. 21: 49–65.

Aravind, R.; et al. (2012). Development of a loop-mediated isothermal amplification procedure as a sensitive and rapid method for detection of '*Candidatus Liberibacter solanacearum*' in Potatoes and Psyllids. *Technoques.*102(9): 900-907.

Bartlett. J.M.S.; & Stirling, D. (2003). A short history of the polymerase chain reaction. *PCR protocols*. 384-4: 3.

Bradbury, L. M.; et al. (2005). The gene for fragrance in rice. *Plant Biotechnology*. 3(3): 363-370.

Bradbury, L. M.; et al. (2008). Inactive of an aminoaldehyde dehydrogenase is responsible for fragrant in rice. *Plant Molecular Biology*. 68: 439-449.

Buttery, R. G.; et al. (1983). Cooked rice aroma and 2-acetyl-1-pyrroline. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 31: 823–826.

Dinggang, Z.; et al. (2014). Establishment and application of a Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) system for detection of *cry1Ac* transgenic sugarcane. *Scientific Reports.* 9(4): 4912.

Dokyung, L.; et al. (2016). A novel loop-mediated isothermal amplification assay for serogroup identfication of *Neisseria meningitidis* in Cerebrospinal Fluid. *Frontiers in Microbiology.* 6:1548.

Grimm, C. C.; et al. (2001). Screening for 2-acetyl 1-pyrroline in the headspace of rice using SPME/GS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 245-249.

Grimm, C. C.; et al. (2011). Analysis of 2-acetyl-1-pyrroline in rice by SPME/GS/MS. *Cereal Chemistry Journal*. 88(3): 271-277.

Jinji, P.; et al. (2014) Development of a real-time fluorescence loop-mediate isothermal amplification assay for rapid and quantitative detection of *Fusarium mangiferae* associated with mango malformation. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 86: 81-88.

Jinzhao, S.; et al. (2016). Instrument-Free Point-of-Care molecular detection of Zika virus. *Analytical Chemistry.* 88(14): 7289-7294.

Li, J.; et al. (2016). A novel visual loop-mediated isothermal amplification assay targeting gene62181533 for the detection of Salmonella spp. In foods. *Food Control.* 60: 230-236.

Lorieux, M.; et al. (1996). Aroma in rice: genetic analysis of a quantitative trait. *Theoretical Applied Genetics*. 93: 1145-1151.

Motoki, G.; et al. (2009). Colorimetric of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy napthol blue. *Short Technical Reports.* 46: 167-172.

Niu, X.; et al. (2008). RNAi-directed downregulation of OsBADH2 results in aroma (2-acetyl-1pyrroline) production in rice (*Oryza sativa* L.). *BMC Plant Biology* http://www.biomed central.com/1471-2229/8/100.

Notomi, T.; et al. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acid Research*. 28(12): e63.

Parida, M.; et al. (2008). Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Review Medical Virology*. 18: 407-21.

Patrica, L.; Ruth A.K.; & Nicole F.S. (2017). A Bioengineered positive control for rapid detection of the Ebola virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Biomaterial Science Engineering.* 3: 452-459.

Prompamorn, P.; et al. (2011). The development of loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick for detection of Vibrio parahaemmolyticus . *Letter in Applied Microbiology*. 52: 344-351.

Riabroy, K.; et al. (2013). Fragrance Gene and Molecular Basis of Fragrant Rice. *Thai J. Genet*. 6(2): 93-114.

Rigano, A.L.; et al. (2014). Rapid and sensitive detection of Canditus Liberibacter asiaticus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *BioMedCentral Microbiology*. 14(86): 1471-2180.

Shigehiko, M.; et al. (2014). Method for colorimetric detection of double-stranded nucleic acid using leuco triphenylmetane dyes. *Analytical Biochemistry*. 473: 28-33.

Sriseaka, T.; Wongpornchai, S.; & Kitsawatpaiboon, P. (2006). Rapid method for qualitative analysis of aroma impact compound, 2-acetyl-1-pyrroline, in fragrant rice using automated headspace gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 8183-8189.

The principle of LAMP method. (2015). Eiken chemical. Retrieved Febuary, 2016, from http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/primer.html.

Vanavichit, A.; et al. (2008). Transgenic rice plants with reduced expression of Os2AP and elevated levels of 2-acetyl-1-pyrroline. *United States Patent*. Patent No7. 319,181.

Widjaja, R.; Craske, J. D.; & Wootton, M. (1996). Comparative studies on volatile components of non-fragrant and fragrant rices. *Journal of the Science Food Agriculture*. 70: 151–161.

Xiayan, G.; et al. (2010). Visual and Rapid Detection of Two Genetically Modified Soybean Events Using Loop-mediated Isothermal Amplification Method. *Food Analytical Method.*3: 313-320.

Zhang, X.; Lowe, S. B.; & Gooding, J. J. (2014). Brief review of monitoring methods for Loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biosensor and Bioelectronic.* 61: 491-499.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สารเคมีที่ใช้

1. 5X TBE (Tris-Borate-EDTA)

Tris base	54.0	กรัม
Boric acid	27.5	กรัม
EDTA	20.0	กรัม
เติมน้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

2. 1M Tris-HCL pH 8.8

Tris base	121.1	กรัม
เติมน้ำกลั่น	800.0	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 8.8 ด้วย HCl เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

3. 1.5 % Agarose gel

ชั่ง Agarose ใส่ใน Buffer TBE (0.5X) ให้มีความเข้มข้น 1.5 % ต้มจน Agarose ละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับ Buffer ทิ้งไว้ให้สารละลายเย็นลงแล้วนำไปเทใส่ Gel Chamber ที่มี Comb อยู่ รอจนเจลแข็งตัว จึงดึง Comb ออก

4. 6X Loading Dye

ชั่ง EDTA 4.54 g และ NaOH 0.75 g แล้วจึงละลายด้วยน้ำ 30 mL คนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตรเป็น 100 mL เติม Tris – base ปริมาตร 4.5 mL Bromophenol blue 0.075 g และ Xylene cyanole FF 0.075 g คนให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 2 นำสารละลายที่ได้เติม Glycerol จนมีปริมาตรครบ 250 mL เก็บรักษา ที่อุณหภูมิ -20°c

5. อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria Bertani Broth (LB)

Peptone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
NaCl	10.0	กรัม
เติมน้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

การคำนวณจำนวน Copies ของพลาสมิดชุดควบคุม badh2RB_TA plasmid

มวลโมเลกุลของพลาสมิด

จำนวนคู่เบสของพลาสมิด	3,633	basepair
คิดคำนวณเป็นกรัม	$3,633 \times 650 \times 1.66 \times 10^{-24} = 3.92 \times 10^{-18}$	g/copies
น้ำหนักของพลาสมิด	3.92×10^{-9}	ng/copies

ถ้าต้องการความเข้มข้นของ Plasmid จำนวน 10^9 Copies/µL จะต้องเตรียมความเข้มข้นของพลาสมิดเท่ากับ $10^{-9} \div 3.92 \times 10^{-9} = 0.25$ ng/µL

ภาคผนวก ค

ค่าสเปกตรัมของการตรวจวัดด้วยวิธี Spectroscopy ที่ช่วงความยาวคลื่น UV-Visible

ตาราง 5 ค่าการดูดกลืนแสงและค่าความยาวคลื่นช่วง 350 - 750 nm ของสารละลาย LCV ที่ความเข้มข้นของโซเดียมซัลไฟต์ช่วง 20-80 mM

Wavelength (nm)	20 mM	30 mM	40 mM	50 mM	60 mM	70 mM	80 mM
350	0.3181	0.2851	0.2521	0.219	0.186	0.1304	0.0748
360	0.3065	0.2736	0.2407	0.2077	0.1748	0.122	0.0692
370	0.2913	0.2593	0.2273	0.1953	0.1632	0.1134	0.0635
380	0.2853	0.2535	0.2217	0.1899	0.1582	0.1092	0.0602
390	0.2793	0.2478	0.2163	0.1847	0.1532	0.1064	0.0597
400	0.2754	0.244	0.2127	0.1813	0.15	0.1048	0.0595
410	0.2737	0.2424	0.2111	0.1798	0.1484	0.1043	0.0601
420	0.2727	0.2413	0.21	0.1786	0.1473	0.1038	0.0603
430	0.3081	0.2632	0.2182	0.1732	0.1282	0.0892	0.0501
440	0.3104	0.2652	0.2201	0.1749	0.1298	0.0908	0.0518
450	0.3147	0.2692	0.2237	0.1782	0.1327	0.0935	0.0543
460	0.3207	0.2747	0.2288	0.1828	0.1369	0.0971	0.0573
470	0.3338	0.2866	0.2393	0.1921	0.1449	0.1043	0.0636
480	0.3459	0.2973	0.2487	0.2002	0.1516	0.1103	0.0689
490	0.3665	0.3156	0.2646	0.2137	0.1627	0.1202	0.0776
500	0.3879	0.3343	0.2808	0.2273	0.1738	0.1298	0.0859
510	0.4137	0.357	0.3003	0.2436	0.1869	0.1414	0.0958
520	0.4451	0.3846	0.324	0.2635	0.203	0.1554	0.1079
530	0.4653	0.4023	0.3393	0.2764	0.2134	0.1644	0.1155
540	0.4582	0.4021	0.3461	0.29	0.234	0.1806	0.1271
550	0.4692	0.4122	0.3552	0.2982	0.2412	0.1865	0.1318
560	0.4867	0.4273	0.368	0.3086	0.2492	0.1939	0.1386
570	0.5171	0.4532	0.3894	0.3255	0.2617	0.2062	0.1507

ตาราง 5 (ต่อ)

Wavelength (nm)	20 mM	30 mM	40 mM	50 mM	60 mM	70 mM	80 mM
530	0.4653	0.4023	0.3393	0.2764	0.2134	0.1644	0.1155
540	0.4582	0.4021	0.3461	0.29	0.234	0.1806	0.1271
550	0.4692	0.4122	0.3552	0.2982	0.2412	0.1865	0.1318
560	0.4867	0.4273	0.368	0.3086	0.2492	0.1939	0.1386
570	0.5171	0.4532	0.3894	0.3255	0.2617	0.2062	0.1507
580	0.5334	0.4672	0.401	0.3348	0.2686	0.2129	0.1572
590	0.521	0.4572	0.3934	0.3296	0.2658	0.2087	0.1517
600	0.4835	0.4258	0.3681	0.3104	0.2527	0.1943	0.1359
610	0.4264	0.3775	0.3285	0.2796	0.2306	0.1716	0.1126
620	0.3766	0.3346	0.2926	0.2505	0.2085	0.1509	0.0932
630	0.3373	0.3	0.2628	0.2256	0.1884	0.1336	0.0789
640	0.3009	0.2676	0.2344	0.2011	0.1678	0.1172	0.0666
650	0.2843	0.2527	0.221	0.1894	0.1577	0.1096	0.0614
660	0.2692	0.239	0.2088	0.1785	0.1483	0.1025	0.0566
670	0.2628	0.2334	0.204	0.1746	0.1452	0.1001	0.055
690	0.2575	0.2281	0.1988	0.1695	0.1402	0.0965	0.0527
700	0.2563	0.227	0.1978	0.1686	0.1394	0.0959	0.0523
710	0.2549	0.2259	0.1969	0.1678	0.1388	0.0953	0.0519
720	0.2542	0.2253	0.1964	0.1674	0.1385	0.0951	0.0517
730	0.2534	0.2246	0.1958	0.167	0.1382	0.0948	0.0514
740	0.2528	0.2241	0.1953	0.1666	0.1379	0.0945	0.0512
750	0.2523	0.2237	0.195	0.1664	0.1377	0.0943	0.0509

ตาราง 6 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 582 nm ของสารละลาย LCV ทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอมาตรฐาน 0-100 ng/reaction

ความเข้มข้นดีเอ็นเอ (ng/reaction)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
100	1.41	1.42	1.42	1.42	0.01
80	1.17	1.17	1.17	1.17	0
60	0.9	0.89	0.89	0.89	0
40	0.62	0.61	0.62	0.62	0
20	0.34	0.34	0.35	0.34	0
0	0.07	0.07	0.07	0.07	0

ตาราง 7 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 582 nm ของสารละลาย LCV ทำปฏิกิริยากับ LAMP product

สารละลาย	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย	SD
Blank	0.432	0.416	0.432	0.426667	0.009238
KDML105 สกัดอย่างง่าย	0.416	0.456	0.432	0.434667	0.020133
AB31 สกัดอย่างง่าย	0.648	0.696	0.728	0.690667	0.040266
KDML105 สกัดชุดคิท	1.808	1.808	1.816	1.810667	0.004619
AB31 สกัดชุดคิท	2.304	2.256	2.256	2.272	0.027713
F	0.472	0.432	0.496	0.466667	0.032332
NF	0.768	0.656	0.664	0.696	0.062482

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นาย อมรเทพ ถาน้อย
วันเดือนปีเกิด	5 กันยายน 2535
สถานที่เกิด	เชียงใหม่
สถานที่อยู่	28/5 ถนนสนามกีฬา ซอย 2 ต. ในเมือง อ. เมือง จ.ลำพูน 51000

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2554	มัธยมศึกษาตอนปลาย จาก โรงเรียนส่วนบุญโญปถัมภ์ ลำพูน
พ.ศ. 2559	การศึกษาบัณฑิต (เคมี) จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จังหวัด กรุงเทพฯ
พ.ศ. 2561	การศึกษามหาบัณฑิต (เคมี) จาก มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จังหวัด กรุงเทพฯ