

การเปรียบเทียบวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนจากลำต้นยางพารา Comparison of RNA Extraction Methods for Gene Expression from Stem of Rubber Tree (*Hevea brasiliensis* Muell-Arg.)

ชญานุช อุดมทรัพย์^{1,2} จรัสศรี นวลศรี^{1,2,3} เสาวภา ต้วงปาน¹ ญัฐกร วรอุสิน⁴ และกรกช นาคคอง^{1,2,3*}
Audomsap, C.^{1,2} Nualsri, C.^{1,2,3} Doungpan, S.¹ Woraathasin, N.⁴ and Nakkanong, K.^{1,2,3*}

¹สาขาวิชาวนวัฒนกรรมและการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110

¹Agricultural Innovation and Management Division, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112

²ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนานวัตกรรมการศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

²Center of Excellence on Agricultural Biotechnology (AG-BIO/MHESI), Bangkok 10900

³ศูนย์วิจัยพืชสวนและไม้ผลเมืองร้อน คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จ.สงขลา 90110

³Tropical Fruit and Plantation Crops Research Center, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112

⁴ภาควิชาเทคโนโลยีและการอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี อ.เมือง จ.ปัตตานี 94000

⁴Faculty of Science and Technology, Prince of Songkla University, Pattani Campus, Pattani 94000

* Corresponding author: korakot_nick@yahoo.com

Received 21 March 2021; Revised 10 July 2021; Accepted 28 October 2021

บทคัดย่อ

คุณภาพและปริมาณของอาร์เอ็นเอเป็นส่วนสำคัญในการศึกษาการแสดงออกของยีน การสกัดอาร์เอ็นเอจากลำต้นยางพาราให้บริสุทธิ์ทำได้ยาก เนื่องจากประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ พอลิฟีนอล และสารประกอบอื่น ๆ ที่ตกตะกอนร่วมกับอาร์เอ็นเอ ดังนั้นจึงทำการศึกษาวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอที่มีประสิทธิภาพ ใช้เวลาน้อย และเหมาะสมกับชิ้นส่วนลำต้นยางพารา โดยเปรียบเทียบวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอจากสารละลาย CTAB 2 วิธี ได้แก่ วิธีการที่ 1 Rubio-Piña และ Zapata-Pérez (2011) และวิธีการที่ 2 Gambino และคณะ (2008) พบว่าการสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธีการที่ 1 ให้อาร์เอ็นเอความเข้มข้นเฉลี่ย 188.97 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร มีค่า OD260/280 เท่ากับ 1.85 และการสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธีการที่ 2 ได้อาร์เอ็นเอที่มีความเข้มข้นเฉลี่ย 642.93 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร มีค่า OD260/280 เท่ากับ 1.97 เป็นอาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพสูง และมีปริมาณสม่ำเสมอ เมื่อนำอาร์เอ็นเอไปตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) พบว่าอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีการที่ 2 สามารถใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณของ *18S rRNA* และ *APX1* (Ascorbate peroxidase) ได้ และมีประสิทธิภาพของปฏิกิริยาพีซีอาร์สูง การสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธีการที่ 2 จึงเป็นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการสกัดอาร์เอ็นเอจากลำต้นยางพาราในระยะต้นกล้าเพื่อใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนได้

คำสำคัญ: ยางพารา, การสกัดอาร์เอ็นเอ, เทคนิค RT-qPCR

Abstract

RNA quality and quantity are critical for gene expression analysis. Isolating high-quality RNA from the stem of rubber tree is often difficult due to large quantities of polysaccharides, polyphenols, and other compounds that bind or co-precipitate with the RNA. This work aimed to obtain an efficient method for RNA isolation to reduce extraction time without reducing the quality and yield. RNA isolation methods were compared between Rubio-Piña and Zapata-Pérez (2011) (method 1) and Gambino *et al.* (2008) (method 2). It was found that method 1 gave the RNA concentration at 188.97 ng/μl which had an OD260/280 ratio of 1.85. RNA extraction by method 2 gave higher RNA concentration at 642.93 ng/μl and OD260/280 was 1.97. Method 2 was the most efficient that gave high quality, integrity, and an equal amount of RNA. Afterward, RNA was further used for gene expression analysis using the real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) technique. It was demonstrated that the RNA could be used as a template for *18S rRNA* and *APX1* (Ascorbate peroxidase) transcript amplification. Taken together, method 2 was the ideal method for isolation of RNA from stem of rubber tree using for gene expression analysis.

Keywords: Rubber tree, RNA extraction, RT-qPCR

บทนำ

ยางพารา (*Hevea brasiliensis* Muell-Arg.) เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย เป็นพืชยืนต้นที่ให้ผลผลิตเป็นน้ำยางธรรมชาติ มีอายุการปลูกและเก็บเกี่ยวยาวนานกว่า 20 ปี ผลผลิตน้ำยางธรรมชาติที่ได้มีคุณสมบัติที่ยางสังเคราะห์ไม่สามารถทดแทนได้ในระบบอุตสาหกรรมหลายประเภท การทำสวนยางพาราสามารถสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรไม่น้อยกว่า 6 ล้านคนทั่วประเทศ ยางพาราจึงเป็นพืชที่ทำให้มีการกระจายรายได้ให้แก่เกษตรกรเป็นจำนวนมาก ยางพารามีการส่งออกในรูปของวัตถุดิบ ผลิตภัณฑ์ยาง ไม้ยางพาราแปรรูป และผลิตภัณฑ์ไม้ คิดเป็นมูลค่ากว่า 287,230 ล้านบาท (Office of Agricultural Economics, 2021) ดังนั้นการขยายพันธุ์ยางพาราเพื่อผลิตต้นกล้ายางพาราทางการค้าจึงเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญ ยางพารานิยมขยายพันธุ์ด้วยวิธีการติดตา เพราะสามารถผลิตต้นยางได้เป็นจำนวนมาก ทำได้ง่าย สะดวกรวดเร็ว และได้ผลสำเร็จสูง (Rubber Authority of Thailand, 2015) ภายหลังการติดตาพืชจะมีการตอบสนองต่อบาดแผลอย่างรวดเร็ว โดยมีกลไกในการสร้างสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ จากบริเวณบาดแผลขึ้น เพื่อช่วยป้องกันเซลล์ที่ได้รับความเสียหาย (Melnyk, 2017) การที่จะสามารถคัดเลือกต้นตอและกิ่งพันธุ์ที่มีความเข้ากันได้ จำเป็นที่จะต้องเข้าใจถึงกลไกที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ โดยเฉพาะการศึกษาในระดับโมเลกุล และการแสดงออกของยีน (Wang et al., 2008) ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปคัดเลือกต้นตอและกิ่งพันธุ์เพื่อการผลิตต้นกล้ายางพาราทางการค้าที่เหมาะสมต่อไปได้

การศึกษาการแสดงออกของยีน (gene expression) ที่ถูกต้องและเชื่อถือได้ ขึ้นอยู่กับวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอที่เหมาะสมเพื่อให้ได้อาร์เอ็นเอที่บริสุทธิ์และมีคุณภาพสูง (Toni et al., 2018) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการศึกษาโดยใช้เทคนิค RT-qPCR ซึ่งวิธีที่มีความจำเพาะ (selectivity) สูง จึงต้องการอาร์เอ็นเอเริ่มต้นที่มีคุณภาพดี มีความบริสุทธิ์ปราศจากสารปนเปื้อน (purity) มีความสมบูรณ์ไม่แตกหัก (integrity) และมีปริมาณที่เพียงพอ (Choopayak et al., 2013) การสกัดอาร์เอ็นเอจากลำต้นยางพาราให้มีคุณภาพดี และบริสุทธิ์ยังมีข้อจำกัด เนื่องจากลำต้นของพืชมักประกอบด้วยสารจำพวกพอลิแซ็กคาไรด์ พอลิฟีนอล และสารเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (Ratanasut, 2018) ที่อยู่ในเซลล์ ซึ่งส่งผลให้คุณภาพและปริมาณของอาร์เอ็นเอลดลง และยังรบกวนการเกิดปฏิกิริยาในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วย ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดอาร์เอ็นเอจากลำต้นยางพารา วิธีการสกัดอาร์เอ็นเอที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดและชิ้นส่วนที่นำมาใช้ การใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอทางการค้ามักไม่มีความจำเพาะต่อพืชแต่ละชนิด โดยเฉพาะชิ้นส่วนลำต้นของยางพารา อีกทั้งยังมีราคาสูง การสกัดอาร์เอ็นเอโดยวิธีที่ใช้ cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) ซึ่งเป็นสารเคมีพื้นฐานที่ใช้กันทั่วไปในห้องปฏิบัติการ (Chan et al., 2004; Rodrigues et al., 2007) จึงเหมาะสมต่อการนำมาประยุกต์ใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอจากชิ้นส่วนลำต้นของยางพารา การสกัดอาร์เอ็นเอด้วยสารละลาย CTAB นิยมใช้กับพืชหลายชนิดที่มีสารจำพวกพอลิแซ็กคาไรด์ และพอลิฟีนอลในปริมาณสูง เช่น พืช กล้วย แอปเปิล มะม่วง และองุ่น เป็นต้น (Hu et al., 2002; Tattersall

et al., 2005; Barbier et al., 2019) เนื่องจากมีคุณสมบัติในการย่อยผนังเซลล์ ทำให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพ รวมทั้งสามารถแยกพอลิแซ็กคาไรด์ออกจากกรดนิวคลีอิกได้ดีอีกด้วย (Ratanasut, 2018; Barbier et al., 2019)

งานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดอาร์เอ็นเอจากลำต้นยางพารา โดยประยุกต์ใช้วิธีการสกัดอาร์เอ็นเอจากสารละลาย CTAB เพื่อให้ได้อาร์เอ็นเอที่มีปริมาณและคุณภาพสูงเพื่อนำไปใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการเข้ากันได้ระหว่างต้นตอและกิ่งพันธุ์ต่อไป

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่างพืช

ทำการเก็บตัวอย่างบริเวณลำต้นยางพารา ทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ตามด้วยน้ำ DEPC (DEPC-treated water) ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูฆ่าเชื้อ ห่อตัวอย่างด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์แล้วแช่ลงในไนโตรเจนเหลวทันที ก่อนนำมาสกัดอาร์เอ็นเอ

2. การสกัดอาร์เอ็นเอ

นำชิ้นส่วนลำต้นยางพารา 0.15 กรัม มาสกัดอาร์เอ็นเอโดยการประยุกต์ใช้ CTAB จำนวน 2 วิธี วิธีการละ 3 ซ้ำ

วิธีการสกัดที่ 1 ตามวิธีการของ Rubio-Piña และ Zapata-Pérez (2011) บดตัวอย่างลำต้นด้วยไนโตรเจนเหลวจนละเอียด เติมสารละลายบัฟเฟอร์ ประกอบด้วย 2% CTAB, 2% PVP, 1.4 M NaCl, 100 mM Tris HCl pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0 และ 10% β -mercaptoethanol) 900 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที กลับหลอดทุก 3 นาที เติม chloroform ปริมาตร 800 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา และเขย่าให้สารละลายเข้ากันเป็นเนื้อเดียว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ ปริมาตร 650 ไมโครลิตร เติม phenol: chloroform: isoamyl alcohol อัตราส่วน 25 : 24 : 1 ปริมาตร 800 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา และเขย่าให้สารละลายเข้ากันเป็นเนื้อเดียว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดึงสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติม chloroform: isoamyl alcohol อัตราส่วน 24 : 1 ที่เย็นจัด ปริมาตร 1 เท่าของส่วนใส กลับหลอดไปมาและเขย่าให้สารละลายเข้ากันเป็นเนื้อเดียว นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดึงสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ เติม 8 M lithium chloride ปริมาตร 1/3 เท่าของส่วนใส กลับหลอดไปมาเบา ๆ นำไปตกตะกอนอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 100% และ 70% ethanol ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ตากตะกอนอาร์เอ็นเอนาน 2-5 นาที ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยน้ำ DEPC (DEPC-treated water) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วตกตะกอน

อาร์เอ็นเอด้วย 3 M sodium acetate ปริมาตร 0.1 เท่าของ ส่วนใส และ 100% ethanol ปริมาตร 2 เท่าของส่วนใส นำ อาร์เอ็นเอไปตกตะกอนที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ที่งสารละลายส่วนใส ล้างตะกอน อาร์เอ็นเอด้วย 70% ethanol ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ตกตะกอนอาร์เอ็นเอให้แห้งนาน 10-15 นาที ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยน้ำ DEPC ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (Figure 1)

วิธีการสกัดที่ 2 ตามวิธีการของ Gambino และคณะ (2008) บดตัวอย่างด้วยไนโตรเจนเหลวจนละเอียด เติมน้ำตาลละลายบัฟเฟอร์ (2% CTAB, 2.5% PVP, 2 M NaCl, 100 mM Tris HCl pH 8.0, 25 mM EDTA pH 8.0 และ 2% β -mercaptoethanol) ปริมาตร 900 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมน้ำ chloroform: isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 24 : 1 ที่เย็นจัด ปริมาตร 900 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาและเขย่าให้สารละลายเข้ากันเป็นเนื้อเดียว นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ย้ายสารละลายส่วนใสด้านบนใสหลอดใหม่ เติมน้ำ 8 M lithium chloride ปริมาตร 1/3 เท่าของส่วนใส กลับหลอดไปมาเบา ๆ นำไปตกตะกอนอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 20,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย SSTE (1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0 และ 1% SDS) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ที่ทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เติมน้ำ chloroform: isoamyl alcohol อัตราส่วน 24 : 1 ที่เย็นจัด ปริมาตร 1 เท่าของส่วนใส นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดึงสารละลายส่วนใสใสหลอดใหม่ ตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย isopropanol ที่เย็นจัด ปริมาตร 0.7 เท่าของส่วนใส ปั่นเหวี่ยงทันทีด้วยความเร็ว 20,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 70% ethanol ปริมาตร 900 ไมโครลิตร ตกตะกอนอาร์เอ็นเอให้แห้งนาน 10-15 นาที ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยน้ำ DEPC ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (Figure 1)

3. การกำจัดดีเอ็นเอที่ปนเปื้อน และการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณอาร์เอ็นเอหลังการสกัด

นำอาร์เอ็นเอที่ได้จากการสกัดไปกำจัดดีเอ็นเอที่ปนเปื้อน ด้วย DNase ตามวิธีการของ Dnase I, RNase-free (Thermo Scientific, USA) และหยุดปฏิกิริยาด้วย stop solution ของชุด DNase นำอาร์เอ็นเอที่ปราศจากดีเอ็นเอไปตรวจสอบคุณภาพด้วย 1% agarose gel electrophoresis และตรวจปริมาณด้วย Nanodrop spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 230, 260 และ 280 นาโนเมตร เก็บรักษาอาร์เอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4. การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA)

ทำการสังเคราะห์ cDNA ตามวิธีการของ Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA) โดยเตรียมปฏิกิริยาในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย อาร์เอ็นเอความเข้มข้น 1 pg-5 μ g, Oligo (dT)₁₈ primer 1 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP Mix 1 ไมโครลิตร และเติมน้ำ DEPC จนมีปริมาตรครบ 15 ไมโครลิตร นำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และวางบนน้ำแข็งทันที เติมน้ำ 5X RT Buffer 4 ไมโครลิตร และ Maxima H Minus Enzyme Mix 1 ไมโครลิตร นำไปทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จะได้ cDNA ที่พร้อมสำหรับการทำ RT-qPCR

5. การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Real-Time quantitative PCR (RT-qPCR)

นำ cDNA ที่ได้เป็นต้นแบบ โดยการทำปฏิกิริยาด้วยชุด SsoAdvanced™ Universal® Green Super Mix (Bio-Rad, USA) และไพรเมอร์ที่จำเพาะ โดย 1 ตัวอย่าง ทำการเพิ่มปริมาณ 2 ยีน คือ ยีน *18S rRNA* ซึ่งเป็นยีนควบคุม และยีน *APX1* (ascorbate peroxidase) ซึ่งเป็นยีนที่ต้องการศึกษาการแสดงออก โดยใช้ไพรเมอร์ 18S - F 5'- AAGCCTACGCTC TGGATACATT-3' และ 18S - R 5'- CCCGACTGTCCCTGT TAATC-3' เป็นยีนควบคุม สำหรับการแสดงออกของยีน *APX1* ใช้ไพรเมอร์ APX1 - F 5'-GCATGGCACTCAGCTGGAAC-3' และ APX1 - R 5'- ACGGCAACAACACCAGCAAG-3' นำไปทำปฏิกิริยา Real-time PCR โดยใช้ cDNA ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อปฏิกิริยา 10 ไมโครลิตรด้วยเครื่อง Thermal cycler รุ่น CFX maestro (Bio-Rad, USA) โดยมีสภาวะในการเกิดปฏิกิริยา ดังนี้ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที ต่อด้วยอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 10 วินาที อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 39 รอบ วิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม CFX Manager™ Software ตรวจสอบการแสดงออกของยีนเป็นจำนวนเท่าของความสัมพันธ์ (relative normalized expression) ด้วยวิธีการ $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ระหว่างยีน *APX1* และยีน *18S rRNA*

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณและคุณภาพอาร์เอ็นเอของแต่ละวิธีการ ค่าเฉลี่ยของข้อมูล และความแปรปรวนของข้อมูลด้วยโปรแกรม R version 2.14.0 และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยความเข้มข้นและคุณภาพของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

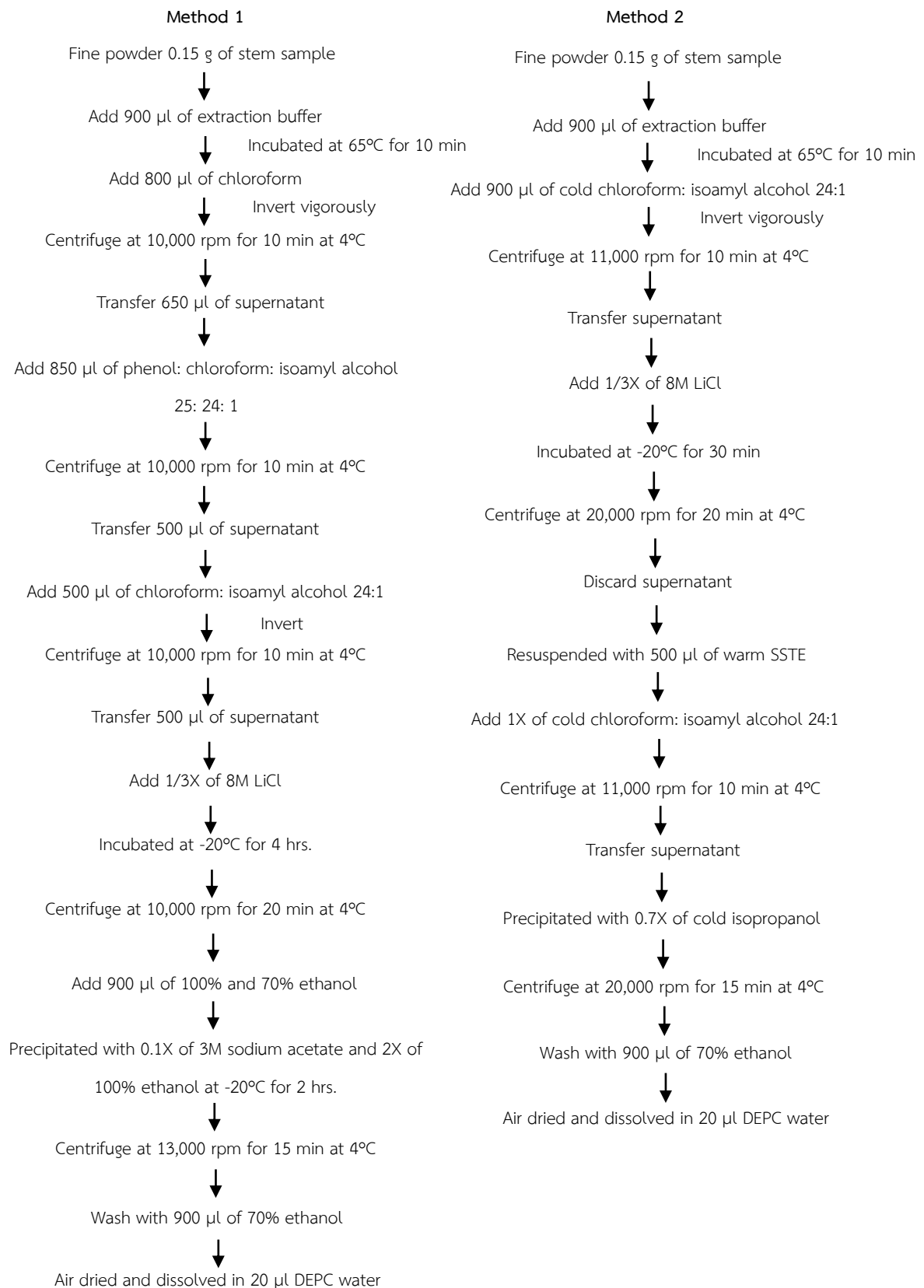


Figure 1 RNA extraction methods for rubber tree

ผลการทดลอง

จากการเปรียบเทียบวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอ 2 วิธีการ (Figure 1) ได้แก่วิธีการของ Rubio-Piña และ Zapata-Pérez (2011) (วิธีการที่ 1) และวิธีการของ Gambino และคณะ (2008) (วิธีการที่ 2) การวัดปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230 260 และ 280 นาโนเมตร พบว่าการสกัดอาร์เอ็นเอจากลำต้นยางพาราวิธีที่ 2 สามารถสกัดอาร์เอ็นเอที่มีความเข้มข้นเฉลี่ย 642.93 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการที่ 1 ที่สามารถสกัดอาร์เอ็นเอที่มีความเข้มข้นเฉลี่ยเพียง 188.97 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร แต่อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่สามารถสกัดได้จากทั้ง 2 วิธี มีปริมาณอาร์เอ็นเอที่เพียงพอต่อการนำไปทำ RT-qPCR ได้ เมื่อพิจารณาค่า OD260/280 พบว่าการสกัดอาร์เอ็นเอทั้ง 2 วิธีมีค่า 1.85 และ 1.97 ตามลำดับซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามการสกัดอาร์เอ็นเอทั้ง 2 วิธีการสามารถสกัดอาร์เอ็นเอได้บริสุทธิ์ไม่มีการปนเปื้อนของโปรตีนเนื่องจากมีค่า OD260/280 มากกว่า 1.8 ในขณะที่ค่า OD260/230 มีค่าอยู่ระหว่าง 1.35-1.53 แสดงว่าอาร์เอ็นเอยังมีการปนเปื้อนสารพวกพอลิแซ็กคาไรด์และพอลิฟีนอลอยู่ อย่างไรก็ตามการสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธีการที่ 2 ทำให้อาร์เอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณและคุณภาพที่ดีกว่าการสกัดด้วยวิธีที่ 1 (Table 1)

Table 1 RNA purity and yield measured on different methods

Method	OD260/230	OD260/280	Concentration RNA (ng/μl)
1	1.35	1.85	188.97
2	1.53	1.97	642.93
F-test	ns	*	*
C.V. (%)	9.03	0.54	9.42

* = significantly different at $p \leq 0.05$ by LSD; ns = not significant at $p > 0.05$

สำหรับการวิเคราะห์อาร์เอ็นเอด้วยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสใน 1% agarose gel (Figure 2) พบว่าอาร์เอ็นเอที่สามารถสกัดได้จาก 2 วิธีการเป็นอาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพดี เนื่องจากมีการปรากฏแถบอาร์เอ็นเอ 2 แถบหลักคือ 28S rRNA และ 18S rRNA อย่างชัดเจนสมบูรณ์ ไม่มีการแตกหัก โดยผลการทดลองสอดคล้องกับการวัดอาร์เอ็นเอจากการดูดกลืนแสง เมื่อได้อาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพดีแล้ว นำไปสังเคราะห์เป็น cDNA เพื่อนำไปวิเคราะห์ RT-qPCR พบว่าอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จาก 2 วิธีการ สามารถใช้วัดการแสดงออกของยีนได้ แต่การสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธีการที่ 2 พบว่ามีประสิทธิภาพของปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ดีกว่า เนื่องจากมีค่า cycle threshold (C_t) ต่ำกว่า และมีค่าที่ใกล้เคียงกันในแต่ละซ้ำ อย่างไรก็ตามเพื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพของปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยวิเคราะห์จากกราฟจุดหลอมเหลว (Melting curve) พบว่าวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอ 2 วิธีการ ทำให้สามารถเกิดปฏิกิริยาพีซีอาร์ได้ดี และมีความจำเพาะกับไพรเมอร์ เพราะมีการปรากฏยอดกราฟเพียงยอดเดียวที่อุณหภูมิเดียวกัน (Figure 3 and 4)

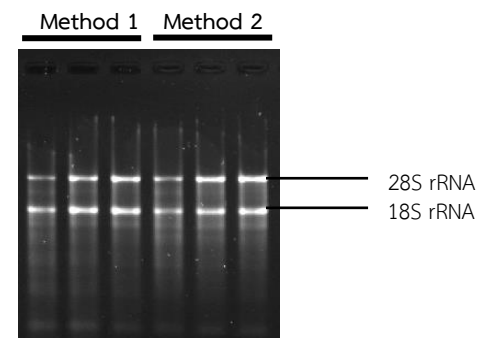


Figure 2 Agarose gel electrophoresis of total RNA extracted from two methods (n=3)

วิจารณ์

การศึกษาการแสดงออกของยีนจากลำต้นของยางพาราเพื่อประเมินความสามารถในการเข้ากันได้ระหว่างต้นตอและกิ่งพันธุ์ดียังไม่ค่อยมีการศึกษามากนัก เนื่องจากข้อจำกัดในการสกัดอาร์เอ็นเอให้มีคุณภาพดี เพราะในลำต้นมักประกอบด้วยสารทุติยภูมิต่าง ๆ พอลิแซ็กคาไรด์ และสารประกอบฟีนอลิก โดยสารเหล่านี้จะเข้าไปจับกับอาร์เอ็นเอ ทำให้อาร์เอ็นเอไม่สามารถแยกออกจากสารที่ปนเปื้อนได้ ทำให้ได้อาร์เอ็นเอที่ไม่บริสุทธิ์ (Salzmann *et al.*, 1999) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ายางพารายังมีค่าการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอจากสารพวกพอลิแซ็กคาไรด์และพอลิฟีนอลสูง แต่เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้สารละลาย CTAB ร่วมกับ SDS ในลำต้นของแมคคาเดเมีย พบว่าอาร์เอ็นเอที่ได้ยังคงมีการปนเปื้อนสารพวกพอลิแซ็กคาไรด์และพอลิฟีนอลสูงกว่าการสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธีที่ 2 (Barbier *et al.*, 2019) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบระหว่างการสกัดอาร์เอ็นเอด้วยสารละลาย CTAB ในพืชตระกูลโกก้าง ซึ่งเป็นพืชที่มีสารทุติยภูมิต่าง ๆ ปริมาณมาก พบว่าปริมาณอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มีปริมาณต่ำกว่าการสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธีที่ 2 ส่วนค่าการปนเปื้อนโปรตีน (OD260/280) พบว่าทั้งสองวิธีการสกัดให้ผลใกล้เคียงกัน (Rubio-Piña and Zapata-Pérez, 2011) สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอ มักจะมีส่วนผสมของ CTAB, Polyvinyl pyrrolidone (PVP) และเกลือที่มีความเข้มข้นสูง (sodium chloride, NaCl) (Chang *et al.*, 1993) ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของทั้ง 2 วิธีการ โดยสารเหล่านี้จะเข้าไปทำหน้าที่ในการกำจัดโปรตีน สารประกอบฟีนอลิก และสารพวกพอลิแซ็กคาไรด์ รวมทั้งช่วยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ RNase อีกด้วย ทำให้อาร์เอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์ไม่มีการปนเปื้อน (Ratanasut, 2018) โดยเฉพาะการสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธีการที่ 2 ทำให้อาร์เอ็นเอมีความบริสุทธิ์และได้ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอมากกว่าการสกัดด้วยวิธีการที่ 1 เนื่องจากวิธีการที่ 2 มีเกลือความเข้มข้นสูงกว่า ทำให้ CTAB เข้าไปรวมกับโปรตีนและพอลิแซ็กคาไรด์เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่ละลายน้ำ ขณะที่อาร์เอ็นเอละลายอยู่ในสารละลายทำให้สามารถแยกอาร์เอ็นเอให้บริสุทธิ์ได้ (Zhang and Teng, 2008; Aiello *et al.*, 2010; Barbier *et al.*, 2019)

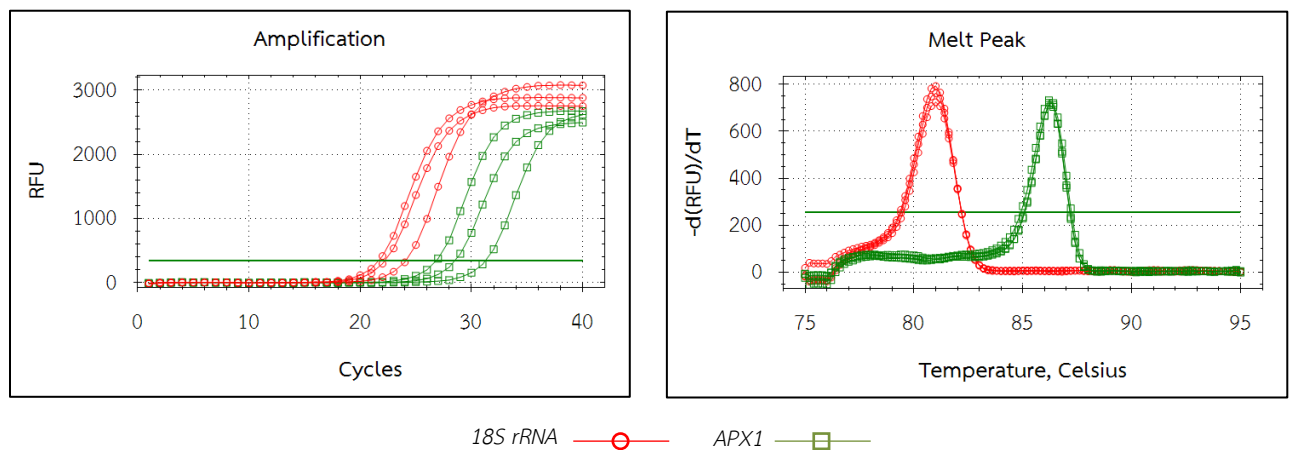


Figure 3 Amplification and melting curves for *18S rRNA* and *APX1* using RNA extracted by method 1 (n=3)

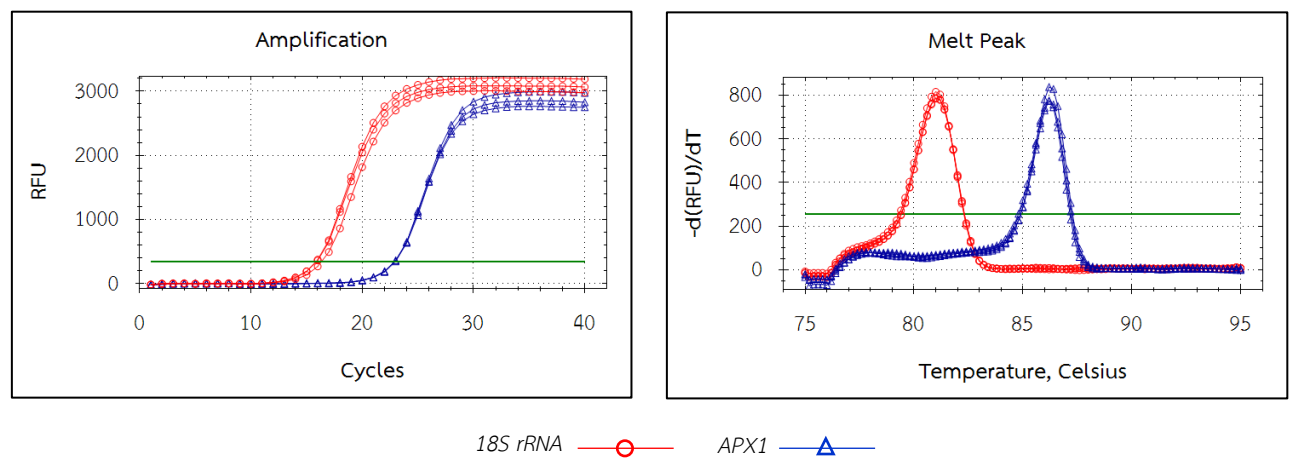


Figure 4 Amplification and melting curves for *18S rRNA* and *APX1* using RNA extracted by method 2 (n=3)

รวมทั้งความเข้มข้นของ PVP ที่สูงกว่ายังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดพอลิฟีนอลออกจากอาร์เอ็นเอ โดย PVP จะเข้าไปรวมกับพอลิฟีนอลด้วยพันธะไฮโดรเจน ทำให้สารพอลิฟีนอลแยกออกมาจากอาร์เอ็นเอได้ (Wang *et al.*, 2005; Gambino *et al.*, 2008; Dash, 2013) อีกหนึ่งขั้นตอนที่มีความแตกต่างกันได้แก่วิธีการที่ 2 มีการย่อยเซลล์ (cell lysis) อีกครั้งด้วย 1% Sodium dodecyl sulphate (SDS) โดย SDS มีหน้าที่ในการย่อยเยื่อหุ้มเซลล์และแยกกรดนิวคลีอิกกับโปรตีนออกจากกัน (Gani *et al.*, 1999) ทำให้อาร์เอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีการที่ 2 มีการปนเปื้อนของโปรตีนน้อยกว่าวิธีการที่ 1 และมีปริมาณอาร์เอ็นเอที่ได้จากการสกัดมากกว่าวิธีการที่ 1 ด้วย และในขั้นตอนของการตกตะกอนอาร์เอ็นเอ วิธีการที่ 2 ทำการตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย isopropanol ทำให้อาร์เอ็นเอตกตะกอนทันทีเมื่อนำไปปั่นเหวี่ยง รวมทั้งโปรตีนและสารปนเปื้อนอื่น ๆ ที่ละลายอยู่ในสารละลายส่วนใสสามารถกำจัดออกไปได้ง่ายอีกด้วย (Gambino *et al.*, 2008; Rio *et al.*, 2010) และในการนำไปทำปฏิกิริยา RT-qPCR พบว่า การสกัดอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากทั้ง 2 วิธีการมีคุณภาพดีเพียงพอต่อการวิเคราะห์การแสดงออกยีนได้ อย่างไรก็ตามการสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธีการที่ 2

ให้อาร์เอ็นเอที่มีปริมาณสม่ำเสมอมากกว่าวิธีการที่ 1 เนื่องจากค่า Ct ซึ่งเป็นค่าที่ใช้ในการคำนวณจำนวนดีเอ็นเอเป้าหมายเริ่มต้น (initial DNA copy number) (Ratanasut, 2018) มีความใกล้เคียงกัน การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยวิธีการ RT-qPCR ต้องอาศัยความใกล้เคียงกันของอาร์เอ็นเอเริ่มต้นเป็นสำคัญ เพราะถ้าอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ไม่เท่ากันจะมีผลอย่างมากต่อการวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน (Taylor *et al.*, 2018) นอกจากนั้นการสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธีการที่ 2 มีความปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงานมากกว่าเพราะไม่มีการใช้ phenol ที่มีความเป็นพิษทำให้มีอาการปวดหัว คลื่นไส้ และระคายเคืองทางเดินหายใจ (Sanprasert, 2020) อีกทั้งขั้นตอนในการสกัดก็ไม่ซับซ้อนสามารถปฏิบัติตามได้ง่าย ใช้สารเคมีไม่มาก ทำให้ช่วยประหยัดค่าใช้จ่าย และใช้ระยะเวลาไม่นานในการสกัดอาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพสูง

สรุป

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า วิธีการสกัดอาร์เอ็นเอวิธีที่ 2 เป็นวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดอาร์เอ็นเอจากลำต้นยางพารา เนื่องจากให้อาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพดี ไม่มีการปนเปื้อน

ของโปรตีน และมีความเข้มข้นสูง ทำให้อาร์เอ็นเอมีประสิทธิภาพในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-qPCR อีกทั้งยังเป็นวิธีการที่ง่าย สามารถปฏิบัติตามได้สะดวก และใช้เวลาในการสกัดไม่นาน เหมาะสำหรับการสกัดที่ใช้ตัวอย่างจำนวนมาก

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานปลัดกระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ขอขอบคุณสถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยี ชีวภาพเกษตร และทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 2 และห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก (ห้องชีวโมเลกุล) ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

เอกสารอ้างอิง

- Aiello, C., Andreozzi, P., Mesa, C.L. and Risuleo, G. 2010. Biological activity of SDS-CTAB cat-anionic vesicles in cultured cells and assessment of their cytotoxicity ending in apoptosis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 78: 149-154.
- Barbier, F.F., Chabikwa, T.G., Ahsan, M.U., Cook, S.E., Powell, R., Tanurdzic, M. and Beveridge, C.A. 2019. A phenol/chloroform-free method to extract nucleic acids from recalcitrant, woody tropical species for gene expression and sequencing. *Plant Methods* 15: 62-74.
- Chan, C.X., Teo, S.S., Ho, C.L., Othman, R.Y. and Phang, S.M. 2004. Optimization of RNA extraction from *Garcilaria changii* (Garcilariales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 16: 297-301.
- Chang, S., Puryear, J. and Cairney, J. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* 22: 1056-1068.
- Choopayak, C., Woranuch, K., Buarueang R. and Kongbunggerd, A. 2013. Comparison of three RNA extraction methods for gene expression analysis by RT-qPCR from Piperaceae Plants. *KKU Science Journal* 41: 1030-1042.
- Dash, P.K. 2013. High quality RNA isolation from polyphenol-, polysaccharide- and protein-rich tissues of lentil (*Lens culinaris*). *3 Biotech* 3: 109-114.
- Gambino, G., Perrone, I. and Griabudo, I. 2008. A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical Analysis* 19: 520-525.
- Gani, S.A., Chatteraj, D.K. and Mukherjee, D.C. 1999. Solubilization and binding of DNA-CTAB complex with SDS in aqueous media. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* 36: 233-239.
- Hu, C.G., Honda, C., Kita, M., Zhang, Z., Tsuda, T. and Moriguchi, T. 2002. A simple protocol for RNA isolation from fruit trees containing high levels of polysaccharides and polyphenol compounds. *Plant Molecular Biology Reporter* 20: 69a-69g.
- Office of Agricultural Economics. 2021. Export for all products of Natural rubber. Available from: http://impexp.oae.go.th/service/export.php?S_YEAR=2564&E_YEAR=2564&PRODUCT_GROUP=5265&wfsearch=&WF_SEARCH=Y [Accessed on 24 July 2021].
- Rubber Authority of Thailand. 2015. Rubber tree propagation by budding. Available from: <https://www.youtube.com/watch?v=kVwLh7SAgb4> [Accessed on 24 July 2021].
- Ratanasut, K. 2018. *Fundamental Molecular Genetics for Plant Research*. Phitsanulok: Naresuan University Publishing House.
- Rio, D.C., Jr, M.A., Hannon, G.J. and Nilsen, T.W. 2010. Purification of RNA by SDS solubilization and phenol extraction. *Cold Spring Harbor Protocols* 6: doi: 10.1101/pdb.prot 5438.
- Rodrigues, S.M., Soares, V.L., Oliveira, T.M., Gesteira, A.S., Otoni, W.C. and Costa, M.G. 2007. Isolation and purification of RNA from tissues rich in polyphenols, polysaccharides, and pigments of annatto (*Bixa orellana*). *Molecular Biotechnology* 37: 220-224.
- Rubio-Piña, J.A. and Zapata-Pérez, O. 2011. Isolation of total RNA from tissues rich in polyphenols and polysaccharides of mangrove plants. *Electronic Journal of Biotechnology* 14: doi: 10.2225/vol14-issue5-fulltext-8.
- Salzman, R.A., Fujita, T., Zhu-Salzman, K., Hasegawa, P.M. and Bressan, R.A. 1999. An improve RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. *Plant Molecular Biology Reporter* 17: 11-17.
- Sanprasert, K. 2020. Phenol. Available from: https://med.mahidol.ac.th/poisoncenter/sites/default/files/public/pdf/books/Toxic-Substance112_Phenol.pdf [Accessed on 5 December 2020].
- Tattersall, E.A.R., Ergul, A., Alkayal, F., Deluc, L. Cushman, J.C. and Cramer, G.R. 2005. Comparison of methods for isolating high-quality RNA from leaves of grapevine. *American Journal of Enology Viticulture* 56: 400-406.
- Taylor, S.C., Nadeau, K., Abbasi, M., Lachance, C., Nguyen, M. and Fenrich, J. 2018. The ultimate qPCR experiment: producing publication quality, reproducible data the first time. *Trends in Biotechnology* 37: 761-774.
- Toni, L.S., Garcia, A.M., Jeffrey, D.A., Jiang, X., Stauffer, B.L., Miyamoto, S.D. and Sucharov, C.C. 2018. Optimization of phenol-chloroform RNA extraction. *MethodsX* 5: 599-608.
- Wang, T., Zhang, N. and Du, L. 2005. Isolation of RNA of high quality and yield from Ginkgo biloba leaves. *Biotechnology Letters* 27: 629-633.
- Wang, X., Tian, W. and Li, Y. 2008. Development of an efficient protocol of RNA isolation from recalcitrant tree tissues. *Molecular Biotechnology* 38: 57-64.
- Zhang, S. and Teng, H.N. 2008. Rheology and microstructure studies of SDS/CTAB/H₂O system. *Colloid Journal* 70: 105-111.