



การเปรียบเทียบการสกัดอาร์เอ็นเอสามวิธีเพื่อใช้ในการศึกษา
การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-qPCR จากพืชวงศ์พริกไทย
Comparison of Three RNA Extraction Methods for
Gene Expression Analysis by RT-qPCR from Piperaceae Plants

ชนนิษฐ์ ชูพยัคฆ์^{1,2*} กำไร วรณัฐ³ รัตติกานต์ บัวเรือง¹ และ อนุพันธ์ กองบังเกิด³

บทคัดย่อ

พืชในวงศ์พริกไทยเป็นพืชสมุนไพรที่อยู่คู่สังคมไทยมานาน พบว่าสารเซสควิเทอร์ปีนซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ในพืชกลุ่มนี้มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่น่าสนใจ แต่มีราคาสูงเนื่องจากโครงสร้างโมเลกุลที่ซับซ้อน ทำให้ยากต่อการผลิตโดยกระบวนการเคมี การใช้เทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วย จึงเป็นทางเลือกที่จะสามารถผลิตสารที่มีคุณภาพดีและราคาถูกได้ ในการนี้ต้องทราบการควบคุมการแสดงออกของยีนสำหรับเอนไซม์ในวิถีการสังเคราะห์สาร ซึ่งต้องการอาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพดีแต่ปัญหาอุปสรรคที่พบในการสกัดอาร์เอ็นเอจากพืชวงศ์นี้คือ ในใบพืชมีสารประกอบฟีนอลิกสูงและมีคลอโรฟิลล์สูง วัตถุประสงค์ของงานวิจัยชิ้นนี้เพื่อที่จะหาวิธีการที่มีประสิทธิภาพที่จะสามารถสกัดแยกเออาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพสูงออกมาจากใบพลู ใบชะพลู และใบติปลี่ จากการเปรียบเทียบวิธีสกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้ RNeasy[®] Plant Mini kit (QIAGEN[®]), TRIzol[®] Reagent (Life technologiesTM) และ Easy-REDTM Total RNA Extraction (iNtRON Biotechnology) พบว่าการใช้ชุด RNeasy[®] Plant เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพที่สุด สามารถสกัดอาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพสูง ปริมาณสม่ำเสมอ จากพืชทั้งสามชนิดที่ทดสอบ เมื่อนำอาร์เอ็นเอไปวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-qPCR พบว่าอาร์เอ็นเอนี้สามารถใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณทรานสคริปต์ของ *Actin* และ *Sesquiterpene synthase* ได้ ชุดสกัดอาร์เอ็นเอ RNeasy[®] Plant จึงเป็นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการสกัดอาร์เอ็นเอจากพืชวงศ์พริกไทยเพื่อใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนและการศึกษาพืชในระดับโมเลกุล

¹ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก 65000

²สถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการ ด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก 65000

³ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก 65000

*Corresponding Author, E-mail: chonnanitc@nu.ac.th

ABSTRACT

Piperaceae plants are medicinal herbs that coexist with Thai society for a long time. Sesquiterpenes, the active components of those plants, have pharmacological interest. However, the complexity of molecular structure makes them still be expensive. Biotechnology should be the better choice for high quality and cheap chemical production. To achieve that goal, the regulation of biosynthetic gene expression needed to be studied that requires high quality of RNA. However, high phenolics and high chlorophyll contents in leaves obstructed RNA isolation from Piperaceae. The aim of this work was to obtain the efficient method for RNA isolation from *P. betle*, *P. sarmentosum* and *P. retrofractum* leaf. By comparison between different methods, RNeasy[®] Plant Mini kit (QIAGEN[®]), TRIzol[®] Reagent (Life technologies[™]) and easy-RED[™] RNA extraction (iNtRON Biotechnology), it was found that RNeasy[®] Plant was the most efficient method. RNA isolated from RNeasy[®] Plant method was high quality, integrity and equal amount from three tested plant species. Afterwards, RNeasy[®] Plant - isolated RNA was further used for gene expression analysis using RT-qPCR technique. It was demonstrated that the RNA could be used as a template for *Actin* and *Sesquiterpene synthase* transcript amplification. Taken together, RNeasy[®] Plant Mini kit was the ideal method for isolation of RNA from Piperaceae plants using for gene expression analysis and molecular study.

คำสำคัญ: พืชวงศ์พริกไทย วิธีการสกัดอาร์เอ็นเอ เทคนิค RT-qPCR

Keywords: Piperaceae plants, RNA isolation method, RT-qPCR

บทนำ

พืชในวงศ์พริกไทย (Piperaceae) ได้แก่ พลู่ (*Piper betle* Linn.) ขะพลู่ (*Piper sarmentosum* Roxb.) และ ดีปลี (*Piper retrofractum* Vahl.) เป็นต้น เป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางยามากมาย ตั้งแต่อดีตกาลถูกใช้ในตำรายาไทย (Thai Pharmacopoeia) สามารถปลูกและเจริญเติบโตได้ดีในทุกครัวเรือน ทุกภาคของประเทศ ไทย มีคุณค่าทั้งทางเศรษฐกิจ สังคม และวัฒนธรรมของคนไทยเป็นอย่างมาก พลู่ถูกใช้รับประทานพร้อมปูนแดงและหมาก ใช้ประกอบพิธีกรรมศักดิ์สิทธิ์ในงานบุญ ขะพลู่ถูกใช้รับประทานในอาหารประเภทแกง เป็น

ส่วนประกอบของอาหารเมี่ยงคำ ดีปลีถูกใช้เป็นเครื่องเทศ เป็นต้น แต่คนรุ่นปัจจุบันไม่ค่อยเห็นความสำคัญของพืชวงศ์นี้ ดังนั้นควรมีการศึกษาเกี่ยวกับพืชกลุ่มนี้ให้มากขึ้น เพื่อให้เห็นถึงคุณค่าที่แฝงอยู่ ทำให้สามารถใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพของบ้านเราได้อย่างเต็มที่ โดยเฉพาะการศึกษาเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ บทบาทของสารในธรรมชาติ และกลไกการสังเคราะห์สารในพืชในระดับโมเลกุล ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาวิธีการเพิ่มการผลิตสารที่มีคุณภาพดี ราคาถูก และปริมาณเพียงพอต่อการที่จะนำไปประยุกต์ใช้

ทางด้านการแพทย์ เกษษวิทยา และทางด้านการเกษตรต่อไปได้

จากรายงานของฐานข้อมูลน้ำมันหอมระเหยไทย และจากผลการศึกษาของคณะผู้วิจัยที่ทำการศึกษามาก่อนหน้านี้พบว่าองค์ประกอบทางเคมีที่พบในน้ำมันหอมระเหยของพืชวงศ์นี้จะอยู่ในกลุ่มฟีนิลโพรพานอยด์และกลุ่มเซสควิเทอร์ปีน (Qin et al., 2010) ได้แก่ β -caryophyllene (Choopayak et al., 2010) สารนี้มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ (Gertsch et al., 2008; Ugusman et al., 2011) ด้านมะเร็ง (Zheng et al., 1992) มีฤทธิ์เป็นยาชาเฉพาะที่ (Ghelardini et al., 2001) และมีฤทธิ์กำจัดจุลชีพ (Nalina and Rahim, 2007; Ramji et al., 2002) เป็นสารที่พืชใช้เพื่อข่มการเจริญเติบโตของพืชอื่น (allelopathy) (Pukclai and Kato-Noguchi, 2011) ทั้งๆที่มีคุณค่ามากมาย แต่การใช้ประโยชน์จากสารในกลุ่มนี้ยังคงมีอยู่อย่างจำกัด ข้อจำกัดที่สำคัญคือ ความยากในการผลิต เนื่องจากโครงสร้างโมเลกุลที่ซับซ้อนทำให้การผลิตโดยกระบวนการทางเคมีทำได้ยาก เป็นผลให้ราคาของสารนี้ยังคงสูงอยู่ (β -caryophyllene ผลิตภัณฑ์ของ Sigma ราคาประมาณ 5,000 บาทต่อมิลลิลิตร) ดังนั้นการใช้เทคโนโลยีภาพเข้ามาช่วย ได้แก่ การใช้พืชเป็นแหล่งผลิตสาร หรือการให้แบคทีเรียเป็นแหล่งของการผลิตสารที่ได้จากยีนของพืช จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ แต่การจะใช้เทคโนโลยีทางชีวภาพได้นั้นจำเป็นที่จะต้องเข้าใจถึงกระบวนการผลิตสารในพืชก่อน ว่ายีนสำหรับเอนไซม์หลักของวิถีชีวสังเคราะห์ มีลักษณะโมเลกุลอย่างไร และมีกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนอย่างไร มีปัจจัยอะไรเป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีน ยีนนั้นมีการแสดงออกเมื่อไหร่แสดงออกที่ไหน เป็นต้น ข้อมูลพื้นฐานดังกล่าวจะ

สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการเพิ่มการผลิตสารด้วยเทคโนโลยีชีวภาพได้

โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาโดยใช้เทคนิค real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) ที่มีความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (selectivity) สูงนั้น ต้องการอาร์เอ็นเอเริ่มต้นที่มีคุณภาพสูง มีความบริสุทธิ์ปราศจากสารปนเปื้อน (purity) มีความสมบูรณ์ไม่แตกหัก (integrity) มีปริมาณที่เพียงพอ และปริมาณที่ใกล้เคียงกันในแต่ละตัวอย่างที่ต้องการศึกษาเปรียบเทียบ ซึ่งทำให้เป็นปัญหาต่อการศึกษาพืชวงศ์พริกไทยในระดับโมเลกุล เนื่องจากพืชวงศ์นี้มีข้อจำกัดที่เป็นปัญหาและอุปสรรคที่สำคัญคือ ในเนื้อเยื่อส่วนใบของพืช มีสารประกอบฟีนอลิกสูงและมีคลอโรฟิลล์สูง ทำให้ปนเปื้อนออกมาพร้อมอาร์เอ็นเอส่งผลให้อาร์เอ็นเอนั้นไม่สามารถนำไปใช้ในการศึกษาระดับโมเลกุลต่อได้ ดังนั้นการหาวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอที่มีประสิทธิภาพจึงเป็นขั้นตอนเริ่มต้นที่สำคัญสำหรับการศึกษาพืชวงศ์พริกไทยในระดับโมเลกุลต่อไป

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอจากใบของพืชวงศ์พริกไทย 3 ชนิดคือ พลู่ ชะพลู และติปลี่ โดยใช้วิธีการสกัด 3 วิธี คือ 1. RNeasy[®] Plant (QIAGEN, Germany) 2. TRIzol[®] Reagent (Life technologiesTM, USA) และ 3. easy-REDTM (iNtRON Biotechnology, Korea) หลังจากนั้นวัดปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ ด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer และทำการวิเคราะห์ใน agarose gel electrophoresis แล้วนำอาร์เอ็นเอไปวิเคราะห์การแสดงออกของยีนหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณทรานสคริปของยีน *sesquiterpene synthase (STS)* ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารเซสควิเทอร์ปีนเทียบกับยีนควบคุม

Actin (Actin) ซึ่งเป็น house keeping gene สำหรับโปรตีนโครงสร้างซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวกับการเคลื่อนไหว และพบว่าการแสดงออกของยีนไม่ขึ้นอยู่กับปัจจัยบำบัดที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้

วิธีการดำเนินการวิจัย

ตัวอย่างพืช

ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้คือ ใบพลู ใบชะพลู และใบตี่ปี่ ซึ่งได้มาจากพืชที่ปลูกในโรงเรือนเพาะเลี้ยง ของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก โดยได้ทำการเก็บตัวอย่างใบพืชในช่วงเดือนพฤษภาคม 2556 ทำความสะอาดด้วยน้ำประปา ชักให้แห้ง ชั่งตัวอย่าง 0.1 กรัม ห่อด้วยกระดาษอลูมิเนียม แล้วนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวก่อนที่จะนำมาสกัดอาร์เอ็นเอ

การสกัดอาร์เอ็นเอ

วิธี RNeasy[®] Plant Mini kit

สกัดอาร์เอ็นเอตามคู่มือการสกัดจากบริษัท โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. บดใบพืชแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว 0.1 กรัม ด้วยโกร่ง จนได้เป็นผงละเอียดสีเขียวถ่ายผงใส่หลอด 1.5 มล.
2. เติมน้ำฟอว์ RLT 450 μ l ลงในหลอด ผสมอย่างแรงให้เข้ากันทันที
3. ดูดสารผสมที่ได้ใส่ลงในคอลัมน์ QIA shredder spin
4. ปั่นด้วยความเร็ว 8000xg ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 นาที ดูดของเหลวที่ผ่านคอลัมน์ออกมาใส่หลอดใหม่
5. เติมน้ำ 96% เอทานอลปริมาตรครึ่งเท่า ผสมให้เข้ากัน แล้วดูดสารผสมที่ใส่น้ำในคอลัมน์ RNeasy Mini spin

6. ปั่นด้วยความเร็ว 8000xg ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 วินาที เก็บคอลัมน์ไปทำต่อ
7. เติมน้ำฟอว์ RW1 700 μ l ลงในคอลัมน์ ปั่นด้วยความเร็ว 8000xg ที่อุณหภูมิห้อง 15 วินาที ที่ทิ้งของเหลว เก็บคอลัมน์ไปทำต่อ
8. เติมน้ำฟอว์ RPE 500 μ l ลงในคอลัมน์ ปั่นด้วยความเร็ว 8000x g ที่อุณหภูมิห้อง 15 วินาที ที่ทิ้งของเหลว เก็บคอลัมน์ไปทำต่อ
9. เติมน้ำปราศจาก RNase ปริมาตร 50 μ l ลงในคอลัมน์ นำไปปั่นด้วยความเร็ว 8000x g ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 วินาที เก็บสารละลายอาร์เอ็นเอ

วิธี TRIzol[®] Reagent

สกัดอาร์เอ็นเอทำตามคู่มือการสกัดจากบริษัท โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. บดใบพืชแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว 0.1 กรัม ด้วยโกร่ง จนได้เป็นผงละเอียดสีเขียว ถ่ายผงใส่หลอด 1.5 มล.
2. เติมน้ำฟอว์ Trizol 1 มล. ลงในหลอด ผสมอย่างแรงให้เข้ากันทันที
3. นำไปปั่นที่ 12,000xg ที่อุณหภูมิ +4 °C เป็นเวลา 10 นาที เก็บของเหลวใสส่วนบนถ่ายใส่หลอดใหม่
4. เติมน้ำคลอโรฟอร์ม 0.2 มล. เขย่าอย่างแรง แล้ววางไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 3 นาที
5. นำไปปั่นที่ 12,000xg ที่อุณหภูมิ +4 °C เป็นเวลา 15 นาที
6. ดูดของเหลวส่วนบนใสหลอดใหม่
7. เติมน้ำ isopropanol 0.5 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
8. นำไปปั่นที่ 12,000xg ที่อุณหภูมิ +4 °C เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนอาร์เอ็นเอ และล้างตะกอนด้วย 70% เอทานอล ปริมาตร 0.5 มล.

9. นำไปปั่นที่ 7500xg ที่อุณหภูมิ +4 °C เป็นเวลา 5 นาที เทของเหลวทิ้ง ระเหยของเหลวออก

10. ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอในน้ำปราศจาก RNase ปริมาตร 20 μ l

วิธี easy-RED™ Total RNA Extraction

สกัดอาร์เอ็นเอทำตามคู่มือการสกัดจากบริษัท โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. บดใบพืชแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว 0.1 กรัม ด้วย โกร่ง จนได้เป็นผงละเอียดสีเขียว ถ่ายผงใส่หลอด 1.5 มล.

2. เติมน้ำ easy-RED™ solution 750 μ l ลงในหลอด ผสมอย่างแรงให้เข้ากันทันที

3. วางหลอดไว้ในอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที

4. นำไปปั่นที่ 12,000xg ที่อุณหภูมิ +4 °C เป็นเวลา 10 นาที เก็บของเหลวใสส่วนบนปริมาตร 400 μ l ใส่หลอดใหม่

5. เติมน้ำ 0.8M Sodium citrate/1.2M NaCl 250 μ l และ isopropanol 250 μ l ลงในหลอดผสมให้เข้ากัน วางไว้ในอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

6. นำไปปั่นที่ 12,000xg ที่อุณหภูมิ +4 °C เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนอาร์เอ็นเอและล้างตะกอนด้วย 70% เอทานอลปริมาตร 0.5 มล.

7. นำไปปั่นที่ 7500xg ที่อุณหภูมิ +4 °C เป็นเวลา 5 นาที เทของเหลวทิ้ง ระเหยของเหลว

8. ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอในน้ำปราศจาก RNase ปริมาตร 20 μ l

การบำบัดอาร์เอ็นเอหลังสกัด และการตรวจวิเคราะห์อาร์เอ็นเอที่สกัดได้

1. หลังจากได้สารละลาย RNA แล้ว นำอาร์เอ็นเอที่ได้ไปบำบัดด้วย DNase (Sigma, USA) และหยุดปฏิกิริยาด้วย stop solution ของชุด DNase

2. วิเคราะห์หาปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง Nanodrop spectrophotometer และ 1% agarose gel electrophoresis

3. เก็บสารละลายอาร์เอ็นเอที่ -80 °C พร้อมสำหรับนำไปสังเคราะห์ cDNA

การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA)

การสร้าง cDNA สายแรกจากอาร์เอ็นเอโดยการทำปฏิกิริยาในหลอดที่มีอาร์เอ็นเอ 500 นาโนกรัม ไพรเมอร์ Oligo dT₁₂₋₁₈ (Invitrogen, USA) RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Scientific, USA) และ RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, USA) หลังจากบ่มที่ 42 °C เป็นเวลา 90 นาที จะได้ cDNA ที่พร้อมสำหรับทำ RT-qPCR

การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Real-Time quantitative PCR (RT-qPCR)

โดยใช้ cDNA เป็นต้นแบบ ทำปฏิกิริยาด้วยชุด iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (BIO-RAD, USA) และไพรเมอร์ที่จำเพาะ โดย 1 ตัวอย่าง ทำการเพิ่มปริมาณ 2 ยีน คือ ยีน *Actin* ใช้เป็นยีนควบคุม และยีน *STS* สำหรับเอนไซม์ sesquiterpene synthase ซึ่งเป็นยีนที่ต้องการศึกษาการแสดงออก โดยในหลอดที่เพิ่มปริมาณยีนควบคุมจะใช้ไพรเมอร์ Actin-F 5'-CATGAGACTACATACAACTCCATC-3' และ Actin-R 5'-TCGTA CTAGCCTTGGCAATCCAC-3' สำหรับหลอดที่วัดการแสดงออกของยีน *STS* จะใช้ไพรเมอร์ STS-F 5'-CGATATAGAAGGCATGTTGAGC-3' และ STS-R 5'-CATGAGATTGACCTCCTTGC-3' หลังจากผสมปฏิกิริยาเสร็จจะนำไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง C1000 Touch Thermal cycler รุ่น CFX96 Real-Time system (BIO-RAD, USA) โดยสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาคือ ที่อุณหภูมิ 96 °C เวลา 3 นาที แล้วต่อด้วย 30 รอบของ 96 °C 10 วินาที 55 °C 10 วินาที

หลังจากนั้นเป็นการวัดจุดหลอมเหลวของผลิตภัณฑ์โดยตั้งสภาวะที่ 95 °C เป็นเวลา 10 วินาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิจาก 65 °C ถึง 95 °C โดยเพิ่มทีละ 0.5 °C เป็นเวลา 5 วินาที หลังจากนั้นวิเคราะห์ผลที่ได้ด้วยโปรแกรม CFX managerTM version 3 การแสดงออกของยีน *STS* รายงานเป็นจำนวนเท่าของความสัมพันธ์ (relative normalized expression; $\Delta\Delta Cq$) ระหว่างยีน *STS* และยีนควบคุม *Actin*

ผลการวิจัย

พืชวงศ์พริกไทยที่ใช้ในการศึกษา คือ พลูชะพลู และติปลี (รูปที่ 1) ใบของพืชในวงศ์นี้มีสารประกอบฟีนอลิกสูง และมีคลอโรฟิลล์สูง ทำให้เป็นอุปสรรคต่อการสกัดอาร์เอ็นเอให้มีคุณภาพดีเพียงพอที่จะนำไปใช้ในการศึกษาระดับโมเลกุลต่อไป การวิจัยนี้ได้ทำการสกัดอาร์เอ็นเอ โดยเปรียบเทียบวิธีการสกัด 3 วิธีคือ วิธี RNeasy[®] Plant Mini kit วิธี TRIzol[®] Reagent และวิธี easy-REDTM total RNA extraction พืชแต่ละชนิดจะทำการศึกษา 2 ซ้ำ โดยเก็บใบพืชจากพืชต้นเดียวกัน ที่ช่วงเวลาเดียวกัน และ

ใบพืชมีอายุ ขนาด ความสมบูรณ์ของใบเท่ากัน (รูปที่ 1)

เมื่อได้อาร์เอ็นเอแล้ว นำอาร์เอ็นเอที่ได้ไปวัดปริมาณ และคุณภาพโดยการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง ที่ความยาวคลื่น 230 260 และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Nanodrop Spectrophotometer (ตารางที่ 1) ผลที่ได้ แสดงให้เห็นว่าวิธี RNeasy Plant Mini kit เป็นวิธีการที่สกัดอาร์เอ็นเอได้ดีจากพืชทั้ง 3 ชนิด อาร์เอ็นเอที่ได้มีปริมาณเพียงพอที่จะนำไปทำ RT-qPCR ได้ มีความสม่ำเสมอ ปริมาณใกล้เคียงกันในการสกัดแต่ละครั้ง มีความบริสุทธิ์จากการปนเปื้อนของโปรตีนสูง ดูได้จากค่า OD260/280 ที่มีค่ามากกว่า 1.8 จากค่า OD260/230 ที่มีค่ามากกว่า 1.0 แสดงว่ายังมีการปนเปื้อนสารประกอบฟีนอลิกอยู่บ้างแต่ไม่สูงนัก สำหรับวิธีการใช้ TRIzol Reagent และ easy-RED นั้น พบว่าให้ผลในการสกัดที่ไม่สม่ำเสมอ อาร์เอ็นเอที่ได้จากใบพลูและใบชะพลูมีทั้งที่ดีและไม่ดี มีเพียงบางตัวอย่างเท่านั้นที่สามารถนำไปทำ RT-qPCR ต่อได้ ในขณะที่สกัดอาร์เอ็นเอจากใบติปลีได้ในปริมาณที่ต่ำมากจนถึงไม่ได้เลยไม่เพียงพอที่จะนำไปทำ RT-qPCR ต่อได้



รูปที่ 1 พืชที่ใช้ในการศึกษา (ก) พลู (ข) ชะพลู และ (ค) ติปลี

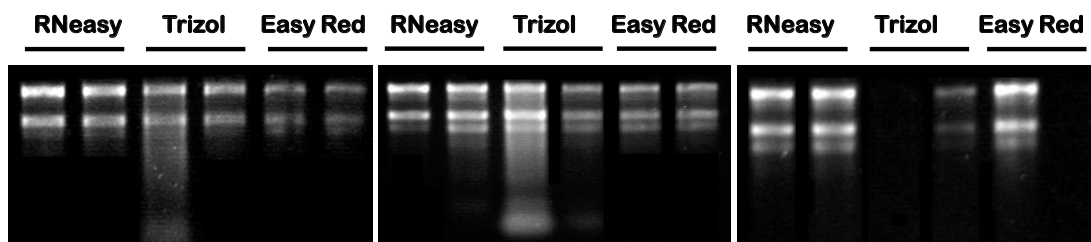
ตารางที่ 1 ผลการสกัดอาร์เอ็นเอจากใบพลู ใบชะพลู และใบติปลี ด้วยวิธี RNeasy Plant, TRIzol Reagent และ easy-REDTM แต่ละตัวอย่างทำ 2 ซ้ำจากตัวอย่างที่เก็บจากธรรมชาติพร้อมกัน

เนื้อเยื่อ	RNA extraction method	ปริมาณ	คุณภาพ	
		[RNA] ng/ μ l	OD260/280	OD260/230
ใบพลู	RNeasy Plant mini kit	108.88	2.25	0.83
	RNeasy Plant mini kit	118.47	2.24	1.04
	TRIzol Reagent	146.46	1.88	1.23
	TRIzol Reagent	81.08	2.17	0.27
	easy-RED RNA extraction kit	18.08	2.12	0.91
	easy-RED RNA extraction kit	16.85	2.12	0.51
ใบชะพลู	RNeasy Plant mini kit	112.02	2.16	1.06
	RNeasy Plant mini kit	129.24	2.18	1.07
	TRIzol Reagent	218.76	2.00	1.53
	TRIzol Reagent	64.23	2.04	0.81
	easy-RED RNA extraction kit	58.01	2.12	1.09
	easy-RED RNA extraction kit	39.7	2.12	0.65
ใบติปลี	RNeasy Plant mini kit	126.55	2.18	1.15
	RNeasy Plant mini kit	126.93	2.19	1.11
	TRIzol Reagent	22.58	1.78	0.18
	TRIzol Reagent	53.11	1.97	0.78
	easy-RED RNA extraction kit	80.85	2.14	1.23
	easy-RED RNA extraction kit	0	0	0

ก) RNA สกัดจากใบพลู

ข) RNA สกัดจากใบชะพลู

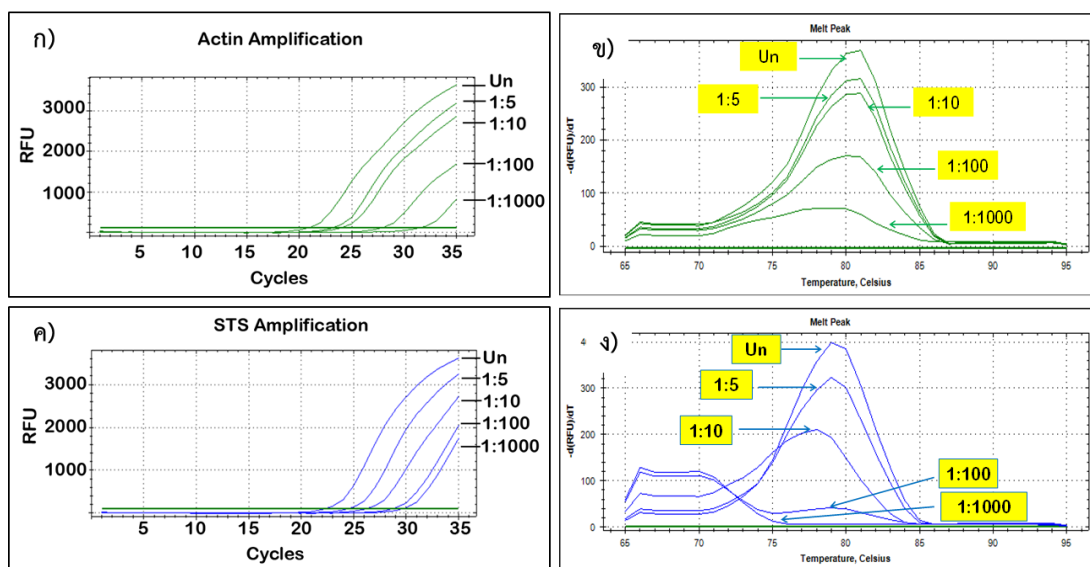
ค) RNA สกัดจากใบติปลี



รูปที่ 2 ผลการวิเคราะห์อาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากใบ (ก) พลู (ข) ชะพลู (ค) ติปลีโดยใช้วิธีการ RNeasy[®] Plant Mini Kit, TRIzol[®] Reagent และ easy-RED[®] Reagent ใน 1% agarose gel electrophoresis แต่ละตัวอย่างจะทำ 2 ซ้ำ

นอกจากนั้นยังทำการวิเคราะห์อาร์เอ็นเอโดยการใช้อิเล็กโตรโฟรีซิสใน 1% agarose gel (รูปที่ 2) ผลจากเจลสอตกคล้องกับผลการวัดอาร์เอ็นเอ ด้วยเครื่อง Nanodrop ผลที่ได้เห็นชัดเจนว่าวิธี RNeasy นั้นสามารถสกัดอาร์เอ็นเอที่ดีได้จากพืชทั้ง 3 ชนิด อาร์เอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพดี ปริมาณเพียงพอ ขณะที่วิธี TRIzol และวิธี easy-RED นั้นให้ผลอาร์เอ็นเอที่ไม่สม่ำเสมอ บางครั้งได้ผลดี บางครั้งได้อาร์เอ็นเอที่มีการแตกหัก บางครั้งได้อาร์เอ็นเอปริมาณน้อยจนถึงน้อยมากไม่เพียงพอที่จะนำไปศึกษาต่อ เมื่อนำอาร์เอ็นเอที่ได้จากวิธีการสกัด RNeasy Plant ไปวิเคราะห์ต่อด้วยการสร้าง cDNA แล้วนำ cDNA ไปหาประสิทธิภาพของการทำ real time โดยการเจือจาง cDNA ที่ใช้เป็นต้นแบบของปฏิกิริยาเป็นลำดับจาก 1:5 1:10 1:100 และ 1:1000 จากผล RT-qPCR ด้วยไพรเมอร์สำหรับ

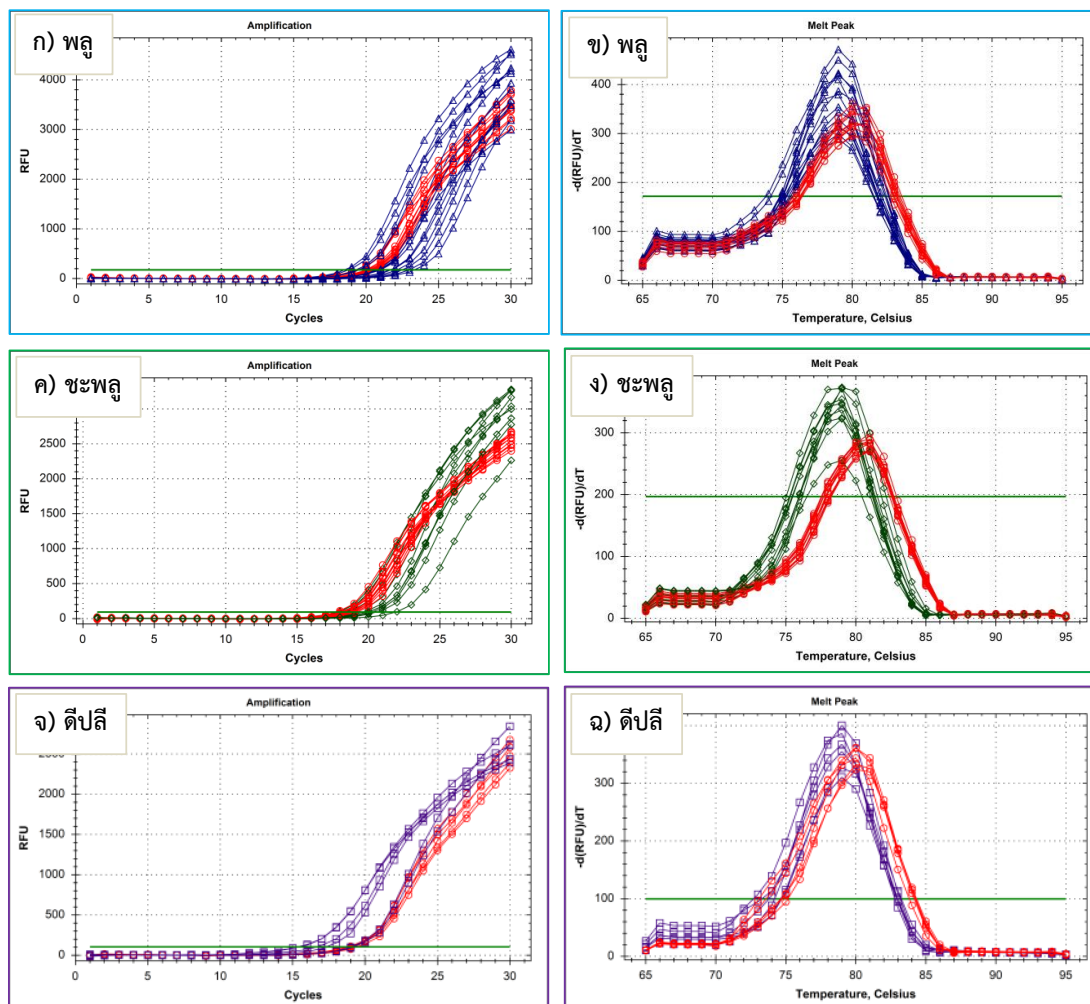
ยีน *Actin* ในรูปที่ 3ก และ ข แสดงให้เห็นว่าอาร์เอ็นเอที่เจือจาง 1:5 และ 1:10 นั้นให้ผลใกล้เคียงกัน คือสามารถใช้ทั้งสองความเข้มข้นทำ PCR ได้ ในขณะที่ความเข้มข้นที่ต่ำลงมาให้ผลิตภัณฑ์ PCR ที่น้อยไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการวิเคราะห์ในขณะที่ได้ผล RT-qPCR ด้วยไพรเมอร์สำหรับยีน *STS* ในรูปที่ 3ค และ 3ง ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่เหมาะสมที่จะใช้วิเคราะห์การแสดงออกของยีน *STS* นั้น ควรจะเป็น 1:5 เนื่องจากความเข้มข้นที่ต่ำกว่านี้จะให้ผลิตภัณฑ์ที่ต่ำลงมาก และจากการวิเคราะห์จุดหลอมเหลวของผลิตภัณฑ์พบว่า ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากไพรเมอร์ *Actin* และ *STS* มีจุดหลอมเหลวที่ 81 °C และ 79 °C ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับจุดหลอมเหลวของผลิตภัณฑ์ *Actin* และ *STS* ที่ควรจะเป็น



รูปที่ 3 ผลการหาประสิทธิภาพของ RT-qPCR โดยใช้ cDNA ที่ได้จากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากใบพลู โดยวิธี RNeasy Plant Mini kit แล้วนำมาเจือจางที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ ไม่เจือจาง (Un) เจือจางที่ความเข้มข้น 1:5 1:10 1:100 และ 1:1000 ก่อนที่จะทำ RT-qPCR ด้วยไพรเมอร์สำหรับยีน *Actin* (ก และ ข) และ *STS* (ค และ ง)

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำ qPCR แล้ว จึงได้ทดสอบกับตัวอย่างที่ต้องการทดสอบจริง โดยนำใบพลู ใบชะพลู และใบติปลี ที่เก็บจากธรรมชาติในช่วงเวลาต่าง ๆ ของวัน มาสกัดอาร์เอ็นเอ ด้วยวิธี RNeasy Plant แล้วนำอาร์เอ็นเอมาทำ RT-

qPCR พบว่าอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ และสภาวะที่ทดสอบนั้นสามารถใช้ในการวัดปริมาณการแสดงออกของยีน STS ได้ โดยวัดเป็นจำนวนเท่าความสัมพันธ์ระหว่างยีน STS กับยีน *Actin* (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 ผลการทำ RT-qPCR โดยใช้ cDNA ที่ได้จากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากใบพลู ใบชะพลู และใบติปลีที่เก็บจากธรรมชาติในช่วงเวลาต่าง ๆ ของวัน (ก และ ข) จากใบพลู (ค และ ง) จากใบชะพลู (จ และ ฉ) จากใบติปลี

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

พืชวงศ์พริกไทยนั้น แม้ว่าจะมีคุณค่า และมีประโยชน์มากมาย แต่ยังไม่ค่อยมีการศึกษาในเชิงลึกในระดับโมเลกุลมากนัก ทำให้พบรายงานการวิจัยจะเป็นการศึกษาเกี่ยวกับการสกัดดีเอ็นเอของพืชในวงศ์พริกไทยหลายชนิด ได้แก่ พริกไทย (*P. nigrum*) พลู่ (*P. betle*) ชะพลู (*P. sarmentosum*) ดีปลี (*P. retrofractum*) *P. colubrinum*, *P. pendulispicum*, *P. ribesoides* (Azevedo et al., 2003; Parker et al., 2007) แต่ยังไม่มียารายงานการศึกษาในระดับอาร์เอ็นเอ หรือการศึกษาการแสดงออกของยีนเลย อุปสรรคใหญ่ที่ทำให้ยังไม่มีการศึกษาอาร์เอ็นเอนั้น น่าจะเป็นเพราะความยากในการที่จะสกัดอาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพดีออกมาจากพืชวงศ์นี้ได้ เนื่องจากในใบของพืช มีสารทุติยภูมิเป็นองค์ประกอบมาก ไม่ว่าจะเป็นสารประกอบฟีนอลิก สารอินทรีย์ระเหยง่ายหรือสารอัลคาลอยด์เป็นต้น จากผลการตรวจวัดชนิดของสารอินทรีย์ระเหยง่ายในน้ำมันหอมระเหยจากใบของพลู่ ชะพลู และดีปลี จากจังหวัดพิษณุโลก โดยใช้ตัวอย่างเดียวกับที่นำมาสกัดอาร์เอ็นเอในการศึกษาครั้งนี้ ด้วยวิธี GC-MS พบว่าสารประกอบหลักในน้ำมันจากใบพืชทั้งสามชนิดเป็นสารประกอบฟีนอลิกน้ำมันพลูพบ isoeugenol 34.75% น้ำมันจากใบชะพลูพบ croweasin 22.62% และ isoeugenol 16.7% น้ำมันจากใบดีปลีพบ crowesin 22.6% (ข้อมูลยังไม่ได้เผยแพร่) พบว่าสารเหล่านี้เมื่อถูกออกซิไดซ์จะเข้าจับกับอาร์เอ็นเออย่างถาวร โดยเฉพาะในขั้นตอนการสกัดที่ไม่มีประสิทธิภาพ สารออกซิไดซ์เหล่านี้จะเข้าจับกับอาร์เอ็นเอ และไม่สามารถกำจัดแยกสารปนเปื้อนออกไปได้ ทำให้อาร์เอ็นเอไม่บริสุทธิ์ไม่สามารถนำอาร์เอ็นเอนั้นไปใช้ได้ ดังนั้นเพื่อให้ได้อาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพดี มีความบริสุทธิ์สูง และมีความสมบูรณ์ไม่

มีการแตกหักจากพืชวงศ์พริกไทยนั้น จำเป็นที่จะต้องหาวิธีการที่มีประสิทธิภาพเหมาะสมสำหรับการสกัดอาร์เอ็นเอจากผลการสกัดอาร์เอ็นเอจากพืชในวงศ์อื่นที่มีปัญหาล้ำกันคือมีสารทุติยภูมิสูง ได้แก่ องุ่น (*Vitis rotundifolia* Michx) (Louime et al., 2008; Reid et al., 2006) เมล็ดกาแฟ (*Coffea Arabica*) (Cordeiro et al., 2008) ผลลูกพีช (*Prunus persica*) (Meisel et al., 2005) สาหร่าย (*Laminaria japonica*) (Yoa et al., 2009) ใบพืชพื้นเมืองบราซิล (Cordeiro et al., 2008) และหนามของต้นไพน์ (*Pinus pinaster* Ait.) (Azevedo et al., 2003) พบว่าวิธีการในการสกัดที่เหมาะสมสำหรับพืชแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันโดยส่วนใหญ่แล้วจะใช้วิธีการที่ต้องเตรียมน้ำยาสกัดเอง ซึ่งมีส่วนผสมของเกลือความเข้มข้นสูง CTAB และ PVP บางกรณีมีการใช้ LiCl ในการตกตะกอนอาร์เอ็นเอ ส่วนใหญ่พบว่าวิธี guanidium thiocyanate การใช้ phenol chloroform การใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป หรือชุดสกัดสำเร็จรูปมักไม่ประสบความสำเร็จ จากความหลากหลายของวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอ จากพืชที่มีสารทุติยภูมิสูงชนิดต่าง ๆ นั้น บ่งบอกว่าวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอมาตรฐานที่ใช้อยู่โดยทั่วไป ที่สกัดบนพื้นฐานของ guanidine thiocyanate-phenol chloroform นั้น ไม่น่าจะเป็นวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดอาร์เอ็นเอจากพืชวงศ์พริกไทยได้

ทางกลุ่มผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบหาวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการที่จะสกัดอาร์เอ็นเอจากพืชวงศ์นี้ ที่มีคุณภาพดีเพียงพอที่จะนำไปใช้ทำ RT-quantitative PCR ได้ เทคนิคนี้มีความไวและมีความจำเพาะสูงในการวัดปริมาณการแสดงออกของยีน แต่ข้อเสียคือมีความไวต่อสารปนเปื้อนที่ติดมากับอาร์เอ็นเอ ปฏิกริยาจะถูกยับยั้งในสถานะที่มีสาร

ปนเปื้อนในอาร์เอ็นเอ ทำให้เป็นอุปสรรคในการศึกษาวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณระหว่างตัวอย่าง ปริมาณอาร์เอ็นเอเริ่มต้น และสารปนเปื้อนในอาร์เอ็นเอนั้นจะมีผลต่อการเพิ่มปริมาณผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาเป็นอย่างมาก ในการศึกษาครั้งนี้ได้เปรียบเทียบวิธีการสกัดจากชุดทางการค้า 3 ชุดคือ ชุด RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany) ซึ่งสกัดอาร์เอ็นเอบนพื้นฐานของเยื่อ silica microspin technology และบัฟเฟอร์ที่มีส่วนผสมของ guanidine-thiocyanate วิธีที่ 2 คือน้ำยาสกัด TRIzol Reagent (Life technologies, USA) ซึ่งสกัดอาร์เอ็นเอ บนพื้นฐานของ guanidine thiocyanate-phenol-chloroform วิธีที่ 3 คือน้ำยาสกัด easy RED Total RNA extraction (iNtRON Biotechnology, Korea) ซึ่งสกัดอาร์เอ็นเอบนพื้นฐานเดียวกับ TRIzol

จากผลการวิเคราะห์อาร์เอ็นเอด้วย nanodrop และ electrophoresis พบว่าวิธีการใช้ RNeasy Plant นั้นสกัดอาร์เอ็นเอได้จากทุกตัวอย่างในปริมาณเพียงพอและสม่ำเสมอสำหรับการนำไปทำ cDNA และ qPCR ปริมาณอาร์เอ็นเอที่ใกล้เคียงกันนั้นเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการวิเคราะห์ด้วย qPCR เพราะถ้าอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ไม่เท่ากันจะมีผลต่อการวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนเป็นอย่างมาก นอกจากนั้นการสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุด RNeasy นั้นไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องปั่นที่ควบคุมอุณหภูมิ ขั้นตอนในการทำก็ไม่ซับซ้อน ใช้เวลาทำเพียงแค่ 1 ชั่วโมง ก็สามารถสกัดอาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพสูงได้ เหมาะที่จะใช้สกัดอาร์เอ็นเอจากพืชในวงศ์พริกไทยซึ่งมีสารทุติยภูมิอยู่ในปริมาณสูง สำหรับวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้แต่น้ำยา guanidine thiocyanate-phenol-chloroform ดังในวิธีการที่ 2 และ 3 นั้น พบว่ามีปัญหาต่อคุณภาพของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ ขั้นตอนที่ใช้ซับซ้อน ใช้เวลาในการ

สกัดนานกว่า ต้องใช้เครื่องปั่นตกตะกอนควบคุมอุณหภูมิ และสารเคมีที่เป็นอันตราย เป็นผลให้ยากต่อการที่จะสกัดอาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพสูง และปริมาณใกล้เคียงกันได้ ทำให้วิธีการสกัดโดยใช้ TRIzol และ easy RED นั้นไม่เหมาะต่อการนำมาใช้กับพืชวงศ์พริกไทย

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้ชุดสกัด RNeasy Plant Mini Kit นั้นมีประสิทธิภาพสามารถนำมาใช้กับพืชในวงศ์พริกไทยที่นำมาทดสอบทั้งสามชนิดอาร์เอ็นเอที่สกัดได้นั้นสามารถนำมาใช้ในการศึกษาระดับโมเลกุล โดยเฉพาะเทคนิคที่มีความไวสูงอย่าง Real time PCR ได้ จึงจะนำไปใช้ในการศึกษาระดับโมเลกุลโดยเทคนิคอื่น ๆ ได้อีก วิธีการนี้น่าจะเป็นทางเลือกสำหรับนักวิจัยที่ต้องการศึกษาพืชวงศ์พริกไทยในระดับโมเลกุล โดยเฉพาะการศึกษาการแสดงออกของยีนได้เป็นอย่างดี

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยนเรศวร สำหรับทุนอุดหนุนการทำวิจัย งบประมาณแผ่นดิน ประจำปี พ.ศ. 2556 สถาบันบริการวิชาการด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร สำหรับการอำนวยความสะดวกในการใช้เครื่อง Real-Time PCR เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์อีกหลายชนิด ขอขอบคุณ ดร.สุพัชรี เนตรพันธุ์ ที่เอื้อเฟื้อโปรแกรมสำหรับยีน *Actin* รศ.ดร.จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล สำหรับตัวอย่างชุดสกัด RNeasy Plant Mini kit ที่นำมาทดสอบใช้สกัดอาร์เอ็นเอ แนวคิดวิจัย คำแนะนำ และ ดร.สุทธิรักษ์ รอยตระกูล สำหรับคำแนะนำและการวิจารณ์ผลการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

- Azevedo, H., Lino-neto, T. and Tavares, R.M. (2003). An improved method for high-quality RNA isolation from needles of adult maritime pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* 21: 333-338.
- Choopayak, C, Laksuk, H, and K., A. (2010). Volatile compounds from *Piper betle* Linn. sample collected from Phitsanulok Thailand by SPME method. 6th Naresuan Research.
- Cordeiro, M., Silva, M., Santos, E. Oliveira-Filho, Miranda, Z., Aquino, F. and Rocha, R. (2008). Optimization of a method of total RNA extraction from Brazilian native plants rich in polyphenols ad polysaccharides. *Symposium international Savanas Tropicais*: 12-17.
- Gertsch, J., Leonti, M., Raduner, S., Racz, I., Chen, J.-Z., Xie, X.-Q., Altmann, K.-H., Karsak, M. and Zimmer, A. (2008). Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105: 9099-9104.
- Ghelardini, C., Galeotti, N., Di Cesare Mannelli, L., Mazzanti, G. and Bartolini, A. (2001). Local anaesthetic activity of [beta]-caryophyllene. *Il Farmaco* 56: 387-389.
- Louime, C., Vasanthaiah, H., Jittayasothorn, Y., Lu, J., Basha, S., Thipyapong, M.P. and Boonkerd, N. (2008). A simple and Efficient Protocol for High Quality RNA Extraction and Cloning of Chalcone Synthase Partial cds from Muscadine Grape Cultivars (*Vitis Rotundifolia* Michx.). *European Journal of Scientific Research* 22: 232-240.
- Meisel, L., Fonseca, B., Gonzalez, S., Baezayates, R., Cambiazo, V. and Campos, R. (2005). A rapid and efficient method for purifying high quality total RNA from Peaches (*Prunus persica*) for functional genomics analyses. *Biol Res*. 38: 83-88.
- Nalina, T., and Rahim, Z.H.A. (2007). The crude aqueous extract of *Piper betle* L. and its antibacterial effect towards *Streptococcus mutans*. *American Journal of Biotechnology and Biochemistry* 3: 10-15.
- Parker, M., Pollnitz, A., Cozzolino, D., Francis, I. and Herderich, M. (2007). Identification and quantification of a marker compound for 'pepper' aroma and flavor in shiraz grape berries by combination of chemometrics and gas chromatography-mass spectrometry. *J Agric Food Chem*. 55: 5948-5955.
- Pukclai, P., and Kato-Noguchi, H. (2011). Allelopathic activity of *Piper sarmentosum* Roxb. *Asian Journal of Plant Sciences* 10: 147-152.
- Qin, W., Huang, S., Li, C., Chen, S. and Peng, Z. (2010). Biological activity of the essential oil from the leaves of *Piper sarmentosum* Roxb. (Piperaceae) and its chemical constituents on *Brontispa longissima* (Gestro) (Coleoptera: Hispididae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 96: 132-139.
- Ramji, N., Ramji, N., Iyer, R. and Chandrasekaran, S. (2002). Phenolic antibacterials from *Piper betle* in the prevention of halitosis. *Journal of Ethnopharmacology* 83: 149-152.
- Reid, K., Olsson, N., Schlosser, J., Peng, F. and Lund, S. (2006). An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biol*. 6: 27.
- Ugusman, A., Zakaria, Z., Hui, C.K. and Nordin, N.A.M.M. (2011). *Piper sarmentosum* inhibits ICAM-1 and Nox4 gene expression in oxidative stress-induced human umbilical

- vien endothelial cells. BMC Complementary and Alternative Medicine 11.
- Yoa, J., Fu, W. and Wang, X. (2009). Improved RNA isolation from *Laminaria japonica* Aresch (Laminariaceae, Phaeophyta). J Appl Phycol. 21: 233-238.
- Zheng, G.-Q., Kenney, P.M. and Lam, L.K.T. (1992). Sesquiterpenes from Clove (*Eugenia caryophyllata*) as Potential Anticarcinogenic Agents. Journal of Natural Products 55: 999-1003.

