บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืช

เลือกใบที่สมบูรณ์จากตำแหน่งที่ 3-4 นับจากยอดของกล้วยไม้สกุลช้าง 2 ชนิด คือ 1) เขาแกะ (*Rhynchostylis coelestis* Rchbf.) ได้แก่ เขาแกะธรรมดา และเขาแกะเผือก ชนิดละ 10 ต้น และ 2) ช้าง (*Rhynchostylis gigantea* Ridl.) ได้แก่ ช้างกระ ช้างแดง ช้างเผือก และช้างประหลาด ชนิดละ 5 ต้น

1.1 เขาแกะ (*Rhynchostylis coelestis* Rchbf.)

ชื่อสามัญ เขาแกะธรรมดา
ลักษณะเด่น ช่อดอกตั้ง กลีบดอกสีขาว มีแต้มสีม่วงครามที่ปลายกลีบทุกกลีบ ปากมีสีม่วงครามมากกว่าที่กลีบ มีกลิ่นหอมแรง
ฤดูดอก เดือนพฤษภาคมถึงกรกฎาคม

ชื่อสามัญ เขาแกะเผือก
ลักษณะเด่น ช่อดอกตั้ง ลักษณะดอกเหมือนเขาแกะธรรมดา แต่มีสีขาวทั้งดอก มีกลิ่นหอมแรง
ฤดูดอก เดือนพฤษภาคมถึงกรกฎาคม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2 ช้าง (*Rhynchostylis gigantea* Ridl.)

ชื่อสามัญ ช้างแดง
ลักษณะเด่น กลีบดอก และปากมีสีแดงอมม่วง มีกลิ่นหอม
ฤดูดอก เดือนมกราคมถึงกุมภาพันธ์

ชื่อสามัญ ช้างกระ
ลักษณะเด่น กลีบดอก และปากมีสีขาว มีจุดกระสีแดงกระจายอย่างสม่ำเสมอมีกลิ่นหอม
ฤดูดอก เดือนมกราคมถึงกุมภาพันธ์

ชื่อสามัญ ช้างประหลาด
ลักษณะเด่น กลีบดอก และปากมีสีขาว มีจุดกระสีแดงเปรอะกระจาย ไม่สม่ำเสมอ มีกลิ่นหอม
ฤดูดอก เดือนมกราคมถึงกุมภาพันธ์

ชื่อสามัญ ช้างเผือก
ลักษณะเด่น กลีบดอก และปากมีสีขาวทั้งดอก มีกลิ่นหอม
ฤดูดอก เดือนมกราคมถึงกุมภาพันธ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. สารเคมี

2.1 Acetic acid

2.2 Agarose บริษัท Promega

2.3 Ammonium acetate

2.4 Bromophenol blue

2.5 Cetyltrimethyl ammonium bromide

2.6 Chloroform

2.7 Deoxyribonucleoside triphosphates

2.8 DNA Marker 50-2500 bp.

2.9 Ethidium bromide

2.10 Ethyl alcohol

2.11 Ethylenediaminetetracetic acid

2.12 EZ Load Precision Molecular Mass Standard

2.13 Isopropanol

2.14 Isoamyl alcohol

2.15 Magnesium chloride

2.16 2-Mercaptoethanol

2.17 Oligonucleotide primers บริษัท Operon

2.18 PCR reaction buffer

2.19 Sodium chloride

2.20 Sucrose

2.21 *Taq* DNA polymerase

2.22 Tris [hydroxyl methyl] aminomethane

2.23 Xylene cyanol FF.

3. อุปกรณ์

3.1 Autoclave

3.2 Automatic pipette P2, P20, P200, P1000 บริษัท Gilson Medical Electronics S.A

3.3 Centrifuge tube ขนาด 30 มิลลิลิตร

3.4 Gel documentation ยี่ห้อ Syngene รุ่น Gene Genius บริษัท Lab Focus

3.5 High speed microcentrifuge

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.6 Horizontal electrophoresis บริษัท BIO-RAD (ภาพ 1)

3.7 Magnetic stirrer

3.8 Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3.9 Microwave oven

3.10 Mortar

3.11 Multi ultra PCR tube ขนาด 0.2 มิลลิลิตร

3.12 Power supply บริษัท BIO-RAD

3.13 Thermal cycler ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น Gene Amp PCR System 24000 (ภาพ 2)

3.14 Water bath

3.15 -20 °C Freezer

3.16 -80 °C Freezer

3.17 เครื่องแก้วขนาดต่าง ๆ ได้แก่ บีกเกอร์ ปิเปต กระบอกตวง แท่งแก้วคนสาร ฯ

3.18 อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่ ช้อนตักสาร ถุงมือพลาสติก กระดาษตวงสาร คีมคีบ กล่องโฟม น้ำแข็ง กระดาษทิชชู กรรไกร เทปใส ปากกา ฯลฯ

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมดีเอ็นเอกล้วยไม้

สกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยไม้โดยวิธีการของ Doyle and Doyle (1990) ดังนี้

1.1 ล้างใบของกล้วยไม้ที่คัดเลือกแล้วด้วยน้ำสะอาด 2 ครั้ง ตามด้วยน้ำกลั่นอีก 1 ครั้ง ซับให้แห้ง นำไปชั่งตัวอย่างละ 1.0 กรัม หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ด้วยมีดสะอาดอย่างรวดเร็ว

1.2 นำตัวอย่างพืชใส่ในโกร่งที่เย็นจัดที่มี extraction buffer 5 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) บดละเอียดให้เข้ากัน แล้วใส่ใน centrifuge tube ขนาด 30 มิลลิลิตร

1.3 นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 30 นาที โดยเขย่าเบา ๆ ทุก 10 นาที

1.4 เติม Chloroform : Isoamyl alcohol (24 :1, v/v) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ ให้ทั่วถึง นำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 15 นาที

1.5 ดูดสารละลายใสส่วนบน (supernatant) ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 30 มิลลิลิตร หลอดใหม่ จากนั้นเติม Isopropanol ปริมาตร 2 ใน 3 ส่วนของสารละลายใสที่ดูดได้ เขย่าเบา ๆ ให้ทั่วถึง แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C ทิ้งไว้ข้ามคืนให้ดีเอ็นเอตกตะกอน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1.6 นำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 15 นาที ดูดสารละลายใสทิ้ง เหลือแต่ตะกอนดีเอ็นเอที่ก้นหลอด แล้วผึ่งให้แอลกอฮอล์ระเหยจนแห้งที่อุณหภูมิห้อง

1.7 เติม wash buffer (ภาคผนวก ข) 5 มิลลิลิตร หมุนเบา ๆ ให้ทั่วถึง 20 นาที

1.8 นำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 15 นาที เทสารละลายออกให้เหลือแต่ตะกอนดีเอ็นเอ แล้วผึ่งดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

1.9 เติม TE buffer (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอเขย่าเบาๆให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การตรวจสอบคุณภาพ และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

ตรวจสอบโดยใช้อิเล็กโทรโฟรีซีสแนวนอน (horizontal electrophoresis) (ภาพ 1) ด้วย agarose gel 1.5% ใน 1 ☒TAE buffer (ภาคผนวก ข) นำดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร ของกล้วยไม้ที่สกัดได้แต่ละตัวอย่างผสมกับ 6 ☒loading dye 2 ไมโครลิตร และน้ำบริสุทธิ์ 9 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) เปรียบเทียบกับ EZ Load Precision Molecular Mass Standard 5 ไมโครลิตร ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที จากนั้นนำเจลมาย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ (ภาคผนวก ข) นาน 10 นาที เขย่าให้ทั่วถึงทั้งแผ่นเจล ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 นาที แล้วนำไปตรวจสอบผลในเครื่อง Gel documentation (ภาพ 3) ตรวจสอบคุณภาพ คำนวณ และปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ประมาณ 10-20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยนำไปเจือจางใน TE buffer เพื่อใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

ภาพ 1 ชุดอุปกรณ์อิเล็กโทรโฟรีซีสแนวนอน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction)

3.1 องค์ประกอบในปฏิกิริยาพีซีอาร์

เตรียม reaction mixture ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ใน multi-ultra PCR tube ขนาด 200 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1 X PCR buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 100 µM dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 1.0 Unit *Taq* DNA Polymerase (INVITROGEN), 100 ng. ไพรเมอร์ (ภาคผนวก ก), 10-20 ng. DNA template และ deionized water ปิดฝาให้สนิท แล้วใส่ลงในเครื่อง thermal cycler ยี่ห้อ Gene Amp System PCR 2400 (ภาพ 2)

3.2 เงื่อนไขการทำปฏิกิริยา PCR ใช้วิธีการดัดแปลงจาก Tsai *et al.* (2002) (ตาราง 1)

ตาราง 1 อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	94	:	94	40	72	:	72	:	4
เวลา (วินาที)	180	:	45	45	60	:	180	:	α
จำนวนรอบ (รอบ)	1	:		45		:	1	:	

3.3 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

ในการทดลองนี้เลือกใช้ไพรเมอร์ที่มีขนาดความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ จากบริษัท Operon Technology Alamada, USA จำนวน 24 ชนิด คือ OPAK01, OPAK05, OPAK06, OPAK10, OPAK11, OPAK17, OPAK20, OPD05, OPD10, OPD11, OPD16, OPD17, OPD18, OPD19, OPD20, OPF03, OPF07, OPF08, OPF10, OPF11, OPF12, OPF13, OPF16 และ OPF17 (ภาคผนวก ก)

ภาพ 2 Thermal cycler ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น Gene Amp PCR System 2400

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR product) ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส (agarose gel electrophoresis)

4.1 การเตียมแผ่นเจลอะกาโรส 1.5%

4.1.1 เตรียมถาดสำหรับเทเจล และหวีเสียบ (comb) ซึ่งมี 30 ช่อง (well) เข้าด้วยกัน โดยใช้ผ้าสะอาดเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70% ไม่ให้มีเศษฝุ่น เศษเจล หรืออื่น ๆ ติด แล้วใช้เทปใสปิดขอบถาดทั้งหัวท้าย

4.1.2 ชั่งอะกาโรส 1.5 กรัม ผสมลงใน 1× TAE buffer 100 มิลลิลิตร หลอมเจลให้ละลายเข้ากันอย่างเบา ๆ จนหมด

4.1.3 เทเจลที่หลอมแล้วลงในถาดให้หนาประมาณ 5 มิลลิลิตร แล้วเอาหวีเสียบลงอย่างเบา ๆ อย่าให้มีฟองอากาศ แล้วกำจัดฟองอากาศบริเวณอื่น ๆ ของเจล ตั้งทิ้งไว้ให้แข็งตัว

4.1.4 ดึงหวีเสียบออกอย่างเบา ๆ และแกะเทปใสออกอย่างเบามือ

4.2 การวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส

4.2.1 นำแผ่นอะกาโรสที่เตรียมไว้วางลงในอ่าง โดยให้ด้านที่มีช่องของหวีเสียบอยู่ด้านขั้วลบ

4.2.2 เท 1× TAE buffer ลงในอ่างให้ท่วมแผ่นอะกาโรสประมาณ 5 มิลลิลิตร

4.2.3 นำ DNA Marker 50-2500 คู่เบส 5 ไมโครลิตร ผสมกับ 6× loading dye 1 ไมโครลิตร หยอดลงในช่องแรกซ้ายสุดของบริเวณที่ต้องการตรวจสอบ แล้วผสม PCR product 10 ไมโครลิตร กับ 6× loading dye 2 ไมโครลิตร หยอดลงในช่องถัดไปของเจล

4.2.4 ปิดฝาอ่าง ต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าโดยกระแสไฟฟ้าจะวิ่งจากขั้วลบไปขั้วบวก ใช้ความต่างศักย์ 50 โวลต์ นาน 150 นาที แล้วจึงปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

4.2.5 นำเจลมาย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์นาน 10 นาที เขย่าให้ทั่วถึงทั้งแผ่นเจล ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 นาที นำไปตรวจสอบผลในเครื่อง Gel documentation (ภาพ 3) บันทึกภาพด้วยโปรแกรม Gene Snap

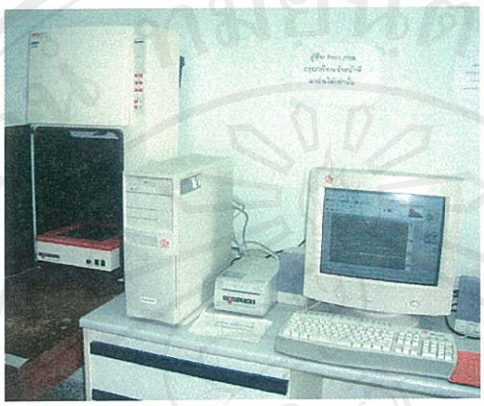
การวิเคราะห์ข้อมูล

4.3 ตรวจดูความคมชัด จำนวนของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ ดูตำแหน่งที่ปรากฏ และไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอในแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอภายในกลุ่มกล้วยไม้เขาแกะ กลุ่มกล้วยไม้ช้าง

4.4 คำนวณขนาดโมเลกุลด้วยโปรแกรม Gene Tool และบันทึกผลใช้ระบบตัวเลข คือ การปรากฏแถบดีเอ็นเอให้สัญลักษณ์เป็น 1 และถ้าไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งเดียวกันให้สัญลักษณ์เป็น 0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.5 ประมวลผลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอด้วย Gene directory โดยใช้ UPGMA cluster analysis ทำ dendrogram



ภาพ 3 Gel documentation ยี่ห้อ Syngene รุ่น Gene Genius บริษัท Lab Focus

สถานที่ทำงานวิจัย

เรือนเพาะชำ ห้องปฏิบัติการเคมีวิเคราะห์ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ห้องปฏิบัติการโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาทำการวิจัย

เดือน มิถุนายน 2546 - เดือน กรกฎาคม 2547

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved