บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1.ตัวอย่างพืช

ข่า (*Alpinia galanga*)

2. สารเคมี

2.1 Acrylamide

2.2 Acetic Acid

2.3 Agarose

2.4 Bind Silane

2.5 Bromophenol Blue

2.6 Chloroform

2.7 Ethidium Bromide

2.8 Ethyl Alcohol

2.9 Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA)

2.10 Formaldehyde(37%)

2.11 Formamide(98%)

2.12 Isopropanol

2.13 Liquid Nitrogen

2.14 Phenol

2.15 Proteinase K (Invitrogen)

2.16 RNaseI (Epicentre)

2.17 Silver Nitrate

2.18 Sodium Carbonate (Na_2CO_3)

2.19 Sodium Chloride (NaCl)

2.20 Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)

2.21 TEMED

2.22 Taq DNA Polymerase (Invitrogen)

2.23 Tris-base

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.24 Urea

2.25 Xylene Cyanol FF

2.26 Nitric Acid (HNO_3)

2.27 Silica Gel 60 G

2.28 Dichloromethane

2.29 Hexane

2.30 Ethylacetate

2.31 Methanol

2.32 Iodine

3. อุปกรณ์

3.1 เครื่องระเหยสารแบบหมุน (Rotary Evaporater)

3.2 ตู้อบอุณหภูมิสูง (Hot Air Oven)

3.3 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)

3.4 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH-Meter)

3.5 แผ่นกระจก (TLC, PTLC Plate) ขนาด 5x20 และ 2x20 เซนติเมตร

3.6 Column Chromatography ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร ยาว 42 เซนติเมตร

3.7 Chromatography Tank และ Iodine Tank

3.8 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply)

3.9 Gel Documentation (ยี่ห้อ Syngene, รุ่น Gene Genius)

3.10 โกร่งบดตัวอย่าง

3.11 ถังบรรจุไนโตรเจน

3.12 เครื่องทำความเย็น (ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส, ตู้แช่ -20 องศาเซลเซียส และตู้แช่ -80 องศาเซลเซียส)

3.14 Water bath

3.15 Adjustable automatic pipettes

3.16 Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตรและ 0.2 มิลลิลิตร

3.17 Pipette tip

3.18 UV transilluminator

3.19 Thermal Cycler : GeneAmp PCR system (MJ Research model PTC 100)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.20 ชุดอุปกรณ์อิเล็คโตรโฟรีซีส (electrophoresis) ชนิดแนวนอน และแนวตั้ง

3.21 Vortex mixer

3.22 กระดาษร้อยปอนด์

3.23 เครื่องแก้ว

3.24 ตู้ดูดไอพิษ

3.25 เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง

3.26 เครื่องชั่งแบบละเอียด

วิธีการทดลอง

1.พืชทดลอง

ตัวอย่างของข่าที่ทำการทดลองได้รวบรวมมาจากข่า ทั้งที่เป็นพันธุ์ปลูกเพื่อการค้าและพันธุ์ป่า ซึ่งได้รวบรวมมาจากแหล่งเพาะปลูกเชิงการค้าในจังหวัดกำแพงเพชร จังหวัดอุตรดิตถ์ จังหวัดนครสวรรค์ จังหวัดลพบุรี และ จังหวัดกาฬสินธุ์ รวมทั้งหมด 20 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3) นำมาปลูกในแปลงภายใต้สภาพแวดล้อมเดียวกันเป็นเวลา 1 ปี (คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่) จากนั้นจึงนำส่วนของเหง้าแก่ไปสกัดสาร 1´ acetoxychavicol acetate และ นำใบอ่อนไปสกัดดีเอ็นเอเพื่อทำ AFLP ต่อไป

ตารางที่ 3 ตัวอย่างข่าที่ทำการศึกษา 20 ตัวอย่าง

ชื่อ	แหล่งที่มา
1. ข่าแดง	พันธุ์ปลูก ต.คุ้งตะเภา อ.เมือง จ.อุตรดิตถ์
2. ข่าหยวก	พันธุ์ปลูก ต.คุ้งตะเภา อ.เมือง จ.อุตรดิตถ์
3. ข่าทอง	พันธุ์ปลูก ต.คุ้งตะเภา อ.เมือง จ.อุตรดิตถ์
4 ข่าสาคู	พันธุ์ป่า ต.คุ้งตะเภา อ.เมือง จ.อุตรดิตถ์
5. ข่าหยวก	พันธุ์ปลูก ต.คุ้งตะเภา อ.เมือง จ.อุตรดิตถ์
6. ข่าแดง	พันธุ์ปลูก ต.คุ้งตะเภา อ.เมือง จ.อุตรดิตถ์
7. ข่าป่า	พันธุ์ป่า ต.คุ้งตะเภา อ.เมือง จ.อุตรดิตถ์
8. ข่าแดง	พันธุ์ปลูก ต.วังแดง อ.ตรอน จ.อุตรดิตถ์
9. ข่าเหลือง	พันธุ์ป่า ต.คุ้งตะเภา อ.เมือง จ.อุตรดิตถ์
10. ข่าหยวก	พันธุ์ปลูก ต.สระแก้ว อ.เมือง จ.กำแพงเพชร
11. ข่าหยวก	พันธุ์ปลูก ต.สระแก้ว อ.เมือง จ.กำแพงเพชร
12. ข่าหยวก	พันธุ์ปลูก ต.บ้านแก่ง อ.เมือง จ.นครสวรรค์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชื่อ	แหล่งที่มา
13. ข่าหยวก	พันธุ์ปลูก ต.บ้านแก่ง อ.เมือง จ.นครสวรรค์
14. ข่าหยวก	พันธุ์ปลูก ต.บ้านแก่ง อ.เมือง จ.นครสวรรค์
15. ข่าลิง	พันธุ์ป่า ต.บ้านแก่ง อ.เมือง จ.นครสวรรค์
16. ข่าแดง	พันธุ์ปลูก ต.บ้านแก่ง อ.เมือง จ.นครสวรรค์
17. ข่าแดง	พันธุ์ปลูก ต. ตะลุง อ.เมือง จ.ลพบุรี
18. ข่าแดง	พันธุ์ปลูก ต. ตะลุง อ.เมือง จ.ลพบุรี
19. ข่าแดง	พันธุ์ปลูก อ. โกสำภี จ.กำแพงเพชร
20. ข่าลิง	พันธุ์ป่า จ.กาฬสินธุ์

2. การสกัดสาร 1´acetoxychavicol acetate ในข่า

ผู้วิจัยจึงได้ดัดแปลงวิธีการของอนุวัฒน์ (2545) และพิทยาและคณะ (2548)ในการวิเคราะห์ปริมาณ 1' acetoxychavicol acetate กล่าวคือ อนุวัฒน์ (2545) ทดสอบสารต้านเชื้อรา ด้วยวิธี TLC-bioassay พบแถบ fraction ที่สามารถต้านเชื้อราได้ดี 2 fraction คือ L14 (R_f=0.47-0.8) และ L15 (R_f=0.83-1.00) จากนั้น พิทยาและคณะ (2548) ได้วิเคราะห์สารประกอบของ L14 และ L15 ด้วยวิธี Chromatography Mass Spectrometer (GC-MS) พบว่า L14 และ L15 มีสาร 1´acetoxychavicol acetate เป็นส่วนประกอบหลัก ซึ่งมีอยู่ถึง 81.01% และ 30.30% ตามลำดับ ดังนั้นผู้วิจัยจึงใช้สาร L14 และ L15 เป็นตัวประมาณปริมาณสาร 1´acetoxychavicol acetate จากข่าทั้ง 20 ตัวอย่าง ซึ่งมีวิธีการดังต่อไปนี้

2.1 การสกัดสารสกัดหยาบจากข่า

นำลำต้นใต้ดินของข่าทั้ง 20 ตัวอย่าง มาอบให้แห้ง แล้วบดให้ละเอียด จากนั้นนำไปแช่ด้วย dichloromethane 2 วัน กรองเอาแต่ส่วนของสารละลาย นำสารละลายที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุน (Rotary Evaporator) นำสารสกัดหยาบที่ได้ใส่ในขวดสีชาและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 การแยกสารออกฤทธิ์ของสารสกัดหยาบด้วยวิธี Column Chromatography

นำสารสกัดหยาบจากข่าที่ได้ ทั้ง 20 ตัวอย่าง มาแยกสารออกฤทธิ์ผ่าน Silica Gel โดยใช้สารตัวทำละลายเคลื่อนที่ (develop solvent) แบบผสม คือ hexane, ethyl acetate และ methanol (อนุวัฒน์,2545) เป็นตัวชะ (eluting solvent) จากนั้นเก็บสารละลายที่ไหลออกมา ครั้งละ 50 มิลลิลิตร

แล้วนำไปตรวจสอบสารออกฤทธิ์ด้วยวิธี TLC ซึ่งอบด้วยไอโอดีน โดยเปรียบเทียบค่า R_f ของสารที่แยกโดย Column Chromatography กับค่า R_f ของวงใส (clear zone) จากการทำ TLC-bioassay ของอนุวัฒน์ (2545) เก็บเฉพาะ fraction ที่ให้ค่า R_f เท่ากับ L14 และ L15 เมื่อแยกกลุ่มสารออกฤทธิ์ได้แล้วนำไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสารแบบหมุน จากนั้นบันทึกน้ำหนักของสารที่ได้ เก็บสารไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ตัวอย่างละ 6 ซ้ำ 20 ตัวอย่าง

3. เปรียบเทียบวิธีการสกัด ดีเอ็นเอ 3 วิธีการ

3.1 SDS Extraction (Kuntapanom and Ikeda, 1998)

1) นำใบอ่อนของข่า 0.1 กรัม มาบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วนำใส่ลงใน Microcentrifuge Tube 1.5 มิลลิลิตร จากนั้น เติม SDS Extraction buffer (ภาคผนวก) 600 ไมโครลิตร

2) นำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วกลับหลอดไปมาทุก ๆ 5 นาที

3) เติม 3 M Sodium acetate (pH 5.2) 200 ไมโครลิตร จากนั้น ผสมให้เข้ากัน และบ่มในน้ำแข็ง 30 นาที

4)จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที, 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

5) ดูดเอาสารละลายส่วนบน ใส่ใน microcentrifuge Tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

6) เติม Isopropanol หลอดใหม่ที่แช่เย็น ปริมาตรต่อปริมาตร เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน

7) บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส 15 นาที แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที, 4 องศาเซลเซียส 5 นาที เทเอาส่วนบนทิ้ง เก็บส่วนตะกอนไว้

8) ล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol 500 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้วเทเอาส่วนสารละลายออก ตากตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

9) จากนั้นละลายตะกอนด้วย 100 ไมโครลิตร ของน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และใส่ 5M NaCl 67 ไมโครลิตร เติม 99% Ethanol 2 เท่าของสารละลายทั้งหมด (334 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากัน บ่มในน้ำแข็ง 10 นาที และ ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส 5นาที เทเอาส่วนสารละลายออก ตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

10) ละลายตะกอนด้วย TE Buffer เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

11) ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพด้วย วิธี Electrophoresis ที่ 1 % Agarose gel

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 วิธีการดัดแปลงจากวิธีของ Doyle and Doyle (1990) (อุไรวรรณ, 2540)

1) นำใบอ่อนของข่า 0.1 กรัม บดในโกร่งด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด แล้วใส่ลงใน Microcentrifuge Tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Extraction Buffer (200 mH Tris-HCl pH8.0, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA และ 0.5% SDS) 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer แล้วนำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส 30 นาที

2) จากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 7,000 รอบต่อนาที 10 นาที และ ดูดเอาส่วนสารละลายด้านบนเก็บไว้

3) เติม Proteinase K (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 25 ไมโครลิตร จากนั้น บ่มที่ 55 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง

4) นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 7,000 รอบต่อนาที 10 นาที ดูดเอาสารละลายส่วนบนเก็บไว้

5) ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย Isopropanol ปริมาตรต่อปริมาตร จากนั้นบ่มที่ -80 องศาเซลเซียส 15 นาที หรือ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

6) ปั่นเหวี่ยงให้ดีเอ็นเอ ตกตะกอนที่ 6,000 รอบต่อนาที 5 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol 2 ครั้ง จากนั้น ตากตะกอนดีเอ็นเอที่ 37 องศาเซลเซียส จนตะกอนแห้ง

7) ละลายตะกอนด้วย 1X TNE Buffer (10mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) 200 ไมโครลิตร เติม RNaseI 5 ยูนิตต่อหลอด บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง

8) สกัดด้วย Phenol โดยเติม Phenol ปริมาตรต่อปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ 7,000 รอบต่อนาที ดูดเอาสารละลายด้านบน ทำซ้ำจนได้สารละลายใส

9) สกัดเอา Phenol ออกด้วย Chloroform: Isoamylalcohol (24:1) 2 ครั้ง

10) ตกตะกอน DNA ด้วย 3 M Sodium acetate เติม 1 ใน 10 ของปริมาตรสารละลายที่ได้ จากนั้นเติม 99% Ethanol 2 เท่าของปริมาตร กลับหลอดไปมาเบา ๆ ให้เข้ากัน จากนั้นเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส หรือ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

11) นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที 10 นาที และล้างตะกอนด้วย 70% Ethanol 2 ครั้ง ตากดีเอ็นเอที่ 37 องศาเซลเซียส ให้แห้ง

12) ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE Buffer 100 ไมโครลิตร

13) นำไปตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Electrophoresis ใน 1% agarose gel หรือ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 การสกัดด้วย Master Pure™ Plant Leaf DNA Purification Kit (Cat Nos. MPP92010 and MPP92100) ของบริษัท EPI CENTRE

1) บดตัวอย่างพืช 0.1 กรัม ใส่ลงใน Microcentrifuge Tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Extraction Solution 300 ไมโครลิตร

2) บ่มที่ 70 องศาเซลเซียส 30 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็ง 10 นาที

3) ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที 5 นาที

4) เก็บสารละลายใสด้านบน ใส่หลอดใหม่ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เพื่อกำจัดเนื้อเยื่อที่เป็นขยะออกให้หมดแล้วนำสารละลายใสใส่หลอดใหม่

5) เติม Isopropanol ปริมาตรต่อปริมาตร กลับหลอดไปมาให้สารละลายเข้ากัน

6) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ

7) ดูดเอาส่วนสารละลายทิ้ง ให้เหลือแต่ตะกอนดีเอ็นเอ

8) ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย Clean-up Solution 100 ไมโครลิตร

9) ตกตะกอนดีเอ็นเออีกครั้งด้วย 100 ไมโครลิตร Isopropanol กลับหลอดไปมาให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที 5 นาที

10) ล้างตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย 70 % Ethanol 2 ครั้ง ตากดีเอ็นเอที่ 37 องศาเซลเซียส จนแห้ง (ถ้าดีเอ็นเอ ไม่บริสุทธิ์ หรือ มีสี ให้ทำซ้ำโดยใส่ Clean-up Solution 100ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วย 150ไมโครลิตร Isopropanol)

11) ละลายดีเอ็นเอใน 50 ไมโครลิตร ของ TE Buffer และ กับดีเอ็นเอที่ 4 องศาเซลเซียส

12) นำไปตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธี Electrophoresis ใน agarose gel 1% หรือ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมและขั้นตอนในการทำ AFLP

4.1 สภาวะที่เหมาะสมในการตัดดีเอ็นเอ (Digestion) ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ทำการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ *Eco*RI และ *Mse*I ซึ่ง *Eco*RI จะทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ *Mse*I จะทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จึงทำการเปรียบเทียบสภาวะที่เหมาะสมในการตัดดีเอ็นเอ ด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดนี้ 3 สภาวะด้วยกัน คือ

วิธีที่ 1 ตัดด้วย *Mse*I ที่ 65 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเติม *Eco*RI และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง โดยมีส่วนประกอบ และขั้นตอนดังนี้

- ตัดด้วย *Mse*I

ดีเอ็นเอ (100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	5 ไมโครลิตร
*Mse*I (10 ยูนิต / ไมโครลิตร)	1 ไมโครลิตร
10x tango buffer	5 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	14 ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	25 ไมโครลิตร

นำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง

- ตัดด้วย *Eco*RI

*Eco*RI (10 ยูนิต / ไมโครลิตร)	1 ไมโครลิตร
10x tango buffer	3 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	11 ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	15 ไมโครลิตร

เติมลงในหลอดที่ตัดด้วย *Mse*I ข้างต้นรวมปริมาตรทั้งหมด 40 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง

วิธีที่ 2 เติมส่วนประกอบทั้งหมดลงในหลอดเดียวกัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง ซึ่งมีส่วนประกอบ ดังนี้

ดีเอ็นเอ (100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	5 ไมโครลิตร
*Mse*I (10 ยูนิต/ไมโครลิตร)	1 ไมโครลิตร
*Eco*RI (10 ยูนิต/ไมโครลิตร)	1 ไมโครลิตร
10x tango buffer	5 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	13 ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	25 ไมโครลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีที่ 3 เติมส่วนประกอบทั้งหมดลงในหลอดเดียวกัน แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง และต่อด้วย 65 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

ดีเอ็นเอ (100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	5	ไมโครลิตร
*Mse*I (10 ยูนิต / ไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
*EcoR*I (10 ยูนิต / ไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
10x tango buffer	5	ไมโครลิตร
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	13	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	25	ไมโครลิตร

4.2 การเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอ เข้ากับ Adapter (Ligation)

- การเตรียม Adapter

ลำดับเบสของ Adapter ของเอนไซม์ *Eco*RI และ *Mse*I มีดังนี้

*EcoR*I Adapter: 5’-CTCGTAGACTGCATACC-3’

3’-CATCTGACGTATGGTTAA-5’

*Mse*I Adapter: 5’-GACGATGAGTCCTGAG-3’

3’-TACTCAGGACTCAT

การนำ Adapter ในรูปโอลิโกนิวคลีโอไทด์สายเดี่ยวแต่ละสายมารวมกัน จะต้องนำมาคำนวณค่าความเข้มข้นและรวมกันในอัตราส่วนจำนวนโมเลกุล (Molar Ratio) ที่เท่ากัน ซึ่งมีวิธีการเตรียม คือ ผสมโอลิโกนิวคลีโอไทด์ สายบนและสายล่างที่มีความเข้มข้น 100 พิโคโมล/ไมโครลิตร (pmole/µl) อย่างละ 30 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำ 60 ไมโครลิตร จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ Adapter เท่ากับ 25 พิโคโมล/ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาทีแล้วทิ้งไว้ให้อุณหภูมิค่อย ๆ ลดลงที่อุณหภูมิห้อง

- การเชื่อมต่อดีเอ็นเอ กับ Adapter โดยการนำดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์เรียบร้อยแล้วมาเติมสารต่าง ๆ ดังนี้

ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ (ข้อ 4.1)	25	ไมโครลิตร
*Eco*RI Adapter (25 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
*Mse*I Adapter (25 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	2	ไมโครลิตร
T4 DNA ligase (3 ยูนิต/ไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร
10x T4 ligase buffer	5	ไมโครลิตร
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	16	ไมโครลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ปริมาตรรวม	50 ไมโครลิตร

บ่มที่ 20 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง และ ต่อด้วย 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

5. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยวิธีพีซีอาร์ (PCR: Polymerase chain reaction)

ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์นั้น จะประกอบด้วยขั้นตอนการทำพีซีอาร์ 2 ครั้ง โดยครั้งที่ 1 เรียกว่า Pre-Selective Amplification เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบให้มากขึ้น และช่วยให้เกิดการคัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกต้อง โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ ไพรเมอร์ที่ใช้มีลำดับเบสทางปลาย 5' เหมือนกับลำดับเบสของ Adapter ต่อด้วยลำดับเบสบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์และเพิ่มเบสเข้าไปที่ปลาย 3' อีกหนึ่งเบส ดัง ตารางที่ 4 และการทำพีซีอาร์ครั้งที่ 2 เรียกว่า Selective Amplification เป็นการใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสคัดเลือกต่อจากไพรเมอร์ที่ใช้ในครั้งแรก อีก 1-2 เบส ดังตารางที่ 4

โดยที่ กลุ่ม E ไพรเมอร์จะเป็นไพรเมอร์ที่เป็นจุดเริ่มต้นปฏิกิริยาพีซีอาร์ จากด้านที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ กลุ่ม M ไพรเมอร์ เป็นจุดเริ่มต้นปฏิกิริยาพีซีอาร์จากด้านที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Mse*I

5.1 สารที่ใช้ในปฏิกิริยาและวิธีการทำ Pre-Selective Amplification

ดีเอ็นเอจากข้อ 4.2 เจือจาง 1:5 เท่า	5 ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ E-A (5 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	2 ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ M-C (5 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	2 ไมโครลิตร
dNTP mix (10 mM)	1 ไมโครลิตร
10x PCR Buffer	5 ไมโครลิตร
$MgCl_2$ (50 mM)	1.5 ไมโครลิตร
Tag DNA polymerase (5 ยูนิต / ไมโครลิตร)	0.2ไมโครลิตร
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	33. ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	50 ไมโครลิตร

ใส่สารทั้งหมดลงในหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร จากนั้นนำหลอดใส่เครื่อง Thermal Cycler โดยมีเงื่อนไขของปฏิกิริยาที่ประกอบด้วย 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 56 องศาเซลเซียส 60 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที จำนวน 20 รอบ จากนั้น เจือจางสารละลายที่ได้ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4 ลำดับเบสของ ไพรเมอร์ต่างๆ

ปฏิกิริยา	ตัวย่อ	ลำดับเบส
Pre-Selective PCR1	E-A	5'GACTGCGTACCAATTCA 3'
	M-C	5'GATGAGTCCTGAGTAAC 3'
Selective PCR2- *Eco*RI	E-AT	5'GACTGCGTACCAATTCAT 3'
	E-AG	5'GACTGCGTACCAATTCAG 3'
	E-AC	5'GACTGCGTACCAATTCAC 3'
	E-AAC	5'GACTGCGTACCAATTCAAC 3'
	E-AAG	5'GACTGCGTACCAATTCAAG 3'
	E-AGA	5'GACTGCGTACCAATTCAGA 3'
	E-AGC	5'GACTGCGTACCAATTCAGC 3'
	E-AGG	5'GACTGCGTACCAATTCAGG 3'
	E-AGT	5'GACTGCGTACCAATTCAGT 3'
	E-ATT	5'GACTGCGTACCAATTCATT3'
	E-ATG	5'GACTGCGTACCAATTCATG 3'
	E-ATC	5'GACTGCGTACCAATTCATC 3'
	E-ACA	5'GACTGCGTACCAATTCACA 3'
	E-ACC	5'GACTGCGTACCAATTCACC 3'
	E-ACG	5'GACTGCGTACCAATTCACG 3'
	E-ACT	5'GACTGCGTACCAATTCACT 3'
Selective PCR2-*Mse*I	M-CAA	5'GATGAGTCCTGAGTAACAA 3'
	M-CAC	5'GATGAGTCCTGAGTAACAC 3'
	M-CAG	5'GATGAGTCCTGAGTAACAG 3'
	M-CAT	5'GATGAGTCCTGAGTAACAT3'
	M-CTA	5'GATGAGTCCTGAGTAACTA 3'
	M-CTC	5'GATGAGTCCTGAGTAACTC 3'
	M-CTG	5'GATGAGTCCTGAGTAACTG 3'
	M-CTT	5'GATGAGTCCTGAGTAACTT 3'

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

5.2 สารที่ใช้ในปฏิกิริยา และ วิธีการทำ Selective Amplification

ดีเอ็นเอจากข้อ 5.1 ที่เจือจาง 1:10 เท่า	5 ไมโครลิตร
E ไพรเมอร์ (ตาราง 4) (10 พิโคโมล/ไมโครลิตร)	0.5 ไมโครลิตร
Mไพรเมอร์ (ตาราง 4) (10พิโคโมล/ไมโครลิตร)	0.5 ไมโครลิตร
dNTP mix (10 mM)	0.4 ไมโครลิตร
10x PCR Buffer	2 ไมโครลิตร
$MgCl_2$ (50 mM)	0.6 ไมโครลิตร
Tag DNA polymerase (5 ยูนิต/ ไมโครลิตร)	0.1 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	10.9 ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	20 ไมโครลิตร

นำสารต่าง ๆ ใส่รวมกันตามปริมาตรข้างต้นในหลอดทำพีซีอาร์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร จากนั้นนำหลอดพีซีอาร์ใส่ลงในเครื่อง Thermal Cycler โดยมีเงื่อนไขของปฏิกิริยา ดังนี้

94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	1 รอบ
65 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	60 วินาที	

จากนั้น ลดอุณหภูมิในขั้น annealing (65 องศาเซลเซียส) ลง รอบละ 1 องศาเซลเซียส แต่ละรอบทำซ้ำ 3 รอบ จนกระทั่งอุณหภูมิในขั้นตอน annealing อยู่ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส รวม 21 รอบ แล้วต่อด้วย

94 องศาเซลเซียส	30 วินาที	20 รอบ
56 องศาเซลเซียส	30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส	60 วินาที	

ในการทำ Selective Amplification ได้ทำการทดสอบคู่ไพรเมอร์แบบพบกันหมดรวม 128 คู่ จากนั้นทำการคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และให้จำนวนแถบดีเอ็นเอที่มาก เพื่อใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ข่าต่อไป ซึ่งในการวิเคราะห์ผลจะใช้วิธีการแยกดีเอ็นเอโดยวิธี Denaturing Polyacrylamide gel electrophoresis โดยใช้ 6% Polyacrylamide gel และทำอิเล็กโตรโฟรีซีส ที่กำลังไฟฟ้า 55 วัตถ์ เวลา 3 ชั่วโมง ในบัฟเฟอร์ TBE จากนั้นจึงย้อมด้วย Silver Stain

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

6. การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี Silver Stain

6.1 หลังจากทำอิเล็กโทรโพรีซีสที่กำลังไฟฟ้า 55 วัตถ์ เวลา 3 ชั่วโมงเสร็จแล้ว นำเจลมาแช่สารละลาย Fixative 2 ตัว คือ 10% Acetic acid 10 นาที แล้วเทสารละลายออก จากนั้น แช่ด้วย 1% Nitric acid 10 นาที

6.2 ล้างด้วยน้ำกลั่นประมาณ 10 นาที

6.3 เติมซิลเวอร์ไนเตรท (0.1% Silver nitrate 0.02% formaldehyde) ทิ้งไว้ 30 นาที

6.4ในขณะที่รอ จึงเตรียมสารละลาย Developer (3% Sodium Carbonate, 0.01% formaldehyde) และ แช่เย็นไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสประมาณ 20 นาที หลังจากนั้น แบ่ง Developer มาส่วนหนึ่ง แล้วทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่น อัตราส่วนของ Developer กับน้ำกลั่นอยู่ที่ 1:2 ส่วน

6.5 เมื่อครบ 30 นาที เทส่วนของซิลเวอร์ไนเตรททิ้ง และล้างด้วยน้ำกลั่นแช่เย็นอย่างรวดเร็ว แล้วล้างซิลเวอร์ไนเตรทด้วย Developer ที่เจือจางกับน้ำกลั่น (1:2) 2 ครั้ง จากนั้น ใส่ Developer ที่แช่เย็นไว้ ทำการเขย่าเบา ๆ ประมาณ 5-10 นาที จนเห็นแถบของดีเอ็นเอปรากฏชัดเจน

6.6 หยุดปฏิกิริยาด้วย 10% Acetic acid 30 วินาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่น จน acetic acid ออกได้หมด

6.7 ประกบกระดาษร้อยปอนด์กับแผ่นเจลแล้วค่อย ๆ ลอกแผ่นเจลออกจากกระจกให้เจลติดกับกระดาษ จากนั้นจึงนำไปทำให้แห้ง และวิเคราะห์ผลต่อไป

7. การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของข่าและการจำแนกสายพันธุ์ข่า

จากการเก็บตัวอย่างและบันทึกข้อมูลทางสัณฐานวิทยาของข่าในด้านของ สีเหง้า ขนาดเหง้า และความสูงของลำต้น จากนั้นทำการตรวจสอบปริมาณสาร 1´acetoxychavicol acetate ทั้งหมด 20 ตัวอย่าง จากนั้นนำทั้ง 20 ตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอ และหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยเทคนิค AFLP (Amplified fragment length polymorphism) ซึ่งคัดเลือกไพรเมอร์จาก 128 คู่ ได้ ไพรเมอร์ 50 คู่ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี Polyacrylamide gel electrophoresis โดยใช้ Polyacrylamide gel ความเข้มข้น 6% ที่กำลังไฟฟ้า 55 วัตถ์ เวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปย้อมด้วย Silver stain และหาความสัมพันธุ์ระหว่างแถบดีเอ็นเอที่ได้กับลักษณะต่างๆ และจำแนกสายพันธุ์ข่าต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved