บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์ และ วิธีการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืช

บัวชั้น (*Curcuma petiolata* Roxb.)

2. สารเคมี

2.1 Acrylamide (บริษัท Sigma)

2.2 Acetic acid

2.3 AFLP Core Reagent Kit (บริษัท Invitrogen)

2.4 AFLP Starter Primer Kit (บริษัท Invitrogen)

2.5 Agarose (บริษัท Promega)

2.6 Bind silane (บริษัท Promega)

2.7 Bromophenol blue

2.8 Chloroform

2.9 Ethidium bromide

2.10 Ethyl alcohol

2.11 Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

2.12 Formaldehyde (37%)

2.13 Formamide (98%)

2.14 Isopropanol

2.15 Liquid nitrogen

2.16 Phenol

2.17 Proteinase K

2.18 RNase ONE™ Ribonuclease (บริษัท Promega)

2.19 Sigmacoat (บริษัท Sigma)

2.20 Silver nitrate

2.21 Sodium carbonate (Na_2CO_3)

2.22 Sodium chloride (NaCl)

2.23 Sodium dodecyl sulfate (SDS)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

2.24 Sodium thiosulfate

2.25 Taq DNA Polymerase (บริษัท Invitrogen)

2.26 Tris [hydroxymethyl] aminomethane

2.27 Urea

2.28 Xylene cyanol FF

3. อุปกรณ์

3.1 เครื่อง thermocycler (ยี่ห้อ Hybaid Omn-E,รุ่น Hybaid Limited Omn-E H8TRE05)

3.2 ชุดอุปกรณ์อิเล็คโตรโฟรีซีส (electrophoresis) ชนิดแนวนอน และ แนวตั้ง

3.3 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply)

3.4 เครื่องชั่งแบบละเอียด

3.5 เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (benchtop centrifuge)

3.6 เครื่องเขย่า

3.7 แผ่นให้ความร้อน

3.8 เครื่องทำน้ำแข็ง

3.9 หม้อนึ่งความดันไอ

3.10 ตู้บ่ม

3.11 UV transilluminator

3.12 Gel Documentation (ยี่ห้อ Syngene, รุ่น Gene Genius)

3.13 ฟิล์มโกดัก 200

3.14 โกร่งบดตัวอย่าง

3.15 ถังบรรจุไนโตรเจนเหลว

3.16 เครื่องทำความเย็น คือตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส, ตู้แช่ -20 องศาเซลเซียส และตู้แช่ -70 องศาเซลเซียส

3.17 Water bath

3.18 Adjustable automatic pipettes

3.19 Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และ multi ultra PCR tube ขนาด 0.6 และ 0.2 มิลลิลิตร

3.20 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง

3.21 pipette tip

3.22 เครื่องดูดอากาศ (suction pump)

3.23 Comb ขนาด 20, 30 และ 36 ช่อง

3.24 ถาดพลาสติกสำหรับเตรียมเจลขนาด 15x15 เซนติเมตร

3.25 เตาอบไมโครเวฟ

3.26 ตู้ดูดไอพิษ

3.27 Vortex mixer

3.28 กระดาษ Kimwipe

3.29 เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ บีกเกอร์ขนาดต่างๆ ปิเปต กระบอกตวง แท่งแก้วคน และกรวยกรอง

3.30 อุปกรณ์อื่นๆ เช่น ช้อนตักสาร ถุงมือ กระดาษชั่งสาร ปากคีบ กล่องโฟม ถาดพลาสติก ถุงพลาสติก กระดาษทิชชู กรรไกร ไม้บรรทัด และ คัตเตอร์

วิธีการทดลอง

1. การคัดเลือกพืชทดลอง

เก็บตัวอย่างใบจากหน่ออ่อนของกระเจียวบัวชั้นซึ่งปลูกในแปลงปลูกของศูนย์บริการการพัฒนาขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ.หางดง จ. เชียงใหม่ ที่ปลูกภายใต้สภาพแสงประมาณ 50% สุ่มมาจาก 7 แปลง และให้รหัสเป็น A, B, C, D, E, F และ G เก็บตัวอย่างแปลงละ 15 ต้น รวม 105 ต้น บันทึก และ ทำเครื่องหมายไว้ จากนั้นนำตัวอย่างพืชทั้งหมดมาสกัดดีเอ็นเอ แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส จากนั้นเมื่อต้นออกดอกจึงทำการถ่ายรูป และ บันทึกลักษณะต่างๆทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ สีกลีบใบประดับ (coma bract) ระยะห่างกลีบใบประดับ (bract) ลักษณะกลีบใบประดับ (bract) ลักษณะกลีบใบประดับส่วนบน (coma bract) สีก้านช่อดอก ความยาวช่อดอก และ สีของกลีบดอก (dorsal lobe) ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมคัดเลือกต้นจาก สีของกลีบใบประดับ สีก้านช่อดอก และ ลักษณะกลีบใบประดับ ทั้งหมด 34 ต้น

2. การเปรียบเทียบวิธีการสกัดดีเอ็นเอ

เก็บใบจากหน่ออ่อนที่งอกขึ้นมาประมาณ 2-3 สัปดาห์ และ มียอดสูงจากพื้นประมาณ 20-30 เซนติเมตร (ภาพ 1) นำมาแช่ในกระติกน้ำแข็งแล้วนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นเตรียมตัวอย่างพืชโดยบดใบอ่อนทั้งใบของบัวชั้นในไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงละเอียด แล้วเก็บไว้ในแผ่น aluminum foil ที่ –70 องศาเซลเซียสเพื่อรอการสกัดดีเอ็นเอ

ภาพ 1 ลักษณะหน่ออ่อนของบัวชั้น

การสกัดดีเอ็นเอเปรียบเทียบ 2 วิธี คือ

- สกัดด้วย DNeasy Plant Mini Kit (Cat No. 69103) ของบริษัท QIAGEN
- สกัดด้วยวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีของ Doyle and Doyle (1990) (อุไรวรรณ, 2540)

2.1 การใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ DNeasy Plant Mini Kit (Cat No. 69103) ของบริษัท QIAGEN มีวิธีการดังต่อไปนี้

- นำตัวอย่างพืชที่บดแล้วประมาณ 0.1 กรัม ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม AP1 buffer ปริมาณ 400 ไมโครลิตร และ RNase A ที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาณ 4 ไมโครลิตร เขย่าอย่างแรงด้วย vortex mixer เป็นเวลา 1-2 นาที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (นำออกมาเขย่าทุกๆ 2-3 นาที)
- เติม AP2 buffer ปริมาณ 130 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที
- ย้ายสารละลายใส่ QIA shredder column นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที แล้วดูดเอาเฉพาะส่วนสารละลายใส ใส่ microcentrifuge tube ใหม่ (ปริมาตรประมาณ 450 ไมโครลิตร)
- เติม AP3 buffer จำนวน 1.5 เท่าของปริมาตรที่มีอยู่ และ เติม ethanol ที่

แช่เย็น จำนวน 1 เท่า (เช่น มีสารละลายใส ปริมาณ 450 ไมโครลิตร เติม AP3 buffer ปริมาณ 675 ไมโครลิตร และ ethanol ปริมาณ 450 ไมโครลิตร ปริมาตรรวมเท่ากับ 1,125 ไมโครลิตร)

- ปั่นตกตะกอนใน DNeasy column โดยนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที (นำสารละลายทิ้ง)

- ย้าย DNeasy column ใส่ microcentrifuge tube ใหม่ ล้างตะกอนด้วย AW buffer ปริมาณ 500 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที (นำสารละลายทิ้ง)

- ล้างตะกอนด้วย AW buffer ปริมาณ 500 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที (นำสารละลายทิ้ง) ทิ้งไว้ให้แห้ง

- เติม AE buffer อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ลงใน DNeasy column นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในงานทดลองขั้นต่อไป

2.2 การสกัดด้วยวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีของ Doyle and Doyle (1990) (อุไรวรรณ, 2540) มีวิธีการดังต่อไปนี้

- นำตัวอย่างพืชที่บดแล้วประมาณ 0.1 กรัม ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม extraction buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.0, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA และ 0.5% SDS) ปริมาณ 400 ไมโครลิตรเขย่าอย่างแรงด้วย vortex mixer แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง

- เติม Proteinase K (1 มิลลิกรัม/ไมโครลิตร) ปริมาณ 4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

- นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดเอาเฉพาะส่วนสารละลายใส ใส่ microcentrifuge tube ใหม่

- ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol 1 เท่า (ปริมาตร/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 ชั่วโมง

- นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนสารละลายทิ้งให้เหลือเฉพาะตะกอนดีเอ็นเอ ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethyl alcohol ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

- ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 150 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ

ให้ตะกอนละลายจนหมดแล้วเติม RNase ONE™ ribonuclease จำนวน 10 ยูนิตต่อหลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมงหรือทิ้งไว้ค้างคืนเพื่อให้เกิดการย่อย RNA จนหมด

- ทำ phenol extraction เพื่อให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ โดยเติม phenol pH 8 1 เท่า (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในหลอดสารละลาย ผสมให้เข้ากันโดยการคว่ำหลอดไปมา แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดเอาส่วนสารละลายใส ใส่หลอดใหม่ ขั้นตอนนี้ให้สกัดด้วย phenol จนได้สารละลายใส

- สกัด phenol ออกด้วย chloroform โดยเติม chloroform 1 เท่า (ปริมาตร/ปริมาตร) ผสมให้เข้ากันโดยการคว่ำหลอดไปมา แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดเอาส่วนสารละลายใส ใส่หลอดใหม่

- ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol ที่แช่เย็น 1 เท่า (ปริมาตร/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส ประมาณ 2-3 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทิ้ง

- ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethyl alcohol จากนั้นทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA) ปริมาณ 150 ไมโครลิตร นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในงานทดลองขั้นต่อไป

2.3 ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ปริมาณ 8 ไมโครลิตร ผสมกับ loading buffer ความเข้มข้น 5x ปริมาณ 2 ไมโครลิตร มาตรวจสอบด้วยวิธี อกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้อกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1.7% ใช้ความต่างศักย์ 90 V กระแสไฟฟ้า 400 mA เป็นเวลา 45 นาทีถึง 1 ชั่วโมง

3. การทดสอบสภาพที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา ใช้ขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.1 ผลของปริมาณดีเอ็นเอ และ ระยะเวลาต่อปฏิกิริยา digestion

Digestion เป็นการตัดดีเอ็นเอด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ ในการทำ AFLP ใช้เอ็นไซม์ คือ *Eco*RI และ *Mse*I ตัดดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส การหาสภาพที่เหมาะสมสำหรับการทำ digestion ทำการทดสอบ 2 ปัจจัย คือ ปริมาณดีเอ็นเอ และ ระยะเวลาในการตัด

ปริมาณดีเอ็นเอ ประกอบด้วย 3 ระดับ คือ

1. ดีเอ็นเอ 250 นาโนกรัม
2. ดีเอ็นเอ 500 นาโนกรัม

3. ดีเอ็นเอ 750 นาโนกรัม

ระยะเวลาในการตัด ประกอบด้วย 2 ระยะ คือ

1. ตัด 2 ชั่วโมง
2. ตัดข้ามคืน

องค์ประกอบในปฏิกิริยา digestion คือ

5x reaction buffer	5	ไมโครลิตร
sample DNA (250, 500 หรือ 750 นาโนกรัม)	5	ไมโครลิตร
*Eco*RI/*Mse*I	2	ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	13	ไมโครลิตร

จากนั้นนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยวิธีอกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้อกาโรสเจลที่ความเข้มข้น 1.7% ความต่างศักย์ 90 V กระแสไฟฟ้า 400 mA เป็นเวลา 45 นาทีถึง 1 ชั่วโมง ถ่ายรูปเจลที่ได้ด้วยเครื่อง Gel documentation ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง

3.2 ผลของระยะเวลาในการทำ ligation ต่อปฏิกิริยา PCR

Ligation เป็นการต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วย *Eco*RI และ *Mse*I เข้ากับ adapter ซึ่งเป็น oligonucleotide ที่ทำหน้าที่เป็นตำแหน่งเริ่มต้นของการจับของไพรเมอร์ในปฏิกิริยา PCR ด้วยเอ็นไซม์ ligase ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส โดยนำสารละลายที่ได้จากการทำ digestion มาบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีเพื่อหยุดการทำงานของเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ แล้วนำมาทำปฏิกิริยา ligation

องค์ประกอบปฏิกิริยา ligation คือ

สารละลายจากการทำ digestion	25	ไมโครลิตร
adapter ligation solution	24	ไมโครลิตร
T4 DNA ligase	1	ไมโครลิตร

บ่มองค์ประกอบทั้งหมด 4 ระยะเวลา คือ

1. 2 ชั่วโมง
2. 4 ชั่วโมง
3. 6 ชั่วโมง
4. 12 ชั่วโมง

จากนั้นนำผลที่ได้ไปทำ PCR ด้วยไพรเมอร์ในเครื่องอัตโนมัติควบคุมปฏิกิริยา (ภาพ 2)

จากขั้นตอน pre-selective amplification และ วิเคราะห์ผลด้วยวิธีอกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้อกาโรสเจลที่ความเข้มข้น 1.7% ความต่างศักย์ 90 V กระแสไฟฟ้า 400 mA เป็นเวลา 45 นาทีถึง 1 ชั่วโมง ถ่ายรูปเจลที่ได้ด้วยเครื่อง Gel documentation

ภาพ 2 เครื่องอัตโนมัติควบคุมปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction)

3.3 ผลของการเจือจางดีเอ็นเอต่อปฏิกิริยา PCR

นำดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ ligation มาเจือจางด้วย TE buffer ประกอบด้วย 3 กรรมวิธี คือ 1. เจือจางในอัตรา 1:5

2. เจือจางในอัตรา 1:10

3. เจือจางในอัตรา 1:50

จากนั้นนำผลที่ได้ไปทำ PCR จากขั้นตอน pre-selective amplification และ วิเคราะห์ผลด้วยวิธีอกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้อกาโรสเจลที่ความเข้มข้น 1.7% ความต่างศักย์ 90 V กระแสไฟฟ้า 400 mA เป็นเวลา 45 นาทีถึง 1 ชั่วโมง ถ่ายรูปเจลที่ได้ด้วยเครื่อง Gel documentation

4. การทดสอบคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการทำ AFLP

เทคนิค AFLP ประกอบด้วยขั้นตอนการทำ PCR 2 ครั้ง โดยการทำ PCR ครั้งที่ 1 (pre-selective amplification) เป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างไพรเมอร์กับ adapter จากการต่อได้ในขั้นตอน ligation โดยที่ไพรเมอร์นั้นเป็นไพรเมอร์ที่มีลำดับเบสเหมือนกัน ในการทำปฏิกิริยา PCR ทุกครั้ง สำหรับ PCR ครั้งที่ 2 (selective amplification) ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอต้นแบบนั้นมีความจำเพาะเจาะจงมากขึ้นโดยมีการเติมเบสเพิ่มขึ้นอีก 3 เบสที่ปลายด้าน 3′ และ

ลำดับเบสที่เพิ่มขึ้นมีความแตกต่างกันตามต้องการ ซึ่งจำนวนของเบสที่เพิ่มขึ้นนี้เป็นส่วนสำคัญที่กำหนดกลุ่มประชากรดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณ เพื่อให้เกิดการเลือกจับได้เฉพาะชิ้น ดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสส่วนที่อยู่ติดกับบริเวณที่จดจำของเอ็นไซม์ที่เข้าคู่ได้กับไพรเมอร์ที่เลือกใช้ เท่านั้น

4.1 การทำ PCR ครั้งที่ 1 ใช้ดีเอ็นเอจาก บัวชั้น (*Curcuma petiolata* Roxb.) ที่ได้จากการทำ digestion เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และ ligation เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

องค์ประกอบของปฏิกิริยา คือ

diluted template DNA	5	ไมโครลิตร
pre-amp primer mix	40	ไมโครลิตร
10x PCR buffer plus Mg	5	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (1 ยูนิต/ไมโครลิตร)	1	ไมโครลิตร

ใส่สารละลายปริมาตร 51 ไมโครลิตรลงใน multi ultra PCR tube ขนาด 0.2 มิลลิลิตร และ ปิดด้านบนของสารละลายด้วย mineral oil จากนั้นนำหลอดใส่เครื่อง PCR โดยมีเงื่อนไขของปฏิกิริยา ประกอบด้วย 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 56 องศาเซลเซียส 60 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที จำนวน 20 รอบ จากนั้นทำการเจือจางสารละลายที่ได้ด้วย TE buffer ในอัตรา 1:10

4.2 การทำ PCR ครั้งที่ 2 มีองค์ประกอบคือ

diluted template DNA	5	ไมโครลิตร
Mix 1	5	ไมโครลิตร
Mix 2	10	ไมโครลิตร

- Mix 1 สำหรับ 5 ปฏิกิริยา ประกอบด้วย

*Eco*RI primer (ดู 4.3)	1 ไมโครลิตร
*Mse*I primer (ดู 4.3)	23 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ	1 ไมโครลิตร

- Mix 2 สำหรับ 10 ปฏิกิริยา ประกอบด้วย

10x PCR buffer plus Mg	20 ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (5 ยูนิต/ไมโครลิตร)	1 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	79 ไมโครลิตร

ใส่สารละลายปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงใน multi ultra PCR tube ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ปิดด้านบนของสารละลายด้วย mineral oil จากนั้นนำหลอดใส่เครื่อง PCR โดยมีเงื่อนไขของปฏิกิริยา ประกอบด้วย 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 65 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นลดอุณหภูมิ annealing ของแต่ละรอบลง 0.7 องศาเซลเซียส จำนวน 12 รอบ และ ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที จำนวน 1 รอบ ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง 20 นาที จากนั้นนำสารละลายที่ได้เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอการตรวจสอบผล

4.3 ไพรเมอร์ที่ใช้ทดสอบ

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ครั้งที่ 2 ประกอบด้วย 2 กลุ่ม คือ

1. กลุ่ม E คือ ไพรเมอร์ที่เป็นจุดเริ่มต้นปฏิกิริยา PCR จากด้านที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ *Eco*RI
2. กลุ่ม M คือ ไพรเมอร์ที่เป็นจุดเริ่มต้นปฏิกิริยา PCR จากด้านที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ *Mse*I

ไพรเมอร์กลุ่ม E	ไพรเมอร์กลุ่ม M
E-AAC	M-CAA
E-AAG	M-CAC
E-ACA	M-CAG
E-ACT	M-CAT
E-ACC	M-CTA
E-ACG	M-CTC
E-AGC	M-CTG
E-AGG	M-CTT

จับคู่ไพรเมอร์แบบพบกันหมดได้ 64 คู่ ผลที่ได้จากการทำ PCR วิเคราะห์ด้วยวิธีอกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้อกาโรสเจลที่ความเข้มข้น 1.7% ความต่างศักย์ 90 V กระแสไฟฟ้า 400 mA เป็นเวลา 45 นาทีถึง 1 ชั่วโมง ถ่ายรูปเจลที่ได้ด้วยเครื่อง Gel document พิจารณาผลที่ได้จากการเกิดแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และ มีหลายแถบ คัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมอย่างน้อย 5 ไพรเมอร์

5. การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของบัวชั้น

จากการเก็บตัวอย่างและบันทึกข้อมูลทางสัณฐานวิทยาของบัวชั้นจำนวน 105 ต้น หลังจากนั้นทำการคัดเลือกต้นที่นำมาทำการทดลอง จากลักษณะสีของกลีบใบประดับ สีก้านช่อดอก และ ลักษณะกลีบใบประดับ โดยแต่ละลักษณะคัดเลือกมาอย่างละ 10 ต้น ทั้งหมดจำนวน 34 ต้น (ภาพ 3 - 19) และ จากการคัดเลือกไพรเมอร์ ใช้ไพร์เมอร์ 5 คู่ ดังนี้ E-AAC + M-CAC, E-ACC + M-CTC, E-AGC + M-CAG, E-ACG + M-CAT และ E- AAC + M-CAT จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้โพลีอะคริลาไมด์เจลที่ความเข้มข้น 6 % เจลยาว 45 เซนติเมตร ใช้ความต่างศักย์ 55 W เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 45 นาที จากนั้นทำไปย้อมด้วย silver stain

ก

ข

ภาพ 3 บัวชั้นที่นำมาศึกษา ต้น A6 (ก) และ A7(ข)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ก

ข

ภาพ 4 บัวชั้นที่นำมาศึกษา ต้น A8 (ก) และ A12 (ข)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ก

ข

ภาพ 5 บัวชั้นที่นำมาศึกษา ต้น A13 (ก) และ A14 (ข)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ก

ข

ภาพ 6 บัวชั้นที่นำมาศึกษา ต้น A15 (ก) และ B5 (ข)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ก

ข

ภาพ 7 บัวชั้นที่นำมาศึกษา ต้น B8 (ก) และ B9 (ข)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ก

ข

ภาพ 8 บัวชั้นที่นำมาศึกษา ต้น B14 (ก) และ C2 (ข)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ก

ข

ภาพ 9 บัวชั้นที่นำมาศึกษา ต้น C5 (ก) และ C8 (ข)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ก

ข

ภาพ 10 บัวชั้นที่นำมาศึกษา ต้น C9 (ก) และ C11 (ข)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ก

ข

ภาพ 11 บัวชั้นที่นำมาศึกษา ต้น C14 (ก) และ D1 (ข)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ก

ข

ภาพ 12 บัวชั้นที่นำมาศึกษา ต้น D3 (ก) และ E2 (ข)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ก

ข

ภาพ 13 บัวชั้นที่นำมาศึกษา ต้น E4 (ก) และ E9 (ข)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ก

ข

ภาพ 14 บัวชั้นที่นำมาศึกษา ต้น E12 (ก) และ F1 (ข)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ก

ข

ภาพ 15 บัวชั้นที่นำมาศึกษา ต้น F2 (ก) และ F4 (ข)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ก

ข

ภาพ 16 บัวชั้นที่นำมาศึกษา ต้น F6 (ก) และ F7 (ข)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ก

ข

ภาพ 17 บัวชั้นที่นำมาศึกษา ต้น F14 (ก) และ G2 (ข)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ก

ข

ภาพ 18 บัวชั้นที่นำมาศึกษา ต้น G4 (ก) และ G9 (ข)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ก

ข

ภาพ 19 บัวชั้นที่นำมาศึกษา ต้น G10 (ก) และ G13 (ข)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

6. การวิเคราะห์ผล

วิเคราะห์ขนาดแถบดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรม gene directory และ ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ด้วยวิธี UPGMA ของ Dice

สถานที่ทำงานวิจัย

ศูนย์บริการการพัฒนาขยายพันธุ์ไม้ดอกไม้ผลบ้านไร่อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อ.หางดง จ. เชียงใหม่

ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์เคมี เรือนเพาะชำ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ห้องปฏิบัติการโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร (CMU-AgBiotech) คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาทำการวิจัย

เดือนมีนาคม 2543 - เดือนมีนาคม 2546

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University