บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ และ วิธีการทดลอง

<u>วัสดุและอุปกรณ์</u>

1. การผสมพันธุ์กล้วยไม้

1.1 วัสดุพันธุ์พืช ได้แก่ ต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์พื้นเมือง 11 ชนิด จาก 4 หมู่ ดังนี้

1.1.1 **หมู่** *Callista*

1.1.1.1 **ชื่อวิทยาศาสตร์** *Dendrobium chrysotoxum* Lindl.

รหัส D026

ชื่อสามัญ เอื้องคำ

ลักษณะเด่น ดอกสีเหลืองสด กลีบดอกหนาเป็นมันคล้ายขี้ผึ้ง ขอบปากหยักเป็นครุย ช่อดอกเป็นแบบช่อห้อย และไม่ทิ้งใบ

ช่วงเวลาการออกดอก เดือนเมษายน

1.1.2 **หมู่** *Dendrobium*

1.1.2.1 **ชื่อวิทยาศาสตร์** *Den. unicum* Seidenf.

รหัส D015

ชื่อสามัญ ครั่งแสด หรือ เอื้องสายสีแสด

ลักษณะเด่น ดอกขนาดเล็ก มีสีส้มสดใส ส่วนของปากชี้ขึ้น-ข้างบน ปากมีสีเหลืองมีเส้นสีส้มขีดเป็นลายทั่วปาก ลำลูกกล้วย สั้น ทรงต้นเล็กกะทัดรัด

ช่วงเวลาการออกดอก เดือนกุมภาพันธ์ - พฤษภาคม

1.1.2.2 **ชื่อวิทยาศาสตร์** *Den. findlayanum* Par & Rchb.f.

รหัส D030

ชื่อสามัญ เอื้องพวงหยก หรือ เอื้องหวายปม

ลักษณะเด่น ดอกสีชมพู โคนปากสีเหลือง ปลายกลีบมีแต้มสีม่วง ลำลูกกล้วยแบน มีส่วนของปล้องพองออกมาเป็นปม มีสีเขียวเหลืองเป็นมัน

ช่วงเวลาการออกดอก เดือนกุมภาพันธ์ - มีนาคม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.1.2.3 **ชื่อวิทยาศาสตร์** *Den. nobile* Lindl.

รหัส D031

ชื่อสามัญ เอื้องเก๊ากิ่ว

ลักษณะเด่น ดอกสีชมพูอมม่วง ปลายกลีบจะมีสีเข้มกว่า ปากห่อเป็นท่อ โคนปากมีสีเหลืองและมีแต้มสีน้ำตาล 2 จุด

ช่วงเวลาการออกดอก เดือนมีนาคม - เมษายน

1.1.2.4 **ชื่อวิทยาศาสตร์** *Den. crystallinum* Rchb.f.

รหัส D044

ชื่อสามัญ เอื้องสายสามสี

ลักษณะเด่น กลีบดอกสีขาว มีแต้มสีม่วงที่ส่วนของปลาย กลีบและปลายปาก โคนปากมีสีเหลือง

ช่วงเวลาการออกดอก เดือนมีนาคม - เมษายน

1.1.3 **หมู่** *Formosae*

1.1.3.1 **ชื่อวิทยาศาสตร์** *Den. scabrilingue* Lindl.

รหัส D012

ชื่อสามัญ เอื้องแซะ

ลักษณะเด่น ดอกเล็กสีขาว มีกลิ่นหอม ปากสีเหลือง ทรงต้นเล็ก

ช่วงเวลาการออกดอก เดือนธันวาคม - กุมภาพันธ์

1.1.3.2 **ชื่อวิทยาศาสตร์** *Den. cariniferum* Rchb.f.

รหัส D018

ชื่อสามัญ เอื้องเงินแดง

ลักษณะเด่น ดอกสีขาวครีม มีกลิ่นหอม ปากสีเหลืองอ่อน คอปากมีสีส้ม ขอบปากหยักและมีสีเหลือง

ช่วงเวลาการออกดอก เดือนกุมภาพันธ์ - เมษายน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.1.3.3 **ชื่อวิทยาศาสตร์** *Den. infundibulum* Lindl.

รหัส D034

ชื่อสามัญ เอื้องตาเหิน

ลักษณะเด่น ดอกมีขนาดใหญ่สีขาว ปากสีขาวมีแต้มสีส้มตรงกลางปาก

ช่วงเวลาการออกดอก เดือนกุมภาพันธ์ - มีนาคม

1.1.3.4 **ชื่อวิทยาศาสตร์** *Den. trigonopus* Rchb.f.

รหัส D037

ชื่อสามัญ เอื้องคำปากไก่

ลักษณะเด่น ดอกสีเหลือง กลีบดอกหนาเป็นมัน ปากสีเขียวเหลือง มีปากด้านข้าง ดอกบานทนนาน

ช่วงเวลาการออกดอก เดือนกุมภาพันธ์ – มีนาคม

1.1.3.5 **ชื่อวิทยาศาสตร์** *Den. draconis* Rchb.f.

รหัส D022

ชื่อสามัญ เอื้องเงิน

ลักษณะเด่น ดอกมีสีขาว ปลายกลีบในแหลม ปลายปากแหลมยื่นออกมา โคนปากมีสีแดง มีกลิ่นหอม

ช่วงเวลาการออกดอก เดือนมีนาคม - เมษายน

1.1.4 **หมู่** *Phalaenanthe*

1.1.4.1 **ชื่อวิทยาศาสตร์** *Den. phalaenopsis* Fitzg.

รหัส D017

ชื่อสามัญ หวายฟาแลนอปซีส

ลักษณะเด่น ดอกสีชมพูอมม่วง ฟอร์มดอกสวย ช่อดอกเป็นแบบ raceme

ช่วงเวลาการออกดอก เดือนตุลาคม - มีนาคม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2 อุปกรณ์

1.2.1 ไม้จิ้มฟันสะอาด

1.2.2 คีมคีบ

1.2.3 ฉลากสำหรับเขียนรายละเอียด

1.2.4 กระดาษชำระ

1.2.5 แอลกอฮอล์

2. การทำ RAPD

2.1 ตัวอย่างพืช

ใบอ่อนที่ 2 หรือ 3 นับจากยอด ที่สะอาดและไม่เป็นโรค

2.2 สารเคมี

2.2.1 agarose (บริษัท Promega)

2.2.2 ammonium acetate

2.2.3 boric acid

2.2.4 bromophenol blue

2.2.5 cetyltrimethyl ammonium bromide

2.2.6 chloroform

2.2.7 deoxyribonucleoside triphosphates (บริษัท Invitrogen)

2.2.8 DNA Marker 50–2500 bp. (คู่เบส)

2.2.9 ethidium bromide

2.2.10 ethyl alcohol

2.2.11 ethylenediaminetetracetic acid

2.2.12 EZ Load Precision Molecular Mass Standard (บริษัท BIO–RAD)

2.2.13 isopropanol

2.2.14 isoamyl alcohol

2.2.15 liquid nitrogen

2.2.16 magnesium chloride (บริษัท Invitrogen)

2.2.17 2 – mercaptoethanol

2.2.18 PCR reaction buffer (บริษัท Invitrogen)

2.2.19 polyvinyl pyrrolidone – 40

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2.20 primer (บริษัท Operon Technology) คือ OPF01-20 และ OPD03 (ภาคผนวก ตาราง 34)

2.2.21 sodium chloride

2.2.22 sodium dodecyl sulfate

2.2.23 sucrose

2.2.24 *Taq* DNA polymerase (บริษัท Invitrogen)

2.2.25 tris [hydroxy methyl] aminomethane

2.2.26 xylene cyanol FF

2.3 อุปกรณ์

2.3.1 เครื่อง thermocycler (Gene Amp PCR System 24000 ; Perkin Elmer)

2.3.2 ชุดอุปกรณ์อิเล็คโตรโฟรีซิส (electrophoresis) ชนิดแนวนอน (บริษัท BIO-RAD)

2.3.3 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply : บริษัท BIO-RAD)

2.3.4 เครื่องชั่งแบบละเอียด

2.3.5 เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง

2.3.6 เครื่องเขย่า (shaker)

2.3.7 แผ่นความร้อน

2.3.8 เครื่องทำน้ำแข็ง

2.3.9 หม้อนึ่งความดันไอ

2.3.10 ตู้บ่ม

2.3.11 UV transilluminator หรือ BIO – RAD Mini-Transilluminator

2.3.12 Gel Documentation ยี่ห้อ Syngene รุ่น Gene Genius (บริษัท Lab Focus)

2.3.13 โกร่งบดตัวอย่าง

2.3.14 ถังบรรจุไนโตรเจนเหลว

2.3.15 ตู้แช่ – 20 องศาเซลเซียส และตู้แช่ –70 องศาเซลเซียส

2.3.16 water bath

2.3.17 adjustable automatic pipettes P2, P10, P20, P100, P200 และ P1000

2.3.18 microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และ multi ultra PCR tube ขนาด 0.5 และ 0.2 มิลลิลิตร

2.3.19 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3.20 เครื่องปั่นผสม (magnetic stirrer)

2.3.21 pipette tip ขนาด 10 และ 200 ไมโครลิตร

2.3.22 เครื่องดูดอากาศ (suction pump)

2.3.23 หวีเสียบ (comb)

2.3.24 ถาดพลาสติกสำหรับเตรียมเจลขนาด 15 × 15 เซนติเมตร

2.3.25 เตาไมโครเวฟ

2.3.26 ตู้ดูดไอพิษ

2.3.27 vortex mixer

2.3.28 เครื่องแก้วต่าง ๆ ได้แก่ บีกเกอร์ขนาดต่าง ๆ ปิเปต กระบอกตวง และแท่งแก้วคนสารละลาย

2.3.29 อุปกรณ์อื่น ๆ เช่น ช้อนตักสาร ถุงมือ กระดาษชั่งสาร ปากคีบ กล่องโฟม แผ่นอลูมิเนียม ถาดพลาสติก กระดาษชำระ กรรไกร ไม้บรรทัด และมีดคัตเตอร์

วิธีการทดลอง

แบ่งแนวการศึกษาออกเป็น 2 ขั้นตอนโดยขั้นแรก ศึกษาความสามารถในการผสมข้ามหมู่ของกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์พื้นเมือง เพื่อสร้างลูกผสมชั่วที่ 1 จากนั้นศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวายในคู่ผสมที่สามารถให้ลูกผสมได้ และลูกผสมที่ได้โดยใช้เทคนิค RAPD ซึ่งมีวิธีการทดลองดังนี้

การทดลองที่ 1 การปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการผสมพันธุ์

เตรียมต้นกล้วยไม้สกุลหวายพันธุ์พื้นเมือง 11 ชนิด จาก 4 หมู่ แล้วผสมพันธุ์กล้วยไม้สกุลหวายด้วยการถ่ายละอองเกสรโดยการผสมข้ามชนิดทั้งภายในหมู่เดียวกันและข้ามหมู่ เพื่อสร้างเมล็ดลูกผสมชั่วที่ 1 (ตาราง 1)

ตาราง 1 คู่ผสมกล้วยไม้สกุลหวายที่ได้มีการศึกษาการผสมข้ามชนิดภายในหมู่เดียวกันและข้ามหมู่

คู่ผสมที่	แม่		พ่อ	
	รหัส	หมู่	รหัส	หมู่
1	D 017	*Phalaenanthe*	D 015	*Dendrobium*
2	D 015	*Dendrobium*	D 012	*Formosae*
3	D 012	*Formosae*	D 017	*Phalaenanthe*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1 (ต่อ)

คู่ผสมที่	แม่		พ่อ	
	รหัส	หมู่	รหัส	หมู่
4	D017	*Phalaenanthe*	D022	*Formosae*
5	D015	*Dendrobium*	D022	*Formosae*
6	D012	*Formosae*	D015	*Dendrobium*
7	D017	*Phalaenanthe*	D012	*Formosae*
8	D022	*Formosae*	D012	*Formosae*
9	D022	*Formosae*	D015	*Dendrobium*
10	D015	*Dendrobium*	D017	*Phalaenanthe*
11	D026	*Callista*	D018	*Formosae*
12	D030	*Dendrobium*	D026	*Callista*
13	D026	*Callista*	D030	*Dendrobium*
14	D031	*Dendrobium*	D030	*Dendrobium*
15	D031	*Dendrobium*	D026	*Callista*
16	D018	*Formosae*	D037	*Formosae*
17	D031	*Dendrobium*	D018	*Formosae*
18	D018	*Formosae*	D031	*Dendrobium*
19	D030	*Dendrobium*	D018	*Formosae*
20	D030	*Dendrobium*	D031	*Dendrobium*
21	D034	*Formosae*	D037	*Formosae*
22	D037	*Formosae*	D034	*Formosae*
23	D037	*Formosae*	D022	*Formosae*
24	D034	*Formosae*	D022	*Formosae*
25	D022	*Formosae*	D034	*Formosae*
26	D022	*Formosae*	D044	*Dendrobium*
27	D044	*Dendrobium*	D022	*Formosae*
28	D017	*Phalaenanthe*	D044	*Dendrobium*
29	D044	*Dendrobium*	D017	*Phalaenanthe*
30	D017	*Phalaenanthe*	D018	*Formosae*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บันทึกผลที่ได้จากการผสมพันธุ์และการติดฝักของแต่ละคู่ผสม สำหรับคู่ผสมที่ติดฝัก เมื่อฝักมีอายุครบ 3 เดือนนับจากวันที่ผสมพันธุ์ นำมาเพาะเมล็ดในสภาพปลอดเชื้อโดยใช้อาหารวุ้นสูตร Vacin and Went (1949) (ดูวิธีเตรียมในภาคผนวก) แล้วบันทึกจำนวนต้นของลูกผสมแต่ละคู่ และเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของลูกผสม เมื่อนำมาย้ายปลูก

การทดลองที่ 2 การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมาย RAPD

1. การเตรียมดีเอ็นเอของกล้วยไม้สกุลหวาย

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของต้นกล้วยไม้โดยวิธีของ Doyle and Doyle (1990) ดังนี้

1.1 ล้างตัวอย่างพืชที่ไม่เป็นโรค ด้วยน้ำสะอาด 2 – 3 ครั้ง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง ซับให้แห้งแล้วชั่งตัวอย่างพืช ชนิดละ 0.5 กรัม นำไปบดใน liquid nitrogen จนเป็นผงละเอียด

1.2 เตรียม extraction buffer (ดูวิธีการเตรียมในภาคผนวก ข) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วตักพืชที่บดแล้วจากข้อ 1.1 ใส่ลงในหลอดทดลองที่เตรียมไว้

1.3 นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที โดยเขย่าหลอดทดลองเบา ๆ ทุก ๆ 10 นาที

1.4 เติม chloroform-isoamyl alcohol (24:1, v:v) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เขย่าเบา ๆ เพื่อให้สารละลายเข้ากันได้ดี แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

1.5 ดูดสารละลายใสส่วนบน (supernatant) ลงในหลอดทดลองหลอดใหม่ให้ได้มากที่สุด จากนั้นเติม isopropanol ปริมาตร 2 ใน 3 ส่วนของสารละลายส่วนใสที่ดูดมาได้ เขย่าเบา ๆ ให้สารละลายเข้ากันได้ดี แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นข้ามคืนเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ

1.6 นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด แล้วเทสารละลายทิ้งไว้เหลือเฉพาะตะกอนดีเอ็นเอ ผึ่งดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

1.7 เติม wash buffer (ดูวิธีการเตรียมในภาคผนวก ข) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ดีดหลอดทดลองเบา ๆ เพื่อให้ตะกอนดีเอ็นเอเข้ากับสารละลาย แล้วตั้งทิ้งไว้ 20 นาที

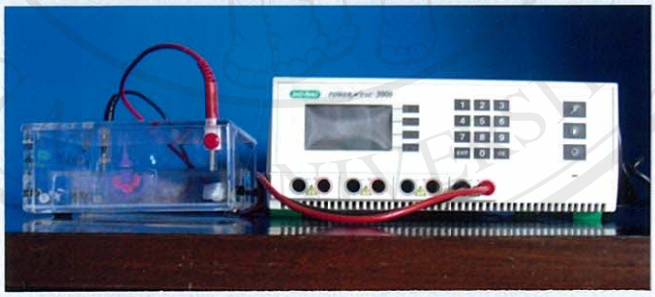
1.8 นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายออกให้เหลือเฉพาะตะกอนดีเอ็นเอ ผึ่งดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

1.9 เติม TE buffer (ดูวิธีการเตรียมในภาคผนวก ข) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในงานทดลองต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การตรวจสอบคุณภาพและปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

ประกอบถาดที่ใช้ในการเตรียมเจลและหวีเข้าด้วยกัน เตรียม agarose gel เข้มข้น 1.0 % โดยละลาย agarose 1.0 กรัม ใน 1X TBE buffer (ดูวิธีการเตรียมในภาคผนวก ข) 100 มิลลิลิตร หลอมเจลโดยใช้ไมโครเวฟ เขย่าเป็นครั้งคราวให้เจลละลายจนหมดแล้วค่อย ๆ เทลงในถาดเจลที่เตรียมไว้ให้เจลหนาประมาณ 5 มิลลิลิตร โดยไม่ให้มีฟองอากาศ ตั้งทิ้งไว้ให้แข็งตัวประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นค่อย ๆ ดึงหวีออก แล้วนำเจลใส่ลงในอ่างโดยให้ด้านที่มีช่องสำหรับหยอดตัวอย่างอยู่ด้านขั้วลบของอ่าง เท 1X TBE buffer ลงไปให้สูงกว่าผิวเจล 2–3 มิลลิเมตร นำ EZ Load Precision Molecular Mass Standard 5 ไมโครลิตร หยอดลงในช่องแรกของแผ่นเจล แล้วผสมดีเอ็นเอที่สกัดได้ 1 ไมโครลิตร ผสมกับ 6X loading dye (ดูวิธีการเตรียมในภาคผนวก ข) หยอดลงในช่องถัดไปของแผ่นเจล ปิดฝาอ่างและต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (ภาพ 1) ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที จากนั้นย้อมเจลด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก่อนนำไปตรวจสอบผลบน UV transilluminator พร้อมกับ บันทึกภาพโดยใช้ Gel Documentation คำนวณค่าและปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยนำลงเจือจางใน TE buffer ให้ได้ความเข้มข้น 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ซึ่งเป็นปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ที่เหมาะสมกับการทำปฏิกิริยา PCR



ภาพ 1 ชุดอุปกรณ์เครื่องอิเล็คโตรโฟรีซีส

3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction)

3.1 องค์ประกอบในปฏิกิริยา PCR

เตรียม reaction mixture ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใน multi ultra PCR tube ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ซึ่งในสารละลายดังกล่าวประกอบด้วย 1x PCR buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 100 µM dNTPs (dCTP, dGTP, dTTP, dATP), 0.8 unit *Taq* DNA polymerase, 100 ng primer, 5 ng DNA template และน้ำกลั่น จากนั้นนำหลอดใส่ลงไปในเครื่อง thermocycler (ภาพ 2)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 2 เครื่อง thermocycler ควบคุมปฏิกิริยา PCR

3.2 การทำปฏิกิริยา PCR ใช้วิธีการดัดแปลงจากวิธีการของ Chen *et al.* (1998) (ตาราง 2)

ตาราง 2 อุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	94	36	72	:	94	42	72	:	72	:	4
เวลา (วินาที)	60	10	10	:	60	45	70	:	240	:	α
จำนวนรอบ (รอบ)		2		:		30		:	1	:	

3.3 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

การทดลองนี้เลือกใช้ไพรเมอร์ที่มีความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ จากบริษัท Operon Technology Alamada, USA จำนวน 21 หมายเลข ได้แก่ OPF01–20 และ OPD03

4. การตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา PCR (PCR product) ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

ประกอบถาดที่ใช้ในการเตรียมเทเจลและหวีเข้าด้วยกัน เตรียม agarose gel เข้มข้น 1.8 % โดยละลาย agarose 1.8 กรัมใน 1X TBE buffer 100 มิลลิลิตร หลอมเจลโดยใช้ไมโครเวฟ เขย่าเป็นครั้งคราวให้เจลละลายจนหมด แล้วเทลงในถาดเจลที่เตรียมไว้ ให้เจลหนาประมาณ 5 มิลลิเมตร โดยไม่ให้มีฟองอากาศ ตั้งทิ้งไว้ให้แข็งตัวประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นค่อย ๆ ดึงหวีออก นำเจลใส่ลงในอ่าง โดยให้ด้านที่มีช่องสำหรับหยอดตัวอย่างอยู่ด้านขั้วลบของอ่าง เท 1X TBE buffer ลงไปให้สูงกว่าผิวเจล 2-3 มิลลิเมตร นำ DNA Marker 50–2500 คู่เบส 5 ไมโครลิตร ผสมกับ 6X loading dye 1 ไมโครลิตร หยอดลงไปช่องแรกของแผ่นเจล แล้วผสม PCR product 5 ส่วน กับ 6X loading dye 1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ส่วน หยอดลงไปในช่องถัดไปของแผ่นเจล ปิดฝาอ่างและต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า ใช้ความต่างศักย์ 50 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง หรือสังเกตสีของ loading dye อยู่ห่างจากขอบล่างของแผ่นเจลประมาณ 1 นิ้ว จึงปิดเครื่อง ย้อมเจลด้วย ด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเขย่าด้วย shaker ตลอดเวลาที่ย้อม ล้างเจลด้วยน้ำสะอาดก่อนนำไปตรวจสอบผลบน UV Transilluminator พร้อมบันทึกภาพโดยใช้ Gel Documentation โปรแกรม Gene Snap

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

ตรวจดูจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏและตำแหน่งการปรากฏและไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในแบบแผนลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพ่อ แม่ และลูกผสมชั่วที่ 1 โดยใช้ Gel Documentation โปรแกรม Gene Tools ซึ่งการบันทึกผลใช้ระบบตัวเลข คือ การปรากฏแถบดีเอ็นเอให้สัญลักษณ์เป็น 1 และถ้าไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งเดียวกันให้สัญลักษณ์เป็น 0 โดยบันทึกทุกตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอในแต่ละไพรเมอร์ เพื่อนำมาประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอระหว่างแม่ พ่อ และลูกผสมชั่วที่ 1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สถานที่ทำงานวิจัย

เรือนเพาะชำ ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และห้องปฏิบัติการวิเคราะห์เคมี หน่วยวิจัยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ห้องปฏิบัติการ โครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร (CMU-Ag Biotech) คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาทำการวิจัย

เดือน กุมภาพันธ์ 2545 – เดือน ธันวาคม 2546

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved