บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

พืชทดลอง

มะม่วงเขียวมรกต สายต้นคัดจำนวน 20 สายต้น บนพื้นที่ของเกษตรกรในเขตอำเภอบ้านโฮ่ง จังหวัดลำพูน ที่มีอายุ 7-10 ปี ทำการศึกษาในปี พ.ศ. 2548-2549

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดความแน่นเนื้อ (digital force gauges, model SHIMPO FGV-50A)
2. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Precia 1620)
3. เวอร์เนีย แคลลิเปอร์ส
4. เครื่องวัดสี (Chroma meter, Minolta CR-300)
5. เครื่องปั่นแยกกาก (juicer, National MJ-GBM)
6. เครื่องวัดของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Digital refractometer, Atago PR-101)
7. Centrifuge, Bench Top Vertifated Microtubles
8. Thermal Cycle, Peltier, Model PTC 100 Microcentrifuge, for breif spin
9. Refrigerated Centrifuge
10. เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง Balance, Basic Plus, Model BP310S
11. Oven, Hot air oven
12. Microwave: EMM2450
13. Mixer, Vortex-Genie II Model G560E, SI/USA
14. pH meter, Scott –Gerate. Model CG 842
15. Hot plate Stirrer, HL-HS 115
16. Block Heater, Weatec Model HB-2.
17. Gel documentation and analysis system Model Genius & Gene Tool Match and Gene Directory
18. Electrophoresis Sequencer, SQ3 (Amersham Pharmacia Biotech)
19. Electrophoresis System, Hoefer HE99X Max submarine unit (Amersham Pharmacia Biotech)
20. Electrophoresis, Gel mate 2000

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

21. Power Supply Model EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech/Sweden)
22. เครื่องทำความเย็น (ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส, ตู้แช่ -20 และ -80 องศาเซลเซียส)
23. Autoclave, Autoclave 53I, TomyModel ES-315
24. Gel dryer, Vacuum gel dryer system, Model GD 2000
25. Waterbath , Water Circulator Bath
26. Spectrophotometer, ELISA Reader, Model DV 990 BV4

วิธีการทดลอง

1. การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของมะม่วงเขียวมรกตสายต้นคัด โดยบันทึกข้อมูลดังนี้

1. การเจริญเติบโต ได้แก่ ความสูง ความกว้างทรงพุ่ม ลักษณะพุ่มต้น
2. ลักษณะต้น ได้แก่ รูปทรงต้น มุมกิ่ง เปลือกลำต้น
3. ลักษณะใบ ได้แก่ รูปร่างของใบ ความยาวของก้าน และโคนก้านใบ
4. ลักษณะช่อดอกและดอก ได้แก่ ความยาวและความกว้างของช่อดอก ตำแหน่งช่อดอก รูปทรงช่อดอก สีของก้านดอก และลักษณะของดอกย่อย สัดส่วนจำนวนของดอกสมบูรณ์เพศและดอกเพศผู้
5. ลักษณะผล ได้แก่ น้ำหนักของผลแก่จัด ความกว้างของผล ความยาวของผล ความหนาของผล รูปร่างของผล รูปร่างของปลายผลเมื่อมองด้านหน้าผล รูปร่างของผลเมื่อมองด้านข้างผล ลักษณะการติดของขั้วผล ไหล่ผลด้านหลัง ไหล่ผลด้านอก จะงอยผล ฐานของผล ส่วนเว้าผล โพรงที่ขั้วผล ความเหนียวก้านขั้วผล สัดส่วนกลุ่มน้ำหนักของผล ความสม่ำเสมอของสีเปลือก สีเปลือก สีเนื้อ เปอร์เซ็นต์เนื้อ และความแน่นเนื้อ pH ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ และปริมาณกรดทั้งหมด
6. ลักษณะเมล็ดรวมผนังผลชั้นใน (กะลา) ได้แก่ น้ำหนักของเมล็ดรวมผนังผลชั้นใน ความยาวของกะลา ความหนาของกะลา และเปอร์เซ็นต์เมล็ดที่รวมผนังผลชั้นใน
7. ทดสอบจำนวนต้นกล้าในเมล็ด โดยนำเมล็ดจากผลสุกไปปอกเนื้อออก จากนั้นนำไปเพาะในดินผสมถ่านแกลบ เป็นเวลา 20 วัน และบันทึกจำนวนต้นกล้าที่งอกต่อเมล็ด
8. บันทึกข้อมูลช่วงเวลาของการออกดอก ผล และอายุการเก็บเกี่ยว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การศึกษาลักษณะทางปริมาณและคุณภาพของผลมะม่วง

1. สุ่มเก็บตัวอย่างมะม่วงจากแต่ละสายต้น สายต้นละ 50 ผล
2. วัดความเหนียวก้านขั้วผล โดยใช้เครื่องวัดความแน่นเนื้อ สายต้นละ 10 ผล
3. ชั่งน้ำหนักผลโดยไม่รวมก้านผล แล้วแบ่งออกเป็นกลุ่มน้ำหนัก ดังนี้

กลุ่มที่ 1 น้ำหนัก มากกว่า	333	กรัม	(น้อยกว่า 3 ผลต่อกิโลกรัม)
กลุ่มที่ 2 น้ำหนัก	251-333	กรัม	(3-4 ผลต่อกิโลกรัม)
กลุ่มที่ 3 น้ำหนัก	167-250	กรัม	(4-6 ผลต่อกิโลกรัม)
กลุ่มที่ 4 น้ำหนัก น้อยกว่า	167	กรัม	(มากกว่า6 ผลต่อกิโลกรัม)

4. ศึกษาคุณลักษณะของมะม่วง โดยแบ่งมะม่วงออกเป็น 2 ชุด คือ ผลดิบแก่จัด และผลสุก (จากการบ่ม) ชุดละ 10 ผล มีวิธีการ ดังนี้

ชุดที่ 1 ผลดิบแก่จัด

1. ชั่งน้ำหนักผลด้วยเครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง มีหน่วยเป็นกรัม
2. วัดความกว้าง ความยาว และความหนาของผล ด้วยเวอร์เนีย แคลลิเปร์ส มีหน่วยเป็นเซนติเมตร แล้วนำมาคำนวณรูปร่างผล (1. round 2. ovoid oblong 3. oblong elongate) ลักษณะผล (1. แบน 2. กลม)
3. วัดสีเปลือก 3 จุด คือ ขั้ว กลาง และปลายผล ด้วยระบบ CIE 1976 (L* c* h*) โดยใช้เครื่องอ่านสี พร้อมทั้งสังเกต และบันทึกความสม่ำเสมอของสีเปลือกผลเป็นเปอร์เซ็นต์โดยการสังเกต
4. บันทึกลักษณะผล คือ ลักษณะการติดขั้วผล (1. elevated 2. level) ลักษณะของไหล่ผลด้านหลัง (1. slope down 2. slight curve และ 3. level) ลักษณะของไหล่ผลด้านนอก (1. curve upwards 2. slope down 3. level) ลักษณะของจะงอยผล (1. absent 2. a point 3. two points 4. prominent) ลักษณะของฐานผล (1. tapered 2. extended 3. necked 4. rounded 5. rounded oblique 6. tapered+rounded 7. necked+rounded) ลักษณะของส่วนเว้าผล (1. absent 2. shallow 3. deep) รูปร่างของปลายผลเมื่อมองจากด้านหน้าผล (1. acute 2. round) รูปร่างของปลายผลเมื่อมองจากด้านข้างผล (1. asymmetry 2. symmetry) โพรงที่ขั้วผล (1. absent 2. shallow 3. deep)
5. วัดสีของเนื้อผลแก่จัดทั้ง 2 ด้าน บริเวณกลางผล ด้านละ 1 จุด โดยใช้เครื่องอ่านสี
6. วัดความแน่นเนื้อไม่รวมเปลือก โดยใช้เครื่องวัดความแน่นเนื้อ แล้วนำมาคำนวณให้มีหน่วยเป็นกิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7. วัดปริมาณน้ำมะม่วง โดยปอกเปลือก และเนื้อมะม่วง ชั่งน้ำหนักส่วนเนื้อ แล้วนำไปปั่นแยกกาก โดยใช้เครื่องปั่นแยกกาก บันทึกปริมาณน้ำที่ได้ มีหน่วยเป็นมิลลิลิตร
8. วัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ โดยนำน้ำมะม่วงที่แยกได้มาวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ โดยใช้เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ มีหน่วยเป็นองศาบริกซ์ วัด 3 ครั้ง
9. วัดความเป็นกรดเป็นด่าง โดยปิเปตต์น้ำมะม่วง 10 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ที่มีน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันดีแล้วนำไปวัดความเป็นกรดเป็นด่าง
10. วัดปริมาณกรดทั้งหมด โดยปิเปตต์น้ำมะม่วงที่ผสมกับน้ำกลั่นในข้อ 9. ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 25 มิลลิลิตร 3 ขวด ขวดละ 10 มิลลิลิตร นำไปไตเตรทด้วยโซเดียม-ไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ โดยใช้ phenolphthalein 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 30 ไมโครลิตร เป็นอินดิเคเตอร์ ไทเทรทจนถึงจุดยุติ คือ เมื่อสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูโดยไม่เปลี่ยนสีคืนนาน 10 นาที บันทึกปริมาณของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไป แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของกรดทั้งหมด เมื่อเทียบเป็นกรดซิตริก
11. วัดความกว้าง ความยาว และความหนาของเมล็ดที่แกะเนื้อมะม่วงออกหมดแล้ว

ชุดที่ 2 ผลสุก

เลือกมะม่วงที่สมบูรณ์ ไม่มีแผล และโรค จำนวน 10 ผลต่อสายต้น บันทึกน้ำหนักผลบ่มด้วย ethrel นาน 5 วัน (ผสม Ethrel 30 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 1000 มิลลิลิตร หรือ ethephon 900 ส่วนต่อล้านส่วน) (ปฐมา, 2543) จากนั้นนำมะม่วงทุกผลบันทึกข้อมูล ดังนี้

1. ชั่งน้ำหนักผลเมื่อสุกหลังบ่ม
2. บันทึกลักษณะผลเหมือนในผลดิบแก่จัด ข้อ 3-11
3. ชั่งน้ำหนักของเมล็ดรวมทั้งผนังผลชั้นใน หลังจากเอาเนื้อมะม่วงออกจากผนังผลชั้นในจนหมด และนำไปล้างน้ำแล้ว

นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ย ค่าต่ำสุด ค่าสูงสุด และค่าความแปรปรวนของแต่ละลักษณะในแต่ละสายต้น หาค่าเฉลี่ย ค่าต่ำสุด ค่าสูงสุด และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของแต่ละลักษณะ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2. การศึกษาทางด้านพันธุกรรม

การศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่เหมาะสม

การศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอของมะม่วงเขียวมรกตใช้ 3 วิธีการ (ภาคผนวกที่ 2) คือ

1. Doyle and Doyle (1990) ประยุกต์โดยอุไรวรรณ (2540)

2. SDS Extraction (Kuntapanom and Ikeda, 1998)

3. ประยุกต์วิธีการของ Doyle and Doyle (1987)

เมื่อได้สารละลายจากการสกัดดีเอ็นเอแล้วนำมาตรวจสอบด้วย 1% agarose gel โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส เพื่อตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้

การศึกษาอายุของใบมะม่วงที่เหมาะสมในการนำมาสกัดดีเอ็นเอ

เก็บตัวอย่างใบอ่อนมะม่วง 3 ระยะ ที่มีอายุ 7, 12, และ 20 วัน ตามลำดับ นับจากวันที่เริ่มแทงยอดอ่อน มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีที่เหมาะสม

การศึกษาพันธุกรรมด้วยเทคนิค AFLP (Vos *et al*., 1995)

การศึกษาพันธุกรรมของมะม่วงเขียวมรกตสายต้นคัด 20 สายต้นด้วยเทคนิค AFLP มีขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียม adapter

adapter เป็นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์เป็นสายเดี่ยวก่อน แล้งจึงนำมาบ่มรวมกันเพื่อให้เกิดเป็นเกลียวคู่ การออกแบบ adapter ต้องสอดคล้องกับลำดับเบสของไพรเมอร์ในการทำ PCR ขั้นต่อไป การสังเคราะห์ adapter โดยเครื่องอัตโนมัติ (DNA synthesizer) จะได้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ไม่มีหมู่ฟอสเฟตที่ปลาย 5’ ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็น adapter ได้โดยไม่ต้องนำมาเติมหมู่ฟอสเฟตก่อน

หลังจากสังเคราะห์ adapter ในรูปโอลิโกนิวคลีโอไทด์สายเดี่ยวแต่ละสายแล้วนำมาคำนวณความเข้มข้นและรวมกันในอัตราส่วนจำนวนโมเลกุล (molar ratio) เท่ากัน ดังนี้

EcoRI adapter ผสมโอลิโกนิวคลีโอไทด์สายบน 8.5 ไมโครกรัม และสายล่าง 9.0 ไมโครกรัม ในน้ำ 60 ไมโครลิตร ซึ่งจะประกอบด้วยโอลิโกนิวคลีโอไทด์ชนิดละ 1500 พิโคโมล (pmol) ได้ความเข้มข้นของ adapter เป็น 25 พิโคโมลต่อไมโครลิตร นำไปบ่มเพื่อให้เสียสภาพที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที แล้วปล่อยให้ค่อยๆ เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แต่อาจไม่ต้องทำให้เสียสภาพก่อน โดยนำมาใส่รวมกันได้เลย เนื่องจากโอลิโกนิวคลีโอไทด์แต่ละสายมีขนาดสั้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

MseI adapter ผสมโอลิโกนิวคลีโอไทด์สายบน 8 ไมโครกรัม และสายล่าง 7 ไมโครกรัม ในน้ำ 60 ไมโครลิตร ซึ่งจะประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ชนิดละ 1500 พิโคโมล ในความเข้มข้น 25 พิโคโมลต่อไมโครลิตร

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

*Eco*RI adapter: 5′-CTCGTAGACTGCATACC-3′

3′-CATCTGACGTATGGTTAA-5′

*Mse*I adapter: 5′-GACGATGAGTCCTGAG-3′

3′-TACTCAGGACTCAT

2. การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

การตัดหรือย่อยดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสองชนิด (*Eco*RI และ *Mse*I) ทำโดยใส่ดีเอ็นเอ และสารละลายแต่ละชนิดในหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตร ดังนี้

1. ดีเอ็นเอ (100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	5.0	ไมโครลิตร
2. 10x tango buffer	2.5	ไมโครลิตร
3. *Mse*I (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1.0	ไมโครลิตร
4. *Eco*RI (10 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1.0	ไมโครลิตร
5. น้ำกลั่น	15.5	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	25.0	ไมโครลิตร

บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

3. การเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter (Ligation)

การเชื่อมต่อ adapter เข้ากับดีเอ็นเอ โดยนำดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมาเติมสารต่างๆ (ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ต่อตัวอย่าง) ดังนี้

1. ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	25.0	ไมโครลิตร
2. *Eco*RI adapter (25 พิโคโมลต่อไมโครลิตร)	1.0	ไมโครลิตร
3. *Mse*I adapter (25 พิโคโมลต่อไมโครลิตร)	2.0	ไมโครลิตร
4. 10x T4 ligase buffer	5.0	ไมโครลิตร
5. T4 DNA ligase (3 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1.0	ไมโครลิตร
6. น้ำกลั่น	16.0	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	50.0	ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และบ่มต่อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 2 ขั้น คือ preselective amplification และ selective amplification โดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกจำนวนมากขึ้น

นำดีเอ็นเอที่ต่อ adapter เรียบร้อยแล้วมาทำปฏิกิริยา PCR ในขั้นตอน preselective amplification โดยใช้สารต่างๆ ดังนี้ (ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส)

1. ดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อดีกับ adapter (เจือจาง 1:5 เท่า)	5.0	ไมโครลิตร
2. 10X PCR buffer	5.0	ไมโครลิตร
3. $MgCl_2$ (50 มิลลิโมลาร์)	1.5	ไมโครลิตร
4. dNTP (10 มิลลิโมลาร์)	1.0	ไมโครลิตร
5. ไพรเมอร์ E-A (5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร)	2.0	ไมโครลิตร
6. ไพรเมอร์ M-C (5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร)	2.0	ไมโครลิตร
7. Taq DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.2	ไมโครลิตร
8. น้ำกลั่น	33.0	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	50.0	ไมโครลิตร

เติมสารทั้งหมดลงในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร จากนั้นนำหลอดใส่ในเครื่อง Thermal Cycler โดยมีเงื่อนไขของปฏิกิริยา คือ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 65 องศาเซลเซียส 60 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที จำนวน 20 รอบ

หลังจากเสร็จสิ้นปฏิกิริยา PCR แบ่งส่วนสารละลายมาตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ 1.8% agarose gel ส่วนที่เหลือ (ผลผลิต PCR) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

นำผลผลิต PCR ที่ได้จากขั้นตอน preselective amplification มาเจือจาง 5, 10 และ 20 เท่า ด้วย TE buffer เพื่อทดสอบระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในขั้น selective amplification ส่วนที่เหลือเก็บไว้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การทำ selective amplification

นำผลผลิต PCR ที่ได้จากขั้นตอน preselective amplification ที่เจือจาง 5, 10 และ 20 เท่า มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในขั้นตอน selective amplification โดยใช้สารต่างๆ ดังนี้

1. ดีเอ็นเอ	5.0	ไมโครลิตร
2. 10X PCR buffer	2.0	ไมโครลิตร
3. $MgCl_2$ (50 มิลลิโมลาร์)	0.6	ไมโครลิตร
4. dNTP (10 มิลลิโมลาร์)	0.4	ไมโครลิตร
5. ไพรเมอร์ E (10 พิโคโมลต่อไมโครลิตร)	0.5	ไมโครลิตร
6. ไพรเมอร์ M (10 พิโคโมลต่อไมโครลิตร)	0.5	ไมโครลิตร
7. Taq DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	0.1	ไมโครลิตร
8. น้ำกลั่น	10.9	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	20.0	ไมโครลิตร

เติมสารทั้งหมดลงในหลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร จากนั้นนำหลอดใส่ในเครื่อง Thermal Cycler โดยมีเงื่อนไขของปฏิกิริยา คือ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 65 องศาเซลเซียส 60 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที จำนวน 1 รอบ

จากนั้นลดอุณหภูมิในขั้น annealing ลงรอบละ 1 องศาเซลเซียส แต่ละรอบทำซ้ำ 3 รอบ จนกระทั่งอุณหภูมิในขั้นตอน annealing อยู่ที่ 56 องศาเซลเซียส รวมจำนวน 21 รอบ และต่อด้วย 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 56 องศาเซลเซียส 60 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที จำนวน 20 รอบ

ไพรเมอร์ที่ใช้ทำปฏิกิริยา PCR ในขั้นตอน selective amplification ประกอบด้วยไพรเมอร์ 2 ชุด ได้แก่ ชุด E คือไพรเมอร์ที่เป็นจุดเริ่มต้นปฏิกิริยา PCR จากด้านที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และชุด M คือไพรเมอร์ที่เป็นจุดเริ่มต้นปฏิกิริยา PCR จากด้านที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Mse*I (ตารางที่ 2) นำไพรเมอร์ทั้ง 2 ชุดจับคู่แบบพบกันหมดได้ไพรเมอร์รวม 64 คู่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์ชุด E และชุด M ที่ใช้ในขั้นตอน selective amplification

ไพรเมอร์ชุด E	ไพรเมอร์ชุด M
E- AC	M-CCA
E- AG	M-CCA
E- AAC	M-CCA
E- AAG	M-CCA
E- AGA	M-CCA
E- ATT	M-CCA
E- ATG	M-CCA
E- ATC	M-CCA

เมื่อปฏิกิริยา PCR สิ้นสุดแล้วนำผลผลิต PCR มาเติม AFLP loading buffer (98% formamide, 10 mM EDTA pH 8.0, 0.1% bromophenol blue, 0.1% xylene cyanol) 20 ไมโครลิตร นำมาบ่มที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่น้ำแข็ง เพื่อนำไปแยกขนาดด้วย denaturing polyacrylamide gel electrophoresis ที่กำลังไฟฟ้า 55 วัตต์ นาน 2 ชั่วโมง 30 นาที ใน TBE Buffer

4. การเตรียมกระจกสำหรับเทเจล

1. นำแผ่นกระจกสำหรับเตรียมเจลมาล้างให้สะอาด แล้วเช็ดด้วย 70% ethanol ให้สะอาดทั้งสองแผ่น

2. เช็ดกระจกแผ่นหลังเป็นกระจกแผ่นยาวด้วย bind silane บริเวณที่จะเสียบหวี เพื่อให้เจลเกาะติดกับกระจก และเช็ดกระจกแผ่นหน้าให้ทั่วด้วย repel silane เพื่อไม่ให้เจลเกาะติดกระจก

3. นำกระจกทั้ง 2 แผ่น มาประกบเข้าชุด โดยวาง spacer ไว้ทั้งสองข้างเพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสอง โดยหันด้านที่ทา bind silane และ repel silane เข้าหากัน ใช้คลิปหนีบยึดให้อยู่คงที่ และใช้เทปกาวติดกระจกด้านท้าย เพื่อกันไม่ให้เจลรั่วซึมออกมา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การทำอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis)

1. เตรียม polyacrylamide gel ตามภาคผนวกที่ 2 เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้วใช้น้ำล้างกระจกด้านนอกให้สะอาด ดึงหวีออก ประกอบกระจก เข้ากับชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส และติดเทอร์โมมิเตอร์ไว้ตรวจสอบอุณหภูมิ ไม่ให้เกิน 55 องศาเซลเซียส เติมบัฟเฟอร์ 1X TBE 1 ลิตร ลงในช่องด้านบนและด้านล่าง (upper and lower tank) ใช้เข็มฉีดยาดูดบัฟเฟอร์มาล้างผิวหน้าของเจล ล้างยูเรียที่อยู่ในช่องหวีแต่ละช่องให้หมด

2. ต่อสายไฟเข้ากับเครื่อง ใช้กำลังไฟฟ้าคงที่ 55 วัตต์ และความต่างศักย์ 1,200 – 1,500 โวลต์ ทำ Pre-run 30-45 นาที

3. ปิดเครื่อง และใช้เข็มฉีดยาล้างยูเรียออกจากช่องหวีทุกช่องให้หมดอีกครั้ง

4. นำตัวอย่างดีเอ็นเอไปทำการเสียสภาพ (denature) ก่อน เพื่อแยกดีเอ็นเอให้เป็นสายเดี่ยว แล้วหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอ 4 ไมโครลิตรลงในช่อง

5. เปิดเครื่องโดยใช้กำลังไฟฟ้าเท่าเดิมเป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง จนกว่าสีของ loading buffer จะเคลื่อนที่ลงมาจนถึงด้านล่างของเจล

6. จากนั้นนำเจลที่ได้ไปย้อมด้วย silver stain

6. การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี silver stain

1. นำเจลมาแช่ในสารละลาย fixative 2 ขั้นตอน คือ 10% acetic acid 300 มิลลิลิตร นาน 20 นาที แล้วเทสารละลายออก จากนั้นแช่ด้วย 1% nitric acid 300 มิลลิลิตร 20 นาที เทสารละลายออก

2. ล้างด้วยน้ำกลั่นมากๆ 3 ครั้ง

3. เติม silver nitrate (ภาคผนวกที่ 2) 300 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 30 นาที

4. เทส่วนของ silver nitrate ทิ้งแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่แช่เย็นอย่างรวดเร็ว และล้างต่อด้วย developer (ภาคผนวกที่ 2) ที่เจือจางกับน้ำกลั่น (1:2) 150 มิลลิลิตร 2 ครั้ง จากนั้นใส่ developer ที่แช่เย็นไว้ เขย่าเบาๆ ประมาณ 5 – 10 นาที จนเห็นแถบของดีเอ็นเอปรากฏชัดเจน

5. หยุดปฏิกิริยาด้วย 10% acetic acid 20 วินาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 3 ครั้ง

6. ประกบกระดาษร้อยปอนด์กับแผ่นเจล แล้วค่อยๆ ลอกแผ่นเจลออกจากกระจก จากนั้นจึงนำไปทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง gel dryer และวิเคราะห์ผลต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7. การวิเคราะห์ข้อมูล (data analysis)

1. การอ่านข้อมูลของแถบดีเอ็นเอ

การอ่านข้อมูลของแถบดีเอ็นเอ ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค AFLP จะบันทึกค่าความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ (polymorphism) เนื่องจากเครื่องหมาย AFLP เป็น dominant markers ดังนั้นการบันทึกข้อมูลจะเป็นแบบ binary data คือ ถ้าช่องใดปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ตรวจสอบให้กำหนดค่าเป็น 1 (presence) แต่ถ้าช่องใดไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งที่ตรวจสอบให้กำหนดค่าเป็น 0 (absence) และพิจารณาร่วมกับลักษณะของสีเปลือกของผล กลุ่มน้ำหนักผล และ ลักษณะผล

2. การประเมินค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

ประเมินค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสายต้นมะม่วงเขียวมรกตประเมินโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis Systems) โดยคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนของมะม่วงเขียวมรกตทีละคู่แล้วนำไปสร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในรูปแบบ phylogenetic tree ด้วยวิธี UPGMA โดยค่า genetic distances ที่มีค่าเข้าใกล้ 1 แสดงว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมมาก ส่วนค่าที่เข้าใกล้ 0 แสดงว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อย ส่วนค่า similarity coefficient ที่ได้ หากมีค่าเข้าใกล้ 1 แสดงว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อย ส่วนค่าที่เข้าใกล้ 0 แสดงว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมมาก ซึ่งจะใช้เป็นข้อมูลในการวิเคราะห์ cluster analysis เพื่อจัดกลุ่มสายต้นมะม่วงเขียวมรกตตามความใกล้ชิดทางพันธุกรรม (dendrogram)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved