บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย (Method)

3.1 สำรวจและเก็บรวบรวมข้อมูลพร้อมทั้งเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพร

สำรวจและเก็บรวบรวมข้อมูลพร้อมทั้งเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพรจากบริเวณพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชในพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ มหาวิทยาลัยขอนแก่น บริเวณเขื่อนอุบลรัตน์ จังหวัดขอนแก่น โดยมีกำหนดการสำรวจและเก็บตัวอย่างในปีงบประมาณ 2552 ดังนี้

ครั้งที่ 1 วันที่ 14 -16 มกราคม 2552

ครั้งที่2 วันที่ 1 -3 เมษายน 2552

ครั้งที่ 3 วันที่ 3 -5 กรกฎาคม 2552

ครั้งที่ 4 วันที่ 16- 18 กันยายน 2552

นำมาเป็นวัตถุดิบในการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างสด เก็บเนื้อเยื่อพืชไว้ในสภาพแห้งและในสภาพแช่แข็งและจัดทำ Herbarium ของตัวอย่างพืช ไว้ที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สำหรับตัวอย่างของหนอนตายหยากจากพื้นที่โคกภูตากา อำเภอภูเวียง จังหวัดขอนแก่น ซึ่งเป็นพื้นที่ในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชในพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ เช่นกัน แต่ในงานวิจัยของปีงบประมาณ 2552 จะใช้เพื่อศึกษาเปรียบเทียบกับหนอนตายหยากที่พบจาก 2 พื้นที่ดังกล่าวข้างต้นเท่านั้น

3.2 การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอตรวจคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืชสมุนไพรจากพื้นที่บริเวณเขื่อนอุบลรัตน์ จังหวัดขอนแก่นและ เขื่อนจุฬาภรณ์ จ. ชัยภูมิ (จากปีงบประมาณ 2551) ดังมีวิธีการสกัดที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้ทั้งสิ้น 3 วิธีด้วยกันดังนี้

วิธีที่ 1 วิธีสกัดดีเอ็นเอของปรียา หวังสมนึก และคณะ (2545) มีขั้นตอนต่อไปนี้

1. ทำความสะอาดใบพืชสด เลือกเอาใบอ่อนประมาณ 0.3 กรัม รากสดประมาณ 0.3 กรัม หรือใช้ใบแห้งประมาณ 0.15 กรัม ใส่ลงในโกร่ง เติมไนโตรเจนเหลวให้ทั่วและบดให้ละเอียด ปล่อยให้ไนโตรเจนเหลวระเหยไปจนหมด แล้วจึงถ่ายผงที่บดแล้วลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม extraction buffer 0.7 มิลลิลิตร

2. บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 60 นาที โดยกลับหลอดไปมา 2-3 ครั้ง

3. ใส่โปแตสเซียมอะซิเตต ความเข้มข้น 5 โมลาร์ 0.22 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน วางบนน้ำแข็งนาน 20-30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 3 นาที

4. ดูดสารละลายส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ เติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

5. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 3 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้งไป ล้างตะกอนเบา ๆ ด้วยแอลกอฮอล์ 70 % เพื่อละลายเกลืออกจากโมเลกุลของดีเอ็นเอ เทแอลกอฮอล์ทิ้งไป

6. เติมสารละลาย T5E ปริมาตร 300 ไมโครลิตร อุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ตะกอน ดีเอ็นเอละลาย

7. เติมแอมโมเนียมอะซิเตต เข้มข้น 7.4 โมลาร์ ปริมาตร150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 3 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ

8. ดูดสารละลายส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ เติม ไอโซโพรพานอล ปริมาตร 330 ไมโครลิตร เพื่อช่วยในการตกตะกอนดีเอ็นเอ

9. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 3 นาที เติมแอลกอฮอล์ 70 % เพื่อละลายเกลืออกจากโมเลกุลของดีเอ็นเอ

10. เติมสารละลาย T5E ปริมาตร100 ไมโครลิตร อุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 5 นาที เขย่าด้วยเครื่อง vortex อีก 2 วินาที เพื่อให้ตะกอนดีเอ็นเอละลาย

11. เติมโซเดียมอะซิเตต เข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และไอโซพานอล ปริมาตร75 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

12. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 3 นาที เติมแอลกอฮอล์ 70 % เพื่อละลายเกลืออกจากโมเลกุลของดีเอ็นเอ เทแอลกอฮอล์ทิ้งไป คว่ำหลอดบนกระดาษให้แห้ง

13. ปล่อยให้ตะกอนแห้งแล้วเติมสารละลาย TE เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นทำการย่อยอาร์เอ็นเอด้วยเอนไซม์ RNase A แล้วนำดีเอ็นเอเก็บที่อุณหภูมิ - 20°C

หมายเหตุ การสกัดดีเอ็นเอจากพืชสมุนไพรบางชนิดจำเป็นต้องมีการดัดแปลงวิธีการสกัด เช่น ใช้เวลาในการแช่ตัวอย่างใน extraction buffer ที่อุณหภูมิ 65°C ให้นานเป็นเวลาหนึ่งชั่วโมง การเติมสารเคมี Beta-Mercaptoethanol (48.7%) ปริมาตร 2 ไมโครลิตรต่อ extraction buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร เพื่อใช้ในการสกัดตัวอย่างแห้งหรือพืชที่มีสารทุติยภูมิที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดดีเอ็นเอ

วิธีที่ 2 วิธีสกัดดีเอ็นเอที่ดัดแปลงมาจาก Li *et al.* (2007)

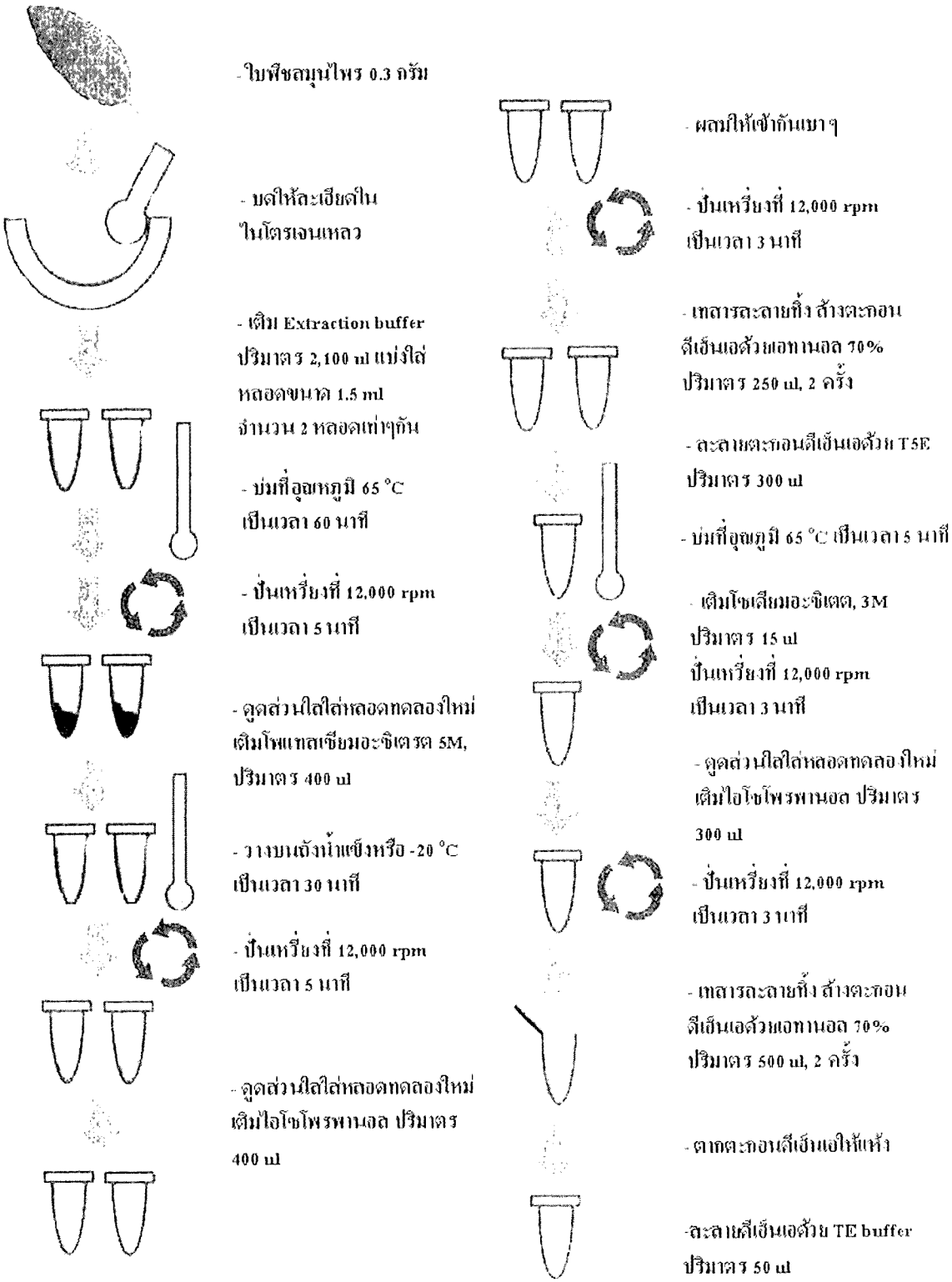
สกัดดีเอ็นเอของสมุนไพรด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Li *et al.* (2007) (ภาพที่ 3.1) โดยนำใบพืชสมุนไพรที่เก็บมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วบดตัวอย่างน้ำหนักประมาณ 0.3 กรัมหรือมากกว่า แล้วบดให้ละเอียดด้วยโกร่งโดยใช้ไนโตรเจนเหลว เติม extraction buffer

(100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 8.3 mM HaOH, 1.25 % SDS, 0.38 % Sodiumbisulfite) ปริมาตร 2,100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันในโกร่ง แบ่งใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 60 นาที กลับหลอดไปมาทุก 10 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอนเศษเซลล์ที่มีอยู่เยอะออกไปก่อน ดูดส่วนใสใส่หลอดทดลองใหม่ ใส่โพแทสเซียมอะซิเตต ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตรประมาณ 400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นวางในตู้ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายส่วนใสใส่หลอดใหม่ (ขั้นตอนนี้จำเป็นต้องแบ่งสารละลายออกเป็น 2 หลอด) เติมไอโซโพรพานอล 2.5 เท่าของปริมาตรสารละลาย ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 3 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง เพื่อละลายเกลือออกจากโมเลกุลของดีเอ็นเอ จากนั้นเทเอทานอลทิ้ง เติมสารละลาย T5E ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่า (vortex) เป็นเวลาประมาณ 2 วินาที อุ่นที่อุณภูมิ 65 องศาเซลเซียส จนกว่าตะกอนดีเอ็นเอจะละลายหมด เติมโซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 15 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 3 นาที นำสารละลายส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ เติมไอโซโพรพานอล ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 3 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง เพื่อละลายเกลือออกจากโมเลกุลของดีเอ็นเอ จากนั้นเทเอทานอลทิ้ง คว่ำบนกระดาษซับให้แห้ง แล้วเติม TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ละลายตะกอนดีเอ็นเอ ตรวจสอบผลด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสวุ้นอะกาโรส เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอไว้ตู้ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

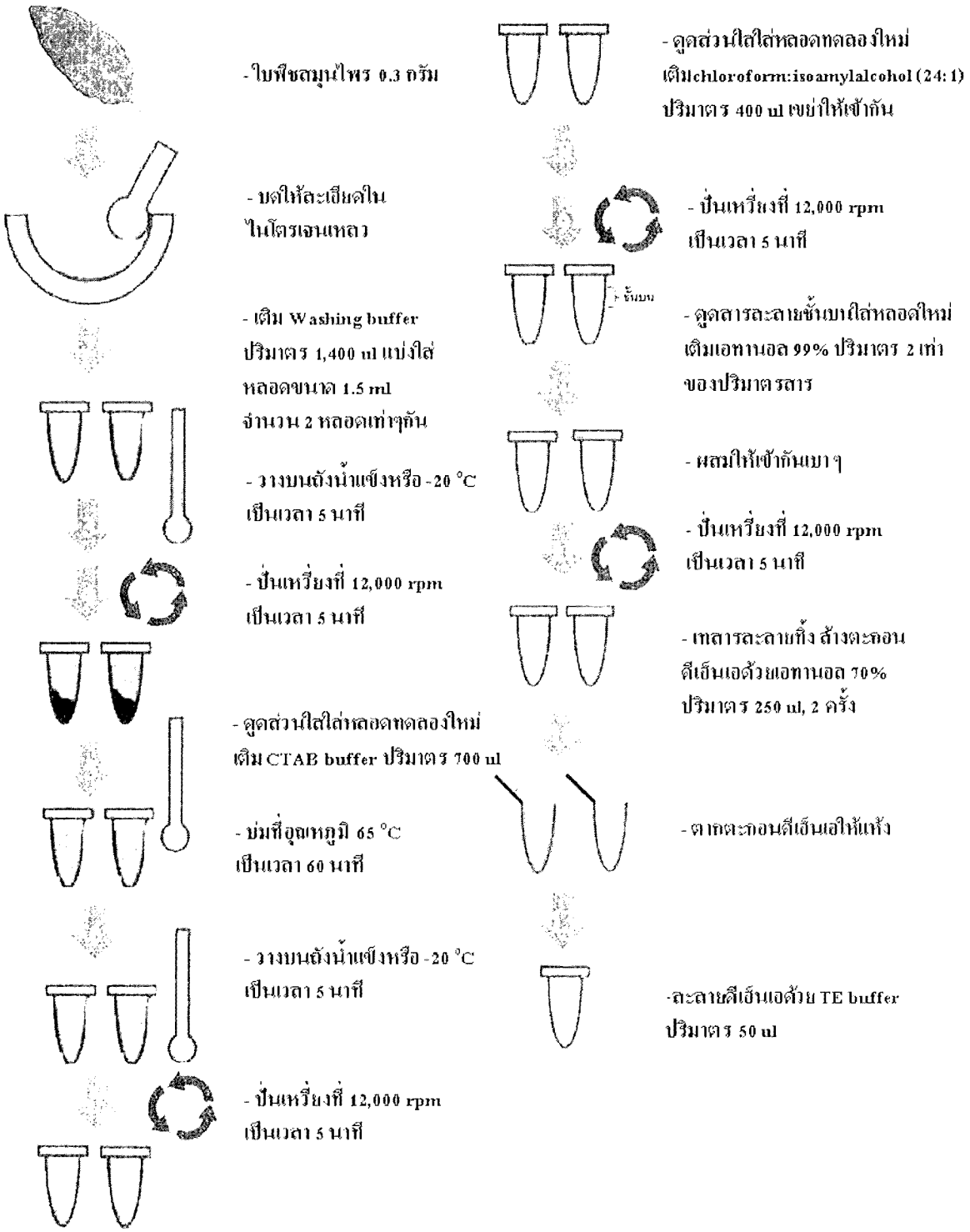
วิธีที่ 3 วิธีสกัดดีเอ็นเอที่ดัดแปลงมาจาก Doyle และ Doyle (1990)

สกัดดีเอ็นเอของสมุนไพรด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Doyle และ Doyle (1990) (ภาพที่ 3.2) โดยนำใบพืชสมุนไพรที่เก็บมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วบดตัวอย่างน้ำหนักประมาณ 0.3 กรัมหรือมากกว่า แล้วบดให้ละเอียดด้วยโกร่งโดยใช้ไนโตรเจนเหลว เติม washing buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM EDTA, 1 M NaCl, 1% PVP, 1% betamercaptoethanol) ปริมาตร 1,400 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ใส่ลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แช่ไว้ที่ตู้ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใสแบ่งใส่หลอดใหม่ 2 หลอดเท่า ๆ กัน เติม CTAB buffer (2% CTAB, 200 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0,1% PVP, 1% beta-mercaptoethanol) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ในแต่ละหลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 60 นาที กลับหลอดไปมาทุก

10 นาที จากนั้นนำไปแช่ตู้ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอนเศษเซลล์ออกไป ดูดส่วนใสใส่หลอดทดลองใหม่ เติมสารละลายผสมระหว่าง chloroform : isoamylalcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายส่วนใสชั้นบนใส่หลอดใหม่ (ขั้นตอนระวังอย่าดูดเอาส่วนของตะกอนที่เป็นฟิล์มบาง ๆ มา) เติมเอทานอล ความเข้มข้น 99 เปอร์เซ็นต์ 2 เท่าของปริมาตรสารละลาย ผสมให้เข้ากัน โดยการกลับหลอดไปมาเบา ๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 3 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง เพื่อละลายเกลือออกจากโมเลกุลของดีเอ็นเอ จากนั้นเทเอทานอลทิ้ง คว่ำบนกระดาษซับให้แห้ง แล้วเติม TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ละลายตะกอนดีเอ็นเอ ตรวจสอบผลด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสวุ้นอะกาโรส เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอไว้ตู้ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้



ภาพที่ 3.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของพืชสมุนไพรที่ดัดแปลงมาจาก Li *et al.* (2007)



ภาพที่ 3.2 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของพืชสมุนไพรที่ดัดแปลงมาจาก Doyle and Doyle (1990)

3.3 ตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้

3.3.1 วิธีการดูดกลืนแสง

เนื่องจากเบสที่เป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิกสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ความยาวช่วงคลื่นประมาณ 260 นาโนเมตร (ส่วนโปรตีนจะดูดได้ที่ความยาวประมาณ 280 นาโนเมตร) ดังนั้น จึงใช้หาปริมาณของกรดนิวคลีอิคได้ โดยสารละลายดีเอ็นเอเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถดูดแสงได้ค่า Absorbance ที่ 260 นาโนเมตร (A260 หรือ OD260) เท่ากับ 1 โดยสูตรที่ใช้คำนวณหาค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอ คือ

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอตัวอย่าง = 50 x A260 x Dilution factor

3.3.2 วิธีวัดการเรืองแสงร่วมกับเอธิเดียมโบรไมด์

วิธีนี้ทำโดยนำดีเอ็นเอที่เตรียมไว้มาทำอิเล็กโทรโฟรีซีสในอะกาโรสเจล แล้วย้อมด้วย เอธิเดียมโบรไมด์ โมเลกุลของเอธิเดียมโบรไมด์ จะเข้าไปแทรกอยู่ในโมเลกุลคู่ของดีเอ็นเอ และเมื่อนำไปส่องแสงอัลตราไวโอเลตจะเกิดการเรืองแสง โดยความเข้มของแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณแล้ว จะสามารถบอกปริมาณของดีเอ็นเอตัวอย่างโดยประมาณได้

3.3.3 ตรวจสอบผลโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีส

คุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ สามารถนำมาตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสบนอะกาโรสเจล ซึ่งจะแยกดีเอ็นเอตามขนาด โดยใช้เจลที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน ในการทดลองนี้จะใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 1.0% สำหรับตรวจคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดจากเนื้อเยื่อพืช และใช้ 1.5-2.0 % สำหรับตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

1. เตรียมถาดสำหรับเทเจลในแนวราบและหวีให้เรียบร้อย
2. ชั่งผงอะกาโรส X กรัม เติมบัฟเฟอร์ 0.5X TBE ปริมาตร Y มิลลิลิตร สำหรับการทำอะกาโรสเจลเข้มข้น 1.5-2.0%
3. หลอมอะกาโรสโดยอุ่นให้ร้อนหรือใช้ไมโครเวฟ เขย่าเป็นครั้งคราวให้อะกาโรสละลายหมด
4. ตั้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 50-55 °C แล้วจึงเทลงในถาดที่เตรียมไว้
5. เมื่อเจลแข็งตัวแล้วค่อย ๆ ดึงหวีออก นำเจลใส่ลงในเครื่องสำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซีส ใส่บัฟเฟอร์ 0.5X TBE ให้ท่วมเจล
6. ใช้ไมโครปิเปตต์ดูดสารละลายดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye buffer 6X ปริมาตร 1 ไมโครลิตร สำหรับตรวจคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดจากเนื้อเยื่อพืช หรือ

ดูดสารละลายสารละลายที่ผ่านการทำ PCR 8 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye buffer 6X ปริมาตร 2 ไมโครลิตร แล้วจึงหยอดลงไปในช่องแผ่นเจลที่เตรียมไว้

7. ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซีส แล้วเปิดกระแสไฟฟ้าประมาณ 50 โวลต์ต่อ ซม. ปล่อยให้ดีเอ็นเอเคลื่อนไปพอประมาณ โดยดูจากสีที่ผสมอยู่ใน loading dye buffer แล้วจึงปิดเครื่อง
8. นำเจลมาย้อมในเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 10-20 นาที แล้วนำเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต แล้วถ่ายภาพเก็บไว้

หมายเหตุ: ทั้งนี้นักเรียนจากโรงเรียนที่เข้าร่วมการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการได้ร่วมฝึกการสกัดดีเอ็นเอพืชสมุนไพรที่มหาวิทยาลัยขอนแก่น และได้นำมาใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

๒๕๑๓

3.4 จัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพร

จัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพรจากพื้นที่บริเวณเขื่อนจุฬาภรณ์และบริเวณเขื่อนอุบลรัตน์ โดยการใช้เทคนิค SRAP-PCR และ AP-PCR ในขั้นตอนนี้ได้มีการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการให้กับนักเรียนจากโรงเรียนที่เข้าร่วมในโครงการด้วย วิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์หรือโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟริซิสแล้วย้อมด้วย silver stain เพื่อตรวจสอบขนาดและจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เป็นผลผลิต พร้อมกับบันทึกภาพไว้

3.4.1 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอพืชสมุนไพรบางชนิดด้วยเทคนิค SRAP-PCR

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอพืชสมุนไพรบางชนิดด้วยเทคนิค SRAP-PCR ด้วยไพรเมอร์จำนวน 6 ชนิด (ตารางที่ 3.1) โดยเตรียมสารละลายเพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย PCR buffer ความเข้มข้นสุดท้าย 1.5 เท่า dNTP (deoxy nucleotide triphosphate, Fermentas) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ (Fermentas) ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ *Taq* DNA polymerase (Fermentas) ความเข้มข้น 0.08 หน่วย ไพรเมอร์ความเข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์ และดีเอ็นเอต้นแบบ 20 นาโนกรัม ในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 0.20 มิลลิลิตร จากนั้นจากนั้นสังเคราะห์ดีเอ็นเอในเครื่อง Thermal cycler (Corbett Research, Germany) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ ขั้นที่ 1 ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 5 นาที ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 นาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 นาที โดยทำซ้ำขั้นที่ 2 จำนวน 5 รอบ แล้วตามด้วยขั้นตอนที่ 3 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 นาที อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 นาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 นาที โดยทำซ้ำขั้นที่ 3 จำนวน 35 รอบ แล้วตามด้วยขั้นตอนที่ 4 อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 5 นาที หลังจากนั้นนำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มา

ตรวจสอบด้วยเทคนิคอะกาโรสอิเล็กโทรโฟรีซีสหรือโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซีส เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder Plus (Fermentas) บันทึกภาพแถบดีเอ็นเอด้วยกล้อง VILBER LOURMAT วิเคราะห์ขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม PhotoCaptMw (Vilber Lourmat, France) วิเคราะห์รูปแบบของลายพิมพ์ดีเอ็นเอและแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อสมุนไพรบางชนิด

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอรวมของแก่นตะวันด้วยเทคนิค SRAP-PCR

ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5'-3')	Tm (^{0}C)
ME-2	TGAGTCCAAACCGGAGC	53.8
Me-5	TGAGTCCAAACCGGAAG	51.0
ME-7	TGAGTCCTTTCCGGTCC	52.6
EM-6	GACTGCGTACGAATTCCA	51.7
EM-5	GACTGCGTACGAATTCAA	49.2
Em-8	GACTGCGTACGAATTCAC	48.2

Tm: melting temperature

3.4.2 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอพืชสมุนไพรบางชนิดด้วยเทคนิค AP-PCR

ทำการจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AP-PCR โดยใช้ไพรเมอร์แบบสุ่มขนาด 17-20 คู่เบส จำนวน 4 ชนิด (ตารางที่ 3.2) การสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค AP-PCR นั้นทำการเตรียมสารละลายเพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย PCR buffer (Tris-HCl ความเข้มข้น 750 มิลลิโมล, $(NH4)_2SO_4$) ความเข้มข้น 200 มิลลิโมล และ Tween 20 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์) dNTP (Fermentas) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมล แมกนีเซียมคลอไรด์ (Fermentas) ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมล Tag DNA polymerase (Fermentas) ความเข้มข้น 5 หน่วยต่อไมโครลิตร ไพรเมอร์ความเข้มข้น 1 พิโคโมล ดีเอ็นเอต้นแบบ 40 นาโนกรัม ในหลอดเซนตริฟิวซ์ขนาด 0.20 มิลลิลิตร ทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในเครื่อง PCR (Corbett Research, Germany) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ ขั้นที่ 1 ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 นาที 30 วินาที ขั้นที่ 2 อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 วินาที อุณหภูมิ Ta ที่เหมาะสมของแต่ละไพรเมอร์ดังตารางที่ 3.3 เป็นเวลานาน 15 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 นาที 30 วินาที โดยทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 จำนวน 40 รอบ และขั้นสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 5 นาที หลังจากนั้นนำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบ

ด้วยเทคนิค อิเล็กโทรโฟริซีสในเจลอะครีลาไมด์ความเข้มข้น 4 ถึง 6 เปอร์เซ็นต์ ใน TBE buffer ความเข้มข้น 1 เท่า ย้อมด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ ส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder Plus (Fermentas) บันทึกภาพแถบดีเอ็นเอด้วยกล้อง VILBER LOURMAT วิเคราะห์ขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม PhotoCaptMw (Vilber Lourmat, France) วิเคราะห์รูปแบบของ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอและแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อสมุนไพรบางชนิด

ตารางที่ 3.2 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของพืชสมุนไพรด้วยเทคนิค AP – PCR

ลำดับที่	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')	GC content	Tm (°C)
1	AP01	ACC AAG CGC CGT CAT GAG	61%	53
2	AP04	ACT CCG CTG GCG CCC ACC C	79%	62
3	AP05	GGT GGG GGC GCC GTC ACC A	75%	62
4	AP06	CCT CTC ACG CAT CCC AG	65%	52
5	AP08	AAC TGG AGG CCA TGA G	58%	49
6	AP09	AATCCACAGGTGGTGATC	50%	50
7	AP10	AGC TTA GAG CCA CAC CC	59%	49
8	AP12	GAC ATG GAG ATC CAC GCC	61%	53

Tm: melting temperature