วิธีดำเนินการวิจัย

แผนการดำเนินงานโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้เป็นโครงการวิจัยต่อเนื่อง 2 ปี ซึ่งมีแผนการดำเนินงานโครงการดังตารางที่ 1 โดยในปีที่ 1 นั้นจะดำเนินการเก็บตัวอย่าง ระบุชนิด และส่งงานวิจัยตีพิมพ์ในกรณีพบพืชชนิดใหม่ (new species) ส่วนปีที่ 2 จะดำเนินการสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอและส่งงานวิจัยตีพิมพ์

โครงการนี้ได้รับการจัดสรรงบประมาณเพียง 1 ปี ดังนั้นจึงไม่สามารถดำเนินการตามแผนงานได้สำเร็จ เนื่องจากในการสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อเป็นเอกลักษณ์จำเพาะชนิดของพืชกว่า 40 ชนิด นั้นต้องใช้งบประมาณค่อนข้างสูงผู้วิจัยจึงไม่สามารถดำเนินการได้เมื่อไม่ได้รับจัดสรรงบประมาณ อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้พยายามอย่างยิ่งที่จะสร้างผลผลิตจากงานวิจัยนี้ในงบประมาณเท่าที่ได้รับจัดสรรในปีแรก

ตารางที่ 1 แผนการดำเนินงานตลอดระยะเวลา 2 ปี แต่โครงการวิจัยนี้ได้รับจัดสรรงบประมาณเพียง 1 ปี **จึงได้ดำเนินการตามแผนงานปีที่ 1 เท่านั้น**

ขั้นตอน/กิจกรรม	ปีที่ 1		ปีที่ 2		ผลที่คาดว่าจะได้รับ
	เดือนที่ 1-6	เดือนที่ 7-12	เดือนที่ 1-6	เดือนที่ 7-12	
1. เก็บตัวอย่างกลุ่มพืชเป้าหมาย	■	■			-ได้ตัวอย่างพืชที่ต้องการ
2. ระบุชนิดโดยใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาและใช้ข้อมูลดีเอ็นเอช่วยในการตรวจสอบในชนิดที่มีลักษณะสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกัน	■	■			รู้ชนิดทั้งหมดของพืชสกุลพริกไทยในประเทศไทย ส่งงานตีพิมพ์ในกรณีที่ได้พืชชนิดใหม่ของโลก
3. ส่งงานตีพิมพ์ในกรณีที่ได้พืชชนิดใหม่ของโลก		■	■		-ได้ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ
4. สร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอ			■	■	-ได้เครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อเป็นเอกลักษณ์จำเพาะชนิดของพืชสกุลพริกไทยในประเทศไทย
5. เขียนรายงานผลการศึกษาวิจัยและตีพิมพ์งานวิจัย			■	■	-ได้ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

การเก็บตัวอย่างและการระบุชนิด

เก็บตัวอย่างพืชสกุลพริกไทยในประเทศไทยจากพื้นที่ที่รายงานไว้โดย Chaveerach et al. (2008) ให้ได้จำนวนชนิดมากที่สุดตามระยะเวลาที่มีและงบประมาณที่ได้รับแล้วระบุชนิดด้วยข้อมูลสัณฐานวิทยาตามเอกสารอ้างอิง โดยเก็บตัวอย่างสำหรับทำพรรณไม้แห้งไว้ใช้อ้างอิงที่พิพิธภัณฑ์พืชสิรินธร (BK) และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และเก็บตัวอย่างสำหรับทำเครื่องหมายดีเอ็นเอ คือเก็บใบอ่อนไว้ในซิลิกาเจลเพื่อให้ใบแห้งทันทีช่วยคงสภาพของดีเอ็นเอที่อยู่ในเซลล์ แล้วนำมาเก็บใน freezer ที่ห้องปฏิบัติการ

การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อพืชตามวิธีการที่รายงานไว้โดย Porebski et al. (1997) ซึ่งมีสารเคมีและขั้นตอนดังต่อไปนี้

สารสกัดดีเอ็นเอ ประกอบด้วย

100 mM Tris pH 8.0

1.4 M NaCl

20 mM EDTA

2% Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB)

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ

1) ดูด extraction buffer ซึ่งอุ่นแล้วที่ 65°C ปริมาตร 600 µL ลงในโกร่ง เติม PVP ปริมาณ 0.03 g และ 2-mercaptoethanol ปริมาตร 3 µL

2) ใส่เนื้อเยื่อพืชที่เตรียมไว้บดจนละเอียดแล้วย้ายใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 ml

3) เติม 10 mg/ml RNase A ปริมาตร 5 µL แล้วบ่มที่ 65°C 30 นาที กลับหลอดไปมาทุก 5 นาที

4) เติม Chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรสารในข้อ 3 (ประมาณ 600 µL) กลับหลอดไปมาให้เข้ากัน

5) Centrifuge ที่ 6,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสชั้นบนไปใส่หลอดใหม่

6) เติม 2-propanol (-20°C) ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรสารที่ได้จากข้อ 5. กลับหลอดไปมาให้เข้ากัน แล้วแช่ไว้ที่ -20°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ

7) Centrifuge ที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนน้ำทิ้งแล้วเติม 70% Ethanol ปริมาตร 500 µL

8) Centrifuge ที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง แล้วรอให้ตะกอนแห้ง

9) เติม (65°C) 10 mM Tris-HCl pH 8.0 ปริมาตร 100 µL แล้วแช่ที่ 4°C ข้ามคืน ก่อนนำไปเก็บที่ -20°C

10) วัดปริมาณและตรวจคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอเรซีส (agarose gel electrophoresis)

เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอเรซีส (agarose gel electrophoresis)

เทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอเรซีสใช้ในการวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ มีสารเคมีและขั้นตอนดังต่อไปนี้

สารอิเล็กโทรฟอเรซีสเข้มข้น (electrophoresis stock solution: 50X TAE buffer)

สำหรับการเตรียมสาร 1000 ml ประกอบด้วยสารต่างๆ ดังนี้

242 g Tris

18.61 g EDTA

57.1 ml Glacial acetic acid

เมื่อจะใช้งานต้องนำสารนี้มาเจือจาง 100 เท่า เป็น 0.5X TAE buffer (working solution)

วิธีการเตรียมเจล (agarose gel preparation)

1) ตวง 0.5X TAE buffer ปริมาตร 30 ml ใส่ใน flask ขนาด 250 ml

2) ชั่งผง Agarose ปริมาณ 0.24 g (=0.8% agarose) หรือ 0.36 g (=1.2% agarose) ตามที่ต้องการใส่ลงในข้อ 1 แล้วแกว่ง flask ให้ผงวุ้นเข้ากับ buffer

3) นำไป microwave สลับกับการแกว่ง flask จนกระทั่งผงวุ้นจะละลายหมด ตั้งไว้ให้อุ่นที่ประมาณ 60°C คือให้มือจับได้

4) ใส่กระบะเจลลงในบล็อกและใส่โคมลงไปให้เข้าล็อค ค่อยๆ เทสารในข้อ 3 ลงในกระบะเจล

5) ทิ้งไว้ 20 นาที ก่อนนำเจลไปใช้

วิธีการอิเล็กโทรฟอเรซีส (agarose gel electrophoresis)

1) ใส่เจลที่เตรียมไว้ลงในกระบะ electrophoresis เติม 0.5X TAE buffer ให้ท่วมผิวเจล

2) ใช้กระแสไฟฟ้า 100 volts เป็นเวลา 30 นาที

3) ย้อมเจลใน 0.001% Ethidium bromide 10 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่า 3 รอบ แล้วนำไปถ่ายรูปเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป

การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA Fingerprinting)

สร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค random amplified polymorphic DNA (RAPD) ด้วย arbitrary primer โดยทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส (polymerase chain reaction) ในปริมาตร 25 µL ซึ่งประกอบด้วยสารต่างๆ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรสเพื่อสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ส่วนประกอบ	ปริมาตรที่ใช้ (µL)	ความเข้มข้นสุดท้าย
1) sterile H_2O	11.25	-
2) 2XGoTaq master mix (Promega)	12.50	1X
3) 50 µM primer	0.25	0.5 µM
4) DNA (10 ng/µL)	1.00	0.4 ng/µL

กำหนดอุณหภูมิและเวลาในแต่ละขั้นตอนดังนี้

1) Predenaturation 3 นาที ที่ 94°C
2) ทำปฏิกิริยา 35 รอบ ดังนี้
   2.1) Denaturation 30 วินาที ที่ 94°C
   2.2) Annealing 30 วินาที ที่ 40°C
   2.3) Extension 2 นาที ที่ 72°C
3) Final extension 5 นาที ที่ 72°C
4) เก็บ ที่ 4°C จนกว่าจะตรวจผล

ตรวจผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรสด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอเรซีส โดยใช้อะกาโรสความเข้มข้น 1.2% ทำตามขั้นตอนที่ได้อธิบายแล้ว

วิเคราะห์ผลและสร้างเดนโดรแกรมด้วยโปรแกรม Fingerprinting II (Bio-Rad)

การสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด (DNA Barcoding)

การทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ดใช้ไพรเมอร์ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังตารางที่ 3 ได้ข้อมูลจาก http://www.kew.org/barcoding/update.html ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรสในปริมาตร 30 µL ซึ่งประกอบด้วยสารต่างๆ ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 3 ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเพื่อสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	บริเวณเป้าหมาย
RB-F2	ATGCAACGTCAAGCAGTTCC	*rpo*B gene
RB-R2	GATCCCAGCATCACAATTCC	
RC-F1	GTGGATACACTTCTTGATAATGG	*rpo*C1 gene
RC-R1	TGAGAAAACATAAGTAAACGGGC	
TP-F	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	*psb*A-*trn*H spacer
TP-R	CGCGCATGGTGGATTCACAATCC	

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรสเพื่อสร้างเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบบาร์โค้ด

ส่วนประกอบ	ปริมาตรที่ใช้ (µL)	ความเข้มข้นสุดท้าย
1) sterile H_2O	11.4	-
2) 2XGoTaq master mix (Promega)	15.0	1X
3) 50 µM primer F	0.3	0.5 µM
4) 50 µM primer R	0.3	0.5 µM
5) DNA (10 ng/µL)	3.0	1 ng/µL

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันดีแล้วนำไปเข้าเครื่องทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR machine)

1) Predenaturation 3 นาที ที่ 94°C
2) ทำปฏิกิริยา 35 รอบ ดังนี้
   2.1) Denaturation 30 วินาที ที่ 94°C
   2.2) Annealing 30 วินาที ที่ 55°C
   2.3) Extension 2 นาที ที่ 72°C
3) Final extension 5 นาที ที่ 72°C
4) เก็บ ที่ 4°C จนกว่าจะตรวจผล

ตรวจผลผลิตด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอเรซีสดังรายละเอียดข้างต้น โดยใช้อะกาโรสความเข้มข้น 1% เมื่อได้ผลผลิตที่ต้องการแล้วส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ MegaBACE 1000 and ALFexpress sequencers โดยเทคนิค dye terminator

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะนำมาวิเคราะห์ตามขั้นตอนต่อไปนี้

1) วิเคราะห์ความถูกต้องด้วยโปรแกรม FinchTV (http://www.geospiza.com/finchtv/index.htm) และ BioEdit (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit. html)

2) ใช้เครื่องมือ Blast (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) เปรียบเทียบความเหมือน (alignment) กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากสิ่งมีชีวิตอื่นซึ่งมีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) วิเคราะห์ทิศทาง (annotation) และตำแหน่งเริ่มการแปลรหัส (reading frame)

3) แปลรหัส (translate) ด้วยเครื่องมือ ExPASy (http://www.expasy.org/tools/dna.html)

4) ส่งลำดับนิวคลีโอไทด์และผลการวิเคราะห์ข้อมูลเหล่านี้ไปบันทึก (submit) ไว้ในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/submit.html) เพื่อใช้อ้างอิงและให้นักวิจัยจากทั่วโลกสามารถเข้าถึงได้