



ภาคผนวก

ภาคผนวก 1

การสกัดดีเอ็นเอ

1. เติม liquid nitrogen ลงไปในโถงเพื่อช่วยให้โถงเย็นทั่วถึงกัน จากนั้นเคาะเบาๆ ลงไปประมาณ 100-300 กรัม

2. บดตัวอย่างให้เป็นผงละเอียดมากที่สุด ค่อยๆ ทอยเติม liquid nitrogen เมื่อตัวอย่างถูกบดละเอียดดีแล้ว ตักตัวอย่างประมาณ 50-100 มิลลิกรัมใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml. ซึ่งมี CTAB buffer อยู่ 700 μ l (ต้องนำ CTAB buffer มาแช่ใน water bath 65 °C ก่อนนำไปใช้อย่างน้อย 1 ชั่วโมง)

3. นำหลอดที่ใส่ตัวอย่างมาเขย่าให้ตัวอย่างผสมเข้ากันได้ดีโดยใช้ vortex จากนั้นนำไปป้อนที่ 65°C นาน 1 ชั่วโมงโดยทำการพลิกกลับหลอดทุก 15 นาที

4. เมื่อครบเวลานำหลอดออกมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เย็นลงประมาณ 5 นาที จากนั้นจึงเริ่มสกัดโดยเติม Phenol : chloroform : isoamyl alcohol 700 μ l พลิกกลับหลอดเพื่อให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน

5. นำหลอดมาทำการปั่นเพื่อให้แยกชั้น ใช้ความเร็วรอบ 14,000 rpm นาน 3 นาทีหลังจากปั่นแล้วสารละลายจะแยกเป็น 2 ชั้น ดีเอ็นเอที่เราต้องการจะอยู่ในชั้นบน ดูดเก็บสารละลายชั้นบน 600 μ l ใส่ในหลอดใหม่ (ในการดูดเก็บสารละลายในชั้นบนไม่ควรดูดเก็บมาหมดให้เหลือไว้ประมาณ 100 μ l เพราะดีเอ็นเอในส่วนนี้จะมีโปรตีนปนอยู่มาก หากติดมากับดีเอ็นเอมากจะทำให้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพต่ำ) เนื่องจากกระเจี๊ยบจะมีเมือกมากเวลาดูดเก็บทำได้ยาก การตัดปลาย tip ให้กว้างจะช่วยให้ดูดได้ง่ายขึ้น

6. ทำการสกัดอีกรอบ โดยการเติม Chloroform : Isoamylalcohol (24:1) 600 μ l พลิกหลอดกลับไป-มาให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปปั่นที่ 14,000 rpm นาน 3 นาที

7. ดูดเก็บสารละลายชั้นบน 500 μ l ใส่หลอดใหม่ จากนั้นทำการสกัดซ้ำอีก 1 ครั้ง (รวมทั้งหมด 3 รอบ จำนวนรอบที่จะใช้ในการสกัดอาจขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและหากต้องการให้ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้นก็สามารถเพิ่มรอบในการสกัดได้ แต่ก็จะมีการสูญเสียดีเอ็นเอไปในแต่ละรอบของการสกัด)

8. ดูดเก็บสารละลายชั้นบน 400 μ l ใส่หลอดใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม 7.5 M sodium acetate 120 μ l (0.3 เท่าของปริมาตรสารละลายทั้งหมด) และ 80% ethanol 800 μ l (2 เท่าของปริมาตรสารละลายทั้งหมด) พลิกหลอดกลับไป-มา เบาๆ หากปริมาณดีเอ็นเอมีมากพอในขั้นตอนนี้จะเห็นเส้นใสดุกลายวุ้น

9. นำหลอดที่ตกตะกอนไปแช่ที่ -20°C 1 ชั่วโมง
10. นำมาปั่นเพื่อเก็บดีเอ็นเอที่ 14,000 rpm นาน 5 นาที (อาจเพิ่มเวลาในการปั่นให้นานขึ้น หากดีเอ็นเอมีปริมาณน้อย) หลังจากปั่นแล้วควรจะได้ตะกอนสีขาวนวล และสีจะเริ่มใสขึ้นเรื่อยๆ ตามจำนวนรอบของการปั่นล้าง ตะกอนที่ได้ไม่ควรจะมีสีเขียวหรือเหลืองปน และไม่ควรมีสีขาวขุ่นเหมือนแป้ง)
11. เทเอาสารละลายทิ้งเบาๆ ระวังอย่าให้ก้อนดีเอ็นเอที่ติดอยู่กันหลุดหลุดหายไป จากนั้นเคาะกันหลอดเบาๆ เพื่อให้ดีเอ็นเอหลุดออกมา
12. จากนั้นทำการล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol แขน 1 ml. พลิกหลอดกลับไปมา 4-5 ครั้งนำไปปั่นที่ 14,000 rpm นาน 5 นาที จากนั้นเทส่วนสารละลายทิ้ง ทำการปั่นล้างตะกอนดีเอ็นเอทั้งหมด 3 รอบ จนดีเอ็นเอมีสีใส หลังจากปั่นล้างรอบสุดท้ายให้ใช้ไปเปิดดูดสารละลายทิ้งแทนการเท เพราะต้องการดูดเอา ethanol ออกให้มากที่สุด
13. ผึ่งดีเอ็นเอให้แห้งโดยเปิดฝาหลอดทิ้งไว้ประมาณ 10-15 นาที ไม่ควรให้นานมากเกินไป เพราะดีเอ็นเอที่แห้งมากจะละลายยาก
14. เติม TE buffer ประมาณ 50-100 μl ขึ้นอยู่กับขนาดตะกอนของดีเอ็นเอ จากนั้นละลายดีเอ็นเอ (resuspended) โดยใช้วิธีเบาๆ ที่ข้างหลอด
15. เติม RNase 0.5 μl incubate ที่ 37°C 3 ชั่วโมง
16. สกัดด้วย Chloroform อีก 2 รอบ เพื่อให้โปรตีนออกมากที่สุด
17. ตกตะกอนด้วย 0.3 เท่า ของ 7.5 M sodium acetate และ 2 เท่า 80% ethanol
18. dry ตะกอนให้แห้ง เติม TE pH 8.0

ตารางผนวก 1 ไพรมอร์ชุด OPA 01-07 และลำดับเบสที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

Code	5' → 3'
OPA-01	-CAGGCCCTTC-
OPA-02	-TGCCGAGCTG-
OPA-03	-AGTCAGCCAC-
OPA-04	-AATCGGGCTG-
OPA-05	-AGGGGTCTTG-
OPA-06	-GGTCCCTGAC-
OPA-07	-GAAACGGGTG-

ตารางผนวก 2 ไพรมอร์ชุด OPB 01-10 และลำดับเบสที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

Code	5' → 3'
OPB -01	-GTTTCGCTCC-
OPB -02	-TGATCCCTGG-
OPB -03	-CATCCCCCTG-
OPB -04	-GGACTGGAGT-
OPB -05	-TGCGCCCTTC-
OPB -06	-TGCTCTGCCC-
OPB -07	-GGTGACGCAG-
OPB -08	-GTCCACACGG-
OPB -09	-TGGGGGACTC-
OPB -10	-CTGCTGGGAC-

ตารางผนวก 3 ไพรเมอร์ชุด OPC 01-15 และลำดับเบสที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

Code	5' → 3'
OPC -01	-TTCGAGCCAG
OPC -02	-GTGAGGCGTC-
OPC -03	-GGGGGTCTTT-
OPC -04	-CCGCATCTAC-
OPC -05	-GATGACCGCC-
OPC -06	-GAACGGACTC-
OPC -07	-GTCCCGACGA-
OPC -08	-TGGACCGGTG-
OPC -09	-CTCACCGTCC-
OPC -10	-TGTCTGGGTG-
OPC -11	-AAAGCTGCGG-
OPC -12	-TGTCATCCCC-
OPC -13	-AAGCCTCGTC-
OPC -14	-TGC GTGCTTG-
OPC -15	-GACGGATCAG-

ตารางผนวก 4 ไพรเมอร์ชุด OPG 01-20 และลำดับเบสที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

Code	5' → 3'
OPG-01	-CTACGGAGGA-
OPG-02	-GGCACTGAGG-
OPG-03	-GAGCCCTCCA-
OPG-04	-AGCGTGTCTG-
OPG-05	-CTGAGACGGA-
OPG-06	-GTGCCTAACC-
OPG-07	-GAACCTGCGG-
OPG-08	-TCACGTCCAC-
OPG-09	-CTGACGTCAC-
OPG-10	-AGGGCCGTCT-
OPG-11	-TGCCCGTCGT-
OPG-12	-CAGCTCACGA-
OPG-13	-CTCTCCGCCA-
OPG-14	-GGATGAGACC-
OPG-15	-ACTGGGACTC-
OPG-16	-AGCGTCCTCC-
OPG-17	-ACGACCGACA-
OPG-18	-GGCTCATGTG-
OPG-19	-GTCAGGGCAA-
OPG-20	-TCTCCCTCAG-

ตารางผนวก 5 ไพรเมอร์ชุด OPN-01 OPO-09 และ OPO-11 และลำดับเบสที่ใช้ในปฏิกิริยา
พีซีอาร์

Code	5' → 3'
OPN-01	-CTCACGTTGG-
OPO-09	-TCCCACGCAA-
OPO-11	-GCAAGGAGGT-