

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

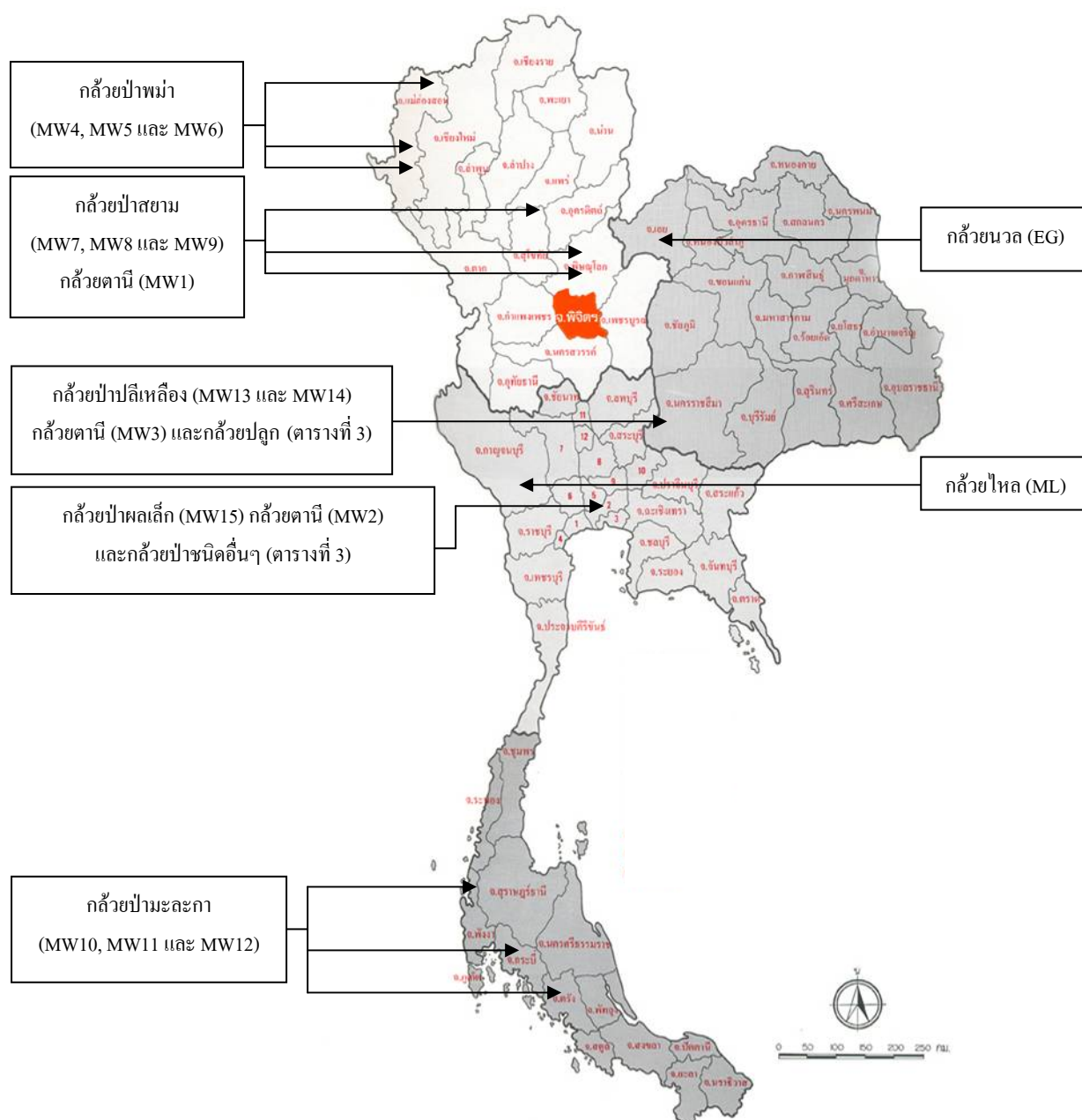
1. ตัวอย่างพืช

ตัวอย่างกล้วยที่นำมาทดลองได้รับความอนุเคราะห์จากแปลงรวบรวมพันธุ์กล้วยสถานีวิจัยปากช่อง จังหวัดนครราชสีมาและเก็บรวบรวมจาก อำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี อำเภอนากลาง จังหวัดเลย ประกอบด้วยกล้วยที่เป็นตัวอย่างกล้วยป่าพื้นเมืองและกล้วยปลุกที่เป็นตัวแทนของชุดจีโนมต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 3

2. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ โกร่งบดยา อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ตู้เย็นหรือตู้แช่ (refrigerator and material storage) ตู้อบ (dry oven) ไมโครไพเปต (micro pipet) เครื่องชั่ง (balance meter) หลอดทดลอง (eppendorf tube) หลอดทดลองขนาดเล็ก (micro tube)

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่ สารละลาย extraction buffer (2% w/v CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl (pH 8), 1% w/v PVP (polyvinylpyrrolidone)) สารละลาย 2-mercaptoethanol สารละลาย chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) สารละลาย phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) สารละลาย isopropanol สารละลาย wash buffer (76% ethanol, 10 mM ammonium acetate) สารละลาย TE buffer (2 M Tris-HCl (pH 8), 0.5 M EDTA) สารละลาย 1x TBE buffer เอ็นไซม์ RNase A สารละลาย 3M sodium acetate pH 5.2 สารละลาย absolute ethanol สารละลาย 75% ethanol และไนโตรเจนเหลว



ภาพที่ 5 สถานที่เก็บตัวอย่างกล้วยที่ใช้ในงานวิจัย

ตารางที่ 3 ชื่อพฤกษศาสตร์ ชื่อชนิดย่อย ชื่อพันธุ์ปลูก ชูดิจโนม ชื่อพื้นเมือง สถานที่เก็บและหมายเลขตัวอย่างของกล้วยที่ใช้ในงานวิจัย

สกุล	เขตกั้น	ชนิด	ชนิดย่อย	พันธุ์ปลูก	ชูดิจโนม	ชื่อพื้นเมือง	แหล่งเก็บตัวอย่าง (อำเภอ, จังหวัด)	รหัส
<i>Musa</i>	Eumusa	<i>Musa balbisiana</i>	-	-	BB	กล้วยตานี	ศรีนคร, สุโขทัย	MW1
<i>Musa</i>	Eumusa	<i>Musa balbisiana</i>	-	-	BB	กล้วยตานี	บางเขน, กทม.	MW2
<i>Musa</i>	Eumusa	<i>Musa balbisiana</i>	-	-	BB	กล้วยตานี	ปากช่อง, นครราชสีมา	MW3
<i>Musa</i>	Eumusa	<i>Musa acuminata</i>	<i>burmannica</i>	-	AA	กล้วยป่าพม่า	เมือง, แม่ฮ่องสอน	MW4
<i>Musa</i>	Eumusa	<i>Musa acuminata</i>	<i>burmannica</i>	-	AA	กล้วยป่าพม่า	เมือง, แม่ฮ่องสอน	MW5
<i>Musa</i>	Eumusa	<i>Musa acuminata</i>	<i>burmannica</i>	-	AA	กล้วยป่าพม่า	เมือง, แม่ฮ่องสอน	MW6
<i>Musa</i>	Eumusa	<i>Musa acuminata</i>	<i>siamea</i>	-	AA	กล้วยป่าสยาม	นครไทย, พิษณุโลก	MW7
<i>Musa</i>	Eumusa	<i>Musa acuminata</i>	<i>siamea</i>	-	AA	กล้วยป่าสยาม	นครไทย, พิษณุโลก	MW8
<i>Musa</i>	Eumusa	<i>Musa acuminata</i>	<i>siamea</i>	-	AA	กล้วยป่าสยาม	ศรีสัชนาลัย, สุโขทัย	MW9
<i>Musa</i>	Eumusa	<i>Musa acuminata</i>	<i>malaccensis</i>	-	AA	กล้วยป่ามะละกา	นาโฆง, ตรัง	MW10
<i>Musa</i>	Eumusa	<i>Musa acuminata</i>	<i>malaccensis</i>	-	AA	กล้วยป่ามะละกา	เมือง, กระบี่	MW11
<i>Musa</i>	Eumusa	<i>Musa acuminata</i>	<i>malaccensis</i>	-	AA	กล้วยป่ามะละกา	ตะกั่วป่า, พังงา	MW12
<i>Musa</i>	Eumusa	<i>Musa acuminata</i>	<i>banksii</i>	-	AA	กล้วยป่าปลีเหลือง	ปากช่อง, นครราชสีมา	MW13
<i>Musa</i>	Eumusa	<i>Musa acuminata</i>	<i>banksii</i>	-	AA	กล้วยป่าปลีเหลือง	ปากช่อง, นครราชสีมา	MW14

ตารางที่ 3 (ต่อ)

สกุล	เซกชั้น	ชนิด	ชนิดย่อย	พันธุ์ปลูก	ชุดจีโนม	ชื่อพื้นเมือง	แหล่งเก็บตัวอย่าง (อำเภอ, จังหวัด)	รหัส
<i>Musa</i>	Eumusa	<i>Musa acuminata</i>	<i>microcarpa</i>	-	AA	กล้วยป่าผลเล็ก	บางบัวทอง, นนทบุรี	MW15
<i>Musa</i>	Eumusa	<i>Musa itinerans</i>	-	-	-	กล้วยหก	ปากช่อง, นครราชสีมา	MI
<i>Musa</i>	Rhodochlamys	<i>Musa laterita</i>	-	-	-	กล้วยไหล	ทองผาภูมิ, กาญจนบุรี	ML
<i>Musa</i>	Callimusa	<i>Musa coccinea</i>	-	-	-	กล้วยรัตกัทธิ	จตุจักร, กทม.	MCo
<i>Ensete</i>	-	<i>Ensete glaucum</i>	-	-	-	กล้วยนวล	นากลาง, เลย	EG
<i>Musa</i>	Eumusa	Musa (AA group)	-	“Kluai Hom Jom Pa”	AA	กล้วยหอมจำปา	ปากช่อง, นครราชสีมา	MC1
<i>Musa</i>	Eumusa	Musa (AA group)	-	“Kluai Nam Thai”	AA	กล้วยน้ำไท	ปากช่อง, นครราชสีมา	MC2
<i>Musa</i>	Eumusa	Musa (AA group)	-	“Kluai Khai Thong Neoy”	AA	กล้วยไข่ทองเอย	ปากช่อง, นครราชสีมา	MC3
<i>Musa</i>	Eumusa	Musa (AA group)	-	“Kluai Khai Thong Rong”	AA	กล้วยไข่ทองรวง	ปากช่อง, นครราชสีมา	MC4
<i>Musa</i>	Eumusa	Musa (AA group)	-	“Kluai Leb Mu Nang”	AA	กล้วยเล็บมือนาง	ปากช่อง, นครราชสีมา	MC5
<i>Musa</i>	Eumusa	Musa (AAA group)	-	“Kluai Hom Khieo Kom”	AAA	กล้วยหอมเขียวค่อม	ปากช่อง, นครราชสีมา	MC6
<i>Musa</i>	Eumusa	Musa (AAA group)	-	“Kluai Nak Dang”	AAA	กล้วยนากแดง	ปากช่อง, นครราชสีมา	MC7
<i>Musa</i>	Eumusa	Musa (AAA group)	-	“Kluai Khai BW. 2”	AAA	กล้วยไข่ บว. 2	ปากช่อง, นครราชสีมา	MC8
<i>Musa</i>	Eumusa	Musa (AAA group)	-	“Kluai Khai Pratabong”	AAA	กล้วยไข่พระตะบอง	ปากช่อง, นครราชสีมา	MC9
<i>Musa</i>	Eumusa	Musa (AAA group)	-	“Kluai Hom Thong”	AAA	กล้วยหอมทอง	ปากช่อง, นครราชสีมา	MC10

ตารางที่ 3 (ต่อ)

สกุล	เขตกั้น	ชนิด	ชนิดย่อย	พันธุ์ปลูก	ชุดจีโนม	ชื่อพื้นเมือง	แหล่งเก็บตัวอย่าง (อำเภอ, จังหวัด)	รหัส
<i>Musa</i>	Eumusa	Musa (AAB group)	-	“Kluai Klai”	AAB	กล้วยกล้วย	ปากช่อง, นครราชสีมา	MC11
<i>Musa</i>	Eumusa	Musa (AAB group)	-	“Kluai Roiwi”	AAB	กล้วยร้อยหวี	ปากช่อง, นครราชสีมา	MC12
<i>Musa</i>	Eumusa	Musa (AAB group)	-	“Kluai Nom Sao”	AAB	กล้วยนมสาว	ปากช่อง, นครราชสีมา	MC13
<i>Musa</i>	Eumusa	Musa (AAB group)	-	“Kluai Nam Fad”	AAB	กล้วยน้ำฝาด	ปากช่อง, นครราชสีมา	MC14
<i>Musa</i>	Eumusa	Musa (AAB group)	-	“Kluai Nam Kab Dam”	AAB	กล้วยน้ำกาดำ	ปากช่อง, นครราชสีมา	MC15
<i>Musa</i>	Eumusa	Musa (ABB group)	-	“Kluai Namwa Sai Leong”	ABB	กล้วยน้ำว้าไส้ เหลือง	ปากช่อง, นครราชสีมา	MC16
<i>Musa</i>	Eumusa	Musa (ABB group)	-	“Kluai Namwa Dam”	ABB	กล้วยน้ำว้าดำ	ปากช่อง, นครราชสีมา	MC17
<i>Musa</i>	Eumusa	Musa (ABB group)	-	“Kluai Namwa Khom”	ABB	กล้วยน้ำว้าค่อม	ปากช่อง, นครราชสีมา	MC18
<i>Musa</i>	Eumusa	Musa (ABB group)	-	“Kluai Hak Muk Kheio”	ABB	กล้วยหักมุกเขียว	ปากช่อง, นครราชสีมา	MC19
<i>Musa</i>	Eumusa	Musa (ABB group)	-	“Kluai Hak Muk Khao”	ABB	กล้วยหักมุกขาว	ปากช่อง, นครราชสีมา	MC20
<i>Musa</i>	Eumusa	Musa (ABBB group)	-	“Kluai Theparod”	ABBB	กล้วยเทพรส	ปากช่อง, นครราชสีมา	MC21
<i>Musa</i>	Eumusa	Musa (BBB group)	-	“Kluai Thepanom”	BBB	กล้วยเทพนม	ปากช่อง, นครราชสีมา	MC22
<i>Musa</i>	Eumusa	Musa (BBB group)	-	“Kluai Phama Hark Kuk”	BBB	กล้วยพม่าแหกคุก	ปากช่อง, นครราชสีมา	MC23
<i>Musa</i>	Eumusa	Musa (BBB group)	-	“Kluai Lep Chang Kut”	BBB	กล้วยเล็บช้างกุด	ปากช่อง, นครราชสีมา	MC24

ตารางที่ 3 (ต่อ)

สกุล	เขตกั้น	ชนิด	ชนิดย่อย	พันธุ์ปลูก	ชุดจีโนม	ชื่อพื้นเมือง	แหล่งเก็บตัวอย่าง (อำเภอ, จังหวัด)	รหัส
<i>Musa</i>	Eumusa	Musa (BBB group)	-	“Kluai Hin”	BBB	กล้วยหิน	ปากช่อง, นครราชสีมา	MC25
<i>Musa</i>	Eumusa	Musa (AA group)	-	“Kluai Nam Thai”	AA	กล้วยน้ำไท	บางบัวทอง, นนทบุรี	MC26

หมายเหตุ การจัดจำแนกพันธุ์กล้วยปลูกออกเป็นชุดจีโนมต่างๆอ้างอิงจาก เบญจมาศ (2538)

3. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ ได้แก่ ชุด electrophoresis equipment เครื่อง UV transilluminator อุปกรณ์ในการย้อมเจลและอุปกรณ์ในการถ่ายภาพ

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ ได้แก่ agarose (Research Organics, INC.) สารละลาย 1x TBE buffer สารละลาย 6x loading buffer (0.25% bromphenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 30% glycerol) สารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus) สารละลาย ethidium bromide (10 mg/ml)

4. อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาและตรวจสอบ inter - simple sequence repeat

4.1 อุปกรณ์และเครื่องมือในการทำปฏิกิริยาและตรวจสอบ inter - simple sequence repeat ได้แก่ เครื่อง PCR รุ่น iCycler BIO-RAD ไมโครไปเปต หลอดทดลองขนาดเล็ก เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifuge)

4.2 สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาและตรวจสอบ inter - simple sequence repeat ได้แก่ 10x PCR buffer (15 mM $MgCl_2$, QIAGEN) แมกนีเซียมคลอไรด์ (25 mM $MgCl_2$, QIAGEN) เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (5unit/ μ l, QIAGEN) สารละลาย dNTP (10 mM, QIAGEN) สารละลาย mineral oil ไพรเมอร์ สารละลายดีเอ็นเอ (DNA template) และ น้ำกลั่นบริสุทธิ์

4.3 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบผลผลิตที่ได้จากการทำปฏิกิริยาและตรวจสอบ inter - simple sequence repeat ได้แก่ อุปกรณ์ต่างๆ ในข้อ 3

5. อุปกรณ์ในการวิเคราะห์ผลลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเทคนิค inter - simple sequence repeat

5.1 โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป NTSYS pc รุ่น 2.01 (Rohlf, 1997) เพื่อวิเคราะห์หาค่าดัชนีความคล้ายคลึงและจัดทำแผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ด้วยวิธี UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic average)

วิธีการ

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างพืช

1.1 ทำการเก็บตัวอย่างกล้วยประกอบด้วยส่วนของ ช่อดอกเพศผู้ ใบ และผล จากถิ่นกระจายพันธุ์ตามธรรมชาติและแปลงรวบรวมพันธุ์กล้วยปลูก สถานีวิจัยปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา และจากอำเภอทองผาภูมิ จังหวัดกาญจนบุรี อำเภอนากลาง จังหวัดเลย และบางตัวอย่างได้เก็บมาจากแหล่งเพาะปลูกของเกษตรกรรวมทั้งทำการจดบันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาและนำมาปลูกไว้ที่สวนรุกขชาติ คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ดังภาพที่ 5

1.2 จัดจำแนกกล้วยตัวอย่างและจัดทำรูปวิธาน

2. การเตรียมดีเอ็นเอ

เตรียมดีเอ็นเอจากใบอ่อนของกล้วยโดยใช้วิธีประยุกต์จาก Agrawal *et al.* (1992) และ Doyle and Doyal (1990) มีวิธีการดังนี้

2.1 เลือกใบอ่อนและสดของกล้วยประมาณ 2-3 g และทำความสะอาดด้วยการล้างด้วยน้ำเปล่าประมาณ 2-3 ครั้งและสุกท้ายล้างด้วยน้ำกลั่น เช็ดให้แห้ง

2.2 นำ extraction buffer ใส่ในหลอดทดลอง จำนวน 20 ml และเติม 2-mercaptoethanol จำนวน 200 μ l นำไปอุ่นใน water bath 65 °C นาน 10-15 นาที

2.3 นำตัวอย่างใบกล้วยประมาณ 2 g บดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลวในโกร่งบดยา

2.4 ย้ายผงตัวอย่างลงในหลอดที่มี extraction buffer อยู่ก่อนแล้วผสมให้เข้ากันและนำไปอุ่นใน water bath 65 °C นาน 45-60 นาที และค่อยๆผสมให้เข้ากันทุกๆ 15 นาที

2.5 นำตัวอย่างมาบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 5-10 นาที

2.6 เมื่อครบเวลาเติม chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) จำนวน 15 ml ผสมให้เข้ากันจนเป็นสีขาวขุ่น ประมาณ 15 นาที

2.7 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,500 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที

2.8 ย้ายสารละลาย ซึ่งลอยตัวอยู่ด้านบนไปใส่ในหลอดทดลอง หลอดใหม่ ระวังอย่าให้ชิ้นส่วนของตัวอย่างติดมาด้วย

2.9 เติม 2-propanol จำนวน 15 ml ที่ผ่านการแช่เย็น -20 °C แล้วค่อยๆผสมไปมาอย่างช้าๆ

2.10 นำไปแช่เย็นที่ -20 °C นาน 30-45 นาที

2.11 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,500 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที

2.12 เทสารละลายในหลอดทดลองออกเหลือไว้แต่เพียงตะกอนของดีเอ็นเอ แล้วเติม wash buffer จำนวน 5 ml เขย่าไปมาอย่างช้าๆ

2.13 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,500 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที

2.14 หลังจากนั้นนำตะกอนดีเอ็นเอ ที่ได้ไปตากจนแห้งสนิท ประมาณ 10-30 นาที

2.15 เติม TE buffer 1-4 ml (ขึ้นอยู่กับปริมาณดีเอ็นเอที่ได้) เพื่อละลายดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ 37 °C ประมาณ 20-30 นาที

2.16 เติม RNase A (ความเข้มข้น 10 mg/ml) ในอัตราส่วน 1 ml TE buffer เติม RNase 4 µl และอุ่นที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง ในกรณีที่มิมีตะกอนให้นำไปปั่นที่ 8,500 rpm อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที แล้วดูคอกเฉพาะสารละลาย

2.17 เติม phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) จำนวน 500 µl เขย่าเบาๆแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,500 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที

2.18 สกัดด้วย chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) จำนวน 500 μ l เขย่าเบาๆแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,500 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที

2.19 ย้ายสารละลายใส่ลงในหลอดทดลอง เติม 3M sodium acetate อัตราส่วน 1 ml TE buffer เติม 3M sodium acetate จำนวน 100 μ l ผสมให้เข้ากันแล้วเติม absolute ethanol จำนวน 2.5 ml ต่อ TE buffer 1 ml ที่ผ่านการแช่เย็นที่ -20 °C แล้วค่อยๆผสมไปมาอย่างช้าๆ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที

2.20 ล้างตะกอนด้วยการเติม 75% ethanol จำนวน 1,000 μ l แล้วเขย่าไปมาเบาๆ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C นาน 10 นาที และเติมล้างอีก 1 ครั้ง

2.21 นำตะกอนดีเอ็นเอ ไปตากจนแห้งสนิท ประมาณ 20 นาที

2.22 เติม TE buffer ประมาณ 200-500 μ l เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอจนหมดตามความเหมาะสมและนำไปเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำไปใช้ต่อไป

3. การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ

การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอสามารถทำได้โดย วัดการเรืองแสงของดีเอ็นเอที่จับตัวกับ ethidium bromide หลังจากแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธี electrophoresis

3.1 วิธีวัดการเรืองแสงร่วมกับ ethidium bromide

โดยการนำดีเอ็นเอที่เตรียมได้มาทำ electrophoresis ใน agarose gel แล้วย้อมด้วย ethidium bromide โมเลกุลของ ethidium bromide จะเข้าไปแทรกอยู่ในเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ และเมื่อนำไปส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตจะเกิดการเรืองแสง โดยความเข้มของแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอ เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณแล้วจะสามารถบอกปริมาณของดีเอ็นเอตัวอย่างโดยประมาณได้ โดยปริมาณที่ตรวจสอบได้จะเป็นระดับนาโนกรัม ดังนั้นในกรณีที่ปริมาณดีเอ็นเอมีน้อยไม่สามารถวัดการดูดกลืนแสงได้จะใช้วิธีนี้ นอกจากนี้การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธี electrophoresis ยังสามารถบอกคุณภาพของดีเอ็นเอได้ว่าการปนเปื้อน

จากอาร์เอ็นเอ ซึ่งจะเห็นเคลื่อนที่ไปได้เร็วกว่าดีเอ็นเอหรือไม่และดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดโมเลกุลขนาดไหน มีการแตกหักของโมเลกุลมากน้อยเพียงใด ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.1.1 เตรียมถาดสำหรับเท gel ในแนวราบและหวีให้เรียบร้อยและเช็ดหวีและถาดด้วย glycerol เพื่อช่วยในการหล่อลื่น

3.1.2 เตรียม 0.8 % agarose gel โดยการชั่ง agarose 0.8 g และเติม 1x TBE buffer จำนวน 100 ml

3.1.3 เขย่าเบาๆเพื่อช่วยในการละลายและอุ่นด้วยไมโครเวฟ ประมาณ 2 นาที

3.1.4 ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 50 - 55 °C แล้วเทลงในถาดที่เตรียมไว้ โดยให้ gel หนาประมาณ 5 mm ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ

3.1.5 ปลอ่ยให้ agarose gel เย็นลงจนแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้เวลาประมาณ 30-45 นาที แล้วจึงดึงหวีออก ระวังอย่าให้เกิดการฉีกขาด

3.1.6 เติม 1x TBE buffer ลงไปในถาดสำหรับเท gel เพื่อช่วยในการนำ gel ออกจากถาดได้ง่ายขึ้น

3.1.7 นำแผ่น gel วางลงในเครื่อง electrophoresis equipment แล้วใส่ 1x TBE buffer ให้ท่วม gel โดยให้สูงกว่าแผ่น gel ประมาณ 2-3 mm

3.1.8 คูดสารละลายดีเอ็นเอ 5 µl ผสมกับ 6x loading buffer 1 µl แล้วหยอดลงใน gel ที่เตรียมไว้

3.1.9 ทำการหดยดสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

3.1.10 ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่อง electrophoresis equipment แล้วเปิดกระแสไฟฟ้าให้มีแรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 30-45 นาที

3.1.11 นำแผ่น gel ไปย้อมในสารละลาย ethidium bromide ประมาณ 5-15 นาที และนำไปล้างด้วยน้ำเปล่าที่สะอาดเพื่อล้าง ethidium bromide ประมาณ 5 นาที

3.1.12 นำแผ่น gel ที่ได้ไปเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตแล้วทำการบันทึกภาพเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนหรือการแตกหักของดีเอ็นเอและหาปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

4. การตรวจสอบดีเอ็นเอโดยเทคนิค inter - simple sequence repeat

การทำเทคนิค inter - simple sequence repeat เริ่มจากการตรวจหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมโดยนำตัวอย่างดีเอ็นเอจำนวนหนึ่งมาทดสอบด้วยไพรเมอร์ชนิดต่างๆเพื่อตรวจหาชนิดไพรเมอร์ที่เหมาะสมที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

4.1 เลือกชนิดไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

4.2 ขั้นตอนและการเตรียมปฏิกิริยา

ขั้นตอนและวิธีการเตรียมปฏิกิริยาในการทำเทคนิค inter - simple sequence repeat มีขั้นตอนดังนี้

4.2.1 เตรียมสารละลายต่างๆ ซึ่งประกอบไปด้วย ดีเอ็นเอ (genomic DNA) เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ไพรเมอร์ สารละลาย dNTP แมกนีเซียมคลอไรด์ 10x PCR buffer น้ำกลั่นบริสุทธิ์และสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน ดังตารางที่ 4 ผสมลงในหลอดทดลองขนาดเล็กและเติม mineral oil จำนวน 1-2 หยด ในกรณีที่เครื่อง PCR ไม่มีระบบให้ความร้อนที่ฝาเพื่อป้องกันการระเหยของสารละลายต่างๆในปฏิกิริยา

4.2.2 ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 8,500 rpm ที่อุณหภูมิ 25 °C ประมาณ 5-7 วินาที

4.2.3 นำเข้าเครื่อง PCR โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาดังตารางที่ 5

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นของสารที่ใช้เป็นองค์ประกอบต่างๆในปฏิกิริยา PCR

สารที่ใช้	ปริมาตร (μl)	ความเข้มข้นในปฏิกิริยา
1. ดีเอ็นเอ (20 ng/μl)	3.0	60 ng/15 μl
2. 10x PCR buffer	1.5	1 เท่า
3. MgCl ₂ (2.5 mM)	0.75	0.125 mM
4. dNTP (2 mM)	0.3	0.04 mM
6. ไพรมเมอร์ (5 pmole/μl)	1.0	5 pmole/15 μl
7. <i>Taq</i> polymerase (5 unit/μl)	0.25	1.25 unit/15 μl
8. น้ำกลั่น	8.2	-
รวม	15.0	

ที่มา: วิชาญ (ม.ป.ป.)

ตารางที่ 5 โปรแกรมการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR

	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
1. Denaturation	94	3	1
2. Denaturation	94	1	40
Annealing	35	1	
Extension	72	2	
3. Final extension	72	5	1

ที่มา: อัญมณี (2544)

4.2.4 นำผลที่ได้จากการทำ PCR เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อรอการตรวจสอบ

ต่อไป

4.3 การตรวจสอบผลที่ได้จากการทำ PCR

โดยนำผลตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR มาทำ electrophoresis ใน 1.4 % agarose gel แล้วย้อมด้วย ethidium bromide ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

4.3.1 เตรียมถาดสำหรับเท gel ในแนวราบและหิวให้เรียบร้อย เช็ดหิวและถาดด้วย glycerol เพื่อช่วยในการหล่อลื่น

4.3.2 เตรียม 1.4 % agarose gel โดยการชั่ง agarose 1.4 g และเติม 1x TBE buffer จำนวน 100 ml

4.3.3 เขย่าเบาๆเพื่อช่วยในการละลายและอุ่นด้วยไมโครเวฟ ประมาณ 2 นาทีและทิ้งให้เย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 50 - 55° C แล้วเทลงในถาดที่เตรียมไว้โดยให้ gel หนาประมาณ 5 mm ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ

4.3.4 ปล่อยให้ agarose gel เย็นลงจนแข็งตัวที่อุณหภูมิ 25° C โดยใช้เวลาประมาณ 30-45 นาที แล้วจึงดึงหิวออก ระวังอย่าให้ gel เกิดการร้าวขาด

4.3.5 เติม 1x TBE buffer ลงไปในถาดเพื่อช่วยในการนำ gel ออกจากถาดได้ง่ายขึ้น และนำแผ่น gel วางลงในเครื่อง electrophoresis equipment และใส่ 1x TBE buffer ให้ท่วม gel โดยให้สูงกว่าประมาณ 2-3 mm

4.3.6 คูดสารละลายดีเอ็นเอ 5 µl ผสมกับ 6x loading buffer 1 µl หยอดลงใน gel ที่เตรียมไว้และทำการหยอดสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดและความเข้มข้นเพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

4.3.7 ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่อง electrophoresis equipment แล้วเปิดกระแสไฟฟ้าให้มีแรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 30-45 นาที

4.3.8 นำแผ่น gel ไปย้อมในสารละลาย ethidium bromide ประมาณ 5-15 นาที และนำไปล้างด้วยน้ำเปล่าที่สะอาดประมาณ 5-10 นาที

4.3.9 นำแผ่น gel ที่ได้ไปตรวจสอบการเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตแล้วทำการเก็บบันทึกผลที่ได้

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

5.1 ทำการแปลงข้อมูลแถบดีเอ็นเอเป็นข้อมูลแบบ binary และทำการเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น โดยตัวอย่างที่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆ ให้สัญลักษณ์เป็น 1 ส่วนตัวอย่างที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันให้สัญลักษณ์เป็น 0

5.2 คำนวณค่าอัลลีลต่อไพรเมอร์ ขนาดของอัลลีล (allele size) ความถี่ของอัลลีล (allele frequency) ค่า polymorphic percentage และค่า heterozygosity (Hn) (Powell *et al.*, 1996)

สูตรในการคำนวณ

1. ค่าความถี่ของอัลลีล (allele frequency) (Powell *et al.*, 1996)

$$\text{Allele frequency} = \frac{\text{จำนวน allele}}{\text{จำนวน allele ทั้งหมด}}$$

2. ค่า polymorphic percentage (Powell *et al.*, 1996)

$$\text{polymorphic percentage} = \frac{\text{จำนวน polymorphic loci}}{\text{จำนวน loci ทั้งหมด}}$$

3. ค่า Heterozygosity (Hn) (Powell *et al.*, 1996)

$$H_n = 1 - \sum P_i^2$$

เมื่อ P_i = ความถี่ของ allele ที่ i โดย P_i ประกอบด้วย P_A และ P_p
 P_A = ความถี่ของ allele ที่ไม่ปรากฏ (absent allele)
 P_p = ความถี่ของ allele ที่ปรากฏ ณ ตำแหน่งเดียวกัน (present allele)

5.3 คำนวณค่าดัชนีความคล้ายคลึง (similarity index) และจัดทำแผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ด้วยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc รุ่น 2.01 (Rohlf, 1997)

สูตรในการคำนวณ

Similarity index (S_D) (Nei and Li, 1979)

$$S_D = 2a / 2a+b+c$$

เมื่อ a = จำนวนของ allele ที่ปรากฏทั้ง i และ j
 b = จำนวนของ allele ที่ปรากฏใน i แต่ไม่ปรากฏใน j
 c = จำนวนของ allele ที่ปรากฏใน j แต่ไม่ปรากฏใน i
 b = จำนวนของ allele ที่ไม่ปรากฏทั้งใน i และ j

5.4 วิเคราะห์ สรุปรูป และวิจารณ์ผลการศึกษา