

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. สายพันธุ์ถั่วหรั่งที่ใช้ในการวิเคราะห์

สายพันธุ์ถั่วหรั่งที่ใช้ในการวิเคราะห์เอเอฟแอลพี แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 รายชื่อสายพันธุ์ถั่วหรั่ง (*Vigna subterranea* (L.) Verdc.) จำนวน 40 สายพันธุ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์เอเอฟแอลพี (สายพันธุ์ทั้งหมดได้รับจาก International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Ibadan, Nigeria)

ลำดับที่	accession no.	ชื่อสายพันธุ์	แหล่งพันธุ์
1	A1	TVSu-1	Nigeria
2	A2	TVSu-2	Nigeria
3	A4	TVSu-4	Nigeria
4	A5	TVSu-5	Nigeria
5	A6	TVSu-6	Nigeria
6	A10	TVSu-10	Nigeria
7	A11	TVSu-11	Nigeria
8	A12	TVSu-12	Nigeria
9	A13	TVSu-13	Nigeria
10	A14	TVSu-14	Nigeria
11	A16	TVSu-16	Nigeria
12	A17	TVSu-17	Nigeria
13	A23	TVSu-23	Nigeria
14	A25	TVSu-25	Nigeria

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ลำดับที่	accession no.	ชื่อสายพันธุ์	แหล่งพันธุ์
15	A38	TVSu-38	Nigeria
16	A84	TVSu-84	Nigeria
17	A85	TVSu-85	Burkina Faso
18	A86	TVSu-86	Burkina Faso
19	A88	TVSu-88	Mali
20	A89	TVSu-89	Mali
21	A110	TVSu-110	Mali
22	A129	TVSu-129	Nigeria
23	A134	TVSu-134	Ghana
24	A138	TVSu-138	Ghana
25	A141	TVSu-141	Ghana
26	A142	TVSu-142	Ghana
27	A148	TVSu-148	Ghana
28	A158	TVSu-158	Ghana
29	A164	TVSu-164	Ghana
30	A165	TVSu-165	Ghana
31	A170	TVSu-170	Ghana
32	A171	TVSu-171	Nigeria
33	A182	TVSu-182	Nigeria
34	A189	TVSu-189	Benin
35	A755	TVSu-755	Zambia
36	A881	TVSu-881	Zambia
37	A913	TVSu-913	Zambia
38	A921	TVSu-921	Zambia

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ลำดับที่	accession no.	ชื่อสายพันธุ์	แหล่งพันธุ์
39	A1596	TVSu-1596	Togo
40	A922	TVSu-922	Zambia
(สงขลา 1)			

2. อุปกรณ์สำหรับการสกัดดีเอ็นเอ

- เครื่อง incubator
- เครื่องปั่นเหวี่ยง
- ชุดอิเล็กโทรโฟรีซิสสำหรับ agarose gel
- เต้าอบไฟฟ้า
- ตู้เย็น
- กล้องส่องรังสีอัลตราไวโอเล็ต

3. อุปกรณ์สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์

- เครื่องพีซีอาร์ หรือ เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมระบบควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ

4. อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์เอเอฟแอลพี

- เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบตั้ง สำหรับ acrylamide gel

5. สารเคมีในการทำปฏิกิริยา

- สารเคมีในการสกัดดีเอ็นเอ เช่น CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide), PVP (polyvinylpyrrolidone), 2-mercaptoethanol, liquid nitrogen, EDTA (disodium salt dehydrate), Tris HCl, chloroform, 95% ethanol และ 70% ethanol เป็นต้น

- สารเคมีในปฏิกิริยาการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและการต่อกับ adapter เช่น เอนไซม์ *EcoRI*, *MseI*, T_4 DNA ligase, *EcoRI* adapter, *MseI* adapter และ ATP เป็นต้น
- สารเคมีในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ เช่น *EcoRI* primer, *MseI* primer, $MgCl_2$, dNTP และ เอนไซม์ *Taq* polymerase เป็นต้น
- สารเคมีในการแยกดีเอ็นเอโดย denaturing polyacrylamide gel เช่น polyacrylamide gel, ammonium persulfate, TEMED, acetic acid, silvernitrate, sodiumcarbonate, formaldehyde และ sodiumthiosulfate เป็นต้น

วิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่างและการเก็บตัวอย่างพืช

นำเมล็ดพันธุ์ถั่วหรั่งจำนวน 40 ตัวอย่างที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก International Institute of Tropical Agriculture (IITA) จากแหล่งพันธุ์ต่าง ๆ ปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 นิ้ว จำนวน 3 ซ้ำต่อสายพันธุ์ ในโรงเรือนปลูกพืชทดลองภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร กำแพงแสน เพื่อเก็บตัวอย่างใบอ่อนในการวิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมโดยเทคนิคเอฟแอลพีและบันทึกข้อมูลทางฐานพันธุศาสตร์

การเก็บตัวอย่างพืชเพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดีและปริมาณมากนั้นขึ้นอยู่กับคุณภาพของเนื้อเยื่อที่ใช้ ถ้าเป็นไปได้ควรใช้เนื้อเยื่อสดมาสกัดทันที แต่ถ้าจำเป็นต้องเก็บตัวอย่างเป็นเวลานาน ควรเก็บรักษาอย่างถูกต้อง ส่วนของพืชที่นิยมใช้ในการสกัด ดีเอ็นเอคือใบอ่อน ถ้าเก็บตัวอย่างสดของพืชแล้วยังไม่ได้นำมาสกัดดีเอ็นเอทันที ควรเก็บในถุงพลาสติก แล้วเก็บในตู้เย็นหรือกล่องน้ำแข็ง

2. การบันทึกข้อมูลทางฐานพันธุศาสตร์

บันทึกข้อมูลทางฐานพันธุศาสตร์ของถั่วหรั่ง 14 ลักษณะ แบ่งเป็นลักษณะทางฐานพันธุศาสตร์เชิงคุณภาพ 8 ลักษณะ และลักษณะทางฐานพันธุศาสตร์เชิงปริมาณ 6 ลักษณะ โดยประยุกต์จาก

description for bambara groundnut [*Vigna subterranea* (L.) Verdc.] (IPGRI, 2000) มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชิงคุณภาพ

1. ลักษณะการเจริญเติบโต (growth habit) บันทึกลักษณะการเจริญเติบโตเมื่อถั่วหรั่งมีอายุ 10 สัปดาห์หลังการปลูก แบ่งเป็น 3 ประเภท ดังนี้

- 1 ตั้งตรงเป็นพุ่ม (bunch type)
- 2 กึ่งเลื้อย (semibunch type)
- 3 เลื้อยแผ่ตามผิวดิน (spreading type)

2. รูปร่างใบ (leave shape) บันทึกลักษณะรูปร่างใบเมื่อถั่วหรั่งมีอายุ 10 สัปดาห์หลังการปลูก แบ่งเป็น 4 ประเภท (ภาพที่ 1) ดังนี้

- 1 กลม (round)
- 2 รี (oval)
- 3 หอก (lanceolate)
- 4 อื่น ๆ (other)

3. รูปร่างเมล็ด (seed shape) บันทึกลักษณะรูปร่างเมล็ดจากตัวอย่างเมล็ดที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก IITA จำนวน 3 เมล็ดต่อสายพันธุ์ แบ่งเป็น 3 ประเภท ดังนี้

- 1 กลม (round)
- 2 ไข่ (oval)
- 3 อื่น ๆ (other)

4. สีเปลือกเมล็ด (testa color) บันทึกลักษณะสีเปลือกหุ้มเมล็ดจากตัวอย่างเมล็ดที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก IITA จำนวน 3 เมล็ดต่อสายพันธุ์ แบ่งเป็น 11 สี ดังนี้

- 1 สีครีม (cream)

- 2 สีเทา (grey)
- 3 สีแดง (light red)
- 4 สีแดงเข้ม (dark red)
- 5 สีน้ำตาล (light brow)
- 6 สีน้ำตาลแดง (light brownish red)
- 7 สีม่วงแดง (light purplish red)
- 8 สีน้ำตาลเข้ม (dark brown)
- 9 สีม่วงเข้ม (dark purple)
- 10 สีดำ (black)
- 11 สีอื่น ๆ (other)

5. ลักษณะเปลือกเมล็ด (testa pattern) บันทึกลักษณะของเปลือกหุ้มเมล็ดจากตัวอย่างเมล็ดที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก IITA จำนวน 3 เมล็ดต่อสายพันธุ์ (ภาพที่ 2)

- 1 no pattern
- 2 entire line
- 3 striped
- 4 marbled
- 5 dotted
- 6 little rhomboid spotting only on one side of hilum
- 7 little rhomboid spotting on both sides of hilum
- 8 much rhomboid spotting on both sides of hilum
- 9 holstein pattern

6. ลักษณะของตาบนเมล็ด (eye pattern) บันทึกลักษณะของตาบนเมล็ดจากตัวอย่างเมล็ดที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก IITA จำนวน 3 เมล็ดต่อสายพันธุ์ (ภาพที่ 3)

- 1 no eye
- 2 eye as a thin circle around hilum
- 3 eye as 2 thin lines on both sides of hilum
- 4 eye as 2 thick lines on both sides of hilum

- 5 eye forms an almost triangular shape
- 6 big eye, more or less shapeless, becoming frayed
- 7 eye like a butterfly
- 8 mottled eye

7. สีพื้นของตาบนเมล็ด (eye ground color) บันทึกลักษณะสีพื้นของตาบนเมล็ดจากตัวอย่างเมล็ดที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก IITA จำนวน 3 เมล็ดต่อสายพันธุ์ แบ่งเป็น 8 สี ดังนี้

- 1 สีเทา (light grey)
- 2 สีน้ำตาล (light brown)
- 3 สีน้ำตาลแดง (light brownish red)
- 4 สีม่วงแดง (light purplish red)
- 5 สีเทาเข้ม (dark grey)
- 6 สีน้ำตาลเข้ม (dark brown)
- 7 สีดำ (black)
- 8 สีอื่น ๆ (other)

8. สีตาบนเมล็ด (eye color) บันทึกลักษณะสีตาบนเมล็ดจากตัวอย่างเมล็ดที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก IITA จำนวน 3 เมล็ดต่อสายพันธุ์แบ่งเป็น 8 สี เช่นเดียวกับสีพื้นของตาบนเมล็ด

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเชิงปริมาณ

1. จำนวนใบ (number of leaves) บันทึกจำนวนใบที่อายุ 10 สัปดาห์หลังปลูก โดยคำนวณค่าเฉลี่ยจาก 3 ต้น

2. ความกว้างของทรงพุ่ม (plant spread) บันทึกความกว้างของทรงพุ่มที่อายุ 10 สัปดาห์หลังการปลูก ทำการวัดความกว้างของทรงพุ่มโดยวัดเป็นแนวตรงจากฝั่งซ้ายไปขวาและคำนวณค่าเฉลี่ยจาก 3 ต้น บันทึกหน่วยเป็นเซนติเมตร

3. ความสูงลำต้น (plant height) บันทึกความสูงต้นโดยทำการวัดจากระดับผิวดิน (ground level) จนถึงจุดสูงสุดของลำต้น โดยรวม terminal leaflet ที่อายุ 10 สัปดาห์หลังการปลูกและคำนวณค่าเฉลี่ยจาก 3 ต้น บันทึกหน่วยเป็นเซนติเมตร

4. จำนวนข้อต่อลำต้น (number of nodes per stem) บันทึกจำนวนข้อต่อลำต้นเมื่อเก็บเกี่ยว คำนวณค่าเฉลี่ยจาก 3 ลำต้น

5. จำนวนกิ่งต่อลำต้น (number of branches per stem) บันทึกจำนวนกิ่งต่อลำต้นเมื่อเก็บเกี่ยว คำนวณค่าเฉลี่ยจาก 2 ลำต้น

6. จำนวนลำต้นต่อต้น (number of stems per plant) บันทึกจำนวนลำต้นต่อต้นเมื่อเก็บเกี่ยว คำนวณค่าเฉลี่ยจาก 3 ลำต้น



Round



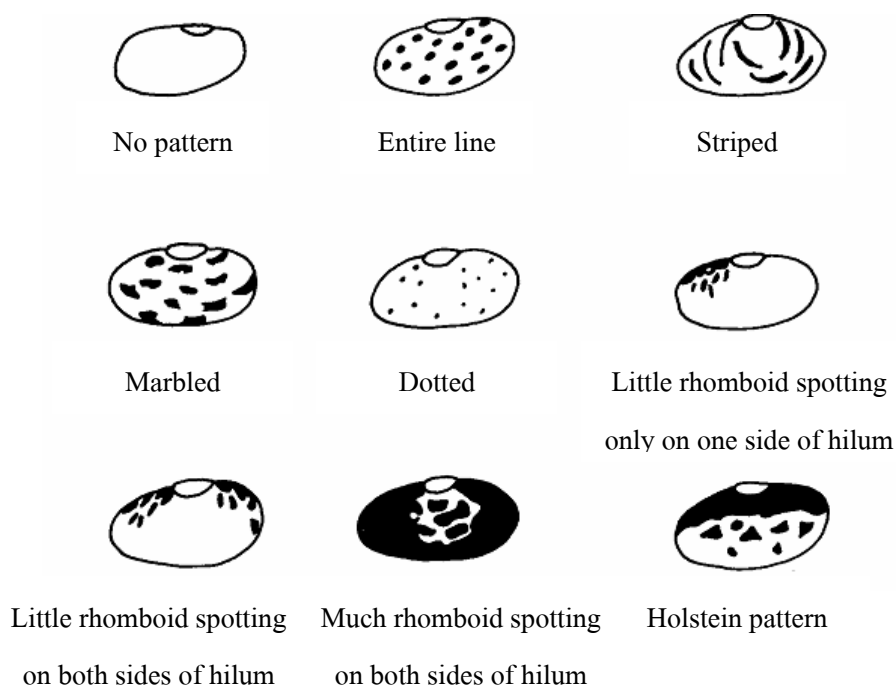
Oval



Lanceolate

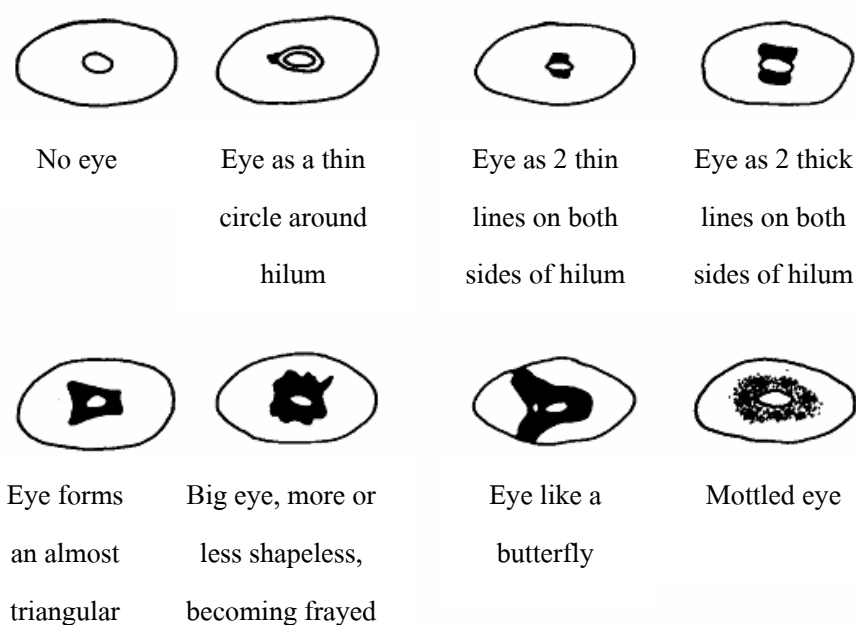
ภาพที่ 2 รูปร่างใบของถั่วหรั่ง (leave shape)

ที่มา: IPGRI (2000)



ภาพที่ 3 ลักษณะของเปลือกหุ้มเมล็ด (testa pattern) ถั่วหรั่ง

ที่มา: IPGRI (2000)



ภาพที่ 4 ลักษณะของตา (eye pattern) บนเมล็ดถั่วหรั่ง

ที่มา: IPGRI (2000)

3. การสกัดดีเอ็นเอ

3.1 นำใบอ่อนถั่วหรั่งบดในโกร่งที่เย็น โดยเติมไนโตรเจนเหลวแล้วบดให้ละเอียดจนเป็นผง

3.2 นำตัวอย่างที่บดแล้วใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมบัฟเฟอร์ปริมาตร 600 ไมโครลิตร (CTAB 2%, NaCl 1.4 mM, PVP 2%, EDTA pH 8.0 20 mM, Tris HCl pH 8.0 100 mM และ 2-mercaptoethanol 2%) ซึ่งอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที โดยกลับหลอดไปมา 2-3 ครั้งทุก 15 นาที

3.3 เติมนสารละลายโพแทสเซียมอะซิเตท ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเขย่าแรง ๆ แล้วแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ในขั้นนี้โปรตีนและโพลีแซคคาไรด์จะตกตะกอนร่วมกับโพแทสเซียมโดเดซิลซัลเฟต เหลือกรดนิวคลีอิกอยู่ในสารละลาย นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที

3.4 คูดสารละลายใสส่วนบนปริมาตร 600 ไมโครลิตรย้ายใส่หลอดใหม่ เติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิล (chloroform:isoamyl, 24:1) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยกลับหลอดไปมาประมาณ 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

3.5 คูดสารละลายใสส่วนบนปริมาตร 600 ไมโครลิตรย้ายใส่หลอดใหม่ เติมนสารละลายโซเดียมอะซิเตท pH 5.2 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรเขย่าเบา ๆ แล้วเติมเอทานอล 95% ที่เย็นจัดปริมาตร 2 เท่าของสารละลายในหลอด นำไปปั่นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

3.6 เทสารละลายส่วนบนทิ้ง แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70% 2 ครั้ง จากนั้นผึ่งตะกอนดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0) ปริมาตร 20-50 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ

4. การตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

ทำโดยนำดีเอ็นเอตัวอย่างที่เตรียมได้มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล แล้วย้อมด้วย เอธิเดียมโบรไมด์ โมเลกุลของเอธิเดียมโบรไมด์จะเข้าไปแทรกในเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ และเมื่อนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตจะเกิดการเรืองแสง โดยที่ความเข้มของแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอ เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นจะสามารถบอกปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่างโดยประมาณได้ โดยปริมาณที่ตรวจสอบได้เป็นระดับนาโนกรัม นอกจากนี้ยังสามารถบอกคุณภาพดีเอ็นเอได้ด้วยว่ามีการปนเปื้อนจากอาร์เอ็นเอหรือไม่ ซึ่งหากมีอาร์เอ็นเอปนอยู่จะเห็นเป็นแถบเคลื่อนที่ไปเร็วกว่าดีเอ็นเอ และยังสามารถบอกได้ว่าดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดโมเลกุลใหญ่มากน้อยเพียงใด มีการแตกหักของโมเลกุลมากเพียงใดโดยมีขั้นตอนการตรวจสอบ ดังนี้

4.1 เตรียมอะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8 % ในบัฟเฟอร์ 0.5x TBE หลอมอะกาโรสโดยใช้ไมโครเวฟ จนอะกาโรสละลายหมด จากนั้นตั้งไว้ให้เย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส แล้วเทลงในถาดที่เตรียมไว้ให้เจลมีความหนาประมาณ 5 มิลลิเมตร เสียบหัวลงไปที่ตรงตำแหน่งเพื่อทำให้เกิดร่องสำหรับหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอ ปล่อยให้เจลแข็งที่อุณหภูมิห้อง

4.2 เมื่อเจลแข็งจึงดึงหัวออก นำเจลใส่ลงในเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส เทปบัฟเฟอร์ 0.5x TBE ให้ท่วมเจล โดยให้สูงกว่าผิวหน้าเจลประมาณ 2-3 มิลลิเมตร

4.3 ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายดีเอ็นเอตัวอย่างปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye (bromophenol blue 0.25%, glycerol 30%) ปริมาตร 9 ไมโครลิตร แล้วหยอดลงไปบนแผ่นเจลที่เตรียมไว้ พร้อมกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่บอกความเข้มข้น 50 100 และ 200 นาโนกรัม

4.4 ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสแล้วเปิดกระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จึงปิดเครื่อง

4.5 นำแผ่นเจลมาย้อมในเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที ล้างเอธิเดียมโบรไมด์ส่วนเกินออกโดยแช่ในน้ำสะอาดเป็นเวลา 20 นาที

4.6 นำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ถ่ายรูปบันทึกผล และประมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอตัวอย่างโดยเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาตรฐาน

5. การวิเคราะห์เอเอฟแอลพี

นำดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบทำปฏิกิริยาตามขั้นตอนดังนี้

5.1 การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและต่อ adapter ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่ต้องการตรวจสอบตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิดพร้อมกัน คือ *EcoRI* ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะที่มีความถี่ในการตัดต่ำ มีตำแหน่งจดจำ 6 เบส และ เอนไซม์ *MseI* ที่มีความถี่ในการตัดสูง มีตำแหน่งจดจำ 4 เบส ผลจากการตัดด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด จะได้ขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 3 ชนิด คือ (1) ชิ้นที่มีปลายทั้งสองด้านถูกตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* (2) ชิ้นที่มีปลายทั้งสองด้านถูกตัดด้วยเอนไซม์ *MseI* และ (3) ชิ้นที่มีปลายด้านหนึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และอีกด้านหนึ่งถูกตัดด้วยเอนไซม์ *MseI*

จากนั้นนำ *EcoRI* adapter และ *MseI* adapter ซึ่งเป็นชิ้นดีเอ็นเอสายคู่สั้น ๆ มาต่อเข้ากับปลายทั้ง 2 ด้านของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อใช้เป็นตำแหน่งจับของไพรเมอร์ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยการนำดีเอ็นเอต้นแบบ 100-150 นาโนกรัม มาตัดส่วนปลายด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และ *MseI* ชนิดละ 5 ยูนิต พร้อมกับ 10x บัฟเฟอร์ A (บริษัท Roche Diagnostics Corporation) 3.0 ไมโครลิตร พร้อมทั้งเติมเอนไซม์ T_4 DNA ligase 1 ยูนิต 10 mM ATP 1.5 ไมโครลิตร ร่วมกับ *EcoRI* adapter และ *MseI* adapter ปริมาณ 5 และ 50 พิโคโมลตามลำดับเพื่อเป็นการต่อเชื่อม adapter เข้ากับปลายดีเอ็นเอต้นแบบ ปรับปริมาตรสุทธิเป็น 30 ไมโครลิตรด้วยน้ำ deionized นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

ลำดับเบสของ adapter เป็นดังนี้

<i>EcoRI</i> adapter	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
	3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'
<i>MseI</i> adapter	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'
	3'-TACTCAGGACTCAT-5'

5.2 การทำพีซีอาร์ I หรือ preselective amplification เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะส่วนที่ต้องการ ทำโดยนำดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและต่อกับ adapter เรียบร้อยแล้วมาเจือจางลง 10 เท่าด้วยน้ำ deionize ใช้ดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร เป็นต้นแบบ ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์กับ *EcoRI* ไพรเมอร์ และ *MseI* ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสคัดเลือกว่าที่ปลาย 3' จำนวน 1 เบส (ตารางที่ 3) เพื่อเพิ่มความจำเพาะเจาะจงในการคัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอ ชนิดละ 0.5 ไมโครลิตร (5 ไมโครโมลต่อ

ไมโครลิตร) พร้อมกับ 10x บัฟเฟอร์ (10 mM Tris HCl pH 8.0, 50 mM KCl) 1.0 ไมโครลิตร 1.5 mM $MgCl_2$ 0.6 ไมโครลิตร dNTP 2.0 ไมโครลิตร (1 ไมโครโมลต่อไมโครลิตร) และเอนไซม์ *Taq* polymerase 0.2 ไมโครลิตร (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปรับปริมาตรสุทธิเป็น 10 ไมโครลิตรด้วยน้ำ deionize แล้วจึงนำไปทำปฏิกิริยาในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมชนิดควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ โดยใช้โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ I ดังนี้

28 รอบ : denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 15 วินาที
 annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที
 extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที
 1 รอบ : extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 120 วินาที

ซึ่งไพรเมอร์แต่ละชนิดที่ใช้ในขั้นตอนนี้ประกอบด้วยลำดับเบส 3 ส่วน คือ เบสหลัก (core base) ลำดับเบสของเอนไซม์ (enzyme base) และเบสคัดเลือกที่ต่อด้านปลาย 3' (extension base) ซึ่งในแต่ละไพรเมอร์มีองค์ประกอบ คือ

	core base	enzyme base	extension base
<i>Eco</i> RI primer	5'-GACTGCGTACC	AATTC	NNN-3'
<i>Mse</i> I primer	5'-GATGAGTCCTGAG	TAA	NNN-3'

ผลผลิตที่ได้จากการทำ preselective amplification คือ การเพิ่มจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอเฉพาะที่มีปลายด้านหนึ่งถูกตัดด้วย *Eco*RI และ ปลายอีกด้านหนึ่งถูกตัดด้วย *Mse*I ในขั้นตอนนี้จะช่วยลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการคัดเลือกลง ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้รับการเพิ่มปริมาณในขั้นตอนนี้จะใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ selective amplification ต่อไป

ตารางที่ 3 คู่ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสคัดเลือกละ 3' จำนวน 1 เบส (primer+1) สำหรับการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอในการทำพีซีอาร์ I

คู่ที่	<i>Eco</i> RI primer+1	<i>Mse</i> I primer+1
1	E-A	M-A
2	E-A	M-G
3	E-A	M-T
4	E-T	M-A
5	E-T	M-C

หมายเหตุ E คือ *Eco*RI primer M คือ *Mse*I primer

5.3 การทำพีซีอาร์ II หรือ selective amplification ใช้ดีเอ็นเอจากพีซีอาร์ I ที่เจือจางลง 10 เท่าด้วยน้ำ deionized เป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา โดยใช้ดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร เป็นต้นแบบ ทำปฏิกิริยากับ *Eco*RI ไพรเมอร์ และ *Mse*I ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสคัดเลือกละ 3' จำนวน 3 เบส (ตารางที่ 4) เพื่อเพิ่มความจำเพาะเจาะจงในการคัดเลือกรั้งดีเอ็นเอ ชนิดละ 0.5 ไมโครลิตร (5 ไมโครโมลต่อไมโครลิตร) พร้อมกับ 10x บัฟเฟอร์ (10 mM Tris HCl pH 8.0, 50 mM KCl) 1.0 ไมโครลิตร 1.5 mM MgCl₂ 0.6 ไมโครลิตร dNTP 2.0 ไมโครลิตร (1 ไมโครโมลต่อไมโครลิตร) และเอนไซม์ *Taq* polymerase 0.2 ไมโครลิตร (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปรับปริมาตรสุทธิเป็น 10 ไมโครลิตรด้วยน้ำ deionize แล้วจึงนำไปทำปฏิกิริยาในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมชนิดควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ โดยใช้โปรแกรมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ II ดังนี้

13 รอบ : denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 10 วินาที
 annealing ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 30 วินาที (ลดอุณหภูมิลง 0.7 องศาเซลเซียสต่อรอบหลังจากเสร็จรอบแรก)
 extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที
 25 รอบ : denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 10 วินาที
 annealing ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที
 extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที (เพิ่มเวลารอบละ 1 วินาที)

ตารางที่ 4 คู่ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสคัดเลือกละ 3' จำนวน 3 เบส (primer+3) สำหรับการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอในการทำพีซีอาร์ II

คู่ที่	<i>Eco</i> RI primer+3	<i>Mse</i> I primer+3
1	E-AAA	M-ACG
2	E-ACC	M-AGG
3	E-ACT	M-ACG
4	E-ACT	M-AGG
5	E-AAA	M-GTC
6	E-ACC	M-GTA
7	E-ACT	M-GTA
8	E-ACT	M-GTC
9	E-AGG	M-GTC
10	E-ACA	M-TAC
11	E-ACC	M-TGA
12	E-ACT	M-TAC
13	E-ACT	M-TGA
14	E-TAC	M-AAC
15	E-TAC	M-ACG
16	E-TCG	M-AGG
17	E-TAC	M-CAG
18	E-TAC	M-CAT
19	E-TAC	M-CTA
20	E-TCG	M-CTA

หมายเหตุ E คือ *Eco*RI primer M คือ *Mse*I primer

5.4 การแยกดีเอ็นเอโดย denaturing polyacrylamide gel

การเตรียมกระจกสำหรับเทเจล

1. นำแผ่นกระจกสำหรับเทเจลมาล้างให้สะอาด แล้วเช็ดด้วยเอทานอล 95 % ให้สะอาด ทั้ง 2 แผ่น
2. เช็ดกระจกแผ่นหลังด้วย bind silane (bind silane 1 ไมโครลิตร, glacial acetic acid 2.5 ไมโครลิตร และ เอทานอล 95 % 500 ไมโครลิตร) เพื่อให้เจลเกาะติดกับกระจก
3. กระจกแผ่นหน้าที่มีลักษณะเป็นหูกระต่าย เช็ดให้ทั่วด้วย clear view เพื่อป้องกันไม่ให้เจล เกาะติดกับกระจก ปล่อยให้แห้งประมาณ 5-10 นาที
4. นำกระจกทั้ง 2 แผ่นมาประกอบเข้าชุดกัน โดยวาง spacer ไว้ทั้งสองข้างเพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสอง โดยหันด้านที่ทา bind silane และ clear view เข้าหากัน ใช้คลิปหนีบยึดให้อยู่คงที่
5. เตรียมโพลีอะครีลาไมด์เจลเข้มข้น 4.5 เปอร์เซ็นต์ โดยนำ 4.5 % acrylamide gel 40 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 10 % 250 ไมโครลิตร และ TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamide) 20 ไมโครลิตร ผสมในขวดสำหรับเทเจลให้เข้ากัน ระวังกอย่างให้เกิดฟองอากาศ
6. เทเจลใส่ลงในช่องระหว่างกระจกจนเต็ม ระวังกอย่าให้เกิดฟองอากาศ แล้วใส่หัวเข้านด้านบน ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 2 ชั่วโมง

การทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

1. เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้วใช้น้ำล้างกระจกด้านนอกให้สะอาด ดึงหัวออก และประกอบกระจกเข้ากับเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส และเติมน้ำบัฟเฟอร์ 1x TBE (100 mM Tris HCl pH 8.0, 10mM boric acid, 2 mM EDTA) ลงในช่องด้านบนและด้านล่าง ระวังกอย่าให้มีฟองอากาศอยู่ใต้กระจก

2. ต่อสายไฟเข้ากับเครื่องอิเล็กทรอนิกส์ เปิดกระแสไฟฟ้าทำ pre-run ที่กำลังไฟฟ้า 60 วัตต์ เป็นเวลา 20-30 นาที จนมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส

3. ปิดเครื่อง ใช้เข็มฉีดยาคูคัพเฟอร์มาล้างผิวหน้าของเจล ใส่หัวแบบฟันทลามโดยให้หัวด้านที่เป็นฟันทลามไปสัมผัสกับผิวหน้าเจลเพียงเล็กน้อย และใช้เข็มฉีดยาคูคัพเฟอร์ล้างยูเรียที่ช่องหัวแต่ละช่องออกให้หมด

4. หยอดตัวอย่างดีเอ็นเอจากการทำ PCR II ที่เติม sequencing dye (98% formamide, 10 mM EDTA, 0.01% (w/v) bromophenol blue, 0.01% (w/v) xylene cyanol) 5 ไมโครลิตร ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมเจล จากนั้นเปิดเครื่องอิเล็กทรอนิกส์ โดยใช้กำลังไฟฟ้ที่ 60 วัตต์ เป็นเวลา 80 นาที จนกว่าสี xylene cyanol (สีที่อยู่ด้านบน) เคลื่อนที่ลงมาประมาณ 2 ใน 3 ส่วนของเจล

5. ปิดเครื่อง เทบัฟเฟอร์จากช่องด้านบนออก นำกระจกออกจากเครื่อง แยกกระจกทั้งสองแผ่นออกจากกัน เจลจะติดกับกระจกแผ่นหลังที่เป็นสื่ห่ลี่ยมตรง นำเจลไปย้อมสีด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท

การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท

1. นำกระจกเจลมาแช่ในสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 10 % เป็นเวลา 30 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที บนเครื่องแช่

2. นำแผ่นกระจกเจลย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (1% silver stain, 0.56% formaldehyde) เพื่อย้อมเจลเป็นเวลา 30 นาที กรณีที่ใช้ซิลเวอร์ไนเตรทซ้ำอาจเพิ่มเวลาได้จนถึง 1 ชั่วโมง แช่อย่างสม่ำเสมอตลอดเวลา ถัดที่ใช้ย้อมซิลเวอร์ไม่ควรใช้ติดต่อกับ fixation เพราะอาจมีการปนเปื้อนของกรดอะซิติก ทำให้ย้อมได้ไม่ดี

3. นำแผ่นกระจกเจลออกล้างด้วยน้ำ deionized อย่างรวดเร็วเพื่อล้างซิลเวอร์ไนเตรทส่วนเกินออก

4. นำแผ่นกระจกเจลใส่ลงในสารละลาย develop (30% sodium carbonate, 0.1% sodium thiosulfate, 0.56% formaldehyde) ที่เตรียมใหม่และแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เขย่าอย่างสม่ำเสมอประมาณ 5-10 นาที จนมองเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน

5. หยุดปฏิกิริยาโดยนำแผ่นกระจกเจลใส่ในสารละลายกรดอะซิติก 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที และล้างด้วยน้ำ deionized 10 นาที ผึ่งให้แห้งในอากาศ

5.5 การอ่านผลจากการวิเคราะห์ AFLP ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของถั่วเหลืองทั้ง 40 สายพันธุ์ นำมาเป็นข้อมูลสำหรับวิเคราะห์ผลหาความสัมพันธ์ระหว่างพันธุกรรม โดยเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันของถั่วเหลืองในทุกตัวอย่าง แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏให้สัญลักษณ์ “1” และ แถบดีเอ็นเอที่ไม่ปรากฏให้สัญลักษณ์ “0” แล้วนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบหาความเหมือน และความแตกต่างทางพันธุกรรม ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์เพื่อคำนวณความสัมพันธ์และสร้าง dendrogram เพื่อบ่งบอกความใกล้ชิดและความแตกต่างทางพันธุกรรมของถั่วเหลืองทั้ง 40 สายพันธุ์

สถานที่ทำการทดลอง

1. โรงเรียนปลูกพืชทดลองภาควิชาพืชไร่ฯ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม

2. ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์พืชและถ่ายยีน ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม

ระยะเวลาทำการทดลอง

ตั้งแต่ มิถุนายน 2548 ถึง มิถุนายน 2549