บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

การวิจัยเพื่อศึกษาภูมิปัญญาท้องถิ่นการใช้ประโยชน์และการอนุรักษ์พันธุ์ข้าวพื้นเมืองในครั้งนี้ เป็นการวิจัยเชิงปฏิบัติการแบบมีส่วนร่วม (อนุรักษ์, 2548) โดยมีรายละเอียดดังนี้

1.พื้นที่วิจัยและประชากร

เลือกชุมชนชาวนาในจังหวัดอุบลราชธานี ในเขตพื้นที่อำเภอต่างๆ 3 อำเภอได้แก่ ชุมชนบ้านหนองพรานคาน ตำบลท่าช้าง อำเภอเขมราฐ ชุมชนบ้านท่าศาลา ตำบลชีทวน อำเภอเขื่องใน และชุมชนบ้านนาคำ ตำบลคอนสาย อำเภอตระกาลพืชผล

ประชากรที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้แก่ครัวเรือนที่ปลูกและใช้ประโยชน์รวมทั้งมีการอนุรักษ์พันธุ์ข้าวพื้นเมือง เลือกกลุ่มตัวอย่างแบบเจาะจง(purpose sampling)ในหมู่บ้านเป้าหมายของพื้นที่วิจัยในแต่ละเขตอำเภอ

2.การศึกษาภูมิปัญญาการใช้ประโยชน์และการอนุรักษ์พันธุ์ข้าวพื้นเมือง

2.1 การเก็บข้อมูลภูมิปัญญาการใช้ประโยชน์และการอนุรักษ์พันธุ์ข้าวพื้นเมือง

1)สำรวจพื้นที่ศึกษา เพื่อศึกษาสภาพหมู่บ้าน ลักษณะพื้นที่และสภาพแวดล้อม ตลอดจนวิถีชีวิตความเป็นอยู่ ขนบธรรมเนียมประเพณีของชุมชนชาวนา

2) เก็บรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับสภาพทางเศรษฐกิจ สังคม วัฒนธรรมที่เชื่อมโยงกับวิถีชีวิตที่สัมพันธ์กับข้าว โดยใช้แบบสำรวจข้อมูลครัวเรือนชาวนาที่ปลูกข้าวพื้นเมือง

3)การสัมภาษณ์แบบเจาะลึก (In-deep interview) ในชุมชนพื้นที่ศึกษาและผู้ที่เกี่ยวข้องถึงข้อมูลที่ต้องการสำหรับตอบคำถามการศึกษาวิจัยนี้ และเก็บข้อมูลเชิงลึกเกี่ยวกับการใช้ประโยชน์และการอนุรักษ์ข้าวพื้นเมือง ในบริบททางสังคม เศรษฐกิจของชุมชนที่เปลี่ยนแปลง

4)การสนทนากลุ่ม (Focus group discussion) ดำเนินการสนทนากลุ่มเพื่อศึกษาและเก็บรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับการใช้ประโยชน์และการอนุรักษ์ข้าวพื้นเมือง ระหว่างกลุ่มผู้สูงอายุ กลุ่มแม่บ้าน กลุ่มพ่อบ้าน และผู้นำชุมชน

2.2 เครื่องมือในการเก็บรวบรวมข้อมูล

2.2.1 เครื่องมือในการเก็บรวบรวมข้อมูล

1) แบบสัมภาษณ์คำถามนำ (Guide Interview)ประกอบการสนทนา การสัมภาษณ์ และการสังเกต ซึ่งคำถามได้ครอบคลุมขอบเขตของเนื้อหาที่ศึกษาที่เชื่อมโยงกับวิถีชีวิตของชุมชนชาวนา

2) แบบสอบถาม เพื่อเก็บรวบรวมข้อมูลวิถีชีวิตของชุมชนและประเด็นที่เกี่ยวกับการใช้ประโยชน์และการอนุรักษ์พันธุ์ข้าวพื้นเมือง

2.2.2 การตรวจสอบเครื่องมือ

ตรวจสอบเครื่องมือหรือแบบสัมภาษณ์คำถามนำในการสัมภาษณ์แบบเจาะลึก และแบบสอบถามเพื่อเก็บรวบรวมข้อมูลวิถีชีวิตชุมชน และแก้ไขตามความเหมาะสม

2.2.3 การตรวจสอบข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จากการเก็บรวบรวม จะนำมาตรวจสอบก่อนการนำไปประมวลและการวิเคราะห์ผล โดยข้อมูลที่มีโครงสร้างคำถามนำในการสัมภาษณ์แบบเจาะลึกจะเน้นการสัมภาษณ์แบบ ตรวจสอบและเช็คข้อมูล (Probe List) และตรวจสอบความถูกต้องโดยการเก็บข้อมูลซ้ำ รวมทั้งการถามซ้ำจากผู้ให้ข้อมูลเดิมเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ ถูกต้อง และเที่ยงตรง

3.การศึกษาความหลากหลายของพันธุ์ข้าว

สำรวจความหลากหลายของพันธุ์ข้าวพื้นเมือง ใช้วิธีจัดเวทีประชาคมเพื่อการเรียนรู้ร่วมกันระหว่างคณะวิจัย ผู้นำท้องถิ่น และชาวนา

3.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของข้าวพันธุ์พื้นเมืองที่ยังคงปลูกอยู่ ทั้งลักษณะของลำต้น ใบ และลักษณะของเมล็ด โดยเทียบเคียงกับวิธีการศึกษาของสถาบันวิจัยข้าว(สถาบันวิจัยข้าว, 2544) และวิธีการศึกษาลักษณะพันธุ์ข้าวพื้นเมืองไทย (กรมวิชาการเกษตร, 2547)

3.2 ศึกษาลายพิมพ์ DNA (DNA fingerprinting) ของข้าวพันธุ์พื้นเมือง

ศึกษาลายพิมพ์ DNA ของข้าวพันธุ์พื้นเมือง เพื่อให้เห็นความแตกต่างของพันธุ์ข้าวโดยมีขั้นตอนดังนี้

3.2.1 การสกัด DNA จากส่วนใบของตัวอย่างข้าวตามวิธีการ Agarwal *et al.*(1992) โดยมีขั้นตอนดังนี้

(1) นำใบข้าวประมาณ 0.2 กรัม (ใช้ใบอ่อน) ใส่ลงในโกร่งเติมไนโตรเจนเหลวให้ท่วมและบดให้ละเอียด ปล่อยให้ไนโตรเจนเหลวระเหยไปจนหมด แล้วจึงถ่ายผงใบลงในหลอดเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี 2X CTAB 600 ไมโครลิตร และ 2-mercaptoethanol 4 ไมโครลิตร ที่อุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที โดยกลับหลอดไปมา ทุกๆ 10 นาที

(2) นำหลอดมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที เพื่อให้อุณหภูมิลดลงแล้วเติมคลอโรฟอร์ม:ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24 :1) 600 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยกลับหลอดไปมาเบาๆ

(3) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนบน ใส่ในหลอดใหม่ และเติมไอโซโพรพานอล 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบา ๆ นำไปเก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

(4). นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม washing buffer 500 ไมโครลิตร เคาะข้างหลอดเบาๆเพื่อละลายเกลือออก จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง คว่ำหลอดบนกระดาษซับให้แห้งหรือปล่อยให้แห้งในอากาศ แล้วละลายตะกอนใน RNase buffer 200 ไมโครลิตร

(5) เติม RNase A 10 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน

(6) เติม ฟีนอล: คลอโรฟอร์ม: ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (25: 24: 1) 200 ไมโครลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยกลับหลอดไปมา แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g เป็นเวลา 5 นาที

(7) ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ สกัดซ้ำด้วยคลอโรฟอร์ม:ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24: 1) 200 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดฟีนอลที่อาจเหลืออยู่ออกไป นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g เป็นเวลา 5 นาที

(8) ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติมโซเดียมอะซิเตทเข้มข้น 3 M pH 5.2 10 ไมโครลิตร และ absolute ethanol 400 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอซ้ำ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

(9) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย ethanol 70% ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 g เป็นเวลา 3 นาที

(10) เทส่วนใสทิ้ง คว่ำหลอดบนกระดาษซับให้แห้งหรือปล่อยให้แห้งในอากาศ และละลายตะกอนใน TE buffer 50 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ต่อไป

3.2.2 ตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณ DNA โดยใช้สเปคโตรไฟโตมิเตอร์

ตรวจสอบความริสุทธ์และวัดปริมาณของ DNA โดยใช้ใช้สเปคโตรไฟโตมิเตอร์ โดยนำสารละลาย DNA ไปวัดค่า optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เพื่อหาความเข้มข้นของ DNA ดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ } (\mu g/ml) = OD_{260} \times 50\ \mu g/ml \times \text{dilution factor}$$

การวัดค่าดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอจะวัดที่ความยาวช่วงคลื่น 280 นาโนเมตร (OD_{280}) ด้วย เพื่อใช้ในการคำนวณอัตราส่วนความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ถ้าค่า OD_{260} / OD_{280} อยู่ระหว่าง 1.7 - 1.8 แสดงว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้เป็นเกลียวคู่บริสุทธิ์แต่ถ้าอัตราส่วนสูงกว่า 1.8 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอเจือปน

อิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นเทคนิคที่ใช้แยกขนาดโมเลกุลของสารละลายที่มีประจุออกจากกันในสนามไฟฟ้าในเจลอะกาโรสแล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์โดยอาศัยหลักการที่ว่าโมเลกุลของเอธิ-เดียมโบรไมด์จะเข้าไปแทรกอยู่ในเกลียวคู่ของดีเอ็นเอและเมื่อนำไปดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตจะเกิดการเรืองแสง โดยความเข้มแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณแล้วสามารถบอกปริมาณดีเอ็นเอ โดยประมาณได้ในระดับนาโนกรัม การแยกขนาดด้วยวิธีนี้ยังสามารถบอกคุณภาพของดีเอ็นเอได้ด้วยว่ามีการปนเปื้อนของอาร์เอ็นเอบ้างหรือไม่และทราบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดโมเลกุลเท่าใด มีการแตกหักของโมเลกุลมากเพียงใด (ภาควิชาพันธุศาสตร์, 2542) ซึ่งมีวิธีการดังนี้

(1) นำถาดเจลมาวางบนฐานวางเจลแล้วเสียบหวีลงปลายด้านบนของแผ่นเจล

(2) เตรียมวุ้นอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งผงอะกาโรสเจล 1 กรัม ใส่ลงใน 0.5 TBE buffer 100 มิลลิลิตร และหลอมอะกาโรสโดยใช้เครื่องไมโครเวฟประมาณ 1 นาที

(3)ปล่อยสารละลายอะกาโรสไว้ให้เย็นลง อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส แล้วจึงเทลงในถาดที่เตรียมไว้ให้เจลมีความหนาประมาณ 5 มิลลิเมตร ระวังอย่าให้เกิดฟอง

(4) ปล่อยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้เวลาประมาณ 30 – 45 นาที แล้วดึงหวีออกอย่างระมัดระวัง

(5) นำถาดเจลไปใส่ใน chamber อิเล็กโทรโฟรีซิส ให้ด้านที่มีช่องอยู่ใกล้ขั้วลบ และเติม 0.5X TBE buffer ให้สูงท่วมแผ่นเจลประมาณ 1 – 2 มิลลิเมตร

(6) ดูดสารละลายดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตรผสมกับ 6 X loading buffer (0.25% bromphenol bule, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol ละลายน้ำ) 1 ไมโครลิตร แล้วหยอดลงในช่องเจลที่เตรียมไว้

(7) หยอดดีเอ็นเอมาตรฐานปริมาตร 20 นาโนกรัม

(8) ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซีส แล้วเปิดกระแสไฟฟ้าให้มีแรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 30 นาที

(9) นำแผ่นเจลไปย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำแผ่นเจลไปล้างด้วยน้ำประปาที่กำลังไหลประมาณ 5 นาที

(10)นำแผ่นเจลไปดูภายใต้เครื่อง gel document ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

3.2.3 เพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR

เพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction; PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ทั้ง 8 คู่ ได้แก่ RM11, RM149, RM167, RM207, RM212, RM215, RM219 และ RM289 โดยมีรายละเอียดของลำดับเบสตามที่แสดงในตาราง

ไพร์เมอร์	ลำดับเบส
RM11F	5’- TCTCCTCTTCCCCCGATC -3’
RM11R	5’- ATAGCGGGCGAGGCTTAG -3’
RM149F	5’- GCTGACCAACGAACCTAGGCCG -3’
RM149R	5’- GTTGGAAGCCTTTCCTCGTAACAC -3’
RM167F	5’- GATCCAGCGTGAGGAACACGT -3’
RM167R	5’- AGTCCGACCACAAGGTGCGTTGTC -3’
RM207F	5’- CCATTCGTGAGAAGATCTGA -3’
RM207R	5’- CACCTCATCCTCGTAACGCC -3’
RM212F	5’- CCACTTTCAGCTACTACCAG -3’
RM212R	5’- CACCCATTTGTCTCTCATTATG -3’
RM215F	5’- CAAAATGGAGCAGCAAGAGC -3’
RM215R	5’- TGAGCACCTCCTTCTCTGTAG -3’
RM219F	5’- CGTCGGATGATGTAAAGCCT -3’
RM219R	5’- CATATCGGCATTCGCCTG -3’
RM289F	5’- TTCCATGGCACACAAGCC -3’
RM289R	5’- CTGTGCACGAACTTCCAAAG -3’

โดยมีขั้นตอนปฏิบัติดังนี้

(1) เตรียมสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาตามตารางที่ 1 ในหลอดขนาด 0.5 มิลลิลิตร

ตารางที่ สารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

สารที่ใช้	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
สารละลายดีเอ็นเอ (5 ng/ μl)	2.0
primer F (5 pmole/μl)	1.0
primer R (5 pmole/μl)	1.0
dNTP mix (2mM)	2.0
10X PCR buffer A	2.0
$MgCl_2$	0.8
Tag DNA polymerase vivantis (5 U/μl)	0.2
น้ำกลั่น	11.0
ปริมาตรรวม	20.0

(2) เมื่อเตรียมสารละลายสำหรับทำ PCR ตามตารางที่ 1 ผสมให้เข้ากันนำเข้าเครื่อง PCR เพื่อทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้อุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยาดังนี้

Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

Annealing ที่อุณหภูมิ 55, 64 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที } จำนวน 28 รอบ

Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

โดยไพร์เมอร์ RM11, RM207, RM212, RM215, RM219 และ RM289 ใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส ส่วนไพรเมอร์ RM149 และ RM167 ใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing ที่ 64 องศาเซลเซียส

3.2.4 การตรวจผล SSR ด้วยอิเล็กโทรโฟรีซีสในโพลิอะคริลาไมด์

ชิ้น DNA ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ซึ่งเป็น Microsatellite DNA หรือ Simple Sequence Repeat; SSR) นำมาตรวจสอบโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสในอะคริลาไมด์ โดยใช้อะคริลาไมด์เข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ โดยมีขั้นตอนดังนี้ (สุรินทร์, 2545)

3.2.4.1 การเตรียมกระจกสำหรับเจลโพลีอะคริลาไมด์ (สุรินทร์, 2545)

นำแผ่นกระจกสำหรับเตรียมเจลมาล้างให้สะอาด แล้วเช็ดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ให้สะอาดทั้ง 2 แผ่น เช็ดกระจกแผ่นหลังด้วย bind silane (bind silane 1.5 ไมโครลิตร, glacial acetic acid 2.5 ไมโครลิตร และเอทานอล 496 ไมโครลิตร) เพื่อให้เจลเกาะติดกับกระจก สำหรับกระจกแผ่นหน้าที่มีลักษณะเป็นหูกระต่ายเช็ดให้ทั่วด้วย repel silane เพื่อไม่ให้เจลเกาะติดกระจก ปล่อยให้แห้งประมาณ 5-10 นาที จากนั้นนำกระจกทั้ง 2 แผ่นมาประกอบเข้าชุดโดยวาง spacer ไว้ทั้งสองข้างเพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสอง โดยหันด้านที่ทา bind silane และ repel silane เข้าหากัน

3.2.4.2 การเตรียมเจลโพลีอะคริลาไมด์ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ (acrylamide : bisacrylamide 19:1, 7.5 M urea) มีส่วนผสมดังตาราง

ตารางแสดงส่วนประกอบของเจลอะคริลาไมด์

สารละลาย	ปริมาณสารที่ใช้	
30 % อะคริลาไมด์ (19 : 1)	3.00	มิลลิลิตร
5X TBE	3.00	มิลลิลิตร
ยูเรีย	6.75	กรัม
น้ำกลั่น	3.75	มิลลิลิตร
10% APS*	150.00	ไมโครลิตร
TEMED*	7.50	ไมโครลิตร

หมายเหตุ *เติมภายหลัง

TBE = 89 mM Tris-borate, 2.5 mM EDTA

APS = ammonium persulfate

TEMED = N,N,N′,N′-tetramethylethylediamine

ผสมโพลีอะคริลาไมด์ บัฟเฟอร์ TBE น้ำและยูเรียในบีกเกอร์ เขย่าเบาๆในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ให้ยูเรียละลายหมด รอจนอุณหภูมิลดลงประมาณเท่าอุณหภูมิห้อง จึงเติม 10 % APS และ TEMED เขย่าให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกันอย่างรวดเร็ว ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ เทเจลใส่ลงในช่องระหว่างกระจกจนเต็ม แล้วใส่หวีลงไปด้านบน ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 2 ชั่วโมง ถ้าปล่อยเจลไว้ข้ามคืนควรใช้แผ่นใสห่ออาหารปิดด้านบนและด้านล่างของเจลไว้เพื่อให้มีความชื้น

3.2.4.2 อิเล็กโทรโฟรีซิส

(1) เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้วใช้น้ำล้างกระจกด้านนอกให้สะอาดดึงหวีออกและประกอบกระจกเข้ากับชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส เติมบัฟเฟอร์ TBE ลงในช่องด้านบนและด้านล่าง ระวังอย่าให้มีฟองอากาศอยู่ใต้กระจก

(2) ต่อสายไฟเข้ากับเครื่อง power supply ทำ pre-run 30 นาที โดยใช้ความต่างศักย์คงที่ 300 โวลต์

(3) ปิดเครื่อง ใช้เข็มฉีดยาดูดบัฟเฟอร์มาล้างผิวหน้าของเจลเพื่อล้างยูเรียที่อยู่ในช่องหวีแต่ละช่องให้หมด

(4) หยอดตัวอย่างดีเอ็นเอ 8 ไมโครลิตร ผสมกับ loading buffer (98% formamide, 10 mM EDTA, 0.1% bromphenol blue, 0.1% xylene cyanol) 2 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที หลังจากนั้นนำไปหยอดในแต่ละช่อง

(5) เปิดเครื่องโดยใช้ความต่างศักย์เท่าเดิม ใช้เวลา 2-3 ชั่วโมง จนกว่าสี xylene cyanol (สีบน) เคลื่อนลงประมาณ 1 ใน 5 ส่วนของเจล

(6) ปิดเครื่อง ดูดบัฟเฟอร์จากช่องด้านบนออก นำกระจกออกจากเครื่อง แยกกระจกทั้งสองแผ่นออกจากกัน เจลจะติดอยู่กับกระจกแผ่นหลังที่เป็นสี่เหลี่ยมตรง

3.2.4.3 การตรวจสอบแถบ DNA โดยวิธีปลอดรังสี

(1) แช่กระจกที่มีเจลติดในสารละลาย fixative เย็น (น้ำ 265 มิลลิลิตร, เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 32 มิลลิลิตร, กรดอะซิติกเข้มข้น 1.5 มิลลิลิตร) เป็นเวลา 5 นาที พร้อมเขย่าเบาๆ

(2) แช่แผ่นเจลในสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (น้ำ 250 ไมโครลิตร, ซิลเวอร์ไนเตรท 0.5 กรัม, ฟอร์มาลดีไฮด์ 37 เปอร์เซ็นต์ 1 มิลลิลิตร) เขย่าเบาๆ อย่างสม่ำเสมอเป็นเวลานาน 10 นาที

(3) นำแผ่นเจลมาล้างด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว

(4) ย้ายแผ่นเจลมาใส่ในสารละลาย developer (น้ำ 250 มิลลิลิตร, โซเดียมไฮดรอกไซด์ 3.75 กรัม, ฟอร์มาลดีไฮด์ 37 เปอร์เซ็นต์ 1 มิลลิลิตร) เขย่าเบาๆ อย่างสม่ำเสมอ นาน 5-10 นาที หรือจนกว่าจะเห็นแถบดีเอ็นเอ ชัดเจน

(5) หยุดปฏิกิริยาโดยนำแผ่นเจลใส่สารละลาย fixative นาน 5 นาที แล้วผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

3.2.4.4 การวิเคราะห์ผล

ทำการวิเคราะห์ผลของแถบดีเอ็นเอโดยเปรียบเทียบความแตกต่างของดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกัน และทำการให้คะแนน โดย ‘0’ หมายถึงไม่มีแถบดีเอ็นเอ และ ‘1’ หมายถึงมีแถบดีเอ็นเอ จากนั้นวิเคราะห์ผลเพื่อดูความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.1(Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ Jaccard’s coefficients และสร้างเดนโดรแกรม (dendrogram)โดยใช้ upweighted pair group method arithmetic average (UPGMA)