2. <u>การสกัดดีเอ็นเอจากปรงในสกุล *Zamia*</u>

สกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนของปรงสกุล *Zamia* โดยวิธีที่ดัดแปลงจาก Doyle and Doyle (1990) เมื่อใช้ CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) เป็นส่วนประกอบบัฟเฟอร์ พบว่าเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับดีเอ็นเอเพื่อใช้ในเทคนิค RAPD (Boiteux *et al*., 1999) เนื่องจากได้ดีเอ็นเอประมาณ 2 ไมโครกรัมต่อใบปรง 1 กรัม โดยตรวจสอบความเข้มข้นจากค่าดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

3. <u>ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้เทคนิค RAPD</u>

3.1 สภาวะที่เหมาะสมเพื่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอมีความจำเป็นมากในการทำ RAPD ทั้งนี้เพื่อให้ได้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน (Koller *et al*.,1993; Wolff *et al*., 1993; Rath *et al*., 1998) โดยเฉพาะความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบ ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ และอุณหภูมิที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อให้ได้สภาพที่เหมาะสมที่สุดสำหรับตัวอย่างที่ทดลอง จากการทดลองหาความเข้มข้นของดีเอ็นต้นแบบที่เหมาะสมในงานวิจัยต่างๆ พบว่าที่ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากและชัดเจนที่สุด (พัทธมน, 2545; สุรินทร์, 2545; มินตา, 2547) การใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่มีความเข้มข้นมากเกินไปมีผลทำให้แถบดีเอ็นเอบางแถบหายไป เนื่องจากในขั้นตอนหลังจากทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพแล้วลดอุณหภูมิลงเพื่อให้ไพรเมอร์เข้ามาจับกับดีเอ็นเอต้นแบบนั้น ดีเอ็นเอต้นแบบที่มีปริมาณมากอาจเกิดการคืนสภาพกลับมาจับตัวกันเป็นเกลียวคู่ใหม่ จึงขัดขวางการจับของไพรเมอร์ นอกจากนี้ถ้าใส่ดีเอ็นเอลงในปฏิกิริยามาก สารเจือปนที่อยู่ในสารละลายดีเอ็นเอก็จะมีปริมาณมากขึ้นด้วย ทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้ไม่ดีเท่าที่ควร (สุรินทร์, 2545) สารสำคัญอีกอย่างที่มีผลต่อการทำ RAPD มาก คือ แมกนีเซียมคลอไรด์ พบว่าถ้าไม่ใส่แมกนีเซียมคลอไรด์หรือใส่ในความเข้มข้นต่ำจะไม่เกิดปฏิกิริยา ถ้าความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์มากเกินไปจะเกิดแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ (non specific band) เพิ่มขึ้น นอกจากนั้นอาจทำให้แถบดีเอ็นเอบางแถบหายไปด้วย การเลือกความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ควรเลือกที่ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนและคงที่ จากการทดลองหาความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ในงานวิจัยต่างๆ พบว่าระดับความเข้มข้นที่ 3.0 มิลลิโมลาร์ มีรูปแบบดีเอ็นเอที่ชัดเจนที่สุดและมีความคงที่ (พัทธมน, 2545; สุรินทร์, 2545) สำหรับความจำเป็นในการหา

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำ PCR มีความสำคัญมากเช่นกัน ในปฏิกิริยา PCR ขั้นตอน annealing เป็นขั้นตอนที่ไพรเมอร์เข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบและเกิดขึ้นโดยสุ่มเนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้เป็น random primer ซึ่งถือว่าเป็นขั้นตอนที่สำคัญที่สุด เมื่อลดอุณหภูมิลงจากขั้นตอนที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ อุณหภูมิที่ต่ำทำให้ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นต้นแบบได้อย่างสมบูรณ์ จากการทดลองหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับใช้ในเทคนิค RAPD พบว่าที่อุณหภูมิ 94 ^{0}C นาน 1 นาที (สำหรับ denaturation) 36 ^{0}C นาน 1 นาที (สำหรับ annealing) และ 72 ^{0}C นาน 2 นาที (สำหรับ primer extension) ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอและมีรูปแบบที่ชัดเจน (พัทธมน, 2545; มินตา, 2547) จากรายงานการวิจัยต่างๆ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ คือ ดีเอ็นเอต้นแบบที่ความเข้มข้น 100 นาโนกรัม แมกนีเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 3.0 มิลลิโมลาร์ และอุณหภูมิที่เหมาะสมได้กล่าวไว้ข้างต้น ซึ่งสภาวะเหล่านี้ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนและคงที่มากที่สุดจึงได้นำมาใช้ในงานวิจัยนี้