

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 ตัวอย่างพืช

- การเก็บรวบรวมตัวอย่างพันธุ์ลำไย เลือกเก็บใบอ่อนของพันธุ์ลำไย 20 พันธุ์

ตาราง 1 รายชื่อพันธุ์ลำไย

หมายเลข	พันธุ์	แหล่งที่เก็บ
1.	คอ	สถานีทดลองพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง
2.	สีชมพู	สถานีทดลองพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง
3.	เบี้ยวเขียว	สถานีทดลองพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง
4.	พวงทอง	สถานีทดลองพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง
5.	คอเชียงราย 13	สถานีทดลองพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง
6.	นราภิรมย์	สถานีทดลองพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง
7.	ค่อนาน	สถานีทดลองพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง
8.	ลิ้นจี่	สถานีทดลองพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง
9.	กะทิ	สถานีทดลองพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง
10.	พวงทอง 05	สถานีทดลองพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง
11.	แห้ว	สถานีทดลองพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง
12.	เพชรสาคร	สถานีทดลองพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง
13.	คอห้างฉัตร 46	สถานีทดลองพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง
14.	คอลำพูน 01	สถานีทดลองพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง
15.	ดอนครพนม	สถานีทดลองพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง
16.	คอหลวง	สถานีทดลองพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง
17.	ปิงปอง	ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย จังหวัดเชียงราย
18.	สกลเกษม	ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย จังหวัดเชียงราย
19.	สุขุม	ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย จังหวัดเชียงราย
20.	เวียงคานาม	ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย จังหวัดเชียงราย

1.2 อุปกรณ์

- 1.2.1 เครื่อง PCR (Perkin Elmer ; Gene Amp PCR system 2400)
- 1.2.2 ถังบรรจุไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank)
- 1.2.3 เครื่องปั่นหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge)
- 1.2.4 หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
- 1.2.5 ตู้ดูดไอพิษ (toxicap)
- 1.2.6 ชุคโกร้งบดตัวอย่าง (mortar และ pestle)
- 1.2.7 ตู้บ่ม (incubator)
- 1.2.8 เครื่องอบเครื่องแก้ว (hot air oven)
- 1.2.9 เครื่องทำน้ำแข็ง (ice machine)
- 1.2.10 เครื่องทำความเย็น (freezer) ได้แก่ ตู้เย็น ตู้แช่ -20°C และตู้แช่ 4°C
- 1.2.11 เครื่องปรับอุณหภูมิด้วยน้ำ (Water bath)
- 1.2.12 เครื่องกวนสารละลายด้วยความร้อน (hot plate)
- 1.2.13 เครื่องเขย่า (shaker)
- 1.2.14 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)
- 1.2.15 เครื่องกวนผสมด้วยแม่เหล็ก (magnetic stirrer)
- 1.2.16 เครื่องผสม (vortex mixer)
- 1.2.17 เครื่องดูดอากาศ (suction stirrer)
- 1.2.18 เครื่องชั่งแบบละเอียด (scales)
- 1.2.19 เตาไมโครเวฟ (microwave)
- 1.2.20 ชุดอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ชนิดแวนอน (BIO-RAD, U.S.A.) และชุดอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ชนิดแนวตั้ง (Sequi-Gen[®] GT, Sequencing cell ; BIO-RAD, U.S.A.)
- 1.2.21 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply ; BIO-RAD, U.S.A.)
- 1.2.22 Adjustable automatic pipettes และ yellow tip ขนาดต่าง ๆ
- 1.2.23 Eppendorf tube ขนาด 1.5 ml. และ Multi Ultra PCR Tube (Sorenson[™] BioScience, Inc., U.S.A.) ขนาด 0.5 ml. และ 0.2 ml.
- 1.2.24 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer, Beck man รุ่น DU-7500)
- 1.2.25 เครื่องถ่ายภาพดีเอ็นเอ โดยแสงยูวี (UV transilluminator, Bio-RAD Mini-Transilluminator)

- 1.2.26 กล้อง polaroid (Polaroid GelCam, U.K.) และฟิล์ม (Instant black & white film FP-3000B super speedy, FUJIFILM, Japan)
- 1.2.27 กล้องถ่ายรูปพร้อมฟิล์ม
- 1.2.28 เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ บีกเกอร์ขนาดต่างๆ (beakers) ปิเปต (pipettes) กระจกตวง (cylinder) ขวดรูปชมพู่ (flasks) แท่งแก้วคนสาร ฯลฯ
- 1.2.29 วัสดุอื่นๆ ได้แก่ ถุงมือ ปากกิบ ซ้อนดักสาร กระดาษขึงสาร ถุงพลาสติก พลาสติกใสอย่างบาง ถาดพลาสติก กล่องโฟม กระจกน็อคสาร กระดาษทิชชู กระดาษเทปใส กระดาษเช็ดกระจก (Kimwipes EX-L, Kimberly-Clark, Canada) aluminium foil กระดาษติดฉลาก กรรไกร ไม้บรรทัด มีดตัดเตอร์ ฯลฯ

1.3 สารเคมี

- 1.3.1 Hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB)
- 1.3.2 Polyvinyl polypyrrolidone (PVPP)
- 1.3.3 Sodium chloride (NaCl)
- 1.3.4 Ethylenediaminetetra acetic acid (EDTA)
- 1.3.5 Tris [hydroxymethyl] aminomethane (Tris)
- 1.3.6 2 – mercaptoethanol
- 1.3.7 Chloroform
- 1.3.8 Isoamyl alcohol
- 1.3.9 Isopropanol
- 1.3.10 Ethyl alcohol (EtOH)
- 1.3.11 Liquid nitrogen
- 1.3.12 RNase ONETM ribonuclease (Promega, U.S.A.)
- 1.3.13 Phenol
- 1.3.14 8 – hydroxy quinolone
- 1.3.15 Hydrochloric acid (HCl)
- 1.3.16 Sodium hydroxide (NaOH)
- 1.3.17 Sodium acetate (NH₄OAc)

- 1.3.18 Glacial acetic acid
- 1.3.19 Ethidium bromide
- 1.3.20 Bromophenol blue
- 1.3.21 Xylene cyanol FF
- 1.3.22 Sucrose
- 1.3.23 DNeasy™ Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany)
- 1.3.24 AFLP™ Core Reagent Kit (GIBCO BRL™ LIFE TECHNOLOGIES, U.S.A.)
- 1.3.25 Reaction buffer (Promega, U.S.A.)
- 1.3.26 Magnesium chloride (MgCl_2) (Promega, U.S.A.)
- 1.3.27 Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP_s) (Promega, U.S.A.)
- 1.3.28 Primer (Primer ; Operon Technology, Alamada, U.S.A.)
- 1.3.29 Tag DNA polymerase (Promega, U.S.A.)
- 1.3.30 Mineral oil หรือ paraffin
- 1.3.31 Acrylamind
- 1.3.32 N,N'-methylene-bisacrylamide (Bis)
- 1.3.33 Urea
- 1.3.34 Boric acid
- 1.3.35 N,N,N', N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)
- 1.3.36 Bind Silane
- 1.3.37 น้ำยาเคลือบกระจก (Clear view, Dietham Trading Co., Ltd, Thailand)
- 1.3.38 Sodium thiosulfate ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
- 1.3.39 Sodium carbonate (Na_2CO_3)
- 1.3.40 Silver nitrate (AgNO_3)
- 1.3.41 Ammonium persulfate (APS)
- 1.3.42 37% Formaldehyde (HCOH)
- 1.3.43 98% Formamide
- 1.3.44 Agarose (Promega, U.S.A.)
- 1.3.45 Agar

2. วิธีการทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็น 3 การทดลอง ดังนี้

2.1 การศึกษาเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของลำไย

การทดลองนี้เป็นการเปรียบเทียบแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อแต่ละส่วน ได้แก่ ใบ เปลือกผล เนื้อ และเมล็ด โดยมีรายละเอียดขั้นตอนการปฏิบัติดังต่อไปนี้

2.1.1 การเตรียมดีเอ็นเอ

2.1.1.1 การเตรียมตัวอย่างพืชทดลอง

นำใบอ่อน เปลือกผล เนื้อ และเมล็ดของลำไยมาบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลวด้วย โกร่ง จากนั้นห่อด้วย aluminium foil แล้วนำไปเก็บในตู้แช่ -20°C เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนของการสกัดดีเอ็นเอต่อไป

2.1.1.2 การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดจากเนื้อเยื่อแต่ละส่วนของลำไย ได้แก่ ใบอ่อน เปลือกผล เนื้อ และเมล็ดของ ลำไยพันธุ์ดอเขียวราย 13 โดยใช้ DNeasy™ Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany) ซึ่งมีขั้นตอนการสกัดดังต่อไปนี้

- นำ buffer AP1 ไปอุ่นที่ 65°C ก่อนนำไปใส่ใน eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (ml.) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร (μl .) เติม RNase ONE™ ribonuclease จำนวน 5 units/หลอด ใส่ตัวอย่างที่บดละเอียดแล้วประมาณ 0.1 กรัม (g.) ผสมอย่างแรงโดยใช้ vortex แล้วนำไปอุ่น (incubate) ใน water bath ที่อุณหภูมิ 65°C นาน 10 นาที พลิกหลอดกลับไปกลับมา (inversion) เบาๆ ทุกๆ 2-3 นาที
- เติม AP2 ปริมาตร 130 μl . พลิกหลอดกลับไปกลับมา แล้วนำไป incubate ในน้ำแข็ง 5 นาที นำไปปั่นหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว (centrifuge) 12,000 rpm ใช้เวลา 5 นาที ดูดเอา ส่วนใสด้านบน (supernatant) ใส่ลงในหลอด QIAshredder spin column นำไป centrifuge 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที นำสารละลายที่ได้ใส่หลอด eppendorf ใหม่
- เติม AP3/E ปริมาตร 675 μl แล้ว inverse จนแน่ใจว่าสารละลายผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ค้างมาปริมาตร 650 μl ใส่ลงใน DNeasy mini spin column ไป centrifuge 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
- เติม buffer AW ปริมาตร 500 μl นำไป centrifuge 12,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที

- เติม buffer AE (incubate 65°C ก่อนนำมาใช้) ปริมาตร 20 μ l incubate ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เปลี่ยนหลอดที่ใช้เก็บสารละลายใหม่ก่อนนำไป centrifuge 8,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เพื่อความแน่ใจว่าเก็บสารละลายได้หมด ให้เติม buffer AE แล้วทำซ้ำอีกรอบ แต่ incubate ที่อุณหภูมิห้องใช้เวลานานขึ้นเป็น 10 นาที นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้เก็บอุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2.1.1.3 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอที่สกัดได้นำมาตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธี agarose gel electrophoresis (อาภัสสร, 2537) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาวัดปริมาณความเข้มข้นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวช่วงคลื่น 260 นาโนเมตร (nm.) แล้วคำนวณหาความเข้มข้น และปรับให้เจือจางได้ปริมาณความเข้มข้นที่พอเหมาะกับการทำการทดลองขั้นต่อไป

2.1.2 ปฏิกริยา HAT-RAPD

2.1.2.1 การเลือกใช้ไพรเมอร์

สุ่มใช้ arbitrary primer ความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) จาก Operon Technology, Alamada, U.S.A. จำนวน 3 ไพรเมอร์

ตาราง 2 แสดงรายชื่อ และลำดับเบสของไพรเมอร์ ที่ใช้ในเทคนิค HAT-RAPD กับเนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆ ของลำไย

รายชื่อ primers	Sequence 5' - 3'
1. OPAT 05	ACA CCT GCC A
2. OPG 13	CTC TCC GCC A
3. OPH 13	GAC GCC ACA C

2.1.2.2 องค์ประกอบในปฏิกริยา PCR

ใส่สารละลายปริมาตร 20 μ l. ลงใน eppendorf tube ขนาด 0.2 ml. ซึ่งประกอบด้วย 1x reaction buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.8, 50 mM KCl, 0.1% TritonX-100), 2 mM $MgCl_2$, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) อย่างละ 200 μ M, ไพรเมอร์ 50-100 ng. Tag DNA polymerase 0.5 unit/reaction และดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA) 10-25 ng หลังจากนั้นนำ Multi Ultra PCR Tube ที่บรรจุสารละลายใส่ในเครื่อง PCR (Perkin Elmer ; Gene Amp PCR system 2400)

2.1.2.3 เงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR (PCR condition)

ปฏิกิริยา PCR คัดแปลงตามวิธีการของ Newton and Graham (1994) ตามสภาวะเงื่อนไขดังต่อไปนี้

94°C	2 min		
94°C	30 sec	}	30 รอบ
46°C	30 sec		
72°C	45 sec		
72°C	5 min		
4°C	α		

2.1.3 agarose gel electrophoresis

2.1.3.1 การเตรียมแผ่น agarose gel

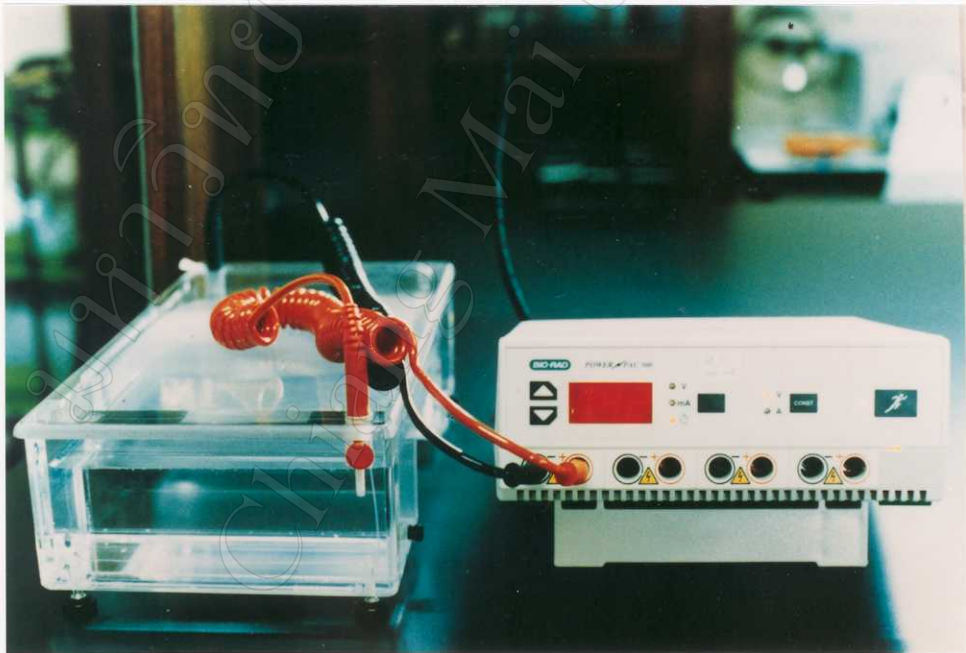
- เตรียม agarose ให้มีความเข้มข้น 2% โดยชั่ง agarose ผสมลงใน 1xTAE buffer ต้มจน agarose ละลาย
- ทำความสะอาด gel ขนาด 15x20 cm. และหัวเสียบ (comb) ให้สะอาดด้วย 70% ethyl alcohol แล้วใช้เทปพลาสติกปิดขอบลาดทั้ง 2 ด้าน
- วางหัวเสียบลงที่ปลายข้างหนึ่งของถาด gel เพื่อให้เกิดช่องเล็กๆ (well) และเมื่อ agarose แข็งตัว จะมีช่องสำหรับหยอดตัวอย่างสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบลงไป
- เท agarose ที่หลอมละลายแล้วลงในถาด gel ที่เตรียมไว้ โดยให้แผ่น agarose gel มีความหนาประมาณ 3-5 mm. ตั้งทิ้งไว้ให้แข็งตัว
- เมื่อ agarose gel แข็งตัวแล้ว ดึงหัวเสียบออก จากนั้นนำ TAE buffer มาเททับให้ agarose gel เปียกไว้ (soak gel) เพื่อป้องกันไม่ให้ไหม้แห้งเกินไปและสะดวกในการดึงหัวเสียบออกได้ง่าย

2.1.3.2 การวิเคราะห์โดย agarose gel electrophoresis

- นำแผ่น agarose gel ที่เตรียมไว้วางลงในอ่าง (tank) อิเล็กโทรโฟรีซิสโดยให้ด้านที่มีช่องสำหรับหยอดตัวอย่างอยู่ใกล้ขั้วลบ
- เท 1x TAE buffer ที่ผสม ethidium bromide จำนวน 1 µg /ml ลงในอ่างให้ท่วมแผ่น agarose gel (แผ่น agarose gel อยู่ใต้ TAE buffer ประมาณ 1-3 mm.) เพื่อให้สามารถมองเห็น

แถบดีเอ็นเอที่ติดสีของ ethidium bromide เมื่อนำแผ่น agarose gel ไปตรวจดูด้วยเครื่อง UV transilluminator

- ผสม loading buffer (ภาคผนวก) กับสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบให้เข้ากัน โดยใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลาย แล้วค่อยๆ หยดลงในช่องของ agarose gel ที่เตรียมไว้ก่อนแล้ว
- ปิดฝาอ่าง (lid) และต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยให้กระแสไฟฟ้าวิ่งจากขั้วลบไปหาขั้วบวก ใช้ความต่างศักย์ 60 v กระแสไฟฟ้า 150 mA ใช้เวลาปล่อยกระแสไฟฟ้า 3-4 ชั่วโมง หรือเมื่อสีของ loading buffer เคลื่อนที่ไปอยู่ที่ปลายของแผ่น agarose gel จึงปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
- นำแผ่น agarose gel ไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วย UV transilluminator พร้อมบันทึกภาพไว้



ภาพ 3 ชุดอุปกรณ์อิเล็กโทรโฟรีซิสชนิดแนวนอน

2.1.4 ปฏิบัติการ AFLP

2.1.4.1 การเลือกใช้ไพรเมอร์

ส่วนเลือกใช้ไพรเมอร์ ความยาว 19-21 nucleotide จากชุด AFLP™ Core Reagent Kit (GIBCO BRL™ LIFE TECHNOLOGIES, U.S.A.) จำนวน 4 คู่ไพรเมอร์

ตาราง 3 แสดงลำดับเบสของ adapter และคู่ไพรเมอร์ ที่ใช้ในปฏิบัติการ PCR I และ PCR II ของเทคนิค AFLP กับเนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆ ของลำไย

Sequence	
Digestion/Ligation	
<i>EcoR</i> I adapter	5'- CTCGTAGACTGCGTACC - 3' 3'- CATCTGACGCATGGTTAA - 5'
<i>Mse</i> I - adapter	5'- GACGATGAGTCCTGAG - 3' 3' - TACTCAGGACTCAT - 5'
Selective primers (+1) และ Amplified primers (+3)	
<i>EcoR</i> I primer	CORE ENZ EXT
<i>EcoR</i> I + 1	5'- GACTGCGTACC <u>AATTC</u> A - 3'
<i>EcoR</i> I + 3	E + AAG E + ACT E + AGG.
<i>Mse</i> I primer	CORE ENZ EXT
<i>Mse</i> I + 1	5'- GATGAGTCCTGAG <u>TAA</u> C - 3'
<i>Mse</i> I + 3	M + CAG M + CTA M + CTT

2.1.4.2 ขั้นตอนการวิเคราะห์ AFLP คัดแปลงตามวิธีการของ Vos *et al.*, (1995)

2.1.4.2.1 Digestion/Ligation genomic DNA

- การตัด genomic DNA ด้วย 2 restriction enzymes (AFLP Core Reagent Kit)

ใช้ genomic DNA ที่มีความเข้มข้น 60-100 ng. ปริมาตร 3 µl ตัดด้วย restriction enzymes คือ *EcoRI/MseI* (ที่มีความเข้มข้นของแต่ละ restriction enzymes ใช้ 1.25 units/µl. ซึ่ง

ผสมอยู่ใน 10mM Tris-HCl pH 7.5, 50mM NaCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT, 0.1 mg/ml BSA, 50%(v/v) glycerol, 0.1% Triton® X-100) ปริมาตร 0.5 µl, 5x reaction buffer (50mM Tris-HCl pH 7.5, 50mM Mg-acetate, 250mM K-acetate) ปริมาตร 1.25 µl, และ distilled water ปริมาตร 1.5 µl incubate ที่ 37°C ใช้เวลา 2-3 ชั่วโมงหรือจนกว่าจะตัดได้สมบูรณ์ นำมาตรวจสอบด้วยวิธีการ agarose gel electrophoresis แล้วหยุดการเกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70°C นาน 15 นาที

- การต่อเชื่อมด้วย adaptor

นำชิ้นส่วนที่ถูกตัดได้สมบูรณ์แล้วมาต่อเชื่อมกับ adapter ตามปฏิกิริยา โดยมีส่วนผสมคือ adapter/ligase solution (*EcoRI/MseI* adapters, 0.4mM ATP, 10mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM Mg-acetate, 50mM K-acetate) ปริมาตร 6 µl, *T₄* DNA ligase (1 unit/µl ซึ่งอยู่ในสารละลายที่มี 10mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM DTT, 50mM KCl, 50% glycerol (v/v)) ปริมาตร 0.5 µl, และสารละลายชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกตัดสมบูรณ์ทั้งหมด 6.25 µl นำไป incubate ที่ 20°C ± 2 เป็นเวลานาน 2-3 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำให้สารละลายเจือจาง 10 เท่า (v/v)

2.1.4.2.2 preselective amplified PCR หรือ PCR I

การเลือกคู่ไพรเมอร์ที่มีจำนวนเบสจำเพาะเจาะจงเพียงตำแหน่งเดียวในแต่ละปลายของ fragment (ซึ่งถูกตัดเป็นชิ้นเล็กๆ และมี adapter มาต่อเชื่อมแล้ว) โดยมีองค์ประกอบ คือ สารละลายของชิ้นส่วนที่ถูกตัดและต่อเชื่อมกับ adapter ทำให้เจือจางแล้วมาใช้ปริมาตร 2 µl, pre-amp primer mix 6 µl, 10x reaction buffer plus Mg (200mM Tris-HCl pH 8.4, 15mM MgCl₂, 500mM KCl) ปริมาตร 1 µl, distilled water 10.9 µl, และ *Taq* DNA polymerase ปริมาตร 0.1 µl (5 units/µl), หยด mineral oil ปิดทับสารละลายป้องกันการระเหย หลังจากนั้นนำ Multi Ultra PCR Tube ที่บรรจุสารละลายใส่ในเครื่อง PCR (Perkin Elmer ; Gene Amp PCR system 2400) หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้ว สารละลายที่ได้ทำให้เจือจาง 50 เท่า ก่อนนำไปทำปฏิกิริยา PCR II

2.1.4.2.3 selective amplified PCR หรือ PCR II

จาก preselective amplified PCR หรือ PCR I ต้องนำมาทำปฏิกิริยาอีกครั้งโดยสุ่มเลือกคู่ไพรเมอร์ที่มีเบสจำเพาะเจาะจงเพิ่มขึ้นเป็น 3 ตำแหน่ง โดยมีองค์ประกอบ คือ สารละลายจาก PCR I ที่เจือจางแล้วปริมาตร 2 µl, *EcoRI* primer (27.8 ng/µl) ปริมาตร 0.5 µl, *MseI* primer (6.7 ng/µl, dNTPs) ปริมาตร 2.25 µl, 10x reaction buffer (200mM Tris-HCl pH 8.4, 15mM MgCl₂, 500mM KCl) ปริมาตร 1 µl, distilled water 4.5 µl, และ *Taq* DNA polymerase ปริมาตร 0.05 µl (5 units/µl) หยด mineral oil ปิดทับสารละลายป้องกันการระเหย จากนั้นนำ Multi Ultra PCR Tube ที่บรรจุสารละลายใส่ในเครื่อง PCR (Perkin Elmer ; Gene Amp PCR

system 2400) หลังจากปฏิกิริยาสิ้นสุดแล้วก็นำมาผสมกับ DNA sequencing stop solution (98% formamide, 0.001% bromophenol blue, 0.001% xylene cyanol FF, 10mM EDTA pH 8.0) แล้วไปวิเคราะห์ด้วยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis ที่มีความเข้มข้น 4.5% ต่อหัวไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยให้กระแสไฟฟ้าวิ่งจากขั้วลบไปหาขั้วบวก ใช้ความต่างศักย์ 1200-1500 v กระแสไฟฟ้า 300 mA ใช้เวลาปล่อยกระแสไฟฟ้าประมาณ 1-2 ชั่วโมง หรือเมื่อสีของ DNA sequencing stop solution (formamide dye) เคลื่อนที่ไปอยู่ที่ปลายของแผ่น polyacrylamide gel จึงปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

2.1.4.3 เงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR (PCR condition)

ปฏิกิริยา selective PCR หรือ PCR I ตามเงื่อนไขดังต่อไปนี้

94°C	30 sec	}	30 รอบ
56°C	60 sec		
72°C	60 sec		
4°C	α		

ปฏิกิริยา amplified PCR หรือ PCR II ตามเงื่อนไขดังต่อไปนี้

94°C	30 sec	}	2 รอบ
65°C	30 sec		
72°C	60 sec		
94°C	30 sec	}	2 รอบ
64°C	30 sec		
72°C	60 sec		
94°C	30 sec	}	2 รอบ
63°C	30 sec		
72°C	60 sec		
94°C	30 sec	}	2 รอบ
62°C	30 sec		
72°C	60 sec		

94°C	30 sec	}	2 รอบ
61°C	30 sec		
72°C	60 sec		
94°C	30 sec	}	2 รอบ
60°C	30 sec		
72°C	60 sec		
94°C	30 sec	}	2 รอบ
59°C	30 sec		
72°C	60 sec		
94°C	30 sec	}	2 รอบ
58°C	30 sec		
72°C	60 sec		
94°C	30 sec	}	2 รอบ
57°C	30 sec		
72°C	60 sec		
94°C	30 sec	}	25 รอบ
56°C	30 sec		
72°C	60 sec		
4°C	α		

2.1.5 polyacrylamide gel electrophoresis

2.1.5.1 การเตรียม polyacrylamide gel

- เตรียม polyacrylamide เข้มข้น 4.5% (ภาคผนวก) เตรียมกระจกทั้ง 2 ด้านล้างให้สะอาดและเช็ดให้แห้งโดยใช้กระดาษเช็ดกระจก (Kimwipes EX-L) แล้วเช็ดด้วย 70% ethanol alcohol อีกครั้ง ปล่อยให้แห้ง

- เช็ดกระจกด้าน IPC (Integral Plate/Chamber) ด้วยน้ำกลั่นเช็ดให้แห้ง หยดน้ำยาเคลือบกระจก (clear view) แล้วเช็ดให้ทั่ว ใช้สารเคลือบป้องกันไม่ให้เนื้อ gel มาติดกับกระจกด้านนี้ เก็บกระจกส่วนนี้ไว้ก่อนเพื่อป้องกันการปนเปื้อนกับสารละลายที่จะใช้กับกระจกอีกด้านหนึ่ง

- นำกระจกด้านที่จะให้ polyacrylamide gel ติดแน่น มาเช็ดด้วย 70% ethanol alcohol รอให้แห้ง จึงผสม bind silane ปริมาตร 1.5 μ l. กับ 95% ethanol alcohol ปริมาตร 1 ml เช็ดบนกระจกให้ทั่วๆ เช็ดซ้ำด้วย 70% ethanol alcohol อีก 2-3 รอบจนแน่ใจว่าทั่วทั้งแผ่นกระจก

- ประกบตัวกระจกทั้งสองโดยวาง spacers ไว้ตรงกลางระหว่างกระจกทั้ง 2 แผ่นที่ขอบทั้ง 2 ด้านของกระจก ประกบกระจกให้แน่นด้วยที่ขีดยึด เพื่อไม่ให้กระจกไม่เขยื้อนเวลาจับ

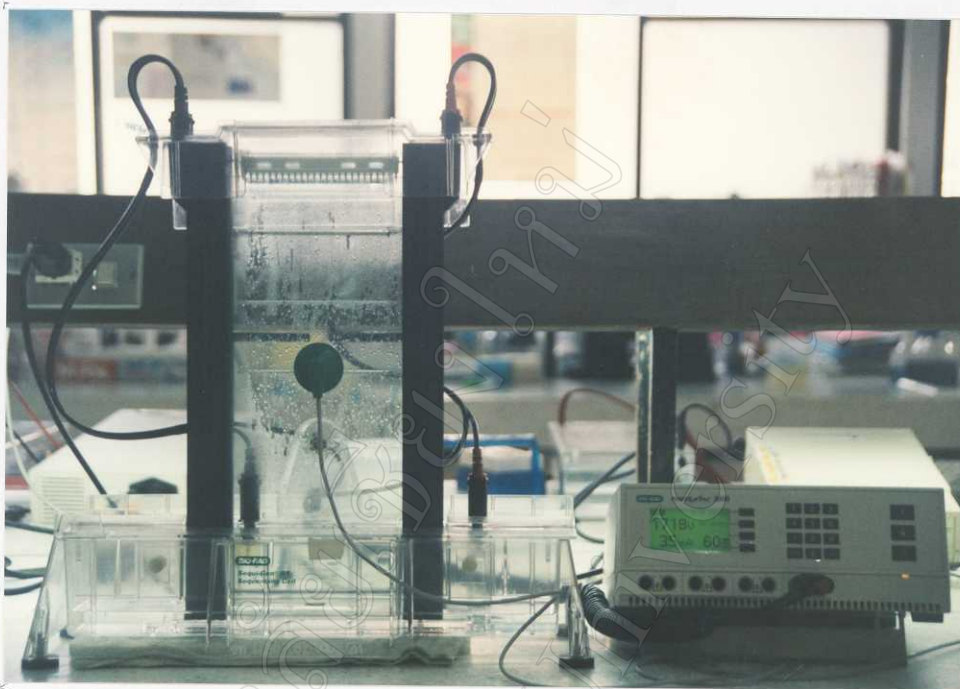
- นำ 4.5% polyacrylamide ปริมาตร 50 ml มาผสมกับ TEMED ปริมาตร 50 μ l. และเติม 10% APS ปริมาตร 300 μ l. ผสมให้เข้ากันแล้วเทในแนวระนาบ หรือใช้กระบอกฉีดสาร(syringe) ฉีดเข้าไปช้าๆ สอด comb ด้านเรียบเข้าไปในเนื้อ gel เพื่อให้เป็นช่องสำหรับหยอดตัวอย่าง ทั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 1-2 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปใช้

2.1.5.2 การ pre-run gel และการวิเคราะห์โดย gel electrophoresis

- นำชุดกระจกที่มี polyacrylamide gel แข็งตัวเรียบร้อยแล้วประกบกับตัวเครื่องอุปกรณ์ gel electrophoresis ชนิดแนวตั้ง เท 1xTBE buffer ลงใน Chamber ให้ท่วมระดับขอบกระจกที่ประกบกัน ทั้งไว้สักครู่ให้ buffer ซึมลงในเนื้อ gel แล้วถอด comb ออก ถ้างอเศษชิ้นส่วนของ gel ออกจากช่องทำให้หยอดตัวอย่างได้ง่ายขึ้น

- ต่อขั้วสายไฟและปรับอุณหภูมิเป็น 50°C โดยใช้กระแสไฟ 50 watt นานประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้น denaturation ดีเอ็นเอ ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 3 นาที เตรียมเพื่อหยอดตัวอย่าง

- หยอดตัวอย่างลงในช่อง เมื่อหยอดจนครบทุกตัวอย่างแล้วต่อขั้วไฟฟ้าเพื่อให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ไปใน polyacrylamide gel จนสีแรกเคลื่อนไปจนสุดความยาวกระจก จึงปิดเครื่องส่งกระแสไฟฟ้า (power supply)



ภาพ 4 อุปกรณ์อิเล็กโทรโฟรีซิสชนิดแนวตั้ง

2.1.6 การย้อมด้วย silver nitrate

- หลังจากปิดเครื่องส่งกระแสไฟฟ้าเสร็จแกะกระบอกที่ประกอบออกจากกัน อย่าให้เนื้อ gel ถีดยออกจากกัน แล้วนำแผ่นกระบอกที่มี gel ติดอยู่ มาใส่ใน fixer solution (ภาคผนวก) พร้อมเขย่าเบาๆ ประมาณ 20 นาที ต่อจากนั้นล้าง DNA sequencing stop solution และตะกอนของ urea ออก ต่อจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆ ละ 2 นาที เพื่อล้าง acetic acid ออกให้หมด
- นำกระบอกที่มี gel ติดอยู่มาลงแช่ใน silver staining solution นาน 30 นาที แล้วนำไปล้างผ่านน้ำไม่เกิน 10 วินาที จากนั้นนำไปแช่ใน developer solution เขย่าจนแถบดีเอ็นเอปรากฏให้เห็นชัดเจน แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการเทผสม fixer solution กับ developer solution ที่เขย่าอยู่ก่อนแช่นาน 2-5 นาที เทออก แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นเขย่าให้ทั่วถึงใช้เวลาอย่างน้อย 5 นาที
- ปลอຍให้ gel แห้ง บันทึกภาพไว้

2.1.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

ตรวจสอบความแตกต่างของแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบระหว่างแต่ละเนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆ ได้แก่ ใบอ่อน เปลือกผล เนื้อ และเมล็ด ทั้งเทคนิค HAT-RAPD และ AFLP

2.2 การเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอในลำไย 9 พันธุ์ ระหว่างเทคนิค HAT-RAPD และ AFLP

การทดลองนี้เป็นการเปรียบเทียบแถบลายพิมพ์ดีเอ็นเอในลำไย 9 พันธุ์ โดยมีขั้นตอนการปฏิบัติดังต่อไปนี้

2.2.1 การเตรียมดีเอ็นเอ

2.2.1.1 การเตรียมตัวอย่างพืชทดลอง

นำใบอ่อนของลำไยทั้ง 9 พันธุ์มาบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลวด้วยโกร่ง จากนั้นห่อด้วย aluminium foil แล้วนำไปเก็บในตู้แช่ -20°C เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอต่อไป

2.2.1.2 การสกัดดีเอ็นเอ

วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อเฉพาะส่วนใบอ่อนของลำไย 9 พันธุ์ โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Doyle and Doyle (1990) มีวิธีการดังต่อไปนี้

- นำตัวอย่างใบลำไยที่บดละเอียดประมาณ 0.1 g ใส่ในหลอด eppendorf ขนาด 1.5 ml. เติม extraction buffer [4% (w/v) CTAB, 1% (w/v) PVPP, 100mM Tris-HCl pH8.0, 20mM EDTA, 1.4M NaCl, 0.1% (v/v) 2-mercaptoethanol] ปริมาตร 400 μl . ผสมกันโดยใช้ vortex แล้วนำไป incubate ใน water bath ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 60 นาที
- นำไป centrifuge 12,000 rpm. ใช้เวลา 5 นาที ดูดเอาส่วนใสใส่หลอด eppendorf ใหม่
- สกัดด้วย chloroform : isoamyl alcohol (24:1) เพื่อให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ขึ้นโดยเติม chloroform : isoamyl alcohol 1 เท่า (v/v) ลงในสารละลาย ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปกลับมามากๆ แล้วนำไป centrifuge 12,000 rpm. ใช้เวลา 5 นาที แล้วดูดเอา supernatant ใส่หลอดใหม่ ขั้นตอนนี้ให้สกัดด้วย chloroform : isoamyl alcohol อีกรอบจนได้สารละลายใส
- ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol 1 เท่า (v/v) ที่อุณหภูมิ -70°C ใช้เวลา 2 ชั่วโมง หรือ -20°C เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง หรือข้ามคืน
- นำไป centrifuge 12,000 rpm. เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายด้านบนทิ้งให้เหลือเฉพาะตะกอนดีเอ็นเอ ล้างตะกอนดีเอ็นเอ ด้วย 70% ethyl alcohol แล้วนำมาผึ่งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องโดยคว่ำหลอด eppendorf วางบนกระดาษทิชชู
- ละลายตะกอนดีเอ็นเอ ด้วยน้ำกลั่นที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 100 μl . เขย่าเบาๆ ให้ตะกอนละลายหมดแล้วเติม RNase ONE™ ribonuclease จำนวน 5 units/หลอด นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง หรือข้ามคืน

- สกัดด้วย phenol เพื่อให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ขึ้น โดยเติม phenol 1 เท่า (v/v) ลงในหลอดที่มีสารละลายดีเอ็นเออยู่ ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปกลับมาเบาๆ แล้วนำไป centrifuge 12,000 rpm. ใช้เวลา 5 นาที ดูดเอา supernatant ใส่หลอดใหม่ ขั้นตอนนี้ให้สกัดด้วย phenol จนได้สารละลายใส
- สกัด phenol ออกด้วย chloroform โดยเติม chloroform 1 เท่า (v/v) ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปกลับมาเบาๆ แล้วนำไป centrifuge 12,000 rpm. เป็นเวลา 5 นาที ดูดเอา supernatant ออกมาใส่หลอดใหม่
- ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol 1 เท่า (v/v) ที่อุณหภูมิ -70°C ใช้เวลา 2-3 ชั่วโมง หรือ -20°C เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง หรือข้ามคืน
- นำไป centrifuge 12,000 rpm. เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethyl alcohol จากนั้นผึ่งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 20 μl . นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2.2.1.3 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอที่สกัดได้นำมาตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธี agarose gel electrophoresis (อาภัสสร, 2537) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาวัดปริมาณความเข้มข้นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวช่วงคลื่น 260 นาโนเมตร (nm.) คำนวณหาความเข้มข้นและปรับเจือจางให้ได้ปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมกับการทำการทดลองต่อไป

2.2.2 ปฏิกริยา PCR ของเทคนิค HAT-RAPD มีขั้นตอนการปฏิบัติเหมือนกับ ข้อ 2.1.2 โดยในข้อ 2.1.2.1 มีการเลือกใช้ 6 ไพรมเมอร์ (ตาราง 3) นำมาใช้ในการวิเคราะห์ลำไย 9 พันธุ์

ตาราง 4 แสดงรายชื่อ และลำดับเบสของไพรมเมอร์ ที่ใช้ในเทคนิค HAT – RAPD กับลำไย 9 พันธุ์

รายชื่อ primers	Sequence 5' - 3'
1. OPAK 10	CAA GCG TCA C
2. OPAK 14	CTG TCA TGC C
3. OPAS 10	CCC GTC TAC C
4. OPD 20	ACC CGG TCA C
5. OPG 13	CTC TCC GCC A
6. OPH 13	GAC GCC ACA C

ปฏิกิริยา PCR ของเทคนิค AFLP มีขั้นตอนการปฏิบัติเหมือนกับข้อ 2.1.4 โดยมีข้อย่อย 2.1.4.1 ของการเลือกใช้ 1 คู่ไพรเมอร์ (ตาราง 4) นำมาใช้ในการวิเคราะห์ลำไย 9 พันธุ์

ตาราง 5 แสดงลำดับเบสของ adapter และคู่ไพรเมอร์ ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR I และ PCR II ของเทคนิค AFLP

Sequence	
Digestion/Ligation	
<i>EcoR</i> I adapter	5'- CTCGTAGACTGCGTACC - 3' 3'- CATCTGACGCATGGTTAA - 5'
<i>Mse</i> I - adapter	5'- GACGATGAGTCCTGAG - 3' 3' - TACTCAGGACTCAT - 5'
Selective primers (+1) และ Amplified primers (+3)	
<i>EcoR</i> I primer	CORE ENZ EXT
<i>EcoR</i> I + 1	5'- GACTGCGTACC <u>AATTC</u> A - 3'
<i>EcoR</i> I + 3	E + ACT
<i>Mse</i> I primer	CORE ENZ EXT
<i>Mse</i> I + 1	5'- GATGAGTCCTGAG <u>TAA</u> C - 3'
<i>Mse</i> I + 3	M + CAT

ปฏิกิริยา PCR ของทั้ง 2 เทคนิค หลังจากเลือกใช้ไพรเมอร์ และปฏิบัติตามขั้นตอนของข้อ 2.1.2 ถึงข้อ 2.1.6

2.2.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

2.2.3.1 เปรียบเทียบแต่ละแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ และในแต่ละพันธุ์ของลำไย โดยนำมาเปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐานของ marker

2.2.3.2 ตรวจสอบตำแหน่งของการปรากฏแถบดีเอ็นเอ และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลำไยแต่ละพันธุ์ ซึ่งการบันทึกผลจะใช้ระบบตัวเลข คือการปรากฏแถบดีเอ็นเอให้สัญลักษณ์เป็น 1 และถ้าไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอให้สัญลักษณ์เป็น 0 โดยทำการบันทึกทุกตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอ ในแต่ละไพรเมอร์ที่ใช้ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ใกล้ชิดระหว่างลำไยแต่ละพันธุ์ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS โดยวิเคราะห์ด้วย cluster analysis และแสดงความสัมพันธ์ลำไยด้วยวิธี UPGMA เพื่อเสนอเป็น dendrogram

2.3 การศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของลำไย 20 พันธุ์ ด้วยเทคนิค HAT-RAPD โดยมีขั้นตอนการปฏิบัติเหมือนกับข้อ 2.2 โดยปฏิกิริยา PCR ของเทคนิค HAT-RAPD มีขั้นตอนการปฏิบัติเหมือนกับ ข้อ 2.1.2 โดยในข้อ 2.1.2.1 มีการเลือกใช้ 10 ไพรมเมอร์ (ตาราง 6) บันทึกภาพเก็บไว้ และการวิเคราะห์ข้อมูลเหมือนกับข้อ 2.2.3

ตาราง 6 แสดงรายชื่อ และลำดับเบสของไพรมเมอร์ ที่ใช้ในเทคนิค HAT-RAPD กับลำไย 20 พันธุ์

รายชื่อ primers	Sequence 5' - 3'
1. OPA 13	CAG CAC CCA C
2. OPAK 10	CAA GCG TCA C
3. OPB 18	CCA CAG CAG T
4. OPG 13	CTC TCC GCC A
5. OPT 15	GGA TGC CAC T
6. OPW 06	CTG GGC ACG A
7. OPW 09	CAG ACA AGC C
8. OPX 01	CTG GGC ACG A
9. OPX 15	CAG ACA AGC C
10. OPZ 01	TCT GTG CCA C

3. สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการอนุชีวโมเลกุล ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย
เชียงใหม่

ศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย จังหวัดเชียงราย กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตร
และสหกรณ์

สถานีวิจัยพืชสวนห้างฉัตร จังหวัดลำปาง กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตร
และสหกรณ์

4. ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

มีนาคม 2542 - สิงหาคม 2544