

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การวิจัยครั้งนี้ใช้พืชทดลองคือ สตรอเบอร์รี่ จำนวน 10 สายพันธุ์ ซึ่งรวบรวมไว้ในสภาพปลอดเชื้อโดยศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางด้านพืชมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ดังนี้

1. Tioga
2. Selva
3. Seascape
4. Nyoho
5. Toyonoka
6. Questa
7. Cramarosa
8. พันธุ์พระราชทาน 50
9. พันธุ์ป่าผลสีแดง
10. พันธุ์ป่าผลสีเหลือง

การสกัดดีเอ็นเอของสตรอเบอร์รี่

นำใบอ่อนของสตรอเบอร์รี่ทั้ง 10 สายพันธุ์ มาทำการสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีของ Uta and Schubert (1993) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กับการสกัดดีเอ็นเอในพืชที่มี phenolic compound สะสมอยู่ในปริมาณมาก นำใบอ่อนของพืชทดลองมาล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาดแล้วเช็ดให้แห้ง ชั่งน้ำหนักใบมา 100 mg ใส่ลงในโถงแช่เย็นจัด เติมนิโตรเจนเหลว บดจนละเอียดเป็นผง เมื่อตัวอย่างเริ่มละลาย เติมห extraction buffer (ดูรายละเอียดจากภาคผนวก) ลงไป 600 μ l บดต่อไปจนตัวอย่างละลาย เติมห 20% PVP 180 μ l และ ผง 2% SDS 8 mg คนของเหลวให้เข้ากันดี เทสารของเหลวที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml และเติมห Rnase 3 μ l ลงในหลอด ปิดฝาเขย่าหลอดทดลองกลับปามาเบาๆ นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการเขย่าหลอดทุก 5 นาที เติมห 5 M KAC 1/10 เท่า ของปริมาตรของเหลว กลับหลอดมาให้เข้ากัน นำไปปั่นในน้ำแข็งประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นปั่นด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ค่อยๆ ดูดสารละลายใส่ลงในหลอดทดลองใหม่ เติมห

isopropanol 0.6 เท่าของปริมาณของเหลวแล้วกลับหลอดไปมาเบาๆ 3 ครั้ง แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทิ้งให้ตกตะกอนข้ามคืน จากนั้นนำไปปั่นด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol 500 μ l เขย่าหลอดเบาๆ นำไปปั่นด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วเท ethanol ทิ้ง ผึ่งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งแล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer 500 μ l พยายามละลายตะกอนให้หมด จากนั้นสกัดดีเอ็นเอซ้ำอีกครั้งด้วย phenol-chloroform-isoamylalcohol (25 : 24 : 1) ปริมาตร 1 เท่าของสารละลาย ดีเอ็นเอเขย่าแรงๆ ให้ของเหลวเข้ากัน นำไปปั่นด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แยกส่วนที่เป็นของเหลวใส่หลอดทดลองใหม่ เติมนิโซโพรพานอล ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรของเหลวใส่หลอดทดลองใหม่ กลับหลอดไปมาเบาๆ นำไปปั่นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทิ้งให้ตกตะกอนข้ามคืน จากนั้นนำไปปั่นด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง เติมนิโซโพรพานอล 500 μ l เขย่าหลอดเบาๆ แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วเท ethanol ทิ้ง ผึ่งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง ละลายตะกอนด้วย TE buffer ตามปริมาณตะกอนที่ได้ แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การตกตะกอนดีเอ็นเอเพื่อกำจัด Polysaccharide ที่ปนมากับดีเอ็นเอตามวิธีของ Graham *et al.* (1996)

ละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วย TE buffer ปริมาณ 100 μ l แล้วเติมนิโซโพรพานอล 25 μ l กลับหลอดไปมาเบาๆ นำไปปั่นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปปั่นด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml แล้วนำมาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย ethanol 99 % จำนวน 1 เท่าของสารละลาย ประมาณ 125 μ l นำไปปั่นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ทิ้งให้ตกตะกอนข้ามคืน แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเท ethanol ทิ้ง เติมนิโซโพรพานอล 500 μ l เขย่าหลอดเบาๆ แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ทำซ้ำอีกครั้งหนึ่งแล้วผึ่งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ ด้วยการทำ agarose gel และอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ชุด

Mupid

เตรียมถาดสำหรับเทเจลในแนวราบพร้อมเสียบหัวให้เรียบร้อยแล้วซึ่งผง Electrophoresis Purity Reagent Agarose 0.8 กรัม เติม running buffer (1x TBE buffer) 100 ml หลอมเจลให้ละลายแล้วค่อยๆ เทลงบนถาดที่เตรียมไว้ให้เจลหนาประมาณ 5 ml ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้แข็งตัว เมื่อเจลแข็งแล้วดึงหัวออก จากนั้นดึงถาดที่ใส่เจลขึ้นมา นำเศษเจลที่ติดอยู่ทิ้งให้หมด นำเจลใส่ลงในเครื่อง Mupid แล้วเติม 1x TBE buffer ให้ท่วมเจลโดยให้สูงกว่าผิวเจลประมาณ 2-3 ml นำดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัด ผสมกับ loading buffer ในอัตราส่วน 2 : 1 ผสมให้เข้ากันแล้วหยอดลงในช่องว่างของเจลที่แช่อยู่ใน 1x TBE buffer ปิดฝาครอบแล้วเปิดสวิทช์ของเครื่อง Mupid โดยใช้กระแสไฟ 100 โวลต์ จนเมื่อแถบสีที่ผสมอยู่ใน loading buffer ห่างจากขอบล่างประมาณ 1 เซนติเมตร ปิดสวิทช์ แล้วนำเจลมาแช่ไว้ในสารละลาย ethidium bromide เขย่าด้วย shaker เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำเจลไปส่องดูภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง Foto/Analysis Visionary (Gel Scanner) พร้อมกับบันทึกภาพด้วย UPP - 1105 High Quality Printing Paper Type 1 (Normal)

การตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้

ผสมดีเอ็นเอที่สกัดได้ 2 μ l กับ TE buffer 48 μ l ให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 260 nm แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ตามสมการนี้ (ตามวิธีของ Farrell, 1993)

$$[\text{DNA}] \mu\text{g/ml} = \text{Abs } 260 \times \text{dilution} \times 50$$

$$(\text{dilution} = \text{dilution factor})$$

การจำแนกกลุ่มของสโตรเบอร์โดยวิธี RAPD

หลังจากสกัดดีเอ็นเอของสโตรเบอร์และตรวจวัดคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่ได้แล้ว ให้ปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอตัวอย่าง โดยใช้ TE buffer ให้ได้ความเข้มข้น 25 ng/ μ l เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทำ RAPD ซึ่งแบ่งเป็น 3 การทดลอง คือ

1. ใช้ primers เดียว 4 ชนิด คือ A13 B07 B14 และ C06
2. ใช้ primers 2 ชนิด คือ C06 + A13
C06 + B07
C06 + B14

3. ใช้ primers 3 ชนิด คือ C06 + B07 + B14

C06 + A13 + B14

C06 + A13 + B07

primers ดังกล่าวมี ลำดับของนิวคลีโอไทด์ดังต่อไปนี้

ชนิดของ primer	ลำดับของนิวคลีโอไทด์
A13	5' – CAGCACCCAC – 3'
B07	5' – GGTGACGCAG – 3'
B14	5' – TCCGCTCTGG – 3'
C06	5' – GAACGGACTC – 3'

การทำ RAPD

นำ primer และดีเอ็นเอที่สกัดได้ ออกจากอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาไว้ในน้ำแข็ง เพื่อให้สารดังกล่าวที่แข็งตัวเกิดการละลาย เตรียม Multi Ultra tubes ขนาด 200 µl ทำเครื่องหมายให้เรียบร้อย ใส่ PCR Beads (amersham pharmacia biotech) จำนวน 1 reaction (Taq DNA Polymerase 1.5 unit, 10 mM Tris – HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl, 200 µM of each dNTP) ลงใน Multi Ultra tube และส่วนประกอบอื่นๆ ของปฏิกิริยา PCR ตามแต่ละการทดลองดังนี้

การทดลองที่ 1 เติมน้ำกลั่น 2 ครั้งที่ผ่านมาเชื้อแล้ว	23	µl
Primers	1	µl
ดีเอ็นเอตัวอย่าง	1	µl
การทดลองที่ 2 เติมน้ำกลั่น 2 ครั้งที่ผ่านมาเชื้อแล้ว	22	µl
Primers	1	µl
ดีเอ็นเอตัวอย่าง	1	µl
การทดลองที่ 3 เติมน้ำกลั่น 2 ครั้งที่ผ่านมาเชื้อแล้ว	22.5	µl
Primers	0.5	µl
ดีเอ็นเอตัวอย่าง	1	µl

ผสมสารให้เข้ากันโดยใช้วิธีคิดเบาๆ แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 วินาที นำไปทำปฏิกิริยา PCR ด้วย Gene Amp PCR Systems 9600 (Perkin Elmer) โดยใช้อุณหภูมิและเวลาดังต่อไปนี้

1.	94 องศาเซลเซียส	5.00	นาที	} 47 รอบ
2.	94 องศาเซลเซียส	1.00	นาที	
	40 องศาเซลเซียส	1.00	นาที	
	72 องศาเซลเซียส	2.00	นาที	
3.	72 องศาเซลเซียส	5.00	นาที	

เมื่อทำ PCR เสร็จแล้วทำ PCR-product ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบผลโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้ Sub - Cell[®] Gt Agarose Gel Electrophoresis Systems (Bio - Rad)

ประกอบภาควัสดุสำหรับเทเจลและหัวเข้าด้วยกัน เตรียม agarose gel เข้มข้น 1.7 % โดยละลาย Ultra - pure DNA Grade Agarose 2.55 g ใน 1x TBE buffer 150 ml หลอมเจลโดยใช้ไมโครเวฟ เขย่าเป็นครั้งคราวให้เจลละลายจนหมด หลังจากนั้นนำมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องพร้อมกับเขย่าเบาๆ จนกระทั่งเย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 50 - 55 องศาเซลเซียส แล้วค่อยๆ เทลงในภาชนะที่เตรียมไว้ ให้เจลหนาประมาณ 5 ml เมื่อเจลแข็งตัวค่อยๆ ดึงหัวออก นำเจลใส่ลงใน Sub - Cell[®] Gt Agarose Gel Electrophoresis Systems เติมน้ำ 1x TBE buffer ให้สูงกว่าผิวเจลประมาณ 2 - 3 ml นำ EZ load 100 bp PCR Molecular Ruler (Bio - Rad) 5 µl ใส่ลงในช่องแรกและช่องสุดท้ายของแผ่นเจล แล้วผสม PCR-product 9 µl กับ 1 µl ของ Nucleic Acid Sample Loading gel 5x (Bio - Rad) ให้เข้ากัน นำไปหยดลงในช่องถัดไปของแผ่นเจล หลังจากนั้นปิดฝาครอบแล้วต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า เปิดสวิตช์ใช้กระแสที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ จนกระทั่งแถบสีที่ผสมอยู่ใน loading buffer ห่างจากขอบล่างประมาณ 1 นิ้ว แล้วจึงปิดเครื่อง นำเจลออกจากภาควัสดุใน 1x TBE buffer 500 ml ที่ผสม 50 µl ของ ethidium bromide เข้มข้น 10 mg/ml ประมาณ 3 ชั่วโมง โดยเขย่าด้วย shaker ตลอดเวลา นำเจลไปส่องดูภาพใต้แสงอัลตราไวโอเลต ด้วยเครื่อง Foto/Analysis Visionary (Gel Scanner) พร้อมกับบันทึกภาพด้วย UPP - 1105 High Quality Printing Paper Type 1 (Normal)

การบันทึกข้อมูล

บันทึกจำนวนของแถบสีอื่นที่ปรากฏทั้งหมด และบันทึกภาพลงในแผ่นดิสก์ เพื่อนำไปวิเคราะห์กลุ่มพืชด้วย Bio - Profile[®] Image Analysis Software โดยกำหนดค่า confidence = 3 ใช้ค่า Jaccard's coefficient of similarity และ Nei and Li (Dice)'s coefficient of similarity ในการจัดกลุ่มพืชเปรียบเทียบกันโดยใช้ค่าความแม่นยำ 97 %