บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองครั้งนี้แบ่งเป็น 5 การทดลอง โดยใช้พืชทดลองที่เป็นกล้วยไม้สกุลหวายชนิดเอื้องแซะที่รวบรวมมาจากแหล่งต่างๆ ในเขตจังหวัดแม่ฮ่องสอน ลำปาง และ เชียงใหม่ (ตารางที่ 1) และใช้กล้วยไม้สกุลหวายชนิดเอื้องเงินแดง และชนิดเอื้องแซะดอยปุย เป็นตัวเปรียบเทียบในการทดลองที่ 2 และ 4

ตารางที่ 1 จำนวนตัวอย่างของประชากรกล้วยไม้สกุลหวายชนิดเอื้องแซะที่นำมาจากแหล่งต่างๆในเขตจังหวัดแม่ฮ่องสอน ลำปาง และ เชียงใหม่

ประชากร	สัญลักษณ์	จำนวนตัวอย่าง	แหล่งที่เก็บ
เอื้องแซะจาก อ. แม่สะเรียง	MSR	8	ต. ขุนห้วยสิงห์ อ. แม่สะเรียง จ. แม่ฮ่องสอน
เอื้องแซะจาก อ. ปางมะผ้า	PMP	8	ต. แม่ตะนา อ. ปางมะผ้า จ. แม่ฮ่องสอน
เอื้องแซะจากดอยขุนตาล	KT	8	อุทยานแห่งชาติดอยขุนตาล ในเขต จ. ลำปาง
เอื้องแซะจาก อ. เชียงดาว	CD	8	อ. เชียงดาว จ. เชียงใหม่

การทดลองที่ 1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานของกล้วยไม้สกุลหวายชนิดเอื้องแซะ

นำแต่ละตัวอย่างที่จะศึกษามาปลูกลงในกระถางไม้ โดยใช้ออสมันดาและถ่านเป็นวัสดุปลูก จากนั้นนำมาเลี้ยงไว้ในโรงเรือนเพาะชำที่มีสภาพแวดล้อมเดียวกันเป็นเวลา 6 เดือน บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลักษณะลำลูกกล้วย ใบ และ ดอก และวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม SPSS for Window release 9.0

การทดลองที่ 2 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์

การสกัดเอนไซม์

นำใบที่สามจากปลายยอดของเอื้องเงินแดง เอื้องแซะดอยปุย และ เอื้องแซะ ที่เป็นตัวอย่างเดียวกับการทดลองที่ 1 มาทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นและเช็ดให้แห้ง ชั่งใบมา 0.1 กรัม หั่นเป็นชิ้นเล็กๆใส่ลงในโกร่งที่แช่เย็นจัด เติมไนโตรเจนเหลวแล้วบดตัวอย่างจนละเอียดเป็นผง (powder) จากนั้นเติม extraction buffer ตามสูตรของ Gottlieb, 1981 (อ้างโดย Kuntapanom and Smitamana, 1997) 1 มิลลิลิตร และ PMSF 100 ไมโครลิตร แล้วบดจนตัวอย่างละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เทสารของเหลวที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็วสูง 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวใสใส่หลอดทดลองอันใหม่ แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทำ polyacrylamide gel electrophoresis ต่อไป

การทำ polyacrylamide gel electrophoresis

ประกอบชุดแผ่นกระจกของ Mini- Protean® 3 Cell Electrophoresis (Bio-Rad) เข้าด้วยกัน จากนั้นเตรียมสารละลายของเจล 10 % สำหรับ separating gel (lower gel) และ 7% สำหรับ stacking gel (upper gel) โดยผสมสารดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ส่วนผสมสำหรับ stacking gel และ separating gel (Kuntapanom and Smitamana, 1997)

Stock solution	Stackinging gel (7%)	Separating gel (10%)
น้ำกลั่น	2.41 มิลลิลิตร	4.20 มิลลิลิตร
0.5 M Tris pH 6.8	0.59 มิลลิลิตร	1.20 มิลลิลิตร
acrylamide 30%	1.00 มิลลิลิตร	2.60 มิลลิลิตร
APS 10%	40 ไมโครลิตร	80 ไมโครลิตร
TEMED	4 ไมโครลิตร	8 ไมโครลิตร

นำสารละลาย separating gel และ stacking gel มาเทลงระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ตามลำดับ จากนั้นทำการต่อชุดอิเลคโตรโฟรีซีสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติม running buffer ลงใน chamber

แล้วหยอดตัวอย่างที่ผสมกับ bromophenol blue ในอัตราส่วน 15:1 ลงในช่องของ stacking gel 30 ไมโครลิตรต่อช่อง ระวังอย่าให้ตัวอย่างผสมปนกันในแต่ละช่อง ปิดฝาครอบแล้วต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า เปิดสวิทช์ดำเนินการผ่านกระแสโดยใช้ 15 มิลลิแอมแปร์ สำหรับ stacking gel และ 25 มิลลิแอมแปร์ สำหรับ separating gel ปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า เมื่อสีของ bromophenol blue เคลื่อนที่มาถึงปลายล่างของเจล จากนั้นนำแผ่นกระจกออกจาก chamber แล้วแกะเจลที่อยู่ระหว่างแผ่นกระจกออกมาวางบนจานแก้ว (plate) เพื่อย้อมสีเอนไซม์ต่อไป

การย้อมสีเอนไซม์ในเจล

นำเจลที่ได้มาย้อมด้วย staining solution ของไอโซไซม์ตามระบบเอนไซม์ 6 ชนิด คือ esterase (EST) glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) shikimate dehydrogenase (SKD) malate dehydrogenase (MDH) leucine aminopeptidase (LAP) และ glucose phosphate isomerase (GPI) (ดูรายละเอียดจากภาคผนวก)

การบันทึกข้อมูล

นำเจลที่ย้อมสีมาบันทึกค่าการเคลื่อนที่ของแถบสี คำนวณค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rm) บันทึกจำนวนและรูปแบบการเกิดแถบสี วาด schematic zymogarm บันทึกการมีและไม่มีแถบสีในตำแหน่งเดียวกัน จากนั้นแปลงค่าที่มีแถบสีเป็น 1 และค่าไม่มีแถบสีเป็น 0 นำมาวิเคราะห์กลุ่มพืช (cluster analysis) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS for Window release 9.0 โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันของ Jaccard (Jaccard ' s coefficient similarity)

ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (Rm) = ระยะการเคลื่อนที่ของแถบสี / ระยะการเคลื่อนที่ของ bromophenol blue

การทดลองที่ 3 การศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอของเอื้องแซะ

นำเอื้องแซะจาก อ. เชียงดาวทั้ง 8 ตัวอย่างมาเป็นพืชทดลอง จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการดังต่อไปนี้

วิธีที่ 1 modified CTAB method ตามวิธีการของ Knapp and Chandlee (1996)

นำใบอ่อนของพืชทดลองมาล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาดแล้วเช็ดให้แห้ง ชั่งน้ำหนักใบมา 50 มิลลิกรัม หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในโกร่งแช่เย็นจัด เติมไนโตรเจนเหลวบดจนละเอียดเป็นผง

เติม extraction buffer (ดูรายละเอียดจากภาคผนวก) ลงไป 300 ไมโครลิตร บดให้เข้ากันจนกลายเป็นของเหลว เทสารของเหลวใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการเขย่าทุก 5 นาที เติม 300 ไมโครลิตร ของ chloroform ลงไป เขย่าหลอดแรงๆ นำไปปั่นด้วยความเร็วสูง 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนที่เป็นของเหลวใสใส่หลอดทดลองใหม่ เติม 5% CTAB ปริมาตร 1/5 เท่าของปริมาตรของเหลวใส เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการเขย่าทุก 5 นาที เติม chloroform เท่ากับปริมาตรของสารผสม เขย่าแรงๆ นำไปปั่นที่ความเร็วและอุณหภูมิเท่าเดิม เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวใสลงในหลอดทดลองอันใหม่ เติม 7.5 M NH_4OAc 1/2 เท่าของปริมาตรของเหลว เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มในน้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที ค่อยๆ ดูดส่วนที่เป็นสารละลายใส ใส่ในหลอดทดลองใหม่ เติม 95% ethanol ปริมาตรเท่ากับของสารละลายใส แล้วนำไปไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ทิ้งให้ดีเอ็นเอตกตะกอนข้ามคืน จากนั้นนำไปปั่นด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง เติม 70% ethanol 500 ไมโครลิตร เขย่าหลอดเบาๆ แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ทำซ้ำอีกหนึ่งครั้ง แล้วผึ่งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

วิธีที่ 2 CTAB method ตามวิธีการของ Doyle and Doyle (อ้างโดย พรพันธ์, 2538)

นำใบอ่อนของพืชทดลองมาล้างด้วยน้ำกลั่นและเช็ดออกให้แห้ง ชั่งน้ำหนักใบมา 50 มิลลิกรัม หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในโกร่งแช่เย็นจัด เติมไนโตรเจนเหลว แล้วบดตัวอย่างจนละเอียดเป็นผงจึงเติม 2× CTAB buffer (ดูรายละเอียดภาคผนวก) 1 มิลลิลิตร ลงไปแล้วทำการบดจนกลายเป็นของเหลว จากนั้นเทลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทุกๆ 10 นาที เขย่าหลอดเบาๆ แล้วจึงนำไปเติม chloroform-isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1:1 ปิดฝาหลอดให้แน่นเขย่าแรงๆ ประมาณ 3 นาที จากนั้นนำไปปั่นด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 5 นาที ดูดสารละลายใสที่ได้ใส่ลงในหลอดทดลองอันใหม่ เติม isopropanol 600 ไมโครลิตร ปิดฝาให้แน่น แล้วกลับหลอดไปมา จะเห็นดีเอ็นเอเป็นเส้นๆ แขวนลอยอยู่ นำไปปั่นด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 5 นาที เทสารละลายออก จะพบดีเอ็นเอตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอดทดลอง ผึ่งดีเอ็นเอให้แห้ง เมื่อดีเอ็นเอแห้งแล้วเติม 75% ethanol + 10 mM ammonium acetate

1,000 ไมโครลิตร เขย่าหลอดเบาๆ หลายๆ ครั้ง และใช้นิ้วดีดเบาๆ เพื่อให้ดีเอ็นเอที่ตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอดเข้ากับสารละลาย หลังจากนั้นนำไปบ่มในน้ำแข็งประมาณ 30 นาที แล้วนำมาปั่นด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นเทสารละลายออกให้หมด แล้วผึ่งดีเอ็นเอให้แห้ง จึงเติม 75% ethanol 800 ไมโครลิตร เขย่าหลอดเบาๆ นำไปบ่มไว้ในน้ำแข็ง 30 นาที แล้วนำมาปั่นด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 3 นาที จากนั้นเทสารละลายออก แล้วคว่ำหลอดไว้กับตะแกรง ตั้งทิ้งไว้จนดีเอ็นเอแห้ง เติม TE buffer นำไปบ่มไว้ในน้ำแข็ง ดีดหลอดเบาๆ ทุกๆ 1 ชั่วโมง จนกว่าดีเอ็นเอจะละลายหมด จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

วิธีที่ 3 SDS extraction procedure ตามวิธีการของ Kuntapanom and Ikeda (1998)

นำใบอ่อนของพืชทดลองมาล้างด้วยน้ำกลั่นและเช็ดออกให้แห้ง ชั่งน้ำหนักใบ มา 50 มิลลิกรัม หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ในโกร่งแช่เย็นจัด เติมไน โตรเจนเหลวแล้วบดตัวอย่างให้ละเอียดเป็นผง เติม extraction buffer (ดูรายละเอียดจากภาคผนวก) ลงไป 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเทตัวอย่างที่ละลายเป็นของเหลวลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 15 นาที เขย่าหลอดเบาๆ ทุก 5 นาที เติม 200 ไมโครลิตรของ 3M sodium acetate (pH 5.2) แล้วเขย่าหลอดแรงๆ นำไปบ่มไว้ในน้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ค่อยๆ ดูดส่วนที่เป็นของเหลวที่ได้มาใส่ลงในหลอดทดลองใหม่ เติม isopropanol ปริมาตรเท่ากับของเหลว เขย่าหลอดทดลองเบาๆ แล้วนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง จะเห็นตะกอนติดอยู่ที่ก้นหลอด ล้างตะกอนด้วย 75% ethanol 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ค่อยๆ รินส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง ผึ่งตะกอนให้แห้งในอากาศ ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 100 ไมโครลิตร เมื่อตะกอนละลายหมดแล้วเติม 67 ไมโครลิตรของ 5 M NaCl และ 2 เท่าของ 99% ethanol ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ในน้ำแข็ง 10 นาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทสารละลายทิ้งแล้วผึ่งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง เติม TE buffer นำไปบ่มในน้ำแข็ง รอจนกว่าดีเอ็นเอจะละลายหมด แล้วจึงนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

การทำ agarose gel และ อิเลคโตรโฟรีซีสโดยใช้ชุด Mupid

เตรียมถาดสำหรับเทเจลในแนวราบพร้อมกับเสียบหวีให้เรียบร้อย จากนั้นชั่งผง Electrophoresis Purity Reagent Agarose 0.8 กรัม เติม running buffer (1×TBE buffer) 100 มิลลิลิตร หลอมเจลให้ละลายแล้วค่อยๆเทลงบนถาดที่เตรียมไว้ให้เจลหนาประมาณ 5 มิลลิเมตร ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้เจลแข็งตัว เมื่อเจลแข็งแล้วดึงหวีออก จากนั้นดึงถาดที่ใส่เจลขึ้นมานำเศษเจลที่ติดอยู่ทิ้งให้หมด นำเจลใส่ลงในเครื่อง Mupid แล้วเติม 1×TBE buffer ให้ท่วมเจลโดยให้สูงกว่าผิวเจลประมาณ 2-3 มิลลิเมตร นำดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดทั้ง 3 วิธี ผสมกับ loading buffer ในอัตราส่วน 2:1 ผสมให้เข้ากัน แล้วหยอดลงในช่องว่างของเจลที่แช่อยู่ใน 1×TBE buffer ปิดฝาครอบแล้วเปิดสวิทช์ของเครื่อง Mupid โดยใช้กระแสไฟ 100 โวลต์ จนกระทั่งแถบสีที่ผสมอยู่ใน loading buffer ห่างจากขอบล่างประมาณ 1 เซนติเมตร ปิดสวิทช์ แล้วนำเจลมาแช่ไว้ในสารละลาย ethidium bromide เขย่าด้วย shaker เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำเจลไปส่องดูภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง Foto/Analysis Visionary (Gel Scanner) พร้อมกับบันทึกภาพด้วย UPP- 110S High Quality Printing Paper TypeI (Normal)

การวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยใช้ DU® Serries 7000 (Dioode array spectrophotometer, Beckman)

ผสมดีเอ็นเอที่สกัดได้ 5 ไมโครลิตร กับ TE buffer 995 ไมโครลิตร ให้เข้ากันจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ช่วงคลื่น 260 280 และ 320 นาโนเมตร และวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม SPSS for Window release 9.0

การทดลองที่ 4 การแยกกลุ่มของเอื้องแซะโดยวิธี RAPD

ทำการสกัดดีเอ็นเอของพืชทดลองที่เป็นตัวอย่างเดียวกับการทดลองที่ 2 โดยใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอที่ได้จากการทดลองที่ 3 และ ปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอตัวอย่างโดยใช้น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ 5 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทำ RAPD ด้วย primers 8 ชนิด คือ primer C07 C08 C21 C22 C43 C44 C48 และ C51 ที่มีลำดับของนิวคลีโอไทด์ดังต่อไปนี้

ชนิดของ primer	ลำดับของนิวคลีโอไทด์
C07	5′- CTC AAG CGT ACA-3′
C08	5′-GGC AGA TAT CAT-3′
C21	5′-GGA GAG CGG ACG-3′
C22	5′-GGT CAC CGG TCC-3′
C43	5′-GGC GGC ACA GGA-3′
C44	5′-CGC AGC CGA GAT-3′
C48	5′-GGA GGA TGG CCC -3′
C51	5′-ATC AAC GTA CGT-3′

การทำ RAPD

นำ Ampli Taq® DNA Polymerase (10× PCR buffer 10 mM dNTP และ Taq DNA polymerase, Perkin Elmer) primer และ ดีเอ็นเอที่สกัดได้ ออกจากอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส มาไว้ในน้ำแข็งเพื่อให้สารดังกล่าวที่แข็งตัวเกิดการละลาย เตรียม Multi Ultra tubes ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ทำเครื่องหมายให้เรียบร้อยใส่น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 6.6 ไมโครลิตร primer 0.5 ไมโครลิตร และ ดีเอ็นเอตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร ลงที่ก้นหลอด ปิดฝาให้แน่น นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นผสมส่วนประกอบ (master mix) ของ Ampli Taq® DNA Polymerase ในหลอดทดลอง ตามลำดับดังต่อไปนี้

10× PCR buffer	(1 × จำนวนตัวอย่าง) ไมโครลิตร
10 mM dNTP	(0.8 × จำนวนตัวอย่าง) ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase (5unit/μl)	(0.1 × จำนวนตัวอย่าง) ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันโดยใช้นิ้วดีดเบาๆ แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติมส่วนประกอบดังกล่าวปริมาตร 1.9 ไมโครลิตร ลงใน Multi Ultra tubes ที่เตรียมไว้ ปิดฝาหลอดให้แน่น ใช้นิ้วเคาะเบาๆ นำไปปั่นด้วยความเร็วรอบเท่าเดิม เป็นเวลา 1 นาที นำมาทำ PCR ด้วย GeneAmp PCR Systems 9600 (Perkin elmer) โดยใช้อุณหภูมิ และ เวลา ดังต่อไปนี้

1. 94 องศาเซลเซียส 5.00 นาที
2. 94 องศาเซลเซียส 60 วินาที
   38 องศาเซลเซียส 7 วินาที
   72 องศาเซลเซียส 70 วินาที
   } 2 รอบ

3. 92 องศาเซลเซียส 60 วินาที
   40 องศาเซลเซียส 7 วินาที
   72 องศาเซลเซียส 70 วินาที
   } 55 รอบ
4. 72 องศาเซลเซียส 5.00 นาที

เมื่อทำ PCR เสร็จแล้ว นำ PCR- product ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบผลโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีสโดยใช้ Sub - Cell® Gt Agarose Gel Electrophoresis Systems (Bio- Rad)

ประกอบถาดสำหรับเทเจลและหวีเข้าด้วยกัน เตรียม agarose gel เข้มข้น 1.5% โดยละลาย Ultra-pure DNA Grade Agarose 2.25 กรัม ใน 1×TBE buffer 150 มิลลิลิตร หลอมเจลโดยใช้ ไมโครเวฟ เขย่าเป็นครั้งคราว ให้เจลละลายจนหมด หลังจากนั้นนำมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องพร้อมกับเขย่าเบาๆ จนกระทั่งเย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส แล้วค่อยๆ เทลงในถาดที่เตรียมไว้ ให้เจลหนาประมาณ 5 มิลลิเมตร เมื่อเจลแข็งตัวค่อยๆ ดึงหวีออก นำเจลใส่ลงใน Sub - Cell® Gt Agarose Gel Electrophoresis Systems เติม 1×TBE buffer ให้สูงกว่าผิวเจลประมาณ 2-3 มิลลิเมตร นำ EZ Load 100 bp PCR Molecular Ruler (Bio- Rad) 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในช่องแรกของแผ่นเจล แล้วผสม PCR-product 9 ไมโครลิตร กับ 1 ไมโครลิตร ของ Nucleic Acid Sample Loading gel 5× (Bio – Rad) ให้เข้ากัน นำไปหยอดลงในช่องถัดไปของแผ่นเจล หลังจากนั้นปิดฝาครอบแล้วต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า เปิดสวิทช์ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ จนกระทั่งแถบสีที่ผสมอยู่ใน loading buffer ห่างจากขอบล่างประมาณ 1 นิ้ว แล้วจึงปิดเครื่อง นำเจลออกจากถาดมาย้อมใน 1×TBE buffer 500 มิลลิลิตร ที่ผสม 50 ไมโครลิตร ของ ethidium bromide เข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ประมาณ 3 ชั่วโมง โดยเขย่าด้วย shaker ตลอดเวลา นำเจลไปส่องดูภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต แล้วถ่ายภาพเก็บไว้เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3

การบันทึกข้อมูล

บันทึกจำนวนของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏทั้งหมด และบันทึกภาพลงในแผ่นดิสก์เพื่อนำไปวิเคราะห์กลุ่มพืชด้วย Bio-Profil® Image Analysis Software โดยกำหนดค่า % confidence = 5% และใช้ค่า Jaccard ' s coefficient similarity ในการจัดกลุ่มพืช

การทดลองที่ 5 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบไอโซไซม์กับลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

นำผลการวิเคราะห์กลุ่มพืชที่ได้จากการทดลองที่ 2 มาเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการทดลองที่ 4

สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางด้านพืช มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

ระหว่างเดือน มกราคม 2542 ถึง มกราคม 2543

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University