

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 ตัวอย่างที่นำมาศึกษา

เมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองที่ใช้ในการศึกษาคือ สายพันธุ์ GC2796 และพันธุ์เชียงใหม่ 60 โดยสายพันธุ์ GC2796 มีลักษณะที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ มีแหล่งที่มาจากศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักแห่งเอเชีย (AVRDC) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม ส่วนพันธุ์เชียงใหม่ 60 เป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่และเป็นพันธุ์มาตรฐานของทางราชการมีแหล่งที่มาจากศูนย์วิจัยพืชไร่ เชียงใหม่ อ. สันทราย จ. เชียงใหม่

3.1.2 สารเคมี

3.1.2.1 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบสำหรับสกัด DNA

1. ไนโตรเจนเหลว
2. Extraction buffer [100 mM Tris (Hydroxymethyl) –aminomethane pH 7.5 , 50 mM Ethylenediamine tetraacetic acid di-sodium salt (EDTA- di-sodium salt) pH 8.0 , 500 mM NaCl , 1.25% Sodium dodecyl sulphate (SDS) และ 10 mM 2-Mercaptoethanol]
3. 5 M Potassium acetate
4. Chloroform : octanol (24:1)
5. Isopropanol
6. Ethanol 65 , 70 , 85%
7. Chloroform : phenol (1:1)
8. 3 M Sodium acetate
9. RNase เติมขึ้น 10 mg/ml
10. TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5 และ 1 mM EDTA pH 8.0)

3.1.2.2 สารเคมีและเอนไซม์สำหรับการทำ RAPD

1. 10X PCR buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM Potassium chloride)

2. 50X Magnesium chloride
3. dNTPs
4. *Taq* DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies, Brazil)
5. Ultrapure water

3.1.2.3 สารเคมีสำหรับอิเล็กโตรโฟรีซิส

1. Agarose gel (Research organic, Inc., USA)
2. Tris-EDTA
3. Boric acid
4. HCl
5. NaOH
6. Loading dye (0.15% Bromophenol blue ใน 50% Glycerol)
7. 0.5 mg/ml Ethidium bromide
8. 1X TBE buffer (10.8 g Tris base, 5.5 g Boric acid, 4 ml 500 mM EDTA pH 8.0)

3.1.2.4 สารเคมีและเอนไซม์สำหรับการทำ AFLP

1. การตัด DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและการเชื่อมต่อ adapter
 - 10X reaction buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.5, 10 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl, 0.1 mg/ml BSA)
 - เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*
 - เอนไซม์ตัดจำเพาะ *MseI*
 - *EcoRI* adapter
 - *MseI* adapter
 - T_4 DNA ligase (Fermentas, USA.)
 - 10X T_4 ligation buffer (400 mM Tris-HCl, 100 mM $MgCl_2$, 100 mM DTT, 5 mM ATP pH 7.8) (Fermentas, USA.)
2. การทำ preselective amplification และ selective amplification
 - 10X PCR buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM Potassium chloride)
 - 50X Magnesium chloride
 - dNTPS

- *Taq* DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies, Brazil)
- Ultrapure water
- *Eco*RI primer+1, *Mse*I primer+1
- *Eco*RI primer+3, *Mse*I primer+3

3. สารเคมีสำหรับการเตรียม denaturing polyacrylamide gel

- Bind silane (Plusone)
- Repel silane (Plusone)
- Glacial acetic acid (Merck)
- 95% ethanol
- 30% acrylamide (19:1) (Plusone)
- 5X TBE buffer (54 g Tris base , 27.5 g Boric acid , 20 ml 500 mM EDTA pH 8.0)
- 7.5 M urea (USB)
- 10% APS (ammonium persulfate)
- TEMED (N,N,N,'N'-tetramethylenediamine)
- AFLP Loading buffer (98% formamide , 10 mM EDTA, 0.1% xlenecyanol, 0.1% bromphenol blue)
- Developper (2.5% sodium carbonate , 0.02% formaldehyde , 2 µg / ml sodium thiosulfate)
- Silver nitrate
- น้ำกลั่น

3.1.3 อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์

- 3.1.3.1 ตู้เย็นรุ่น MR-F31E (Mitsubishi)
- 3.1.3.2 ตู้แช่ -20 °C และ -80°C รุ่น SF-C69GR (Sanyo)
- 3.1.3.3 อ่างควบคุมอุณหภูมิ รุ่น WB 22 (Memmert)
- 3.1.3.4 เครื่องสังเคราะห์ DNA (PCR) รุ่น PCT-100TM (MJ Research, Inc.)
- 3.1.3.5 ชุด Horizontal electrophoresis (Hoefer)
- 3.1.3.6 ชุด Vertical electrophoresis รุ่น SEQ-2050 (SCIE-PLAS)

- 3.1.3.7 เครื่องถ่ายภาพ DNA (VIBER LOURMAT)
- 3.1.3.8 เครื่อง refrigerated centrifuge รุ่น Universal 32R (Hettich)
- 3.1.3.9 เครื่อง vortex รุ่น G560E (Genie)
- 3.1.3.10 เครื่อง spectrophotometer รุ่น Ultraspec (Amersham)
- 3.1.3.11 หม้อนึ่งความดัน รุ่น HVE 50 (Hirayama)
- 3.1.3.12 เครื่องซังสารทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น BP 221S (Satourius)
- 3.1.3.13 ไมโครปิเปตชนิดปรับปริมาณได้ (GILSON : P2, 20, 200, 1000, 5000)
- 3.1.3.14 หลอดใส่สารขนาดเล็กลักษณะ 15, 1.5, 0.5 และ 0.2 มิลลิลิตร
- 3.1.3.15 Hotplate stirrer รุ่น HS-101 (Gem)
- 3.1.3.16 โกร่งบดตัวอย่าง
- 3.1.3.17 ตู้อบลมร้อน (hot air oven) WTB binder รุ่น F115
- 3.1.3.18 ตู้เพาะ hotpack รุ่น 352602 และ WTB binder รุ่น VAP2
- 3.1.3.19 เครื่องแก้ว
- 3.1.3.20 อุปกรณ์อื่นๆ เช่น อุปกรณ์ที่ใช้ในการผสมพันธุ์พืช และอุปกรณ์เกี่ยวกับการปลูกพืชในแปลงทดลอง

3.2 สถานที่ดำเนินงานวิทยานิพนธ์

3.2.1 แปลงปลูกพืชทดลอง ศูนย์วิจัยข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติ อำเภอบางบาล จังหวัดนครราชสีมา

3.2.2 แปลงทดลองพืชไร่ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.2.3 ห้องปฏิบัติการโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.2.4 ห้องปฏิบัติการเมล็ดพันธุ์ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.2.5 ห้องปฏิบัติการภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

3.3 ระยะเวลาการดำเนินงาน

เดือนสิงหาคม 2546 – สิงหาคม 2548

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การสร้างประชากรชั่วที่ 2

สร้างประชากรชั่วที่ 2 โดยการผสมข้ามระหว่างสายพันธุ์ GC2796 ใช้เป็นสายพันธุ์พ่อมีลักษณะที่ต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่กับพันธุ์เชียงใหม่ 60 ใช้เป็นพันธุ์แม่ซึ่งเป็นพันธุ์การค้า แต่มีลักษณะที่อ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ได้ลูกผสมชั่วที่ 1 ทำการคัดเลือกลูกผสมชั่วที่ 1 ไปปลูกโดยการตรวจสอบความเป็นลูกผสมด้วยเทคนิค SSR โดยการสกัด DNA จากใบอ่อนของลูกผสมชั่วที่ 1 วิธีการสกัด DNA ได้ประยุกต์มาจาก Dellaporta *et al.* (1983) เมื่อนำลูกผสมชั่วที่ 1 ที่คัดเลือกได้ไปปลูกและปล่อยให้ผสมตัวเองจนได้เมล็ดชั่วที่ 2 เก็บเมล็ดชั่วที่ 2 แยกกันในแต่ละต้นและนำเมล็ดชั่วที่ 2 ไปปลูกต่อในแปลงทดลอง เพื่อดูลักษณะการกระจายตัว (segregation) ของประชากรชั่วที่ 2 เมื่อต้นถั่วเหลืองอายุ 21 วัน เก็บตัวอย่างใบอ่อนโดยเก็บแยกกันในแต่ละต้นและนำตัวอย่างใบที่ได้มาล้างทำความสะอาด ซับให้แห้งด้วยกระดาษ towel paper แล้วชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักประมาณ 1 g ใส่ถุงพลาสติกเก็บไว้ที่ตู้แช่ -80 °C เพื่อรอการสกัด DNA จากนั้นดูแลรักษาต้นถั่วเหลืองจนถึงระยะออกดอก ปล่อยให้ผสมตัวเองเมื่อถึงระยะสุกแก่ทางสรีรวิทยาทำการเก็บเกี่ยวเมล็ดชั่วที่ 3 จากประชากรชั่วที่ 2 โดยเก็บแบบแยกกันแต่ละต้น นำเมล็ดชั่วที่ 3 ไปทดสอบระดับความต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่เพื่อแบ่งกลุ่มประชากรชั่วที่ 2 ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ต้านทานและกลุ่มอ่อนแอต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ต่อไป

3.4.2 การทำให้เมล็ดพันธุ์เสื่อมคุณภาพ

ทำให้เมล็ดพันธุ์เสื่อมคุณภาพด้วยวิธี rapid aging ซึ่งเป็นสภาพที่สร้างขึ้นภายในตู้ โดยการนำเมล็ดจากประชากรชั่วที่ 2 จำนวน 25 เมล็ดต่อซ้ำ จำนวน 3 ซ้ำ ไปไว้ในตู้อุณหภูมิ 40°C ความชื้นสัมพัทธ์ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นนำเมล็ดไปทดสอบความงอกมาตรฐานตามวิธีของ ISTA (1985) โดยการเพาะเมล็ดจำนวน 25 เมล็ดต่อซ้ำ จำนวน 3 ซ้ำ บนกระดาษเพาะที่ชื้นด้วยน้ำกลั่นใช้วิธี between paper ที่อุณหภูมิ 25 °C ประเมินผลความงอกที่ 5 วัน และ 8 วันภายหลังการเพาะ นำข้อมูลที่ได้หาค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐานในแต่ละตัวอย่าง จากนั้นพิจารณาการแบ่งกลุ่มประชากรชั่วที่ 2 ออกเป็น 2 กลุ่ม โดยการสร้างกลุ่ม DNA จากข้อมูลทางฟีโนไทป์ที่ตรงกัน คือ กลุ่มที่มีลักษณะต้านทานต่อการเสื่อมคุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่ โดยมีค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐานมากกว่า 98 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มที่มีลักษณะอ่อนแอต่อการเสื่อม

คุณภาพของเมล็ดพันธุ์ในสภาพไร่มีค่าเฉลี่ยความงอกมาตรฐานน้อยกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกลุ่มที่มีความงอกมาตรฐานอยู่ระหว่าง 75-98 เปอร์เซ็นต์ไม่นำมาพิจารณาเพื่อลดการศึกษาประชากรที่มีขนาดใหญ่

3.4.3 การสกัด DNA โดยประยุกต์จาก Dellaporta *et al.* (1983) มีดังนี้

3.4.3.1 นำตัวอย่างใบอ่อนถั่วเหลืองประมาณ 1 g มาบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลวแล้วใส่ extraction buffer (65 °C) 5 ml ลงในโกร่งผสมให้เข้ากันแล้วตักใส่หลอด 1.5 ml จากนั้น ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C นาน 20 นาที

3.4.3.2 เติม 5 M potassium acetate 300 µl แล้วนำไปบ่มบนน้ำแข็งนาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม chloroform : octanol (24:1) 300 µl ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 15 นาที คัดเฉพาะสารละลายส่วนบนสุดใส่หลอดใหม่ขนาด 15 ml

3.4.3.3 เติม isopropanol ที่เย็นปริมาณเป็น 2 เท่าของสารละลายในหลอดเพื่อตกตะกอน DNA ผสมให้เข้ากัน แล้วทิ้งไว้ประมาณ 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C เก็ว DNA ด้วยแท่งแก้วปลายงอขนาดเล็ก ล้าง DNA ด้วย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ 1 ml แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอน โดยทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นฝัง DNA ให้แห้งแล้วละลายตะกอน DNA ใน TE buffer 200 µl

3.4.3.4 เติม chloroform : phenol (1:1) 400 µl ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที คัดสารละลายส่วนบนสุดใส่หลอดใหม่ขนาด 1.5 ml นำสารละลาย DNA จำนวน 200 µl มาเติมสารละลาย RNase ความเข้มข้น 10 mg/ml ปริมาตร 3 µl แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที หรือที่อุณหภูมิห้องนาน 60 นาที

3.4.3.5 เติม 3M sodium acetate 20 µl ผสมให้เข้ากันและเติม isopropanol ที่เย็นจัดปริมาณ 240 µl เพื่อตกตะกอน DNA แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C นาน 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 4 นาที ทิ้งส่วนที่เป็นสารละลายเก็บส่วนของ DNA ไปล้างด้วย ethanol 65 และ 85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ปริมาตรที่ใช้ 1 ml รอให้ตะกอน DNA แห้งแล้วตกตะกอนใน TE buffer ปริมาตร 50-200 µl ขึ้นอยู่กับปริมาณตะกอน DNA ที่ได้

3.4.4 การตรวจสอบคุณภาพและวัดความเข้มข้นของ DNA

3.4.4.1 วิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส ปฏิบัติดังนี้

เตรียม agarose ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TBE buffer หลอม agarose โดยใช้ไมโครเวฟให้ agarose ละลายจนหมด ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงจนอุณหภูมิเหลือประมาณ 50-55 °C แล้วจึงเทลงในถาดที่เตรียมไว้ เทเจลหนาประมาณ 5 มิลลิเมตร วางหวีลงในตำแหน่งที่กำหนด ปล่อยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเจลแข็งตัวแล้วค่อยๆ ดึงหวีออก นำเจลใส่ลงในเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส ใส่บัฟเฟอร์ให้สูงกว่าผิวเจล 2-3 มิลลิเมตร แล้วจึงเตรียมสารละลาย DNA

ปริมาณ 2 μl ต่อตัวอย่างผสมกับ dye 1 μl บนแผ่นพาราฟิน แล้วหยอดลงในช่องของแผ่นเจล จากนั้นต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้แรงดัน 100 โวลต์ ประมาณ 40 นาที นำเจลมาย้อมด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 $\mu\text{g/ml}$ นาน 15 นาที แล้วจึงล้าง ethidium bromide ส่วนเกินออก โดยเปิดน้ำไหลเบาๆ ประมาณ 5 นาที นำเจลไปตรวจสอบคุณภาพภายใต้แสง UV แล้วถ่ายภาพเก็บไว้ด้วยกล้องโพรลอคซ์

3.4.4.2 วิธีวัดการดูดกลืนแสง UV ปฏิบัติดังนี้

ตัวอย่าง DNA ที่ต้องการตรวจสอบปริมาณ 3 μl นำมาผสมกับน้ำกลั่น ปริมาณ 297 μl ในหลอด quartz cuvette และอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{260} และ OD_{280} โดยสารละลาย DNA ที่บริสุทธิ์จะอ่านค่าอัตราการดูดกลืนแสง $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ ประมาณ 1.8 หากค่าที่ได้มากกว่า 1.8 แสดงว่าอาจมี RNA ปน และถ้าค่าที่ได้ต่ำกว่า 1.8 แสดงว่าอาจมีการปนเปื้อนของโปรตีน (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545) คำนวณค่าความเข้มข้นของ DNA จากนั้นเจือจาง DNA ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ โดยค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1 ที่ OD_{260} จะมีปริมาณ DNA เท่ากับ 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

3.4.5 การตรวจสอบ DNA ของประชากรลูกผสมชั่วที่ 1 โดยเทคนิค SSR

3.4.5.1 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม

คัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ DNA ถั่วเหลือง โดยใช้ไพรเมอร์ที่ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ 2-5 ตัว ซ้ำๆ จำนวน 4 ชนิด (ตารางที่ 3.1) นำมาคัดเลือกด้วยเทคนิค PCR กับถั่วเหลืองสายพันธุ์ GC2796 พันธุ์เชียงใหม่ 60 และประชากรลูกผสมชั่วที่ 1 ทั้งหมด 30 ต้น เพื่อตรวจสอบว่าไพรเมอร์ใดที่สามารถให้ผลผลิต PCR ที่ชัดเจน โดยแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย

DNA (50 ng/ μl)	1.0	μl
10X PCR buffer	1.25	μl
MgCl_2 (25 mM)	1.0	μl
d NTP (2.5 mM)	0.5	μl
primer sense (1 μM)	1.25	μl
primer antisense (1 μl)	1.25	μl
Taq polymerase (5 unit/ μl)	0.1	μl
Ultrapure water	6.15	μl
รวม	12.5	μl

การทำ PCR จากตัวอย่างทั้งหมดโดยจะเตรียมสารละลายรวมของ buffer, MgCl_2 , d NTP, primer Taq polymerase และน้ำกลั่น ในหลอดเดียวกัน (master mixture) และแบ่งใส่หลอดโดยในแต่ละ

หลอดจะมี DNA template อยู่ จากนั้นผสมให้เข้ากัน นำไปใส่เครื่อง PCR โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มปริมาณดังนี้

ขั้นที่ 1	95 °C	นาน	3	นาที
ขั้นที่ 2	94 °C	นาน	30	วินาที
ขั้นที่ 3	56 °C	นาน	30	วินาที
ขั้นที่ 4	72 °C	นาน	2	นาที
ทำซ้ำรอบที่ 2-4 34 รอบ				
ขั้นที่ 5	72 °C	นาน	10	นาที

รักษาอุณหภูมิที่ 4 °C จนถึงเวลาวิเคราะห์ DNA ต่อไป

ตารางที่ 3.1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ศึกษาด้วยเทคนิค SSR (Akkaya *et al.* 1992 ; Rongwen *et al.* 1995)

ชนิดไพรเมอร์	Sense primer	Antisense primer
SOYHSP176 (AT) _n	ttttgtaagtactgtactgtgg	tatttttagcagtttttagatgattcg
SOYSC514 (AT) _n	ctacatgacacaattcttagggacc	tggaaatcagtggaaatgtgaagc
SOYPRP1 (ATT) _n	aagaggtacgtgccaaattacatca	atcttgtagaaaaactccgccacaca
SAT43 (AT) _n	aaattctgttcattgtccgtc	cattttaatatcccagtagtg

3.4.5.2 การแยก DNA โดย denaturing polyacrylamide gel

1. การเตรียกระจกสำหรับเทเจล

นำแผ่นกระจกสำหรับการเตรียมกระจกมาล้างให้สะอาด แล้วเช็ดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ให้สะอาดทั้งสองแผ่น เช็ดกระจกแผ่นหลังด้วย bind silane (bind silane 1 µl, glacial acetic acid 2.5 µl และ เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 500 µl) และเช็ดกระจกแผ่นหน้าด้วย repel silane 500 µl ให้ทั่วแผ่น ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที นำกระจกทั้งสองแผ่นมาวางเข้าหากันกันด้วย spacer ไม้ทั้งสองด้านของกระจก ใช้คลิปหนีบกระจกและปิดเทปกาวด้านท้ายกระจกเพื่อป้องกันเจลรั่วซึม แล้วจึงเตรียม 6 เปอร์เซ็นต์ polyacrymide gel ปริมาตร 40 ml โดยมีส่วนผสมดังนี้

30% acrylamide (19:1)	8	ml
5X TBE	8	ml
urea	18	g
น้ำกลั่น	10	ml
10% APS	400	µl

TEMED 20 μ l

โดยเริ่มจากผสม 5X TBE, urea และ น้ำกลั่น ให้เข้ากันในบีกเกอร์คนเบาๆ ในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิประมาณ 50 °C ให้ยูเรียละลายจนหมด รอจนอุณหภูมิลดลงประมาณอุณหภูมิห้องแล้วจึงเติม 30% acrylamide, 10% APS และ TEMED คนให้เข้ากันอย่างรวดเร็วแล้วเทใส่ในช่องกระจกจนเต็ม จากนั้นเสียบหัวที่ด้านบนวางกระจกราบในแนวระดับ ปล่อยให้เจลแข็งตัวข้ามคืนโดยใช้แผ่นพลาสติกใสปิดด้านบนและล่างของเจลเพื่อรักษาความชื้น

2. การทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

ล้างกระจกด้านนอกให้สะอาดด้วยน้ำ ดึงหัวและแกะเทปกาวออก ประกอบกระจกเข้ากับชุดอิเล็กโตรโฟรีซิสและเติมบัฟเฟอร์ จากนั้นต่อสายไฟและ pre-run 30 นาที ที่ความต่างศักย์ 300 โวลต์ ปิดเครื่อง แล้วใช้เข็มฉีดยาดูดบัฟเฟอร์ล้างยูเรียที่อยู่ในช่องหัว แต่ละช่องให้หมด หยอดตัวอย่าง DNA 8 μ l ผสมกับ loading buffer 4 μ l ลงในแต่ละช่องแล้วจึงเปิดเครื่องโดยใช้ความต่างศักย์ 200 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง ปิดเครื่องแล้วแยกกระจกทั้งสองแผ่นออกจากกันและนำกระจกแผ่นหลังไปเชื่อมต่อไป

3. การย้อมเจลด้วย silver nitrate

นำกระจกแผ่นที่มีเจลติดอยู่มาแช่ในน้ำกลั่นนาน 5 นาที เขย่าเบาๆ จากนั้นนำแผ่นเจลไปแช่ในสารละลาย CTAB ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 นาที โดยเขย่าตลอดเวลา เมื่อครบกำหนดย้ายแผ่นเจลไปแช่ในสารละลายแอมโมเนีย ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ นาน 15 นาที โดยเขย่าตลอดเวลา จากนั้นนำแผ่นเจลไปย้อมโดยใช้ลงในสารละลาย silver nitrate (0.2% silver nitrate) 20 นาที เขย่าอย่างสม่ำเสมอ เมื่อย้อมเสร็จแล้วย้ายแผ่นเจลออกมาจุ่มลงในน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว แล้วนำแผ่นเจลมาใส่สารละลาย developer (2 % sodium carbonate, 0.02% formaldehyde, 2 μ l/ml sodium thiosulfate) ที่เตรียมใหม่ๆ และแช่เย็นที่อุณหภูมิ 10 °C เขย่าอย่างสม่ำเสมอ 5-10 นาที หรือจนกว่าจะเห็นแถบ DNA ชัดเจน และหยุดปฏิกิริยาโดยนำแผ่นเจลมาใส่ใน stop solution (5% acetic acid, 3% glycerol) นาน 3-5 นาที ในขั้นสุดท้ายนำแผ่นเจลมาจุ่มลงในน้ำกลั่น และประกบด้วยกระดาษแก้วแผ่นใสแล้วผึ่งให้แห้งในอากาศ

3.4.6 การรวม DNA (pooled DNA)

วิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของสารละลาย DNA ที่สกัดได้จากประชากรช่วงที่ 2 แต่ละต้นที่มีค่าเฉลี่ยของความงอกมาตรฐานมากกว่า 98 เปอร์เซ็นต์ มารวมเข้าด้วยกันเป็น bulk resistance และประชากรช่วงที่ 2 แต่ละต้นที่มีค่าความงอกมาตรฐานน้อยกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ มารวมเข้าด้วยกันเป็น bulk susceptible กลุ่มละ 16 ต้น เตรียม DNA จากแต่ละต้นให้มีความเข้มข้น 100 ng/ μ l แล้วนำตัวอย่างดังกล่าวอย่างละ 6.25 μ l มารวมกันในหลอดใหม่ซึ่งจะได้ DNA ของประชากรกลุ่ม bulk resistance และ กลุ่ม bulk susceptible อย่างละ 100 μ l

3.4.7 การตรวจสอบ DNA โดยเทคนิค RAPD

3.4.7.1 การคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม

คัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ DNA ถั่วเหลืองโดยใช้ไพรเมอร์ความยาว 10-15 นิวคลีโอไทด์ จำนวน 200 ชนิด (ตารางที่ 3.2) มาคัดเลือกด้วยเทคนิค PCR กับถั่วเหลืองทั้ง 4 ตัวอย่าง คือ ถั่วเหลืองสายพันธุ์ GC2796 พันธุ์เชียงใหม่ 60 bulk resistance และ bulk susceptible เพื่อตรวจสอบว่าไพรเมอร์ใดที่สามารถให้ผลผลิต PCR ที่ชัดเจนโดยในแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย

DNA (100 ng/μl)	1.0	μl
10X PCR buffer	1.5	μl
MgCl ₂ (25mM)	1.5	μl
dNTP (2mM)	1.2	μl
primer (5 pmole/μl)	1.0	μl
Taq polymerase (5 unit/μl)	0.1	μl
Ultrapure water	8.7	μl
รวม	15	μl

การทำ PCR จากตัวอย่างทั้ง 4 ตัวอย่าง โดยจะเตรียมสารละลายรวมของ buffer, MgCl₂, dNTP, primer, Taq polymerase และ น้ำกลั่น ในหลอดเดียวกัน (master mixture) และแบ่งใส่หลอด โดยในแต่ละหลอดจะมี DNA template อยู่ จากนั้นผสมให้เข้ากัน นำไปใส่เครื่อง PCR โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาสำหรับเพิ่มปริมาณดังนี้

ขั้นที่ 1	94 °C	นาน	3	นาที
ขั้นที่ 2	94 °C	นาน	1	นาที
ขั้นที่ 3	36 °C	นาน	1	นาที
ขั้นที่ 4	72 °C	นาน	2	นาที
ทำซ้ำรอบที่ 2-4 40 รอบ				
ขั้นที่ 5	72 °C	นาน	5	นาที

รักษาอุณหภูมิที่ 4 °C จนถึงเวลาวิเคราะห์ DNA ต่อไป

3.4.7.2 การตรวจสอบขนาดชิ้นของ DNA ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส

ภายหลังปฏิกิริยา PCR นำผลผลิต (PCR product) ปริมาตร 10 μl มาตรวจสอบโดยอิเล็กโตรโฟรีซิสบน agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TBE buffer โดยใช้ Lambda DNA marker เปรียบเทียบขนาดของ DNA ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 80 โวลต์

นาน 1 ชั่วโมง และย้อมด้วย ethidium bromide จากนั้นถ่ายภาพภายใต้แสง UV เพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากผลการทดลองต่อไป

ตารางที่ 3.2 ไพร์เมอร์ที่ใช้ศึกษาด้วยเทคนิค RAPD 200 ชนิด

ชุดไพร์เมอร์	หมายเลขลำดับไพร์เมอร์	บริษัท
AA	01, 03, 07, 09, 11, 16, 18, 19, 20	Operon Technologies
AB	01, 04, 05, 06, 11, 13, 15, 16, 18, 19, 20	Operon Technologies
AC	02, 03, 05, 07, 08, 09, 10, 13, 14, 15, 19	Operon Technologies
AD	02, 03, 05, 06, 11, 19, 20	Operon Technologies
AF	04, 06, 07	Operon Technologies
AH	01, 02, 09, 11, 12, 16, 17, 18, 19	Operon Technologies
AI	05, 08, 11, 12, 13, 14, 15, 16	Operon Technologies
AP	11	Operon Technologies
APG	03	Operon Technologies
APW	01, 02	Operon Technologies
OPA	02, 03, 04, 05, 07, 08, 09, 11, 13, 14, 16, 18, 19	Operon Technologies
OPB	02, 06, 08	Operon Technologies
OPC	02, 03, 05, 06, 07, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 19, 20	Operon Technologies
OPD	01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20	Operon Technologies
OPE	01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20	Operon Technologies
OPF	01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20	Operon Technologies
OPH	02	Operon Technologies
OPI	03, 04, 10, 12, 14, 18	Operon Technologies

ตารางที่ 3.2 (ต่อ)

ชุดไพรเมอร์	หมายเลขลำดับไพรเมอร์	บริษัท
OPJ	05	Operon Technologies
OPK	02, 14, 16	Operon Technologies
OPL	12, 13, 19	Operon Technologies
OPN	03, 04, 14, 20	Operon Technologies
OPR	02, 03, 05	Operon Technologies
OPV	01	Operon Technologies
OPX	04, 05	Operon Technologies
OPY	02, 03	Operon Technologies
O	08	Bioprobe
PRP	01, 02	Chen <i>et al.</i> 1997
RSR	01, 02, 03	Chen <i>et al.</i> 1997
TPXR	01, 02	Chen <i>et al.</i> 1997
RS	01	Chen <i>et al.</i> 1997
U.B.C.	01, 02, 03, 04, 05, 06 ,07, 08 ,09 10, 11, 12, 13,14	University of British Columbia (Thseng <i>et al.</i> 1999)

3.4.8 การตรวจสอบ DNA โดยเทคนิค AFLP (Vos *et al.* 1995)

3.4.8.1 การตัด DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและการเชื่อมต่อ adapter

การทดลองใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่เป็น rare cutter คือ *EcoRI* ซึ่งมีตำแหน่งจดจำขนาด 6 คู่เบส (G/AATTC) และเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เป็น frequent cutter คือ *MseI* ซึ่งมีตำแหน่งจดจำขนาด 4 คู่เบส (T/TAA) และเชื่อมต่อปลาย DNA ด้วย adapter 2 ชนิด ตามชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย

Genomic DNA (100 ng/μl)	2.5	μl
Reaction buffer	10.0	μl
เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i> (10 unit/μl)	4.0	μl
เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>MseI</i> (5 unit/μl)	2.0	μl
<i>EcoRI</i> adapter (5 pmol/μl)	1.0	μl
<i>MseI</i> adapter (5pmol/μl)	2.0	μl
T ₄ DNA ligase (1 unit/μl)	1.0	μl

T ₄ ligation buffer	2.0	μl
Ultrapure water	36.0	μl
รวม	60.5	μl

ผสมสารต่างๆ ให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง

3.4.8.2 การทำ preselective amplification

เป็นการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 1 ตัว ที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย

Ligated DNA	2.0	μl
10X PCR buffer	2.5	μl
MgCl ₂ (50mM)	0.75	μl
dNTP (2mM)	2.5	μl
Taq DNA polymerase (5 unit/μl)	0.1	μl
EcoRI primer-A/C (5 pmol/μl)	1.0	μl
MseI primer-C/A (5 pmol/μl)	1.0	μl
Ultrapure water	15.15	μl
รวม	25.0	μl

ผสมสารต่างๆ ให้เข้ากัน นำเข้าเครื่อง PCR ใช้อุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยาดังนี้

ขั้นที่ 1	94 °C	นาน	30	วินาที
ขั้นที่ 2	56 °C	นาน	1	นาที
ขั้นที่ 3	72 °C	นาน	1	นาที
ทำซ้ำรอบที่ 1-3 20 รอบ				

แบ่งส่วนของสารละลายมาทำอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นแบ่งตัวอย่างบางส่วนมาเจือจาง 20 เท่า ด้วยสารละลาย TE buffer เพื่อใช้ในการทำ selective amplification ตัวอย่างส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

3.4.8.3 การทำ selective amplification

เป็นการเพิ่มปริมาณชิ้น DNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มนิวคลีโอไทด์ 3 ตัว ที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย

Diluted DNA	5.0	μl
10X PCR buffer	2.0	μl
MgCl ₂ (50mM)	0.6	μl
dNTP (2mM)	2.0	μl
Taq polymerase (5 unit/μl)	0.1	μl

<i>Eco</i> RI primer- ANN/CNN (5 pmol/ μ l)	1.0	μ l
<i>Mse</i> I primer -CAA/ANN (5 pmol/ μ l)	1.0	μ l
Ultrapure water	8.3	μ l
รวม	20.0	μ l

ทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณโดยโปรแกรม touch down ดังนี้

ขั้นที่ 1	94 °C	นาน	30	วินาที
ขั้นที่ 2	65 °C	นาน	30	วินาที
ขั้นที่ 3	72 °C	นาน	1	นาที

จากนั้นลดอุณหภูมิในขั้น annealing (65 °C) ลงรอบละ 1 °C ให้ถึง 56 °C แล้วทำซ้ำอีก 23 รอบ เมื่อจบปฏิกิริยา PCR แล้วนำมาเติม AFLP loading buffer 20 μ l นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 3 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันที ก่อนนำไปตรวจสอบผลโดยอิเล็กโตรโฟรีซิส

ในขั้นตอน selective amplification นี้จะคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ DNA ถั่วเหลืองโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีการเพิ่มนิวคลีโอไทด์ 3 ตัว จำนวน 82 คู่ (ตารางที่ 3.3) คัดเลือกจากถั่วเหลืองทั้ง 4 ตัวอย่าง คือ สายพันธุ์ GC 2796 เชียงใหม่ 60 bulk resistance และ bulk susceptible เพื่อตรวจสอบว่าไพรเมอร์ใดที่สามารถเพิ่มจำนวน DNA ได้ผลดี

3.4.8.4 การแยก DNA โดย denaturing polyacrylamide gel

1. การเตรียกระจกสำหรับเทเจล

นำแผ่นกระจกสำหรับการเตรียมกระจกมาล้างให้สะอาด แล้วเช็ดด้วยเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ให้สะอาดทั้งสองแผ่น เช็ดกระจกแผ่นหลังด้วย bind silane (bind silane 1 μ l , glacial acetic acid 2.5 μ l และ เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 500 μ l) และเช็ดกระจกแผ่นหน้าด้วย repel silane 500 μ l ให้ทั่วแผ่น ทั้งไว้ประมาณ 10 นาที นำกระจกทั้งสองแผ่นมาวางเข้าหากันด้วย spacer ไว้ทั้งสองด้านของกระจก ใช้คลิปหนีบกระจกและปิดเทปกาวด้านท้ายกระจก เพื่อป้องกันเจลรั่วซึม แล้วจึงเตรียม 6 เปอร์เซ็นต์ polyacrylamide gel ปริมาตร 60 ml โดยมีส่วนผสมดังนี้

30% acrylamide (19:1)	12	ml
5X TBE	12	ml
urea	27	g
น้ำกลั่น	15	ml
10% APS	600	μ l
TEMED	30	μ l

โดยเริ่มจากการผสม 5X TBE, urea และ น้ำกลั่น ให้เข้ากันในปิกเกอร์คนเบาๆ ในอ่างน้ำอุ่น อุณหภูมิประมาณ 50 °C ให้ยูเรียละลายจนหมด รอจนอุณหภูมิลดลงประมาณอุณหภูมิห้องแล้วจึง

เติม 30% acrylamide, 10% APS และ TEMED คนให้เข้ากันอย่างรวดเร็วแล้วเทใส่ในช่องกระจกจนเต็ม จากนั้นเสียบหัวที่ด้านบนวางกระจกราบในแนวระดับ ปล่อยให้เจลแข็งตัวข้ามคืนโดยใช้แผ่นพลาสติกใสปิดด้านบนและล่างของเจลเพื่อรักษาความชื้น

2. การทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

ล้างกระจกด้านบนออกให้สะอาดด้วยน้ำ ดึงหัวและแกะเทปกาวยอก ประกอบกระจกเข้ากับชุดอิเล็กโตรโฟรีซิสและเติมบัฟเฟอร์ จากนั้นต่อสายไฟและ pre-run 30 นาที ที่ความต่างศักย์ 1100 โวลต์ ปิดเครื่อง แล้วใช้เข็มฉีดยาดูดบัฟเฟอร์ล้างยูเรียที่อยู่ในช่องหัวแต่ละช่องให้หมด หยอดตัวอย่าง DNA 10 μ l ผสมกับ loading buffer 5 μ l ลงในแต่ละช่องแล้วจึงเปิดเครื่องโดยใช้ความต่างศักย์ 1100 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง 20 นาที ปิดเครื่องแล้วแยกกระจกทั้งสองแผ่นออกจากกันและนำกระจกแผ่นหลังไปย้อมต่อไป

3. การย้อมเจลด้วยซิลเวอร์ไนเตรท

นำกระจกแผ่นที่มีเจลดิจอยู่มาแช่ใน fixative solution (10% acetic acid) นาน 20 นาที เช่าเบาๆ บนเครื่องเช่า นำไปล้างในน้ำกลั่นนาน 30 นาที เปลี่ยนน้ำใหม่และล้างต่ออีก 5 นาที โดยเช่าตลอดเวลา จากนั้นนำแผ่นเจลไปย้อมโดยใช้ลงในสารละลาย silver nitrate (0.2% silver nitrate) 30 นาที เช่าอย่างสม่ำเสมอ เมื่อย้อมเสร็จแล้วย้ายแผ่นเจลออกมาจุ่มลงในน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว แล้วนำแผ่นเจลมาใส่สารละลาย developer (2.5% sodium carbonate, 0.02% formaldehyde, 2 μ l/ml sodium thiosulfate) ที่เตรียมใหม่ๆ และแช่เย็นที่อุณหภูมิ 10 °C เช่าอย่างสม่ำเสมอ 5-10 นาที หรือจนกว่าจะเห็นแถบ DNA ชัดเจน และหยุดปฏิกิริยาโดยนำแผ่นเจลมาใส่ใน stop solution (5% acetic acid, 3% glycerol) นาน 3-5 นาที ในขั้นสุดท้ายนำแผ่นเจลมาจุ่มลงในน้ำกลั่น และประกบด้วยกระดาษแก้วแผ่นใสแล้วผึ่งให้แห้งในอากาศ

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

3.5.1 บันทึกข้อมูลแถบ DNA ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของแต่ละคู่ไพรเมอร์ คัดเลือกแถบ DNA ที่แตกต่างกันระหว่างพ่อแม่ แล้วพิจารณาแถบ DNA ของแต่ละกลุ่ม DNA (bulk resistance และ bulk susceptible) โดยให้คะแนน “1” เมื่อปรากฏแถบ DNA และให้คะแนนเป็น “0” เมื่อไม่ปรากฏแถบ DNA

3.5.2 จำนวนเปอร์เซ็นต์พอลิมอร์ฟิซึม โดยพิจารณาจากแถบ DNA ที่เป็น polymorphic band จะเป็นแถบ DNA ที่พบในพืชชนิดหนึ่งแต่ไม่พบในพืชอีกชนิดหนึ่ง อันเนื่องมาจากความแตกต่างของตำแหน่งจุดตัดใน DNA เป็นผลทำให้เกิดแถบ DNA ที่ต่างกันพืชแต่ละชนิด จากนั้นนับจำนวน polymorphic band ที่เกิดขึ้นทั้งหมดในพืชแต่ละชนิดแล้วนำไปหารด้วยจำนวนแถบ DNA ที่เกิดขึ้นทั้งหมด

ตารางที่ 3.3 ลำดับเบสของ adapter, +1 primer และ +3 primer ที่ใช้ศึกษาโดยเทคนิค AFLP

ชนิดไพรเมอร์	ลำดับเบส
<i>Eco</i> RI adapter	5'-CTCGTAGACTGCGTACC CATCTGACGCATGGTTAA-3'
<i>Mse</i> I adapter	5'-GACGATGAGTCCTGAG TACTCAGGACTCAT-3'
<i>Eco</i> RI + 1 primer (E-A)	5'-GACTGCGTACCAAATTCA-3'
<i>Eco</i> RI + 3 primer	5'-GACTGCGTACCAAATTCA <u>AA</u> C-3' 5'-GACTGCGTACCAAATTCA <u>AG</u> -3' 5'-GACTGCGTACCAAATTC <u>ACA</u> -3' 5'-GACTGCGTACCAAATTC <u>ACC</u> -3' 5'-GACTGCGTACCAAATTC <u>ACG</u> -3' 5'-GACTGCGTACCAAATTC <u>ACT</u> -3' 5'-GACTGCGTACCAAATTC <u>AGC</u> -3' 5'-GACTGCGTACCAAATTC <u>AGG</u> -3'
<i>Mse</i> I + 1 primer (M-C)	5'GATGAGTCCTGAGTAAC-3'
<i>Mse</i> I + 3 primer	5'GATGAGTCCTGAGTAAC <u>AA</u> -3' 5'GATGAGTCCTGAGTAAC <u>AC</u> -3' 5'GATGAGTCCTGAGTAAC <u>AG</u> -3' 5'GATGAGTCCTGAGTAAC <u>AT</u> -3' 5'GATGAGTCCTGAGTAAC <u>TA</u> -3' 5'GATGAGTCCTGAGTAAC <u>TC</u> -3' 5'GATGAGTCCTGAGTAAC <u>TG</u> -3' 5'GATGAGTCCTGAGTAAC <u>TT</u> -3'

ตารางที่ 3.3 (ต่อ)

ชนิดไพรเมอร์	ลำดับเบส
<i>EcoRI</i> + 1 primer (E-C)	5'-AGACTGCGTACCAATTCC-3'
<i>EcoRI</i> + 3 primer	5'-AGACTGCGTACCAATTCCAG-3'
	5'-AGACTGCGTACCAATTCCAC-3'
	5'-AGACTGCGTACCAATTCCAA-3'
<i>MseI</i> +1 primer (M-A)	5'GACGATGAGTCCTGAGTAAA-3'
<i>MseI</i> +3	5'GACGATGAGTCCTGAGTAAAAG-3'
	5'GACGATGAGTCCTGAGTAAAAT-3'
	5'GACGATGAGTCCTGAGTAAAGA-3'
	5'GACGATGAGTCCTGAGTAAAGG-3'
	5'GACGATGAGTCCTGAGTAAACG-3'
	5'GACGATGAGTCCTGAGTAAATA-3'