อุปกรณ์และวิธีการ

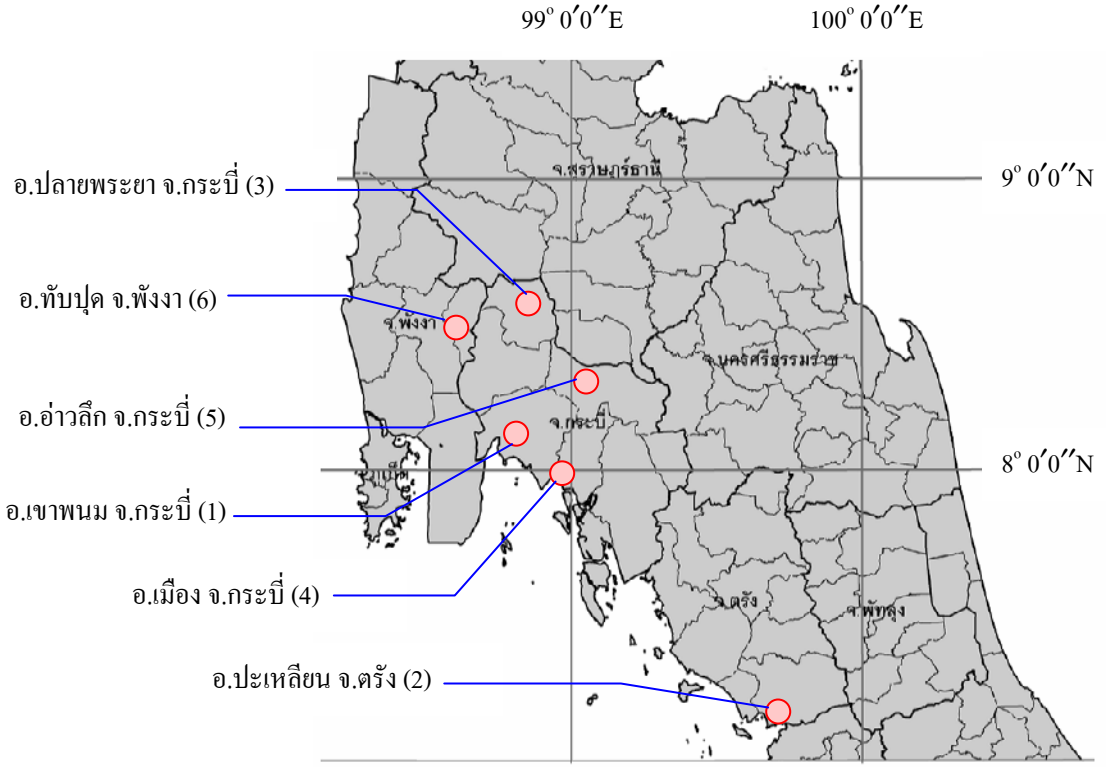
1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างกล้วยไม้รองเท้านารีเพื่อใช้ในการศึกษา

การรวบรวมตัวอย่างกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่จำนวน 6 แหล่ง (ตารางที่ 1) เนื่องจากกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่พบได้ในบางพื้นที่เท่านั้น และปัจจุบันมีจำนวนในธรรมชาติลดน้อยลงมาก การศึกษานี้จึงได้เก็บตัวอย่างจากแหล่งรวบรวมพันธุ์กล้วยไม้รองเท้านารีซึ่งระบุที่มาไว้อย่างชัดเจน จากโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมกล้วยไม้รองเท้านารีในพระราชดำริ ศูนย์วิจัยข้าวกระบี่ ต.เหนือคลอง อ.เหนือคลอง จ.กระบี่ เมื่อพิจารณาจากแผนที่แสดงพิกัดทางภูมิศาสตร์บ่งบอกว่ากล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ทั้ง 6 แหล่งมีการกระจายตัวอยู่ตั้งแต่พิกัดประมาณ $98^{\circ}\ 0'0''$E ถึง $100^{\circ}\ 0'0''$E และ $9^{\circ}\ 0'0''$N ถึง $7^{\circ}\ 0'0''$N (ภาพที่ 1) โดยตัวอย่างที่รวบรวมได้ทั้ง 6 แหล่งนี้ จะนำมาสกัดดีเอ็นเอและใช้ในการวิเคราะห์เอเอฟแอลพี เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและประเมินสถานภาพแหล่งพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่

กล้วยไม้รองเท้านารีชนิดต่างๆที่มีการกระจายพันธุ์อยู่ในประเทศไทย (ภาพผนวกที่ 1-18) อยู่ในสถานภาพถูกคุกคามอย่างหนัก ทำให้มีจำนวนในธรรมชาติลดน้อยลงมาก และการจำแนกที่ชัดเจนจำเป็นต้องพิจารณาจากต้นที่มีดอกเท่านั้น ทำให้ไม่สามารถเก็บตัวอย่างโดยตรงจากธรรมชาติได้ จึงได้รวบรวมตัวอย่างกล้วยไม้รองเท้านารีชนิดต่างๆจากโครงการพัฒนาดอยตุงในพระราชดำริ และแหล่งรวบรวมกล้วยไม้ที่ต่างๆ (ตารางที่ 2) เพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธีวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งไอทีเอส (ITS, Internal Transcribed Spacer)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ *Paphiopedilum exul* (Ridl.) Rolfe แหล่งต่างๆ

ลำดับ	แหล่งที่มาของตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	แหล่งที่มา
1	อ.เขาพนม จ.กระบี่	7	โครงการอนุรักษ์พันธุกรรม
2	อ.ปะเหลียน จ.ตรัง	10	กล้วยไม้รองเท้านารี
3	อ.ปลายพระยา จ.กระบี่	20	ในพระราชดำริ
4	เกาะนัก อ.เมือง จ.กระบี่	4	ศูนย์วิจัยข้าวกระบี่
5	เกาะน้อย อ.อ่าวลึก จ.กระบี่	8	ต.เหนือคลอง อ.เหนือคลอง
6	บ.คลองเตย อ.ทับปุด จ.พังงา	21	จ.กระบี่



ภาพที่ 1 แผนที่แสดงตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่แหล่งต่างๆ

ตารางที่ 2 ตัวอย่างกล้วยไม้รองเท้านารีจำนวน 15 ชนิด ที่มีการกระจายพันธุ์อยู่ในประเทศไทย ที่ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

ลำดับ	ชื่อภาษาไทย	ชื่อวิทยาศาสตร์	แหล่งที่มา
1	รองเท้านารีเหลืองปราจีน	*Paphiopedilum concolor*	แหล่งรวบรวม 2
2	รองเท้านารีเหลืองอุดร	*Paph. concolor*	แหล่งรวบรวม 2
3	รองเท้านารีเหลืองกาญจน์	*Paph. concolor*	แหล่งรวบรวม 2
4	รองเท้านารีเหลืองตรัง	*Paph. godefroyae*	แหล่งรวบรวม 1
5	รองเท้านารีขาวสตูล	*Paph. niveum*	แหล่งรวบรวม 1
*6	รองเท้านารีช่องอ่างทอง	*Paph.* X Ang Thong	แหล่งรวบรวม 3
7	รองเท้านารีฝาหอย	*Paph. bellatulum*	แหล่งรวบรวม 1
8	รองเท้านารีคางกบคอแดง	*Paph. appletonianum*	แหล่งรวบรวม 1
9	รองเท้านารีคางกบ	*Paph. callosum*	แหล่งรวบรวม 1

ลำดับ	ชื่อภาษาไทย	ชื่อวิทยาศาสตร์	แหล่งที่มา
10	รองเท้านารีสุขะกุล	*Paph. sukhakulii*	แหล่งรวบรวม 1
11	รองเท้านารีหนวดฤาษี	*Paph. parishii*	แหล่งรวบรวม 2
12	รองเท้านารีอินทนนท์	*Paph. villosum*	แหล่งรวบรวม 1
13	รองเท้านารีอินทนนท์ลาว	*Paph. gratrixianum*	แหล่งรวบรวม 1
14	รองเท้านารีดอยตุง	*Paph. charlesworthii*	แหล่งรวบรวม 1
**15	รองเท้านารีตุงกาญจน์	*Paph.* sp.	แหล่งรวบรวม 2
16	รองเท้านารีเหลืองกระบี่	*Paph. exul*	อ.ปลายพระยา จ.กระบี่
17	รองเท้านารีเหลืองเลย	*Paph. hirsutissimum*	แหล่งรวบรวม 1

ตารางที่ 2 (ต่อ)

หมายเหตุ ภาพดอกกล้วยไม้รองเท้านารีชนิดต่างๆ ดูได้จากภาคผนวก (ภาพผนวกที่ 1-17)
หมายเลข 1-7 เป็นสกุลย่อย Brachypetalum และหมายเลข 8-17 เป็นสกุลย่อย Paphiopedilum
เครื่องหมาย (*) หมายถึงกล้วยไม้รองเท้านารีช่องอ่างทอง ที่ต้องการยืนยันความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมภายในหมู่ Brachypetalum
เครื่องหมาย (**) หมายถึงกล้วยไม้รองเท้านารีดอยตุงกาญจน์ ซึ่งเป็นชนิดใหม่ที่ยังไม่ได้รับการตั้งชื่อวิทยาศาสตร์ โดยศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับชนิดอื่นๆ
แหล่งรวบรวม 1 หมายถึงสถานที่รวบรวมกล้วยไม้ของโครงการพัฒนาดอยตุงในพระราชดำริ
แหล่งรวบรวม 2 หมายถึงสถานที่รวบรวมกล้วยไม้ของคุณไกรฤทธิ์ เวศวรุต
แหล่งรวบรวม 3 หมายถึงสถานที่รวบรวมกล้วยไม้ของคุณธนา พานิช

2. การสกัดดีเอ็นเอกล้วยไม้รองเท้านารี

การเตรียมดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพีต้องได้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดี และไม่มีการปนเปื้อนจากสิ่งต่างๆ เพื่อป้องกันการตัดดีเอ็นเอที่ไม่สมบรูณ์ ซึ่งอาจทำให้การวิเคราะห์ผลผิดพลาดได้ ในการทดลองนี้ได้ประยุกต์ใช้วิธีการสกัดจาก Doyle and Doyle (1990) และ Changtragoon *et al.* (1996) ดังนี้

2.1 คัดเลือกกล้วยไม้รองเท้านารีที่เป็นใบสด ตรงบริเวณยอดอ่อน โดยชั่งประมาณ 0.4 กรัม มาบดในโกร่งบดยาที่เติม 2X CTAB buffer (2% CTAB, 1% PVP, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris–HCl pH 8.0, 0.2% 2-mercaptoethanol) 1,500 ไมโครลิตร ให้ละเอียด

2.2 ถ่ายใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

2.3 นำไปเติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ในสัดส่วน 24 :1(chloroform : isoamyl alcohol 24 :1) ลงไปประมาณ 800 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอนและกำจัดโปรตีน เขย่าเบาๆ ให้เป็นเนื้อเดียวกัน

2.4 นำไปปั่นที่ระดับความเร็ว 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดนำใสส่วนบนมาใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ ส่วนที่เหลือทิ้งไปทำขั้นตอนที่ 2.3 และ 2.4 ซ้ำอีก 2 รอบ

2.5 เติมไอโซโพรพานอล (isopropanol) ที่เย็นจัดลงไป 500 ไมโครลิตรเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ผสมเบาๆให้เข้ากันนำไปแช่ไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

2.6 นำไปปั่นที่ระดับความเร็วรอบ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทไอโซโพรพานอลทิ้ง ระวังอย่าให้ตะกอนที่ก้นหลอดหลุดออกมา หลังจากนั้นเติมแอลกอฮอล์ 70% ที่เย็นจัดลงไปปริมาณ 800 ไมโครลิตร เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ

2.7 นำไปปั่นที่ระดับความเร็วรอบ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทแอลกอฮอล์ 70% ทิ้ง ทำขั้นตอนนี้ 2 ครั้ง

2.8 ปล่อยให้ตะกอนแห้งโดยการเปิดฝาทิ้งไว้ (air drying method) นาน 20-30 นาที จากนั้นนำมาละลายใน TE buffer (10 mM Tris –HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) ปริมาณ 50 ไมโครลิตร เมื่อละลายดีแล้วเก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส

3. การวัดคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

ใช้วิธีวัดการเรืองแสงของดีเอ็นเอที่จับตัวกับเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) หลังจากแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซีส แล้วเปรียบเทียบกับสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน การวัดคุณภาพและปริมาณของสารละลายดีเอ็นเอด้วยวิธีนี้ โมเลกุลของเอธิเดียมโบรไมด์ จะเข้าไปแทรกในเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ และเมื่อนำไปตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตจะพบว่าสามารถบอกถึงปริมาณดีเอ็นเอได้โดยประมาณ นอกจากนี้ยังสามารถบอกได้ถึงคุณภาพดีเอ็นเอได้ด้วย ซึ่งมีวิธีการดังนี้

3.1 เตรียมเจลอะกาโรส 0.8% โดยชั่งผงวุ้นอะกาโรส 0.4 กรัม ใส่ลงใน 1X TAE buffer (0.04 M Tris-acetate, 0.001 M EDTA) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปละลายด้วยไมโครเวฟจนกระทั่งวุ้นหลอมละลายหมด รอให้อะกาโรสเจลเย็นลงแล้วเทลงในถาดเตรียมเจลที่มีหวีเสียบไว้แล้วปล่อยทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที หรือจนกระทั่งเจลแข็งตัว

3.2 เมื่อเจลแข็งตัวแล้วดึงหวีออก ย้ายเจลที่ได้ลงใน horizontal chamber โดยให้ด้านที่มีช่องหวีอยู่ด้านขั้วลบ แล้วเท 1X TAE buffer ลงจนท่วมแผ่นเจล

3.3 ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับโหลดดิ้งบัฟเฟอร์ (6x loading buffer : 0.25% bromophenal blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol) ในอัตราส่วน 5 ต่อ 1 แล้วค่อยๆ หยอดลงในช่องหวีด้วยปิเปตต์

3.4 ปิดผาเครื่องแล้วเปิดกระแสไฟฟ้าให้กระแสไฟฟ้าวิ่งผ่านจากขั้วลบไปที่ขั้วบวก โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ และปิดกระแสไฟฟ้าเมื่อสีของโหลดดิ้งบัฟเฟอร์เคลื่อนที่ไปได้ระยะทาง 3 ใน 4 ของแผ่นเจล

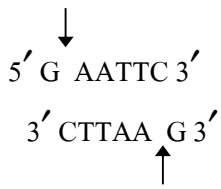
3.5 นำแผ่นเจลไปย้อมในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (μg/ml) นาน 10-15 นาที แล้วนำไปล้างเอธิเดียมโบรไมด์ที่ค้างอยู่ในเจลโดยนำไปแช่ในถาดที่มีน้ำไหลผ่านนาน 3-5 นาที

3.6 นำแผ่นเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และบันทึกภาพโดยใช้เครื่อง DNA photo documentation

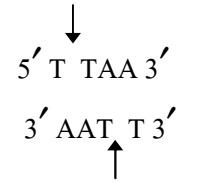
4. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่โดยใช้เทคนิคเอเอฟแอลพี

4.1 การเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template)

4.1.1 การตัดดีเอ็นเออย่างสมบรูณ์ด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด เพื่อให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดเล็กๆ ที่สามารถเพิ่มปริมาณในการทำพีซีอาร์ได้ดีและมีขนาดเหมาะสมในการแยกบน non-denaturing polyacraylamide gel สำหรับเอนไซม์ที่ใช้ในการตัดในขั้นตอนนี้คือ *Eco*RI และ *Mse*I โดยที่ *Eco*RI มีตำแหน่งจดจำ 6 คู่เบสและมีจุดตัดดังนี้



ส่วน *Mse*I นั้นมีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบสและมีจุดตัดดังนี้



การตัดดีเอ็นเออย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด ในปฏิกิริยารวม 25 ไมโครลิตร ทำโดยใส่ดีเอ็นเอและสารละลายแต่ละชนิดในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย สารละลายดีเอ็นเอเข้มข้น 100 นาโนกรัมกรัมต่อไมโครลิตร (ng/μl) ปริมาณ 2.50 ไมโครลิตร สารละลายบัฟเฟอร์เข้มข้น 5 เท่า (5X reaction buffer : 10mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM magnesium acetate, 50 mM potassium acetate) ปริมาณ 5.0 ไมโครลิตร, และเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 2 ชนิด คือ *Eco*RI ความเข้มข้น 10 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาณ 0.25 ไมโครลิตร และ *Mse*I ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาณ 0.50 ไมโครลิตร ปรับปริมาณด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื่อแล้วให้ได้ 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงในไมโครเซนตริฟิวจ์ประมาณ 30 วินาที เพื่อป้องกันสารละลายติดค้างที่ผนังข้างหลอด จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

4.1.2 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter (ligation) เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับการเพิ่มปริมาณโดย adapter ที่ต่อเข้าที่ปลายของชิ้นดีเอ็นเอจะทำหน้าที่เป็นตำแหน่งจับเกาะของไพรเมอร์ในการทำพีซีอาร์ ซึ่งจะใช้ adapter ที่สามารถต่อเข้ากันได้กับดีเอ็นเอที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ *Eco*RI และ *Mse*I มาแล้วคือ *Eco*RI adapter และ *Mse*I adapter มีลำดับเบสดังนี้

*Eco*RI adapter 5′- CTCGTAGACTGCGTACC 3′
3′- CATCTGACGCATGGTTAA- 5′

*Mse*I adapter 5′-GACGATGAGTCCTGAG-3′
3′-TACTCAGGACTCAT-5′

การเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter นั้นทำได้โดยนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 4.1.1 ซึ่งมีปริมาตร 25 ไมโครลิตร มาเติมสารละลาย *Eco*RI adapter ที่มีความเข้มข้น 5 พิกโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร และ *Mse*I adapter ที่มีความเข้มข้น 25 พิกโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาณ 2 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 5 เท่า (5X T4 ligase buffer : ประกอบด้วย 1mM ATP, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM magnesium acetate, 50 mM potassium acetate, 5 mM DTT และ 50 ng/μl) ปริมาณ 10 ไมโครลิตร แล้วเติมเอนไซม์ T4 DNA ligase ที่มีความเข้มข้น 1 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยนำไปหมุนเหวี่ยงในไมโครเซนตริฟิวจ์ 0.5-1.0 นาที บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องหรือที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส อีก 2 ชั่วโมง

4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ (PCR, Polymerase Chain Reaction)

ในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ของเทคนิคเอเอฟแอลพีนั้นจะทำ 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 เรียกว่า preamplification เป็นการเพิ่มปริมาณโดยการใช้ไพรเมอร์เพิ่มเบสเพื่อคัดเลือก 1 เบสที่ปลาย 3′ และขั้นที่ 2 เป็นการนำผลผลิตที่ได้จากขั้นแรกมาเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ที่มีการเพิ่มเบสเข้าไปที่ปลาย 3′ จำนวน 3 เบส เรียกว่า selective amplification โดยมีวิธีการดังนี้

4.2.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในขั้นตอน preamplification (ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร) นำสารละลายที่ได้จากข้อ 4.1 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 ไมโครลิตร ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส แล้วเติมสารละลายไพรเมอร์ 2 ชนิดที่มีการเพิ่มเบสคัดเลือกเข้าไปที่ปลาย 3′ ไพรเมอร์ละ 1 เบส คือไพรเมอร์ E+1, และไพรเมอร์ M+1 ความเข้มข้น 5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาณอย่างละ 1 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับทำพีซีอาร์ความเข้มข้น 10 เท่า (10X PCR buffer : 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 15 mM $MgCl_2$, 500 mM KCl) ปริมาณ 2.50 ไมโครลิตร, dNTP mix (ประกอบด้วย : dATP, dCTP, dGTP, dTTP ความเข้มอย่างละ 200 ไมโครโมลาร์) ความเข้มข้นรวม 2 mM ปริมาณ 2.50 ไมโครลิตร และสารละลายแมกนีเซียม ($MgCl_2$) ความเข้มข้น 50 mM ปริมาณ 0.75 ไมโครลิตร ใส่เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 1 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาณ 0.1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื่อแล้วให้ได้ 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงในไมโครเซนตริฟิวจ์ 0.5-1.0 นาที หลังจากนั้นนำสารละลายทั้งหมดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ (Biometra T- gradient) ตั้งอุณหภูมิและเวลาของเครื่องจำนวน 20 รอบดังนี้คือ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 56 องศาเซลเซียส 60 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที แล้วแบ่งบางส่วนมาทำการเจือจาง 20 เท่าด้วยสารละลาย TE สำหรับเป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณขั้นที่ 2 ในข้อ 4.2.2 ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส

4.2.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในขั้นตอน selective amplification (ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร) นำสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วจากข้อ 4.2.1 ปริมาณ 5.0 ไมโครลิตรมาเติมสารละลายไพรเมอร์ 2 ชนิด ไพรเมอร์ E+3 และไพรเมอร์ M+3 ที่มีการเพิ่มเบสเข้าไปที่ปลาย 3′ ความเข้มข้น 5 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาณอย่างละ 1 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับทำพีซีอาร์ความเข้มข้น 10 เท่า (10X PCR buffer : 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 15 mM $MgCl_2$, 500 mM KCl) ปริมาณ 2.0 ไมโครลิตร, dNTP mix (ประกอบด้วย : dATP, dCTP, dGTP, dTTP ความเข้มอย่างละ 200 ไมโครโมลาร์) ความเข้มข้นรวม 2 mM ปริมาณ 2.0 ไมโครลิตร และ สารละลายแมกนีเซียม ($MgCl_2$) ความเข้มข้น 50 mM ปริมาณ 0.6 ไมโครลิตร, เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 1 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาณ 0.1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื่อแล้วให้ได้ 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยนำไปหมุนเหวี่ยงในไมโครเซนตริฟิวจ์ 0.5-1.0 นาที เสร็จแล้วนำสารละลายทั้งหมดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ (Biometra T-gradient) ทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณโดยใช้โปรแกรม touch down PCR ดังนี้คือ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 65 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที จำนวน 1 รอบ ลดอุณหภูมิ

ในขั้น annealing (65 องศาเซลเซียส) ลงอย่างละ 0.7 องศาเซลเซียส จำนวน 12 รอบ และต่อด้วยตั้งอุณหภูมิที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 60 วินาที จำนวน 23 รอบ

4.2.3 การแยกชิ้นดีเอ็นเอโดย non denaturing polyacraylamide gel ทำการแยกชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องแยกขนาดแบบ non denaturing polyacrylamide gel (Gel-scan 3000) ที่ความเข้มข้นของโพลีอะคริลาไมด์ (polyacraylamide) 6 เปอร์เซ็นต์ (ประกอบด้วยอะคริลาไมด์ ที่เตรียมโดยผสม อะคริลาไมด์ (acrylamide) 19 กรัม : บิสอะคริลาไมด์ 1 กรัม (bisacrylamide), 5X TBE, น้ำกลั่น, 10%APS และ TEMED) ใน 0.6X TBE buffer ที่ผสมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ผ่านกระแสไฟฟ้า 1,000 โวลต์ นาน 45 นาที

4.3 การคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม

นำดีเอ็นเอซึ่งสกัดจากตัวอย่างกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ ที่สุ่มจากตัวแทนของทั้ง 6 แหล่งมาจำนวน 10 ตัวอย่าง นำมาทดสอบกับการวิเคราะห์เอเอฟแอลพีโดยดำเนินการตามข้อที่ 4.1 และ 4.2 เพื่อทำการคัดเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในขั้นตอน select-amplification โดยคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการคัดเลือกประกอบไปด้วยชุดไพรเมอร์ 2 ชุด แต่ละชุดมีจำนวน 8 ไพรเมอร์ (ตารางที่ 3) ซึ่งจะทำให้ได้จำนวนคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ในการคัดเลือกทั้งสิ้น 64 คู่ เมื่อนำตัวอย่างที่สุ่มมาทดสอบกับคู่ไพรเมอร์ทั้งหมด จะทำให้สามารถคัดเลือกคู่ไพรเมอร์บางคู่ที่สามารถทำให้เกิดรูปแบบดีเอ็นเอที่เหมาะสม คือมีจำนวนแถบดีเอ็นเอจำนวนมาก มีความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งเดียวกันของแต่ละตัวอย่างในสัดส่วนที่สูง (polymorphism) ในขณะเดียวกันแถบดีเอ็นเอที่ได้จะต้องมีความคมชัด อันจะทำให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจน เหมาะสำหรับการนำมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ adapter และ primer ในขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยเอเอฟแอลพี

สัญลักษณ์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
Adapter	
*Eco*RI adapter	5′- CTCGTAGACTGCGTACC 3′
	3′- CATCTGACGCATGGTTAA- 5′
*Mse*I adapter	5′-GACGATGAGTCCTGAG-3′
	3′-TACTCAGGACTCAT-5′
Primer+1	
E-A	5′-GACTGCGTACCAATTCA-3′
M-C	5′-GATGAGTCCTGAGTAAC-3′
Primer+3	
E-AAC	5′-GACTGCGTACCAATTCAAC-3′
E-AAG	5′-GACTGCGTACCAATTCAAG-3′
E-ACA	5′-GACTGCGTACCAATTCACA-3′
E-ACT	5′-GACTGCGTACCAATTCACT-3′
E-ACC	5′-GACTGCGTACCAATTCAAC-3′
E-ACG	5′-GACTGCGTACCAATTCACG-3′
E-AGC	5′-GACTGCGTACCAATTCAGC-3′
E-AGG	5′-GACTGCGTACCAATTCAGG-3′
M-CAA	5′-GATGAGTCCTGAGTAACAA-3′
M-CAC	5′-GATGAGTCCTGAGTAACAC-3′
M-CAG	5′-GATGAGTCCTGAGTAACAG-3′
M-CAT	5′-GATGAGTCCTGAGTAACAT-3′
M-CTA	5′-GATGAGTCCTGAGTAACTA-3′
M-CTC	5′-GATGAGTCCTGAGTAACTC-3′
M-CTG	5′-GATGAGTCCTGAGTAACTG-3′
M-CTT	5′-GATGAGTCCTGAGTAACTT-3′

4.4 การวิเคราะห์ผลของเอเอฟแอลพี

4.4.1 การประเมินสถานภาพทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมจะได้จากค่า percentage of polymorphic loci ซึ่งคำนวณได้จากสูตร

$$\% \text{ polymorphic loci} = \frac{\text{number of polymorphic loci}}{\text{number of total loci}} \times 100$$

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่โดยใช้ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม (heterozygosity) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ (TFPGA program) เพื่อประเมินสถานภาพทางพันธุกรรม (Miller, 1997)

4.4.2 การศึกษาความใกล้ชิดทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ทั้ง 6 แหล่ง โดยเปรียบเทียบจากความเหมือนและความแตกต่างของรูปแบบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น โดยตัวอย่างที่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆ ให้สัญลักษณ์เป็น “1” ส่วนตัวอย่างที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นที่ตำแหน่งเดียวกันนั้น ให้สัญลักษณ์เป็น “2” และข้อมูลที่สูญหาย (missing data) ให้สัญลักษณ์เป็น “0” จากนั้นแปลข้อมูลโดยใช้ Nei’s genetic identities (I) และ genetic distance (D) (Nei, 1978) นำมาเข้าสู่ตาราง matrix เพื่อใช้ในการจัดกลุ่มศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค unweigthed pair group method of arithmetic average (UPGMA)

5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของกล้วยไม้รองเท้านารีชนิดต่างๆในประเทศไทย

5.1 การออกแบบคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสม

ใช้ฐานข้อมูล NCBI จากเครือข่ายใยแมงมุมเพื่อหาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตำแหน่งไอทีเอส (Internal Transcribed Spacer, ITS) ของกล้วยไม้รองเท้านารีสกุล *Paphiopedilum* ซึ่งมีขนาดประมาณ 600 คู่เบส จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของกล้วยไม้รองเท้านารีชนิดที่มีความใกล้เคียงนำมาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม ClustalW (EBI) เพื่อหาบริเวณที่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่มีอัตราการกลายพันธุ์ต่ำ เหมาะสมจะนำมาออกแบบคู่

ไพรเมอร์ จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอนุรักษ์ดังกล่าวมาใช้ออกแบบคู่ไพรเมอร์ โดยใช้โปรแกรม Oligo nucleotide (NCBI) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปใช้สังเคราะห์คู่ไพรเมอร์ต่อไป ไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองนี้สังเคราะห์จาก KU Vector มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.2 การเพิ่มปริมาณยีนโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์

ใช้ชุดพีซีอาร์ MasterAmp™ Tth DNA Polymerase (Epicentre, USA) โดยนำสารละลายดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วประมาณ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรปริมาณ 1 ไมโครลิตรมาเติมสารละลายไพรเมอร์ 2 ชนิดคือ forward primer และ reverse primer ที่ได้จากข้อ 5.1 ความเข้มข้น 10 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาณอย่างละ 2 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับทำพีซีอาร์ความเข้มข้น 20 เท่า (20x Tth PCR Reaction Buffer) ปริมาณ 2.5 ไมโครลิตร dNTP mix (ประกอบด้วย : dATP, dCTP, dGTP, dTTP ความเข้มข้นอย่างละ 200 ไมโครโมลาร์) ความเข้มข้นรวม 2.5 mM ปริมาณ 2.0 ไมโครลิตร และ สารละลายแมกนีเซียม ($MgCl_2$) ความเข้มข้น 25 mM ปริมาณ 3 ไมโครลิตร เอนไซม์ *Tth* DNA polymerase (MasterAmp *Tth* DNA Polymerase) ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาณ 0.25 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยนำไปหมุนเหวี่ยงในไมโครเซนตริฟิวจ์ 30 วินาที เสร็จแล้วนำสารละลายทั้งหมดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ (Biometra T-gradient) ทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณโดยใช้โปรแกรมดังนี้รอบแรกใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที ตามด้วยรอบต่อมา 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 54 องศาเซลเซียส 45 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 90 วินาที จำนวน 30 รอบ และต่อด้วยตั้งอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียสนาน 7 นาที เมื่อสิ้นสุดโปรแกรมตั้งค่าให้อุณหภูมิลดลงมาอยู่ที่ 8 องศาเซลเซียส

5.3 การโคลนยีนที่ต้องการศึกษาเข้าสู่พลาสมิด

การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอหรือยีนเข้ากับพลาสมิดใช้ชุด pGEM-T Easy Vector System I kit (Promega, USA) ซึ่งมาพร้อมกับพลาสมิด pGEM-Teasy vector โดยนำชิ้นดีเอ็นเอที่ผ่านการเพิ่มปริมาณโดยเทคนิคพีซีอาร์จากข้อ 5.2 ปริมาณ 3 ไมโครลิตร มาเติมสารละลายบัพเฟอร์ความเข้มข้น 2 เท่า (2x rapid buffer) ปริมาณ 5 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายพลาสมิด pGEM-Teasy vector ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร และเติมเอนไซม์ T4 DNA ligase

ปริมาณ 1 ไมโครลิตร ทั้งหมดมีปริมาตรรวมทั้งสิ้น 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียสเป็นเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง (ข้ามคืน)

5.4 การถ่ายยีนเข้าสู่แบคทีเรียเจ้าบ้าน (host)เพื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดสายผสม

5.4.1 การเตรียม competent cell โดยวิธี $CaCl_2$ heat shock transformation (Sambrook *et al*., 1989) เป็นการเตรียมทำให้เชื้อ *E .coli* ให้มีความพร้อมสำหรับการรับพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ เพื่อทำการเพิ่มปริมาณพลาสมิดสายผสม ทำได้โดยนำเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α มา streak ในplate ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแอมพิซิลลิน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง (ข้ามคืน) หลังจากบ่มได้เวลาแล้วจะพบการเจริญของเชื้อเป็นแบบ single colony นำไม้จิ้มฟันจิ้ม single colony ที่ได้หย่อนลงในหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 5 มิลลิลิตร นำเชื้อไปเลี้ยงใน incubator shaker ที่แกว่งด้วยความเร็วรอบ 150 rpm อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง (ข้ามคืน) จากนั้นย้ายเชื้อ *E. coli* ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหาร Luria-Bertani Medium (LB) 50 มิลลิลิตร แล้วนำเชื้อไปเลี้ยงใน incubator shaker ที่ตั้งความเร็วในการเหวี่ยง 150 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง เมื่อได้เวลาแล้วย้าย *E. coli* ลงในหลอด 1.5 มิลลิลิตร (ซึ่งจะทำให้ได้จำนวนหลอดทั้งสิ้น 33 หลอด) นำทั้งหมดไปแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที เสร็จแล้วปั่นตกตะกอนที่ 4,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ถึงตรงนี้เตรียมกล่องใส่น้ำแข็งไว้เพราะขั้นตอนที่เหลือทั้งหมดจะต้องทำในที่เย็น เทอาหารเดิมทิ้งแล้วล้างตะกอนด้วย RF1 (100 mM KCl, 50 mM $MnCl_2$ $4H_2O$, 30 mM K acetate, 10 mM $CaCl_2$, 15% Glycerol pH5.8) ปริมาณ 500 ไมโครลิตร โดยใช้ปลายทิปเขี่ยเชื้อให้แยกออกจากกันก่อนแล้วเติม RF1 ทีละน้อยจนเชื้อละลาย แล้วนำไปแช่น้ำแข็ง 15 นาที จากนั้นดูดสารละลายข้างบนออกละลายตะกอนด้วย RF2 (10mM MOPS, 10mM KCl, 75mM $CaCl_2$, 15% Glycerol pH6.8) ปริมาณ 60 ไมโครลิตร นำไปเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้

5.4.2 การย้ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านโดยวิธี $CaCl_2$ heat shock transformation (Sambrook *et al*., 1989) ทำได้โดยนำ competent cell จากตู้ -80 องศาเซลเซียสที่เตรียมไว้ออกมาแช่น้ำแข็งทันที ประมาณ 5-10 นาที เพื่อให้ละลาย เมื่อละลายแล้วดูด competent cell ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด reaction mix ที่ได้จากขั้นตอนในข้อ 5.3 จากนั้นผสมเบาๆ ให้เข้ากันแล้วนำไปแช่น้ำแข็งไว้เป็นเวลา 20-30 นาที ระหว่างรอเตรียมน้ำอุ่นอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นำหลอดที่แช่ในน้ำแข็งครบ 30 นาทีแล้วมาแช่น้ำอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส

ที่เตรียมไว้ประมาณ 45-60 วินาที แล้วย้ายลงแช่ในน้ำแข็งทันที โดยแช่ในน้ำแข็งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำมาเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาณ 950 ไมโครลิตร แล้วนำเชื้อไปเลี้ยงต่อที่ incubator shaker อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 150 rpm นาน 1 ชั่วโมง ระหว่างที่รอนี้ทำการ spread plate ด้วยสาร X-gal ไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแอมพลิซิลินไว้ก่อนหน้านี้ เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 1 ชั่วโมงแล้ว นำออกมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ จากนั้นดูดอาหารทิ้งแล้วละลายตะกอนเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาณ 200 ไมโครลิตร (อาจมากหรือน้อยกว่านี้ แล้วแต่ปริมาณตะกอนเซลล์ที่ได้) ผสมให้ตะกอนเซลล์เข้ากันกับอาหาร แล้ว spread เชื้อลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแอมพิซิลลินและ spread plate ด้วย X-gal แล้ว ปริมาณ plate ละ 100 ไมโครลิตร เสร็จแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง (เลี้ยงข้ามคืน)

5.5 การตรวจยืนยันชิ้นดีเอ็นเอหรือยีนที่อยู่ในพลาสมิดสายผสม หลังจากเพิ่มปริมาณในเซลล์เจ้าบ้านโดยใช้วิธีโคโลนีพีซีอาร์ (Sambrook *et al*., 1989)

ใช้ไม้จิ้มฟันที่ทำการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วนำมาจิ้ม single colony แล้วใส่ลงในหลอดที่เติมน้ำกลั่นไว้แล้วปริมาตร 5 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาเติมสารละลายไพรเมอร์ 2 ชนิดคือไพรเมอร์ T7 ความเข้มข้น 10 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร และไพรเมอร์ SP6 ความเข้มข้น 10 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับทำพีซีอาร์ ความเข้มข้น 10 เท่า (10X PCR buffer : 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 15 mM $MgCl_2$, 500 mM KCl) ปริมาณ 1.5 ไมโครลิตร dNTP mix (ประกอบด้วย : dATP, dCTP, dGTP, dTTP ความเข้มอย่างละ 200 ไมโครโมลาร์) ความเข้มข้นรวม 2.5 mM ปริมาณ 2.0 ไมโครลิตร และเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาณ 0.15 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ 15 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยนำไปหมุนเหวี่ยงในไมโครเซนตริฟิวจ์ 30 วินาที เสร็จแล้วนำสารละลายทั้งหมดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ (Biometra T-gradient) ทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณโดยใช้โปรแกรมดังนี้รอบแรกใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 4 นาที ตามด้วยรอบต่อมา 94 องศาเซลเซียส 1 นาที ตามด้วย 45 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 30รอบ และต่อด้วยตั้งอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที เมื่อสิ้นสุดโปรแกรมตั้งค่าให้อุณหภูมิลดลงมาอยู่ที่ 4 องศาเซลเซียส เมื่อได้ PCR product แล้ว นำไปเช็คผลด้วยการทำอิเล็กโทรโฟริซิสโดยใช้เจลอากาโรสเข้มข้น 1.2 %

5.6 การสกัดแยกพลาสมิดให้บริสุทธิ์

เลือก single colony ที่ตรวจเช็คผล PCR แล้ว มาเลี้ยงในอาหาร LB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใน incubator shaker ที่ความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วนำมาสกัดพลาสมิดสายผสมออกจากเซลล์แบคทีเรียด้วยวิธี alkaline lysis ดัดแปลงจาก Sambrook *et al.* (1989) มีขั้นตอนคือเก็บตะกอนเซลล์โดยการนำอาหาร LB ที่ผ่านการเลี้ยงเซลล์มาถ่ายลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาณ 1.5 มิลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที เทน้ำใสส่วนบนออก ทำซ้ำอีกจนเก็บตะกอนเซลล์ไว้ได้ทั้งหมด นำมาเติม solution I (50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0) ปริมาณ 100 ไมโครลิตร จากนั้น vortex ให้เข้ากัน แล้วเติม solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS) ปริมาณ 200 ไมโครลิตร (พลิกหลอดกลับไปมาให้เข้ากัน 10 ครั้งทันทีหลังจากที่เติม solution II ลงไป) ตามด้วยเติม solution III (3M potassium acetate, 0.2 M gracial acetic acid) ปริมาณ 150 ไมโครลิตร (พลิกหลอดกลับไปมาให้เข้ากัน 10 ครั้งทันทีที่เติม solution III ลงไป) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เสร็จแล้วดูดน้ำใสทั้งหมดใส่หลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยระวังอย่าดูดตะกอนขาวติดมาด้วย เติมเอธานอลบริสุทธิ์ปริมาณ 2.5 เท่าของปริมาตรน้ำใสที่ได้ ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ถึงตรงนี้จะสังเกตเห็นตะกอนพลาสมิดที่ก้นหลอด ให้ดูดส่วนน้ำใสทิ้งไปแล้วเติมเอธานอล 70 % ปริมาณ 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นดูดเอธานอล 70 % ทิ้งให้มากที่สุดโดยทำอย่างระมัดระวังอย่าให้ปลายทิปไปสัมผัสบริเวณตะกอน เสร็จแล้วปล่อยให้ตะกอนแห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง เมื่อแห้งแล้วละลายตะกอนพลาสมิดด้วยน้ำกลั่น เติม RNaseA เพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอ เช็คผลการสกัดด้วยการทำอิเล็กโทรโฟริซิสโดยใช้เจลอากาโรสเข้มข้น 1.2 %

5.7 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ศึกษา

5.7.1 จากหลักการของวิธี Chain termination method ใช้ชุด Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA) โดยนำสารละลายพลาสมิดสายผสมที่สกัดได้จากข้อ 5.6 จำนวน 2 หลอด ปริมาณหลอดละ 0.5 ไมโครลิตรมาเติมสารละลายไพรเมอร์ หลอดละชนิด จำนวน 2 ชนิดคือ T7 และ SP6 ไพรเมอร์แต่ละตัวมีความเข้มข้น 10 พิโคโมลต่อไมโครลิตร

ปริมาณอย่างละ 0.5 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับทำพีซีอาร์ความเข้มข้น 5 เท่า (5x BigDye Sequencing Buffer) ปริมาณ 1 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 2x Ready Reaction Premix ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื่อแล้วให้ได้ 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยนำไปหมุนเหวี่ยงในไมโครเซนตริฟิวจ์ 30 วินาที เสร็จแล้วนำสารละลายทั้งหมดในแต่ละหลอดเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ (Biometra T-gradient) โดยแต่ละไพรเมอร์จะใช้โปรแกรมที่แตกต่างกัน หลอดที่ใส่ไพรเมอร์ T7 ใช้โปรแกรมดังนี้รอบแรกใช้อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส 1 นาที ตามด้วยรอบต่อมา 96 องศาเซลเซียส 10 วินาที 48 องศาเซลเซียส 5 วินาที และ 60 องศาเซลเซียส 4 นาที จำนวน 25 รอบ เมื่อสิ้นสุดโปรแกรมตั้งค่าให้อุณหภูมิลดลงมาอยู่ที่ 8 องศาเซลเซียส ส่วนหลอดที่ใส่ไพรเมอร์ SP6 ใช้โปรแกรมดังนี้รอบแรกใช้อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส 1 นาที ตามด้วยรอบต่อมา 96 องศาเซลเซียส 10 วินาที 41 องศาเซลเซียส 5 วินาที และ 60 องศาเซลเซียส 4 นาที จำนวน 25 รอบ เมื่อสิ้นสุดโปรแกรมตั้งค่าให้อุณหภูมิลดลงมาอยู่ที่ 8 องศาเซลเซียส

5.7.2 ย้ายปฏิกิริยาที่ได้จากข้อ 5.7.1 ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเตรียม ethanol/sodium acetate solution (3M sodium acetate, pH4.6-5.2 ปริมาณ 3 ไมโครลิตร เอธานอล 95% ปริมาณ 62.5 ไมโครลิตร deionized water ปริมาณ 14.5 ไมโครลิตร) ปริมาตรรวม 80 ไมโครลิตร นำสารละลาย ethanol/sodium acetate solution ใส่ลงในหลอดที่เตรียมไว้ ปริมาณ 80 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm นาน 20 นาที เสร็จแล้วดูดสารละลายออกโดยใช้ปิเปต แล้วเติมเอธานอล 70% ปริมาณ 250 ไมโครลิตร นำไป vortex และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm เป็นเวลานาน 5 นาที จากนั้นดูดเอธานอลออกด้วยความระมัดระวังโดยใช้ปิเปต เสร็จแล้วระเหย เอธานอลที่เหลือออกโดยนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อแห้งดีแล้วนำไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะใช้ โดยเติม deionized water ปริมาณ 15 ไมโครลิตรก่อนใช้

5.7.3 นำสารละลายที่ได้ในข้อ 5.7.2 มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้เครื่องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)

5.7.4 การวิเคราะห์ผลลำดับนิวคลีโอไทด์โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละตำแหน่ง เพื่อหาความสัมพันธ์ใกล้ชิดทางพันธุกรรมของกล้วยไม้รองเท้านารีที่ใช้ศึกษา ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ของเครื่องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จะถูกนำมา

ตรวจสอบความถูกต้องและตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ได้ใช้ในการวิเคราะห์ผลออกไปโดยใช้โปรแกรม Bioedit ได้แก่การตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นส่วนของพลาสมิดและไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณยีนจากจีโนมิกดีเอ็นเอออก พร้อมทั้งตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลโดยเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จากไพรเมอร์ T7 และ SP6 ซึ่งเป็น forward primer และ reverse primer ตามลำดับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากวิเคราะห์โดยใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดนี้จะต้องเป็นตำแหน่งที่คู่สมกันทุกตำแหน่ง หากผลลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่ตรงกันที่ตำแหน่งใด ก็จะยึดเอาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากไพรเมอร์ที่มีค่าที่น่าเชื่อถือกว่าเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกต้อง เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของกล้วยไม้รองเท้านารีชนิดต่างๆ ที่พร้อมจะนำไปวิเคราะห์ความใกล้ชิดทางพันธุกรรมแล้ว นำไปวิเคราะห์ต่อโดยใช้โปรแกรม ClustalW (version 1.82) (Chenna *et al*., 2003)

สถานที่และระยะเวลาทำงานวิจัย

สถานที่ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอและไอโซเอนไซม์ กลุ่มงานวิจัยอนุรักษ์พันธุกรรมไม้ป่าและเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพรรณพืช กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช

สถานที่เก็บตัวอย่างกล้วยไม้รองเท้านารีเหลืองกระบี่ที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมกล้วยไม้รองเท้านารีในพระราชดำริ ศูนย์วิจัยข้าวกระบี่ ต.เหนือคลอง อ.เหนือคลอง จ.กระบี่ กล้วยไม้รองเท้านารีชนิดต่างๆที่มีการกระจายพันธุ์ในประเทศไทยได้รับจากสถานที่รวบรวมกล้วยไม้ของคุณไกรฤทธิ์ เวศวรุต นายกสมาคมกล้วยไม้รองเท้านารีแห่งประเทศไทย กล้วยไม้รองเท้านารีช่องอ่างทองและกล้วยไม้รองเท้านารีพริมูลินัมได้รับจากสถานที่รวบรวมกล้วยไม้ของคุณธนา พานิช

ระยะเวลาทำการทดลองเริ่มการทดลองวันที่ 1 มิถุนายน พ.ศ. 2547 สิ้นสุดการทดลองวันที่ 28 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2549