บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการวิจัย

ยอดอ่อนของกวาว 5 ชนิด (species) ซึ่งเก็บตัวอย่างมาจาก ดอยสุเทพ 2 ชนิด (species) คือ *Pueraria stricta* Kurz. และ *Pueraria wallichii* DC. , กิ่งอำเภอแม่วาง 1 ชนิด (specie) คือ *Pueraria mirifica* A. Shaw & Suvat. , อำเภอแม่ทา จ.ลำพูน 1 ชนิด (specie) คือ *Pueraria allopecuroides* Craib. และ บ้านแม่เหียะใน อ.เมือง 1 ชนิด (specie) คือ *Pueraria phaseoloides* (Roxb.)Benth.

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. เครื่องทำความเย็น ได้แก่ ตู้เย็น สำหรับแช่สารละลาย และตู้แช่ - 20 ^{0} C และ - 70 ^{0} C สำหรับแช่ตัวอย่างพืชทดลอง
2. ชุดสำหรับทำเจลอิเลคโตรโฟรีซีส (Gel electrophoresis)แบบ Slab gel ประกอบด้วยแผ่นแก้ว spacer comb และ chamber
3. เครื่องมือสำหรับอ่านแถบเจลโดยใช้หลอดไฟ (Visible light translumitor)
4. เครื่องเหวี่ยงสารชนิดควบคุมความเย็นได้ (refigerated centrifuge)
5. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply)
6. ชุดสำหรับอิเลคโตรโฟรีซีส (electrophoresis) ชนิดแนวนอน
7. เครื่องหมุนเหวี่ยงขนาดเล็ก
8. เครื่องชั่งไฟฟ้า (electrical balance)
9. เครื่องชั่งแบบละเอียด(analytical balance)

10. เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)

11. เครื่องดูดอากาศ (suction pump)

12. เครื่องคนสารด้วยแม่เหล็ก (magnetic stirrer)

13. เครื่อง PCR (Perkin elmer ; Gene Amp PCR system 2400)

14. Adjustable automatic pipets และ yellow tip ขนาดต่างๆ

15. ถังบรรจุไนโตรเจนเหลว

16. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)

17. เครื่องปั่นสำหรับบดตัวอย่าง

18. Eppendorf tube ขนาด 1.5 ml.

19. เตาไมโครเวฟ

20. เครื่องทำน้ำแข็ง

21. กล่องโฟม

22. incubator

23. เครื่องแก้วต่างๆ เช่น บีเกอร์ ปีเปต กระบอกตวงสาร ขวดรูปชมพู่ แท่งแก้วคนสาร จานทดลองขนาดกลาง ฯลฯ

24. วัสดุอื่นๆ ได้แก่ ถุงมือ ปากคีบ ช้อนตักสาร กระดาษชั่งสาร พลาสติกใสอย่างบาง ถาดพลาสติก alumimium foil พลาสติกสำหรับปิดหลอดทดลอง กล้องถ่ายรูปพร้อมฟิล์ม ฯลฯ

25. เครื่องบันทึกภาพ พร้อมเครื่องพิมพ์ Sony (Colour vedeo printing)

สารเคมี

1. Stock solution

1.1 Acrylamide Stock Solution 30 %

1.2 Ammonium persulfate (APS) 1.5 % (เตรียมก่อนจะใช้)

1.3 Ethylenediaminetetra acetic acid (EDTA) 0.5 M

1.4 Ethyl alcohol 70 %

1.5 Extraction buffer

1.6 Loading buffer

1.7 Magnesium chloride ($MgCl_2$) 1 M

1.8 Nitro Blue Tetrazolium (NBT) 10 %

1.9 β - Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADP) 10 %

1.10 β - Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD) 10 %

1.11 Phenazine Methosulfate (PMS) 10 %

1.12 Piridoxal 5 P 10 %

1.13 Sample buffer (50 % Glyceral., 0.5 % Bromophenol blue)

1.14 Sodium chloride (NaCl) 5 M

1.15 Sodium dodenocyl sulfate (SDS) 30 %

1.16 50 mM Na_2 HPO_4 pH 7.5

1.17 Tris Acetate (TAE buffer) 1X

1.18 Tris Ethylenediaminetetra acetic acid (TE buffer)

1.19 0.5 M Tris - HCl pH 6.8

1.20 3 M Tris - HCl pH 8.8

2. Acetone

3. Agarose

4. 3 - Amino - 9 - Ethyl Carbazole (3A9EC)

5. Aspartic acid
6. Chloroform
7. DL- Dithiothreitol (DTT)
8. Ethidium bromide
9. Eugenol
10. Fast Blue BB
11. Hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB)
12. Hydrogen peroxide (H_2O_2)
13. Isoamyl alcohol
14. Isopropanal
15. L - glutamic acid
16. L - Leucin β naphtyl acid
17. L - malic acid
18. N, N, N', N' - tetramethyl ethyienediamine (TEMMED)
19. Phenol
20. Polyvinyl pyrrolidone (PVP)
21. Polyvinyl polypyrrolidone (PVPP)
22. Taq polymerase
23. RNase
24. α - ketoglutaric acid
25. α and β naptylacetate
26. O - Dianisidine Salt

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

วิธีการวิจัย

1.การเตรียมพืชทดลอง

เก็บตัวอย่างพืชจากแหล่งต่าง โดยเลือกเก็บเฉพาะส่วนที่เป็นยอดอ่อน นำมาแช่ในไนโตรเจนเหลวและนำมาบดให้ละเอียดจากนั้นห่อด้วย aluminium foil นำไปเก็บไว้ในตู้แช่ - 20^{0}C เพื่อนำมาใช้ในการสกัดไอโซไซม์

2. การสกัดพืชทดลอง

2.1 การสกัดไอโซไซม์

นำตัวอย่างกวาวที่บดไว้มาสกัดไอโซไซม์โดยใช้ Extraction buffer ตัวอย่างกวาวที่ใช้ 0.5 กรัม ต่อ สารละลาย 1 ml และ PVPP 10 กรัม นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้า 1 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4^{0}C (Bradford ,1976) นำสารละลายที่ได้ใส่ใน Eppendrof tube เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4^{0} C เพื่อนำไปทำ อิเลคโตรโฟรีซีส(electrophoresis) โดยใช้ polyacrylamide gel ศึกษาเพื่อศึกษารูปแบบของไอโซไซม์ (Zymogram) และ Dendrogram ของ ไอโซไซม์ เอสปาเทต อะมิโนทรานสเฟอเรส (Aspartate amino transferase : AAT or GOT) , เอสเทอเรส (Esterase : EST) , ลิวซีน อะมิโน เปบติเดส (Leucine amino peptidase : LAP) , มาเลทดีไฮโดรจีเนส (Malate dehydrogenase : MDH) และ เพอร์ออกซิเดส (Peroxidase : POX)

2.2 การเตรียม ดี เอ็น เอ

ในการวิจัยครั้งนี้การเตรียม ดี เอ็น เอ มี 2 วิธี ดังนี้

รูปที่ 1 แสดงขนาดยอดอ่อนของกวาวที่นำมาใช้ในการวิจัย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

2.2.1 การเตรียม ดี เอ็น เอ โดยปรับปรุงจากวิธีของ Weissing *et. al.*

นำตัวอย่างกวาวที่บดละเอียดแล้วประมาณ 3 กรัม ใส่ในหลอดพลาสติกที่ใช้สำหรับเครื่องหมุนเหวี่ยงใส่ Extraction buffer 15 ml นำไป incubate ใน water bath ที่ระดับอุณหภูมิ 60^{0}C นาน 30 นาที (เขย่าหลอดทุกๆ 5 นาที) จากนั้นเติมสารละลาย Chloroform Isoamyl alcohol นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 g อุณหภูมิ 4^{0}C นาน 20 นาที ใช้ปิเปตดูดเอา aqueous phase ออกมาใส่หลอดสำหรับหมุนเหวี่ยง จากนั้นใส่ isopropanol ลงไป 1 เท่า (v/v) นำไปตกตะกอน ดี เอ็น เอ ค้างคืนที่อุณหภูมิ - 20 ^{0}C เพื่อให้ ดี เอ็น เอ ตกตะกอน นำหลอดที่ทิ้งให้ตกตะกอนข้ามคืนมาหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 g อุณหภูมิ 4 ^{0}C นาน 20 นาที เทของเหลวในหลอดออกแล้วคว่ำหลอดให้สะเด็ดน้ำ (air dry) ระวังอย่าให้ตะกอนข้างหลอดหลุดออกมา ล้างตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ 70 % โดยใส่ลงในหลอดให้แอลกอฮอล์ท่วมตะกอน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงนาน 10 นาที เพื่อล้างตะกอนและเกลือที่ตกค้างออก เทแอลกอฮอล์ทิ้ง เติมน้ำกลั่น 600 μl เพื่อละลายตะกอน นำไปเก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อให้ส่วนของ ดี เอ็น เอ ที่อยู่ในตะกอนละลายออกมา (เก็บไว้ 12 ชม.) หลังจากนั้นดูดสารละลายในหลอดออกมาใส่ Eppendrof tube ทำ Phenol extraction และ Chloroform extraction อย่างละ 1 ครั้ง นำสารละลายที่ได้มาใส่ NaCl 0.5 M 50 μl และ isopropanol 1 เท่าของสารละลาย (v/v)นำไปเก็บในตู้ที่มีอุณหภูมิ - 20^{0} C นาน 12 ชั่วโมง เพื่อให้ ดี เอ็น เอ ตกตะกอน นำไปหมุนเหวี่ยง 3 นาที แล้วล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70 % นำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง คว่ำหลอดให้สะเด็ดน้ำ (air dry) ละลายตะกอนด้วย TE buffer นำไปสกัดเอา อาร์ เอ็น เอ ออกโดยใช้ RNase หลัง

จากนั้นนำ ดี เอ็น เอที่ได้ไปตรวจดูปริมาณของ ดี เอ็น เอ โดยการทำ อิเลคโตรโฟรีซีส(electrophoresis) บน Agarose gel และย้อมด้วย Ethidium bromide นำเจลไปดูด้วย UV Transluminator หลังจากนั้นนำ ดี เอ็น เอ ที่ได้ไปเก็บไว้ในตู้ที่มีอุณหภูมิ - 20^{0}C เพื่อเก็บไว้สำหรับทำ PCR ต่อไป

2.2.2 การเตรียม ดี เอ็น เอ โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Doyle and Doyle นำตัวอย่างกวาวที่บดละเอียด 0.5 กรัม ใส่ในหลอด Eppendrof tube เติมสารละลาย extraction buffer 400 μl เขย่านาน 1 นาที แล้วนำไป incubate ที่ 60^{0}C นาน 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยง 3 นาที ดูดเอา aqueous phase ออกมา ใส่หลอดใหม่ สกัดด้วย chloroform isoamyl alcohol (24 : 1) 3 ครั้ง หรือจนกว่าจะหมดสีเขียวของคลอโรฟิลล์ ดูดสารละลายออกมาเติมด้วย isoprppanol 1 เท่า (v/v) ทิ้งไว้ให้ตกตะกอน 1 คืน นำมาหมุนเหวี่ยงให้เหลือเฉพาะตะกอนล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70 % นำมาทำคว่ำให้สะเด็ดน้ำ (air dry) ละลายตะกอนด้วย น้ำกลั่น 150 μl ย่อย อาร์ เอ็น เอ ออกด้วย RNase หลังจากนั้นทำ phenol extraction และ chloroform extraction อย่างละ 1 ครั้ง ดูดสารละลายที่ได้ใส่หลอดใหม่ เติม isopropanol 1 เท่า (v/v)ทิ้งให้ตกตะกอนค้างคืน นำมาหมุนเหวี่ยงแล้วล้างด้วย แอลกอฮอล์ 70 % คว่ำหลอดให้สะเด็ดน้ำ (air dry) ละลายด้วย TE buffer 50 μl หลังจากนั้นนำ ดี เอ็น เอไปตรวจปริมาณโดยทำอิเลคโตรโฟรีซีส (electrophoresis) บน Agarose gel และ นำ ดี เอ็น เอ ที่ได้ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 20 ^{0} C เพื่อทำ PCR ต่อไป

3. การเลือกใช้ Primers

การเลือกใช้ Primers ในปฏิกิริยา PCR ใช้ Arbitary primer จากบริษัท Operon Technologies Alameda California USA. (ภาคผนวก)

4. ปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction)

ใส่สารละลาย 25 μl ลงในหลอดสำหรับทำ PCR ซึ่งประกอบด้วย 1X buffer , 2 mM $MgCl_2$, 150 μM dNTP (dATP , dCTP , dGTP , dTTP) , Primer 40 ng และ ดี เอ็น เอ (DNA template) ~ 10-15 ng นำหลอดไปใส่ในเครื่อง PCR ทำ Hot strat 1 นาทีเติม Taq polymerase 1 unit หลังจากนั้นจะเข้าสู่ปฏิกิริยา PCR ตามเงื่อนไขดังนี้

ตารางที่ 1 PCR condition

อุณหภูมิ (^{0}C)	:	93	34	72	;	93	36	72	;	93	37	72	;	72	;	4
เวลา (min.)	:	1	1	2	;	1	1	3	;	1	1	2	;	5	;	α
จำนวนรอบ (cycle) :			2		;		2		;		36					

นำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ไปทำอิเลคโตรโฟรีซีส (electrophoresis) บน Agarose gel 2 % หลังจากนั้นจึงนำผลไปดูแบบแผนของลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ (DNA fingerprint) ด้วย UV transluminitor พร้อมทั้งบันทึกภาพเพื่อนำแบบแผนของลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ (DNA fingerprint) ของตัวอย่างกวาวมาเปรียบเทียบเพื่อศึกษาความแตกต่าง

รูปที่ 2 เครื่อง PCR (Perkin elmer ; Gene Amp PCR system 2400)

5. การเตรียม Slab Gel

5.1 ต่อชุดแผ่นแก้วสำหรับทำ slab gel ใช้ spacers เป็นตัวปรับความหนาของเจล ตามความต้องการ คำนวนปริมาณของสารละลายที่จะใช้ในการเตรียมเจล โดยใส่ stacking gel (upper) ที่มีความสูงประมาณ 1 - 2 เซนติเมตร ไว้ด้านบนของ seperating gel (lower)

5.2 เตรียมสารละลายที่จะใช้ในการเตรียมเจล 2 ชุด คือ ส่วนที่เป็น seperating gel และ stacking gel ที่มีความเข้มข้นของ acrylamide 10 % และ 6 % ตามลำดับโดยผสมสารต่างๆตามตารางดังนี้

ตารางที่ 2 สูตรสำหรับ Native - PAGE discontinous system Davis (1964)

Lower (seperating) gel (10 %) ;	H_2O	4.8 ml
	Acrylamide 30 %	3.3 ml
	Tris - HCl 3 M pH 8.8	1.25 ml
	APS 1.5 %	0.5 ml
	TEMED	15 μl
Upper (stacking) gel (6 %) ;	H_2O	2.7 ml
	Acrylamide 30 %	0.75 ml
	Tris - HCl 3 M pH 6.8	1.25 ml
	APS 1.5 %	0.25 ml
	TEMED	10 μl

ผสมสารต่างเข้าด้วยกันตามลำดับ ยกเว้น APS และ TEMED ซึ่งจะใส่หลังจากดูดอากาศซึ่งแทรกอยู่ในสารละลายออกโดยใช้เครื่องดูดอากาศ (air suction) ประมาณ 15 นาที

5.3 หลังจากดูดอากาศออกหมดแล้วนำสารละลายที่เตรียมสำหรับ seperating gel มาเติม APS และ TEMED เขย่าให้สารละลายผสมกันดีแล้วค่อยๆเทสารละลายลงไประหว่างแผ่นแก้วที่เตรียมไว้ เมื่อได้ความสูงของเจลตามที่ต้องการแล้ว จากนั้นค่อยๆหยอด

น้ำกลั่นให้คลุมผิวหน้าเจล ทิ้งไว้ให้เจล แข็งตัว ซึ่งสังเกตได้จากรอยต่อระหว่างเจลกับน้ำกลั่นที่คลุมผิวหน้าเจล อยู่ ค่อยๆซับน้ำกลั่นออกให้หมด

5.4 นำสารละลายที่เตรียมไว้สำหรับ stacking gel ออกจากเครื่องดูดอากาศมาเติมสาร APS และ TEMED เขย่าเบาๆให้สารละลายผสมกันดี จากนั้นนำมาเทลงไประหว่างแผ่นแก้วที่เตรียม seperating gel ไว้แล้ว เทให้สูงประมาณ 2 เซนติเมตร (ในการเทเจลทั้ง 2 ครั้งต้องระวังไม่ให้มีฟองอากาศเกิดขึ้น) จากนั้นเสียบ comb ลงไปใน stacking gel เพื่อให้เกิดช่องว่างสำหรับหยอดตัวอย่างที่สกัดได้จากพืช ทิ้งไว้ประมาณ 25 - 30 นาที เพื่อให้เจลแข็งตัว

5.5 ดึง comb ออกจาก stacking gel จะเห็นช่องสำหรับหยอดตัวอย่าง หยอดน้ำกลั่นลงไปในช่องว่างเหล่านั้น เพื่อล้างเศษเจลที่ตกค้างอยู่ออกให้หมด เพื่อสะดวกในการหยอดตัวอย่าง ใช้กระดาษทิชชู ซับน้ำออกให้หมด

รูปที่ 3 Slab gel สำหรับการทำอิเลคโตรโฟรีซีส (electrophoresis)ในเทคนิคไอโซไซม์

6.การเตรียมแผ่น Agarose gel

6.1 นำถาดเจล มาปิดขอบด้านปลายทั้ง 2 ด้านให้แน่นหนาด้วยเทปพลาสติก

6.2 วางหวีเสียบ (comb) ลงที่ปลายข้างหนึ่ง เพื่อให้เจลที่แข็งตัวมีช่องเล็กๆ (well) ที่จะใช้ในการหยอดตัวอย่างสารละลาย ดี เอ็น เอ ที่ต้องการตรวจสอบลงได้

6.3 ชั่ง Agarose ผสม TAE Buffer 1X ลงไป ให้ได้ความเข้มข้นของเจล 2 % ต้มจนเดือดเพื่อให้ Agarose หลอมละลาย

6.4 เท Agarose เหลวลงในพิมพ์ให้ได้แผ่นเจลที่มีความหนาประมาณ 3 - 5 มม. โดยไม่ให้มีฟองอากาศ ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว

6.5 เมื่อ Agarose แข็งตัวดีแล้ว ดึง comb ออกอย่างระวัง ดึงเทปกาวออกหลังหลังจากนั้นนำเจลไปเก็บไว้ทำ อิเลคโตรโฟรีซีส(electrophoresis) เพื่อตรวจสอบ ดี เอ็น เอ และ แบบแผนของลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ (DNA fingerprint) ต่อไป

รูปที่ 4 Agarose gel สำหรับทำอิเลคโตรโฟรีซีส (electrophoresis) ดี เอ็น เอ

7. การทำอิเลคโตรโฟรีซีส (electrophoresis)ในเทคนิคไอโซไซม์

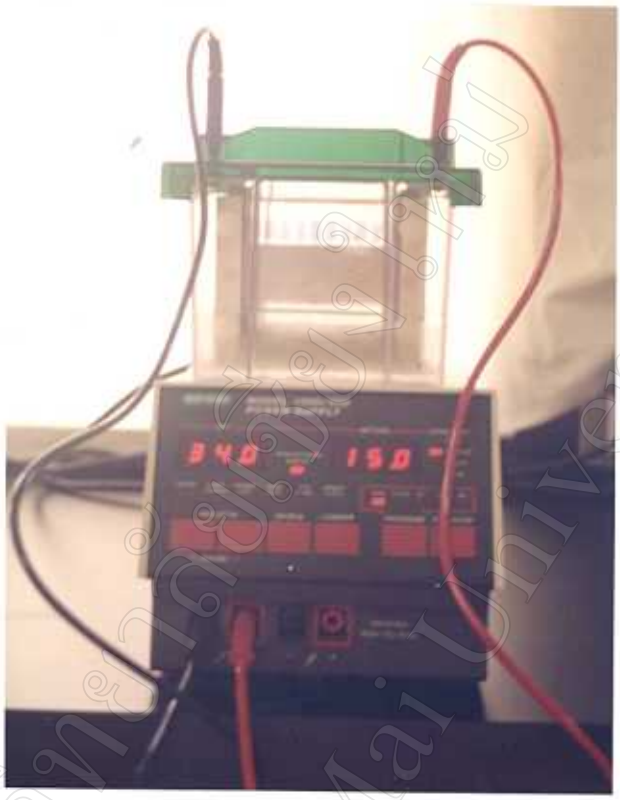
7.1 ต่อชุดอิเลคโตรโฟรีซีสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติม Running Buffer ลงไประหว่างแผ่นแก้วและใน Chamber

7.2 ใส่สารสกัดจากตัวอย่างพืชที่ผสมไว้กับ sample buffer โดยใช้เข็มหยอดตัวอย่างค่อยๆหยอดตัวอย่างผ่าน buffer ลงในช่องของเจล

7.3 ต่อขั้วอิเลคโทรดเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Power supply) โดยต่อขั้วลบเข้ากับ chamber บน และขั้วบวกเข้ากับ chamber ล่าง เปิดสวิทซ์เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยให้กระแสคงที่ ที่ 12.5 mA สำหรับ stacking gel และ 25 mA สำหรับ seperating gel (150 - 200 V) เมื่อเห็นสีของ bromophenol blue เคลื่อนที่มาจนถึงด้านล่างของเจล ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง

5.4 นำแผ่นแก้วออกจาก chamber แล้วนำแผ่นเจลที่อยู่ระหว่างแผ่นแก้วออกมาเพื่อนำไปย้อมและตรวจหาตำแหน่งของไอโซไซม์ต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



รูปที่ 5 แสดงการทำอิเลคโตรโฟรีซีส (electrophoresis)เทคนิคไอโซไซม์

8. การทำอิเลคโตรโฟรีซีส (electrophoresis) สำหรับ ดี เอ็น เอ

8.1 นำถาด Agarose gel วางในอ่าง อิเลคโตรโฟรีซีส(electrophoresis) ให้ด้านที่มี well อยู่ใกล้ขั้วลบ

8.2 เท Bufferลงในอ่างให้ท่วมเจลพอสมควร (ผิวเจลอยู่ใต้ Buffer ประมาณ

1-5 มม.) หยดสารละลาย Ethidium bromide ประมาณ 3 μl ลงใน Buffer(เพื่อให้ ดี เอ็น เอ ติดสีของ Ethidium bromide เมื่อนำเจลไปศึกษาโดยใช้ UV transluminator จะทำให้เห็นแถบของ ดี เอ็น เอได้ชัดเจน)

8.3 ผสม Loading buffer กับสารละลาย ดี เอ็น เอ แล้วค่อยๆหยอดสารละลายลงไปใน well ของ Agarose gel ที่เตรียมไว้ ซึ่งสารละลายจะจมลงก้นของ well

8.4 ปิดฝาอ่างและต่อขั้วไฟฟ้าให้เรียบร้อย แล้วจึงปล่อยกระแสไฟฟ้า ซึ่งจะขึ้นอยู่กับความยาวของ เจล โดยให้กระแสวิ่งจากขั้วลบไปขั้วบวก

8.5 เมื่อเห็นสีของ loading buffer เคลื่อนที่ไปอยู่ที่ปลายเจล จึงปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

8.6 นำแผ่นเจลมาส่องดูแถบของ ดี เอ็น เอ (DNA banding) ด้วย UV transluminator

รูปที่ 6 แสดงการทำอิเลคโตรโฟร์ซีส (electrophoresis)เพื่อตรวจสอบ ดี เอ็น เอและ ลายพิมพ์ ดี เอ็น เอ

9. การย้อมสีไอโซไซม์ในเจล

เตรียมสารละลายสำหรับย้อมไอโซไซม์แต่ละตัว จากนั้นนำเจลมาใส่ในจานเพาะเชื้อขนาดกลางที่มีสารละลายสำหรับย้อมอยู่ ในการย้อมไอโซไซม์ EST ต้องนำไปบ่ม (incubate) ในที่มืดประมาณ 20 - 30 นาทีก็จะปรากฏแถบสี สำหรับ GOT LAP และ MDH ต้องนำไปบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C ทิ้งไว้ประมาณ 20 - 60 นาที จนปรากฏแถบ และในการย้อมไอโซไซม์ POX จะวางบนเครื่องเขย่าและที่ที่มีแสงสว่างจนปรากฏแถบ (ตามภาคผนวก)

10. การบันทึกข้อมูล

บันทึกผลเจลที่ย้อมสีแล้วโดยถ่ายภาพและนำมาศึกษา ตำแหน่ง ขนาด จำนวน และความเข้มของแถบสี และนำค่าการมีแถบสีและไม่มีแถบสีมาวิเคราะห์กลุ่ม

การวิเคราะห์กลุ่ม (cluster analysis) โดยใช้ไอโซไซม์ กำหนดตัวอย่างพืชเป็น operational taxonomic units (OTU' S) และแถบสีเป็นลักษณะ (character) ค่าที่ใช้ในการวิเคราะห์ได้จากค่าการมีแถบสีหรือไม่มีแถบสีของแต่ละตำแหน่ง (loci) แล้วแปลงค่าเป็น 1 และค่าไม่มีแถบสีเป็น 0 (Sneath and Sokal, 1973) วิเคราะห์ความแตกต่างของตัวอย่างกวาวโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS release 6.0(FOR WINDOW)

การวิเคราะห์กลุ่มพืชโดยเทคนิค RAPD โดยเปรียบเทียบจากแบบแผนของลายพิมพ์ดี เอ็น เอ (DNA fingerprint)ของตัวอย่างกวาวที่ปรากฏบนเจลจากการใช้ primer แต่ละชนิด

11. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเคมี หน่วยวิจัยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

12. ระยะเวลาในการวิจัย

เริ่มทำการวิจัยตั้งแต่ เดือนมิถุนายน 2537 และสิ้นสุดการวิจัยเดือนสิงหาคม 2539

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University