# บทที่ 3
# วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

## วัสดุ อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

### 1. ตัวอย่างพืช

ใบอ่อนของลิ้นจี่จำนวน 20 พันธุ์ โดยได้รับความอนุเคราะห์จากแปลงรวบรวมพันธุ์ลิ้นจี่ของศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย อำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย และสถานีทดลองพืชสวนฝาง อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ (ภาคผนวก) ในการทดลองใช้ใบอ่อนของลิ้นจี่ที่คลี่เต็มที่อายุไม่เกิน 2 สัปดาห์ (ภาพ 1)

ภาพ 1 ใบอ่อนของลิ้นจี่ที่ใช้ในการวิจัย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

2. อุปกรณ์

1. เครื่อง PCR (Perkin Elmer ; Gene Amp PCR system 2400)
2. ถังบรรจุไนโตรเจนเหลว
3. เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง
4. หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
5. ตู้ดูดไอพิษ (toxicap)
6. โกร่งบดตัวอย่าง
7. ตู้บ่ม (incubator)
8. เครื่องทำน้ำแข็ง
9. เครื่องทำความเย็น ได้แก่ ตู้เย็น ตู้แช่ -20 $^{o}$C และตู้แช่ -70 $^{o}$C
10. Water bath
11. Hot plate
12. เครื่องเขย่า
13. เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)
14. เครื่องปั่นผสม (magnetic stirrer)
15. Vortex mixer
16. เครื่องดูดอากาศ (suction pump)
17. เครื่องชั่งแบบละเอียด
18. เตาไมโครเวฟ
19. ชุดอุปกรณ์อิเลคโตรโฟรีซีสชนิดแนวนอน (บริษัท BIO-RAD)
20. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply) (บริษัท BIO-RAD)
21. Adjustable automatic pipets และ yellow tip ขนาดต่าง ๆ
22. Eppendorf tube
23. Spectrophotometer (Beck man) รุ่น DU - 7500
24. UV transilluminator (BIO - RAD Mini - Transilluminator)
25. Sony color video camera (CCD - IRIS/RGB) รุ่น DXC - 151AP
26. Sony color video printer รุ่น PVM - 1453MD
27. กล้องถ่ายรูปพร้อมฟิล์ม
28. เครื่องแก้วต่าง ๆ ได้แก่ บิกเกอร์ ปิเปต กระบอกตวง ขวดรูปชมพู่ แท่งแก้วคนสาร ฯลฯ

29. วัสดุอื่น ๆ ได้แก่ ถุงมือ ปากคีบ ช้อนตักสาร กระดาษชั่งสาร พลาสติกใสอย่างบาง ถุงพลาสติก ถาดพลาสติก aluminium foil กล่องโฟม syringe ฯลฯ

**3. สารเคมี**

1. Hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB)
2. Polyvinyl polypyrrolidone (PVPP)
3. Sodium chloride (NaCl)
4. Ethylenediaminetetra acetic acid (EDTA)
5. Tris [hydroxymethyl] aminomethane (Tris)
6. 2 - mercaptoethanol
7. Chloroform
8. Isoamyl alcohol
9. Isopropanol
10. Ethyl alcohol
11. RNase ONE™ ribonuclease (บริษัท Promega, USA)
12. Phenol *
13. 8 - hydroxy quinolone
14. Hydrochloric acid (HCl)
15. Sodium hydroxide (NaOH)
16. Glacial acetic acid
17. Ethidium bromide *
18. Bromophenol blue
19. Xylene cyanol FF
20. Sucrose
21. Reaction buffer (บริษัท Promega, USA)
22. Magnesium chloride ($MgCl_2$) (บริษัท Promega, USA)
23. Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs) (บริษัท Promega, USA)
24. Primer (บริษัท Operon Technology, Alamada USA)
25. Tag DNA polymerase (บริษัท Promega, USA)

26. Liquid nitrogen

27. Agarose (บริษัท Promega)

28. Agar

* วิธีเตรียมอยู่ในภาคผนวก

## วิธีการวิจัย

1. การเตรียม DNA

1.1 การเตรียมพืชทดลอง

นำใบอ่อนของลิ้นจี่มาบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลวด้วยโกร่ง จากนั้นห่อด้วย aluminium foil แล้วนำไปเก็บในตู้แช่ -70 $^{o}$C เพื่อใช้ในขั้นตอนการสกัด DNA

1.2 การสกัด DNA

ในการวิจัยครั้งนี้ใช้วิธีการสกัด DNA โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Doyle and Doyle (1990) Weising *et al.* (1991) และ Adato *et al.* (1995) มีวิธีการดังต่อไปนี้

1.2.1 นำตัวอย่างใบลิ้นจี่ที่บดละเอียดประมาณ 0.1 g.ใส่ใน eppendorf tube ขนาด 1.5 ml. เติม extraction buffer [4 % (w/v) CTAB 1 % (w/v) PVPP 100mM Tris - HCl pH8.0 20mM EDTA 1.4M NaCl 0.1 % (v/v) 2 - mercaptoethanol] ปริมาตร 400 µl. เขย่าอย่างแรง ด้วย vortex mixer แล้วนำไป incubate ใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 $^{o}$C เป็นเวลา 60 นาที

1.2.2 นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm. เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดเอาส่วน supernatant ใส่ eppendorf tube ใหม่

1.2.3 สกัดด้วย chloroform isoamyl alcohol (24:1) เพื่อให้ DNA บริสุทธิ์ขึ้น โดยเติม chloroform isoamyl alcohol 1 เท่า (v/v) ลงในสารละลาย ผสมให้เข้ากันโดยคว่ำหลอดไปมา (inversion) แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm. เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดเอา supernatant ใส่หลอดใหม่ ขั้นตอนนี้ให้สกัดด้วย chloroform isoamyl alcohol จนได้สารละลายใส

1.2.4 ตกตะกอน DNA ด้วย isopropanol 1 เท่า (v/v) ที่อุณหภูมิ -70 $^{o}$C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

1.2.5 นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm. เป็นเวลา 5 นาที ให้เหลือเฉพาะตะกอน DNA ล้างตะกอน DNA ด้วย 70 % ethyl alcohol แล้วนำมาคว่ำไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

1.2.6 ละลายตะกอน DNA ด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 150 µl. เขย่าเบา ๆ ให้ตะกอนละลายหมดแล้วเติม RNase ONE™ ribonuclease จำนวน 5 units/หลอด นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 - 5 ชั่วโมง หรือค้างคืน

1.2.7 สกัดด้วย phenol เพื่อให้ DNA บริสุทธิ์ขึ้น โดยเติม phenol 1 เท่า (v/v) ลงในหลอดสารละลาย ผสมให้เข้ากัน โดยการคว่ำหลอดไปมา แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm. เป็นเวลา 5 นาที ดูดเอาส่วน supernatant ใส่หลอดใหม่ ขั้นตอนนี้ให้สกัดด้วย phenol จนได้สารละลายใส

1.2.8 สกัด phenol ออกด้วย chloroform โดยเติม chloroform 1 เท่า (v/v) ผสมให้เข้ากัน โดยการคว่ำหลอดไปมา แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm. เป็นเวลา 5 นาที ดูดเอาส่วน supernatant ออกมาใส่หลอดใหม่

1.2.9 ตกตะกอน DNA ด้วย isopropanol 1 เท่า (v/v) ที่อุณหภูมิ -70 °C เป็นเวลา 2 - 3 ชั่วโมง

1.2.10 นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm. เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอน DNA แล้วล้างตะกอน DNA ด้วย 70 % ethyl alcohol จากนั้นทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงละลายตะกอน DNA ด้วย TE buffer ปริมาตร 50 µl. นำไปเก็บอุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

1.3 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ DNA

นำ DNA ที่สกัดได้ มาตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธี agarose gel electrophoresis จากนั้นนำ DNA มาวัดปริมาณด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 nm. แล้วคำนวณหาความเข้มข้นและปรับให้เจือจางได้ปริมาณที่พอเหมาะกับการทำ PCR ต่อไป

2. ปฏิกิริยา PCR (Polymerase Chain Reaction)

2.1 การเลือกใช้ primers

ทำการสุ่มใช้ arbitary primers ความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ จากบริษัท Operon Technology, Alamada USA จำนวน 69 primers (ภาคผนวก)

2.2 องค์ประกอบในปฏิกิริยา PCR

ใส่สารละลายปริมาตร 25 µl. ลงใน eppendorf tube ขนาด 0.2 ml. ซึ่งสารละลายนั้นประกอบด้วย 1x reaction buffer (10mM Tris - HCl pH 8.8 50 mM KCl 0.1 % TritonX-100), 2 mM $MgCl_2$ dNTPs(dATP dCTP dGTP dTTP) อย่างละ 150 µM primer 40 ng. และ DNA ต้นแบบ 10 - 25 ng. หลังจากนั้นนำ eppendorf tube ที่บรรจุสารละลายใส่ในเครื่อง

PCR (Perkin Elmer ; Gene Amp PCR system 2400) (ภาพ 2) เพื่อทำ hot start ที่อุณหภูมิ 93 °C เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาชั่วคราว เพื่อเติม Tag DNA polymerase 1 unit/reaction

2.3 เงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR (PCR condition)

หลังจากเติม Tag DNA polymerase แล้วจึงเริ่มเข้าสู่ปฏิกิริยา PCR ตามเงื่อนไขต่อไปนี้ (ตาราง 3)

ตาราง 3 เงื่อนไขปฏิกิริยา PCR

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| อุณหภูมิ (°C) | : | 93 | 34 | 72 | ; | 93 | 36 | 72 | ; | 93 | 37 | 72 | ; | 72 | ; | 4 |
| เวลา (นาที) | : | 1 | 1 | 2 | ; | 1 | 1 | 2 | ; | 1 | 1 | 2 | ; | 5 | ; | $\alpha$ |
| จำนวนรอบ(รอบ) | : | | 2 | | ; | | 2 | | ; | | 36 | | ; | | | |

จากนั้นจึงนำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ไปทำ agarose gel eletrophoresis ต่อไป

ภาพ 2 เครื่อง PCR (Perkin Elmer ; Gene Amp system 2400)

3. agarose gel electrophoresis

3.1 การเตรียมแผ่น agarose gel

3.1.1 เตรียม agarose เข้มข้น 2 % โดยชั่ง agarose ผสมลงใน 1x TAE buffer ต้มจน agarose ละลาย

3.1.2 ทำความสะอาดถาด gel ขนาด 15 x 20 cm. และหวีเสียบ (comb) ให้สะอาดด้วย 70 % ethyl alcohol แล้วใช้เทปพลาสติกใสปิดขอบถาดทั้ง 2 ด้าน

3.1.3 วางหวีเสียบลงที่ปลายข้างหนึ่งของถาด gel เพื่อให้เกิดช่องเล็ก ๆ (well) เมื่อ agarose แข็งตัว สำหรับหยอดตัวอย่างสารละลาย DNA ที่ต้องการตรวจสอบลงไป

3.1.4 เท agarose ที่หลอมละลายแล้วลงในถาด gel ที่เตรียมไว้ โดยให้แผ่น agarose gel มีความหนาประมาณ 3 - 5 mm. ตั้งทิ้งไว้ให้แข็งตัว

3.1.5 เมื่อ agarose gel แข็งตัวแล้ว ดึงหวีเสียบออก จากนั้นใช้พลาสติกใสหุ้มเก็บในตู้เย็น เพื่อใช้ทำอิเลคโตรโฟรีซีสต่อไป

3.2 การ run agarose gel electrophoresis

3.2.1 นำแผ่น agarose gel ที่เตรียมไว้มาแกะพลาสติกออก วางลงในอ่างอิเลคโตรโฟรีซีส โดยให้ด้านที่มีช่องสำหรับหยอดตัวอย่างอยู่ใกล้ขั้วลบ

3.2.2 เท 1x TAE buffer ที่ผสม ethidium bromide จำนวน 1 µg./ml ลงในอ่างให้ท่วมแผ่น agarose gel ( ผิว agarose gel อยู่ใต้ TAE buffer ประมาณ 1 -3 mm.) เพื่อให้สามารถมองเห็นแถบ DNA ที่ติดสีของ ethidium bromide เมื่อนำแผ่น agarose gel ไปตรวจดูด้วยเครื่อง UV transilluminator

3.3.3 ผสม loading buffer กับสารละลาย DNA ที่ต้องการตรวจสอบให้เข้ากัน ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลาย แล้วค่อย ๆ หยอดลงในช่องของ agarose gel ที่เตรียมไว้

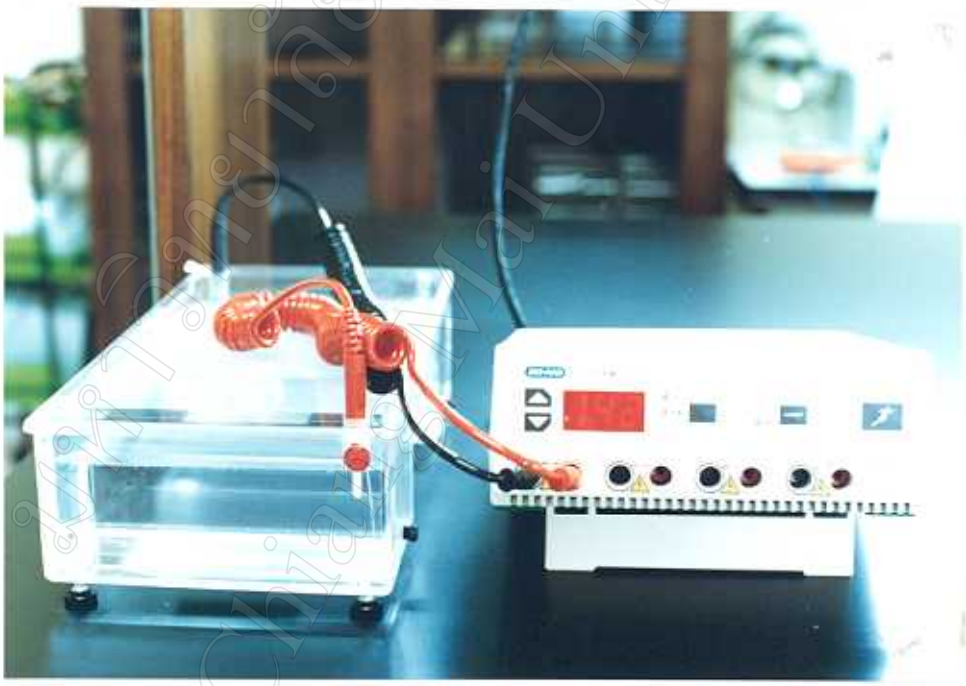
3.3.4 ปิดฝาอ่าง และต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (ภาพ 3) โดยให้กระแสไฟฟ้าวิ่งจากขั้วลบไปหาขั้วบวก ใช้ความต่างศักย์ 60 V กระแสไฟฟ้า 150 mA ใช้เวลาปล่อยกระแสไฟฟ้า 3 - 4 ชั่วโมง หรือเมื่อสังเกตสีของ loading buffer เคลื่อนที่ไปอยู่ที่ปลายของแผ่น agarose gel จึงปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

3.3.5 นำแผ่น agarose gel ไปตรวจดูแถบ DNA ด้วย UV transilluminator พร้อมบันทึกภาพไว้

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

4.1คำนวณน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละแถบ DNA โดยเปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐานของ marker คือ DNA ladder 100 bp.

4.2 ตรวจดูตำแหน่งของการปรากฏแถบ DNA และไม่ปรากฏแถบ DNA ในแบบแผนลายพิมพ์ DNA ของลิ้นจี่แต่ละพันธุ์ ซึ่งการบันทึกผลจะใช้ระบบตัวเลข คือการปรากฏแถบ DNA ให้สัญลักษณ์เป็น 1 และถ้าไม่ปรากฏแถบ DNA ให้สัญลักษณ์เป็น 0 โดยทำการบันทึกทุกตำแหน่งของแถบ DNA ในแต่ละ primer ที่ใช้ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างลิ้นจี่แต่ละพันธุ์ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS (cluster analysis) และเสนอเป็น dendrogram แสดงความสัมพันธ์



ภาพ 3 ชุดอุปกรณ์ agarose gel electrophoresis

**สถานที่ทำการวิจัย**

ห้องวิเคราะห์เคมี หน่วยวิจัยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่

**ระยะเวลาทำการวิจัย**

พฤษภาคม 2539 - กันยายน 2541

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University