บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 ตัวอย่างพืช

1.1.1 ลำไยพันธุ์ดอ (*Dimocarpus longan* Lour.) อายุ 10 ปี จากสวนนายทองดี ใจมูล เขตอำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่

1.1.2 ปวยเล้ง (*Spinacea oleracea* L.) พันธุ์ลูกผสม F1 hybrid พันธุ์ HI-UP 6901 จากบริษัทเพื่อนเกษตรกร จำกัด

1.1.3 ข้าว (*Oryza sativa*) พันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จากสถานีวิจัยข้าวสันป่าตอง

1.1.4 พิทูเนีย (*Petunia hybrida*) พันธุ์ Border Gem จากบริษัท Arthur Yates & Co Ltd, Australia

1.2 อุปกรณ์

1.2.1 ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ

1.2.2 เครื่องฆ่าเชื้อหรือตะเกียงแอลกอฮอล์

1.2.3 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) ที่ 10 °C (Conthem รุ่น M 620 RH Number 98509)

1.2.4 หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)

1.2.5 Adjustable automatic pipette และ yellow tip ขนาดต่างๆ

1.2.6 Eppendorf tube ขนาด 1.5 ml และ Multi Ultra PCR tube(Sorenson™ Bioscience, Inc., U.S.A.) ขนาด 0.5 ml และ 0.2 ml

1.2.7 เครื่อง PCR (Perkin Elmer ; Gene Amp PCR system 2400)

1.2.8 ชุดอุปกรณ์อิเล็กโทรโฟรีซีสชนิดแนวนอน (BIO-RAD, U.S.A)

1.2.9 ชุดอุปกรณ์อิเล็กโทรโฟรีซีสชนิดแนวตั้ง (Sequi-Gen® GT, Sequencing cell ; BIO-RAD, U.S.A.)

1.2.10 เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply ; BIO-RAD, U.S.A.)

1.2.11 เครื่องถ่ายภาพดีเอ็นเอโดยแสง UV (UV transilluminator, BIO-RAD Mini-Transilluminator)

1.2.12 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer, Beck man รุ่น DU-7500)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.13 เครื่องปั่นหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (centrifuge)

1.2.14 เครื่องเขย่า (shaker)

1.2.15 เครื่องอบเครื่องแก้ว (hot air oven)

1.2.16 เครื่องทำความเย็น (freezer) ได้แก่ ตู้แช่ 4 °C, –20 °C และ –80 °C

1.2.17 เครื่องปรับอุณหภูมิด้วยน้ำ (water bath)

1.2.18 เครื่องกวนสารละลายด้วยความร้อน (hot plate)

1.2.19 เครื่องกวนผสมด้วยแม่เหล็ก (magnetic stirrer)

1.2.20 เครื่องผสม (vortex mixer)

1.2.21 เครื่องชั่งแบบละเอียด (analytical balance)

1.2.22 เตาไมโครเวฟ (microwave)

1.2.23 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)

1.2.24 ถังบรรจุไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank)

1.2.25 ชุดโกร่งบดตัวอย่าง (mortar and pestle)

1.2.26 เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ บีกเกอร์ขนาดต่างๆ (beakers) ขวดรูปชมพู่ (flasks) กระบอกตวง (cylinders) ปิเปต (pipettes) แท่งแก้วคนสาร (stirrer) ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและขวดฟอกเมล็ด ฯลฯ

1.2.27 วัสดุอื่นๆ ได้แก่ ช้อนตักสาร กระดาษชั่งสาร กระดาษติดฉลาก กระดาษเทปใส กระดาษทิชชู กระดาษเช็ดกระจก aluminium foil ถุงพลาสติกใสชนิดทนร้อน ปากคีบ ถุงมือ กล่องโฟม มีดคัตเตอร์ กรรไกร ฯลฯ

1.2.28 กล้อง polaroid (Polaroid GelCam, U.K.) และฟิล์ม polaroid (Instant black&white film FB-3000B super speedy, FUJIFILM, Japan)

1.2.29 กล้องถ่ายรูปพร้อมฟิล์ม และกล้องดิจิตอล

1.3 สารเคมี

1.3.1 Clorox 10%

1.3.2 Tween20 หรือน้ำยาล้างจาน

1.3.3 อาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS (1962) ดัดแปลง (ภาคผนวก)

1.3.4 5-azacytidine

1.3.5 Potassium Clorate ($KClO_3$)

1.3.6 Liquid nitrogen

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.3.7 Hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB)

1.3.8 Polyvinyl polypyrrolidone (PVPP)

1.3.9 Sodium chloride (NaCl)

1.3.10 Ethylenediaminetetra acetic acid (EDTA)

1.3.11 Tris [hydroxymethyl] aminomethane (Tris)

1.3.12 2-mercaptoethanol

1.3.13 Chloroform

1.3.14 Isoamyl alcohol

1.3.15 Isopropanol

1.3.16 Ethyl alcohol (EtOH)

1.3.17 RNaseONE™ ribonuclease (Promega, U.S.A.)

1.3.18 Phenol

1.3.19 8-hydroxy chinolin

1.3.20 Reaction buffer (Promega, U.S.A.)

1.3.21 Magnesium chloride ($MgCl_2$) (Promega, U.S.A.)

1.3.22 Deoxyribonucleotide triphosphate ($dNTP_s$) (Promega, U.S.A.)

1.3.23 Primer (Primer ; Operon Technology, Alamada, U.S.A.)

1.3.24 *Taq* DNA polymerase (Promega, U.S.A.)

1.3.25 Mineral oil หรือ parafin

1.3.26 Restriction enzymes (*Hpa*II และ *Msp*I ; New England BioLabs, Inc.,U.S.A.)

1.3.27 Hydrochloric acid (HCl)

1.3.28 Sodium hydroxide (NaOH)

1.3.29 Bromophenol blue

1.3.30 Xylene cyanol FF

1.3.31 Sucrose

1.3.32 Boric acid

1.3.33 Tris base

1.3.34 Ethidium bromide

1.3.35 Agarose (Promega, U.S.A.)

1.3.36 Agar

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.3.37 Acrylamide

1.3.38 N,N'-methylene-bisacrylamide (Bis)

1.3.39 Urea

1.3.40 Bind Silane

1.3.41 น้ำยาเคลือบกระจก (Clear view, Dietham Trading Co., Ltd, Thailand)

1.3.42 Ammonium persulphate (APS)

1.3.43 N,N,N',N'-Tetramethylethylethylenediamine (TEMED)

1.3.44 Glacial acetic acid

1.3.45 Silver nitrate ($AgNO_3$)

1.3.46 37% Formaldehyde (HCOH)

1.3.47 Sodium carbonate (Na_2CO_3)

1.3.48 Sodium thiosulfate ($Na_2S_2O_3$)

2. วิธีการทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็นขั้นตอนดังนี้

2.1 การเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อและการเตรียมต้นกล้า

2.1.1 ปวยเล้ง (*Spinacea oleracea* L.)

อ้างอิงจากการวิจัยของนพมณี และคณะ (2543) โดยนำเมล็ดปวยเล้งจำนวน 200 เมล็ด มาฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 70% นาน 30 วินาที แล้วฟอกด้วยคลอรอกซ์ 10% ที่เติม tween 20 ลงไป 3-4 หยด เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง นำเมล็ดปวยเล้งที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Murashige and Skoog (1962) ดัดแปลง ซึ่งไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ขวดละ 20 เมล็ด นำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 40 μmol.$m^{-2}s^{-1}$ นาน 14 ชั่วโมง จนกระทั่งเมล็ดงอกและมีใบจริงเกิดขึ้น จึงย้ายต้นกล้าไปเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962) ดัดแปลง ที่มีการเติมสาร 5-azacytidine หรือสารโพแทสเซียมคลอเรท ตามความเข้มข้นที่กำหนดทั้งหมด 4 กลุ่มๆ ละ 50 ขวด ดังนี้

(1) กลุ่มที่เติมสาร 5-azacytidine ความเข้มข้น 125 μM

(2) กลุ่มที่เติมสารโพแทสเซียมคลอเรทความเข้มข้น 250 μM

(3) กลุ่มที่ไม่เติมสารใด ๆ แต่ให้อุณหภูมิต่ำ 10 °C นาน 20 วัน

(4) กลุ่มควบคุม ไม่เติมสารใด ๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หลังจากนั้นทุก 2 สัปดาห์ ทำการเติมอาหารเหลวสูตร Murashige and Skoog (1962) ดัดแปลง ตามความเข้มข้นที่กำหนดข้างต้น ปริมาณ 10 มิลลิลิตรต่อ 1 ขวด ส่วนกลุ่มที่ได้รับอุณหภูมิต่ำและกลุ่มควบคุมเติมอาหารเหลวที่ไม่มีการเติมสารใด ๆ จากนั้นนำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช จนกระทั่งออกดอก ทำการเก็บตัวอย่างใบปวยเล้งทุก 7 วัน พร้อมทั้งวัดความสูง จำนวนใบต่อต้น น้ำหนักสดของต้น ระยะเวลาที่ใช้ในการออกดอก และเปอร์เซ็นต์การออกดอก

2.1.2 ลำไย (*Dimocarpus longan* Lour.)

การทดลองนี้ได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างใบลำไย จากต้นลำไยพันธุ์ดออายุ 10 ปี ของสวนคุณทองดี ใจมูล เกษตรกรในเขตอำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่ มาใช้ในการศึกษา โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

(1) กลุ่มที่มีการให้สารโพแทสเซียมคลอเรท 1 กิโลกรัมต่อต้น จำนวน 3 ต้น

(2) กลุ่มควบคุม ซึ่งไม่มีการให้สารโพแทสเซียมคลอเรท จำนวน 1 ต้น

ในการเก็บตัวอย่างจะสุ่มเก็บใบอ่อนลำไยจากแต่ละต้นๆ ละ 4 กิ่ง เป็นระยะทุก 10 วัน หลังการให้สาร ไปจนกระทั่งออกดอก

นอกจากนี้ ได้ทำการทดลองในพืชอีก 2 ชนิด ได้แก่ ข้าว และพิทูเนีย ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุม เนื่องจากมีรายงานมาก่อนแล้วว่า สาร 5-azacytidine มีผลไปลดกระบวนการเติมหมู่เมทิลในจีโนมพืชทั้ง 2 ชนิดนี้ ซึ่งจะมีรายละเอียดขั้นตอนการทดลองในพืชแต่ละชนิดดังต่อไปนี้

2.1.3 ข้าว (*Oryza sativa*)

อ้างอิงจากการทดลองของ Cherdshewasart (1998) โดยนำเมล็ดข้าวซึ่งแกะเปลือกแล้ว จำนวน 100 เมล็ด มาฟอกฆ่าเชื้อเช่นเดียวกับการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดปวยเล้ง จากนั้นนำเมล็ดข้าวที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Murashige and Skoog (1962) ดัดแปลง ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต และผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ขวดละ 10 เมล็ด นำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 40 μmol.m^{-2}s^{-1} นาน 14 ชั่วโมง จนกระทั่งเมล็ดงอกจึงย้ายต้นกล้าไปเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962) ดัดแปลง ที่มีการเติมสาร 5-azacytidine ตามความเข้มข้นที่กำหนดทั้งหมด 2 กลุ่ม ๆ ละ 50 ขวด ดังนี้

(1) กลุ่มที่เติมสาร 5-azacytidine ความเข้มข้น 25 μM

(2) กลุ่มควบคุม ไม่เติมสาร 5-azacytidine

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำขวดเพาะไปเลี้ยงในที่มืดเป็นเวลา 5 วัน จากนั้นย้ายขวดเพาะออกจากที่มืดให้ต้นกล้าได้รับแสงนาน 14 ชั่วโมงต่อวัน นาน 2 สัปดาห์ จึงย้ายต้นกล้าออกปลูกในกระถาง ทำการเก็บตัวอย่างใบข้าวทุก 10 วันหลังจากย้ายลงกระถาง พร้อมทั้งวัดความสูง และจำนวนกอ (tiller number) จนกระทั่งข้าวเริ่มออกรวง

2.1.4 พิทูเนีย (*Petunia hybrida*)

อ้างอิงจากการทดลองของ Prakash และ Kumar (1997) และการทดลองของ แก้วกาญจน์ และวิชัย (2542) โดยนำเมล็ดพิทูเนีย จำนวน 150 เมล็ด มาฟอกฆ่าเชื้อเช่นเดียวกับการฟอกฆ่าเชื้อเมล็ดปวยเล้ง จากนั้นนำเมล็ดพิทูเนียที่ฟอกฆ่าเชื้อแล้วไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร Murashige and Skoog (1962) ดัดแปลง ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ขวดละ 25 เมล็ด แล้วนำไปเลี้ยงในห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 40 μmol.m^{-2}s^{-1} นาน 14 ชั่วโมง จนกระทั่งเมล็ดงอกและมีใบจริงเกิดขึ้น จึงย้ายต้นกล้าไปเลี้ยงบนอาหารสูตร Murashige and Skoog (1962) ดัดแปลง ที่มีการเติมสาร 5-azacytidine ตามความเข้มข้นที่กำหนดทั้งหมด 3 กลุ่มๆ ละ 50 ขวด ดังนี้

(1) กลุ่มที่เติมสาร 5-azacytidine ความเข้มข้น 50 μM

(2) กลุ่มที่เติมสาร 5-azacytidine ความเข้มข้น 100 μM

(3) กลุ่มควบคุม ไม่เติมสาร 5-azacytidine

หลังจากนั้น 2 สัปดาห์เติมอาหารเหลวสูตร Murashige and Skoog (1962) ดัดแปลง ตามความเข้มข้นที่กำหนดข้างต้น ปริมาณ 10 มิลลิลิตรต่อ 1 ขวด แล้วเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อต่อนาน 2 สัปดาห์ จากนั้นย้ายปลูกในกระถาง และทำการเก็บตัวอย่างใบพิทูเนียทุก 10 วันหลังจากย้ายปลูก พร้อมทั้งวัดความสูง จำนวนยอดต่อต้น จำนวนใบต่อต้น และเวลาที่ใช้ในการออกดอก ทุก 2 สัปดาห์ หลังจากย้ายปลูก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 การเตรียมดีเอ็นเอ

2.2.1 การเตรียมตัวอย่างพืชทดลอง

นำใบอ่อนของพืชทดลองมาบดให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว จากนั้นห่อผงละเอียดของพืชด้วย aluminium foil แล้วเก็บไว้ในตู้แช่ อุณหภูมิ –20 °C เพื่อนำไปใช้ในการสกัดดีเอ็นเอต่อไป

2.2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

ดัดแปลงตามวิธีของ Doyle and Doyle (1990) มีวิธีการดังต่อไปนี้

- นำ extraction buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 4% (w/v) CTAB, 1%(w/v) PVPP) อุ่นที่ 60 °C ก่อนเติม 0.1% (v/v) 2-mercaptoethanol แล้วนำไปใส่ใน eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (ml) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร (μl) จากนั้นใส่ตัวอย่างพืชที่บดละเอียดแล้วประมาณ 0.1 กรัม (g) เขย่าอย่างแรงด้วย vortex แล้วนำไปอุ่น (incubate) ใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พลิกหลอดกลับไปมาเบาๆ เป็นระยะๆ เมื่อครบ 1 ชั่วโมงจึงนำหลอดออกจาก water bath แล้วทิ้งให้เย็น
- เติม chloroform - isoamyl (24 :1) ปริมาตร 400 μl พลิกหลอดกลับไปมาเบาๆ ก่อนนำไปปั่นหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงดูดเอาเฉพาะส่วนใสด้านบน (supernatant) ใส่หลอดใหม่
- เติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่า(v/v) พลิกหลอดไปมาเบาๆ ทิ้งไว้ให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิ –80°C เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง
- นำมา centrifuge ที่ความเร็ว 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้งไป เหลือไว้เฉพาะส่วนของตะกอน หลังจากนั้นจึงล้างตะกอนโดยเติม 70% ethanol แล้วนำมา centrifuge ที่ความเร็ว 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วคว่ำหลอดทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณภูมิห้อง (air dry)
- ละลายตะกอนด้วย TE buffer 50 μl เขย่าเบาๆ แล้วทิ้งไว้ให้ตะกอนละลายจนหมด จากนั้นเติม RNase A (100 ng/μl) 5 μl บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 15 นาที
- เติม phenol ปริมาตร 1 เท่า (v/v) ลงในหลอดสารละลายดีเอ็นเอ แล้วพลิกหลอดกลับไปมาเบาๆ จากนั้นนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงดูดเอาเฉพาะส่วนที่เป็น supernatant ใส่หลอดใหม่ ในขั้นตอนนี้ถ้าพบว่าสารละลายยังขุ่นอยู่ ให้เติม phenol ปริมาตร 1 เท่า (v/v) แล้วทำตามขั้นตอนข้างต้นจนกว่าสารละลายจะใส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

- เติม chloroform 1 เท่า (v/v) ลงในหลอดสารละลายดีเอ็นเอ แล้วพลิกหลอดกลับไปมาเบาๆ จากนั้นนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงดูดเอาเฉพาะส่วนที่เป็น supernatant ใส่หลอดใหม่ จากนั้นเติม absolute ethanol 2 เท่า (v/v) พลิกหลอดกลับไปมาเบาๆ ทิ้งไว้ให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิ –80°C เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง
- นำมา centrifuge ที่ความเร็ว 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้งไป เหลือไว้เฉพาะส่วนของตะกอน หลังจากนั้นจึงล้างตะกอนโดยเติม 70% ethanol แล้วนำมา centrifuge ที่ความเร็ว 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วคว่ำหลอดทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณภูมิห้อง (air dry) จากนั้นจึงละลายตะกอนดีเอ็นเอที่สกัดได้ ใน TE buffer 50 μl ก่อนนำไปเก็บไว้ในตู้แช่อุณหภูมิ –20°C เพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

2.2.3 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธี agarose gel electrophoresis จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และคำนวณหาค่าความเข้มข้น ของดีเอ็นเอที่เตรียมได้ เพื่อนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่พอเหมาะสำหรับการทดลองในขั้นตอนต่อไป

2.3 การตัด genomic DNA ด้วย restriction enzymes *Hpa*II และ *Msp*I

นำ genomic DNA ที่มีความเข้มข้น 40-80 ng ในปริมาตร 1 μl มาตัดด้วย restriction enzymes ที่ sensitive ต่อ methylation ได้แก่ *Hpa*II และ *Msp*I โดยใช้ความเข้มข้น 20 Units ของแต่ละ restriction enzyme ซึ่งผสมรวมอยู่ใน 10 x reaction buffer ปริมาตร 3 μl และ distilled water ปริมาตรรวมทั้งหมด (total volume) 30 μl แล้วนำไป incubate ที่ 37 °C ทิ้งไว้ 1 คืน หรืออย่างน้อย 5 ชั่วโมง ตรวจสอบการตัดดีเอ็นเอให้สมบูรณ์โดยวิธี agarose gel electrophoresis จากนั้นจึงหยุดการเกิดปฏิกิริยาโดย incubate ที่ 90 °C เป็นเวลา 5 นาที

2.4 การตรวจสอบ DNA methylation ด้วยเทคนิค HAT-RAPD

2.4.1 การเลือกใช้ไพรเมอร์

สุ่มใช้ arbitary primer ความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ของบริษัท Operon Technology, Alamada, U.S.A. ซึ่งในแต่ละพืชจะใช้ primer แตกต่างกัน ดังแสดงในตาราง 1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1 แสดงรายชื่อ และลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ ที่ใช้ในการตรวจสอบกระบวนการ DNA methylation ใน ป่วยเล้ง ลำไย ข้าว และพิทูเนีย โดยเทคนิค HAT-RAPD

พืชทดลอง	รายชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5' – 3'
ป่วยเล้ง	OPW-09	GTGACCGAGT
	OPL-04	GACTGCACAC
ลำไย	OPW-09	GTGACCGAGT
	OPL-04	GACTGCACAC
	OPC-09	CTCACCGTCC
	OPH-06	ACGCATCGCA
	OPL-15	AAGAGAGGGG
ข้าว	OPW-09	GTGACCGAGT
	OPL-04	GACTGCACAC
	OPL-14	GTGACAGGCT
พิทูเนีย	OPW-09	GTGACCGAGT
	OPL-04	GACTGCACAC

2.4.2 องค์ประกอบในปฏิกิริยา PCR

เตรียมสารละลายปริมาตรทั้งหมด 20 μl ลงใน eppendorf tube ขนาด 0.2 ml ซึ่งประกอบด้วย 1x reaction buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.8, 50 mM KCl, 0.1 % Triton X-100), 2 mM $MgCl_2$, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP และ dTTP) อย่างละ 200 μM, ไพรเมอร์ 50-100 ng, Taq DNA polymerase 0.5 Unit/reaction และดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (DNA template) 10-25 ng จากนั้นจึงดำเนินการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR (Perkin Elmer ; Gene Amp PCR system 2400)

2.4.3 เงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR (PCR condition) ในเทคนิค HAT-RAPD

ได้ดัดแปลงตามวิธีของ Anuntalabhochai *et al.*, 2000 มีสภาวะเงื่อนไขดังแสดงในตาราง 2

ตาราง 2 แสดงเงื่อนไขของปฏิกิริยา PCR ในเทคนิค HAT-RAPD

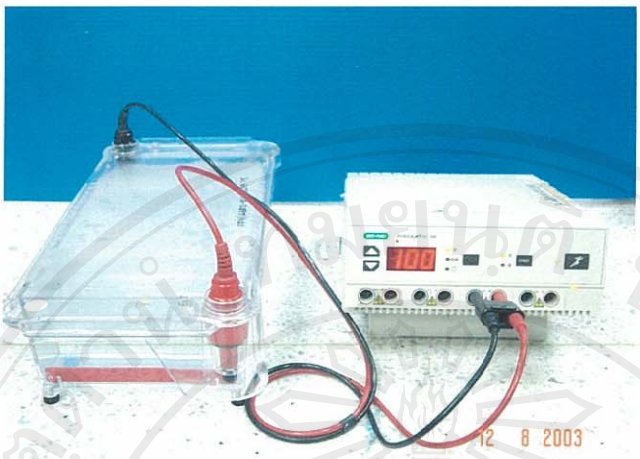
อุณหภูมิ	94 °C	94 °C	46 °C	72 °C	72 °C	4 °C
ระยะเวลา	2 min	30 sec	30 sec	45 sec	5 min	α
จำนวนรอบ	⟵ 30 รอบ ⟶					

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5 การวิเคราะห์โดย Agarose gel electrophoresis

- เตรียม agarose ความเข้มข้น 1.4% โดยชั่ง agarose ผสมลงใน 1x TBE buffer (ภาคผนวก) แล้วนำไปต้มจน agarose หลอมละลาย
- ทำความสะอาดถาดเจลและหวีเสียบ (comb) ให้สะอาดด้วย 70% ethanol แล้วใช้เทปพลาสติกใสปิดขอบของถาดเจลให้แน่นทั้ง 2 ด้าน
- วางหวีเสียบลงที่ปลายข้างหนึ่งของถาดเจล เพื่อให้เกิดช่องเล็กๆ (well) สำหรับหยอดสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบ
- เมื่อ agarose หลอมละลายแล้วจึงเติม ethidium bromide ก่อนนำไปเทลงในถาดเจลที่เตรียมไว้ โดยให้แผ่น agarose gel มีความหนาประมาณ 3-5 mm ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว
- เมื่อ agarose gel แข็งตัวแล้ว ปิดทับผิวหน้าของเจลด้วย 1x TBE buffer เพื่อไม่ให้เจลแห้ง และสะดวกต่อการดึงหวีเสียบออก
- นำถาด agarose gel ที่เตรียมไว้ มาแกะเทปพลาสติกใสออกทั้ง 2 ด้าน แล้ววางถาดลงในอ่าง electrophoresis ให้ด้านที่มีช่องสำหรับหยอดตัวอย่างอยู่ใกล้ขั้วลบ
- เท 1x TBE buffer ลงในอ่างให้ท่วมแผ่น agarose gel โดยให้ระดับของ TBE buffer อยู่เหนือผิวเจลประมาณ 1-3 mm
- ผสม loading buffer (ภาคผนวก) กับสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจให้เข้ากัน ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลาย แล้วค่อยๆ หยอดลงในช่องของ agarose gel
- ปิดฝาอ่าง electrophoresis แล้วต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า แล้วปล่อยกระแสไฟฟ้า โดยให้กระแสไฟฟ้าวิ่งจากขั้วลบไปยังขั้วบวก ใช้ความต่างศักย์ 60 v กระแสไฟฟ้า 150 mA นานประมาณ 3-4 ชั่วโมง หรือเมื่อแถบสีของ loading buffer เคลื่อนที่ไปอยู่ปลายอีกด้านหนึ่งของเจลจึงปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
- นำแผ่น agarose gel ไปตรวจดูลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วย UV transilluminator พร้อมกับบันทึกภาพไว้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 2 อุปกรณ์อิเล็กโทรโฟรีซีสชนิดแนวนอน

2.6 การวิเคราะห์โดย Polyacrylamide gel electrophoresis

- เตรียม 4.5 % polyacrylamide (ภาคผนวก)
- เตรียมกระจก โดยล้างกระจกทั้งสองด้านให้สะอาด แล้วเช็ดให้แห้งโดยใช้กระดาษเช็ดกระจก (Kimwipes EX-L) จากนั้นเช็ดด้วย 95% ethanol อีกครั้ง แล้วปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง
- เตรียมกระจกด้าน IPC (Integral Plate/chamber) โดยเช็ดด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง จากนั้นหยดน้ำยาเคลือบกระจก (clear view) เช็ดให้ทั่ว เพื่อป้องกันไม่ให้เนื้อเจลติดกับกระจกด้านนี้ แล้วจึงเช็ดด้วยน้ำกลั่นอีก 3 ครั้ง
- จากนั้นนำแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ก่อนหน้านี้แล้วมาเช็ดด้วย 95% ethanol 1 ครั้ง รอให้แห้ง แล้วจึงผสม bind silane ปริมาตร 1.5 μl กับ 0.5% acetic acid / 95% ethanol ปริมาตร 1 ml เช็ดบนกระจกให้ทั่วเพื่อให้เจลติดกับกระจกด้านนี้ แล้วเช็ดซ้ำด้วย 95% ethanol อีก 3 รอบจนแน่ใจว่าทั่วทั้งแผ่นกระจก
- ประกบตัวกระจกทั้งสองเข้าด้วยกัน โดยวาง spacers ไว้ตรงกลางระหว่างกระจกทั้ง 2 แผ่นที่ขอบทั้ง 2 ด้านของกระจก แล้วประกอบชุดกระจกให้แน่นด้วยตัวยึด
- นำ 4.5% polyacrylamide ปริมาตร 50 ml มาเติม 10% APS ปริมาตร 300 μl แล้วเติม TEMED ปริมาตร 100 μl ผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงในชุดกระจกที่เตรียมไว้ โดยเทช้าๆ ในแนวราบ เอียงเล็กน้อยเพื่อให้เจลไหลทั่วแผ่น ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ แล้วสอด comb ด้านเรียบเข้าไปในเนื้อเจล เพื่อให้เกิดเป็นช่องสำหรับหยอดตัวอย่าง ตั้งชุดกระจกทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 2-3 ชั่วโมง จึงจะนำไปใช้ได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- นำชุดกระจกที่มี polyacrylamide gel แข็งตัวเรียบร้อยแล้วมาประกอบกับตัวเครื่องอุปกรณ์ gel electrophoresis ชนิดแนวตั้ง เท 1x TBE buffer ลงใน chamber ให้ท่วมระดับขอบกระจกที่ประกบกัน ทิ้งไว้สักครู่ให้ buffer ซึมลงในเนื้อเจล แล้วจึงถอด comb ออก ล้างเอาเศษชิ้นส่วนของเจลออกจากช่องเพื่อทำให้หยอดตัวอย่างได้ง่ายขึ้น จากนั้นจึงวาง comb ลงไปใหม่ โดยเอาด้านที่มีปลายแหลมลง เพื่อให้เกิดช่องสำหรับหยอดตัวอย่าง
- หยอดตัวอย่างลงในช่อง แล้วจึงต่อขั้วไฟฟ้าเพื่อให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ไปใน polyacrylamide gel โดยใช้กระแสไฟฟ้า 60 watt นานประมาณ 2 ชั่วโมง แล้วจึงปิดเครื่องส่งกระแสไฟฟ้า (power supply)
- หลังจากปิดเครื่องส่งกระแสไฟฟ้าแล้ว แกะชุดกระจกที่ประกบออกจากกัน แล้วนำแผ่นกระจกที่มีเจลติดอยู่ มาใส่ใน fixer solution (ภาคผนวก) เขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่า ประมาณ 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆ ละ 2 นาที เพื่อล้าง acetic acid ออกให้หมด
- จากนั้นนำแผ่นกระจกที่มีเจลติดอยู่มาใส่ใน silver staining solution แล้วเขย่าบนเครื่องเขย่าประมาณ 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นนาน 6 วินาที จากนั้นจึงนำไปแช่ใน developer solution (ภาคผนวก) เขย่าจนเห็นแถบดีเอ็นเอปรากฏชัดเจน หยุดปฏิกิริยาด้วยการเทผสม fixer solution กับ developer solution ในขณะที่ยังเขย่าอยู่ แล้วเขย่าต่อไปอีกประมาณ 2-5 นาที ก่อนล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง
- นำแผ่นกระจกมาตั้งทิ้งไว้ให้เจลแห้ง แล้วบันทึกภาพเก็บไว้

ภาพ 3 อุปกรณ์อิเล็กโทรโฟรีซีสชนิดแนวตั้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

ตรวจดูตำแหน่งที่มีการปรากฏแถบดีเอ็นเอหรือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ในลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพืชทดลองในกลุ่มที่ได้รับสาร 5-azacytidine กลุ่มที่ได้รับสารโพแทสเซียมคลอเรท และกลุ่มที่ได้รับอุณหภูมิต่ำ เปรียบเทียบกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกลุ่มควบคุม

3. สถานที่ทำการวิจัย

3.1 ห้องปฏิบัติการอณูชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.2 ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

3.3 สวนลำไยนายทองดี ใจมูล เขตอำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่

4. ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

พฤษภาคม 2544 – สิงหาคม 2546

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved