บทที่ 3
อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 เครื่องมือ /อุปกรณ์

1. เครื่องผลิตลำไอออนพลังงานต่ำ (CMU- 2)
2. เครื่อง PCR (Thermo cycler)
3. เครื่องอิเล็กโตรโฟเรซิสชนิดแนวนอน
4. เครื่อง UV
5. โปรแกรม GelDoc
6. Holder

3.1.2 สารเคมี

1. ไนโตรเจนเหลว
2. DNA extraction buffer (ภาคผนวก)
3. Chloroform
4. Iso-propanol (แช่ตู้เย็น)
5. Ethanol 70 % (แช่ตู้เย็น)
6. Master Mix (สำหรับPCR)
7. Deionized water (dH_2O)
8. Mineral oil
9. Agarose gel/ Agar gel
10. TBE 1X Buffer (ภาคผนวก)
11. DNA marker หรือ Ladder (ภาคผนวก)
12. Loading Buffer (ภาคผนวก)
13. Ethidium Bromide (ภาคผนวก)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.3 พืชตัวอย่างในการทดลอง

ตัวอย่างเมล็ดผักทั้ง 5 สายพันธุ์ (*Lactuca sativa* L.) คือ ผักสลัดแก้ว, ผักกาดหอมห่อ, สลัดคอส, เรดสลัดโบว์ และเรดโครอล ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ. ฉันทนา สีผึ้ง สาขาวิชาพืชผัก ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเมล็ดผักสลัดทั้ง 5 สายพันธุ์ โดยใช้วิธีการระดมยิงด้วยลำไอออนของไนโตรเจน

1. นำเมล็ดผักสลัดทั้ง 5 สายพันธุ์ จำนวน 6000 เมล็ดมาเรียงบน Holder เพื่อนำไประดมยิงด้วยลำไอออน ที่มีเงื่อนไขดังนี้

-ระดับพลังงาน 50 keV

-ปริมาณไอออน (Dose) = 4.0 – 8.0 x10^{15} ion/cm^2

-Species ion คือ Nitrogen ion

ตาราง 3.1 แสดงเงื่อนไขที่ใช้ในการทดลอง

เมล็ดพันธุ์	ระดับพลังงาน	Dose (ion/cm^2)
ผักสลัดแก้ว ผักกาดหอมห่อ สลัดคอส เรดสลัดโบว์ และ เรดโครอล	50 keV	4.0 x 10^{15} ion/cm^2 8.0 x 10^{15} ion/cm^2

2. นำHolder ที่เรียงเมล็ดผักสลัดไปใส่ใน Chamber ที่มีสภาวะสุญญากาศ สำหรับยิงด้วยลำไอออน ดังเงื่อนไขที่แสดงในตาราง 3.1

3. นำเมล็ดที่ผ่านการระดมยิงด้วยลำไอออนไปเพาะในถาดหลุม โดยหยอดเมล็ดลงไปในดินที่ลึกประมาณ 0.5 เซนติเมตร แล้วเกลี่ยดินทับ จากนั้น รดน้ำวันละ 1 ครั้ง

4. นับจำนวนเมล็ดที่งอกหลังจากเพาะเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำตัวเลขที่ทำการบันทึกไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การงอก (Percentage germination)

5. ปลูกผักสลัดต่อไปเป็นเวลาเป็นเวลา 14 วัน จากนั้นทำการบันทึกจำนวนต้นผักสลัดที่รอดชีวิต จากนั้นนำตัวเลขที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต (Percentage survival)

6. ทำการบันทึกลักษณะภายนอก (Phenotype) ของต้นผักสลัดที่เปลี่ยนแปลงไปจากต้นควบคุม ทำการบันทึก ทุกๆ 2 อาทิตย์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

7. เมื่อต้นผักสลัดมีอายุ 50 วันนับจากงอก ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างต้นผักสลัดใส่ในถุงซิบ ทำเครื่องหมาย แล้วนำไปเก็บในตู้แช่เย็นโดยเร็วที่สุด สำหรับเตรียมการสกัดดีเอ็นเอต่อไป

3.2.2 การเตรียมดีเอ็นเอจากใบพืช ดัดแปลงวิธีการของ Doyle and Doyle (1990)

1. ใช้กรรไกรตัดใบผักสลัดที่เก็บมาให้เป็นชิ้นเล็กๆ ลงในโกร่งที่ผ่านการเช็ดด้วยแอลกอฮอล์ 70% แล้ว

2. เทไนโตรเจนเหลวลงไปในโกร่งให้พอท่วม ทิ้งไว้ 2-3 นาที แล้วบดตัวอย่าง อย่างรวดเร็วเพื่อให้ใบละเอียด

3. ใช้ช้อนตักสาร ตักตัวอย่างที่บดแล้วลงในอะลูมิเนียมฟอยด์ แล้วพับปิดให้สนิท เก็บไว้ในถุงซิบ ที่ทำเครื่องหมายไว้ แล้วแช่ในตู้เย็น

4. นำตัวอย่างพืชที่บดละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลวประมาณ 0.1 กรัม ใส่ใน Eppendrof tube ขนาด 1.5 ml. ที่มีExtraction buffer (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 700 µl ผสมอย่างแรงโดยใช้เครื่องผสม

5. นำไป Incubate ใน Water bath ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พลิกทุกๆ 10 นาที

6. เติมChloroform: Isoamyl alcohol (24:1) 1 เท่า ผสมให้เข้ากัน โดยพลิกหลอดไปมาเบาๆ จากนั้นนำไปปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 rpm 5 นาที ที่ 0-4 °C แล้วดูดเอาส่วนใส ใส่ Eppendrof tube หลอดใหม่

7. เติม Isopropanol 1 เท่า ผสมเข้ากันเบาๆ จากนั้นนำไปแช่ตู้เย็น -20 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือทิ้งไว้ข้ามคืน

8. นำไปปั่นตกตะกอนดีเอ็นเอ ที่ความเร็ว 13000 rpm เป็นเวลา 30 นาที ที่ 0-4 °C จากนั้นเท Supernatant ทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol alcohol ปั่นตกตะกอนดีเอ็นเออีกครั้ง เท Supernatant ทิ้ง ผึ่งตะกอนดีเอ็นเอไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

9. ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย Deionized water หรือ TE buffer ปริมาตร 20 µl เขย่าเบาๆ จนตะกอนละลายจนหมด

10. เติม RNase A เข้มข้น 500 µl/ ml 1 µl Incubate ที่ 37 °C ข้ามคืน

11. ทำการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเทคนิค gel electrophoresis (ตามข้อ 3.2.2)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.3 การทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) โดยใช้เทคนิค HAT-RAPD (Anunthalabhochai *et al*., 2000)

1. เจือจางตัวอย่างดีเอ็นเอที่เตรียมได้ โดยใช้ Deionized water ให้มีปริมาณดีเอ็นเอ 20-40 ng

2. เปิดเครื่อง PCR แล้วตั้งโปรแกรมดังตาราง

ตาราง 3.2 แสดงการตั้งโปรแกรมเพื่อการเกิดปฏิกิริยาPCR

Step	Temperature (^{o}C)	Time
- Warm up	94	2 min
- 3 Step cycling		
Denaturation	94	45 sec
Primer annealing	46-48	30 sec
Primer extention (30 – 40 cycle)	72	45 sec
- Final extention	72	7-10 min

3. เตรียม Master mix โดยใส่สารตามลำดับดังตาราง

ตาราง 3.3 Master mix ของปฏิกิริยา PCR

Component	Stock	Final concentration
dH2O		
Buffer	10 X	1 X
MgCl2	25 mM	2.5 mM
dNTP (Mix)	25 mM	0.2 mM
Primer	0.5 µl/ rxn	0.5 µl
Taq Polymerase	0.5 u/ µl	0.5 u/ rxn
Total volume/ rxn		19 µl

4. เติม DNA template ของแต่ละตัวอย่างจำนวน 1 µl ต่อรอบปฏิกิริยา แล้วผสมให้เข้ากัน โดยใช้เครื่องผสม 2-3 นาที แล้วปั่นตก (Spin down) โดยใช้เครื่องเหวี่ยงความเร็วต่ำ 2-3 วินาที ซึ่งขั้นตอนที่ 3 และ 4 ต้องทำอย่างรวดเร็ว (ในกรณีที่ Eppendrof ขนาดเล็กไม่ใช่ฝาแบบโดม ให้เติม Mineral oil 40 µl อีกครั้งหนึ่ง)

5. นำไปใส่เครื่อง PCR แล้วกดเครื่องให้เริ่มทำงาน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุด นำเอา PCR product ไปตรวจสอบโดยทำ Gel electrophoresis ต่อไป หรือเก็บในตู้เย็น 4 °C จนกว่าจะนำไปตรวจสอบ

3.2.4 การตกตะกอนดีเอ็นเอจาก PCR product และการตัด PCR product ด้วย Restriction enzyme

1. เติมน้ำลงใน PCR product ให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 200 µl

2. เติม Ethanol alcohol 2 เท่าของปริมาตรทั้งหมด คือ 400 µl

3. เติม Sodium acetate or Potassium acetate ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 mol

4. ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ -20 °C

5. นำมาปั่นตกตะกอนดีเอ็นเอ ที่ความเร็ว 13000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา5นาที

6.จากนั้นเท Supernatant ทิ้งแล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70 % Ethanol alcohol และนำมาปั่นตกตะกอนดีเอ็นเอ ที่ความเร็ว 13000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที

7. เท Supernatant ทิ้ง แล้ว ผึ่งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

8. เติมน้ำ 17 µl จากนั้นเติม Buffer ของ Restriction enzyme 2 µl และเติม Restriction enzyme 1 µl จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือทิ้งไว้ข้ามคืน

9. นำไปตรวจสอบโดยวิธีการ Gel electrophoresis

3.2.5 Gel electrophoresis

1. เช็ดถาด และหวีด้วย 70% Ethyl alcohol ให้สะอาด และประกอบให้เรียบร้อย

2. เตรียมอะกาโรสเจล ที่ความเข้มข้น 1.4 % ของ TBE Buffer นำไปหลอมให้ละลายในเตาไมโครเวฟ จนละลายหมด รอให้เย็นลงจนอุณหภูมิประมาณ 50°C

3. เติม Ethidium bromide ให้มีความเข้มข้น 3.5 -4 $X10^{-3}$% (v/v) แกว่งให้เข้ากัน

4. เทเจล ลงในถาดที่เตรียมไว้ ให้มีความหนาประมาณ 4-5 มิลลิเมตรรอให้เจล แข็งตัวแล้วเท TBE 1X Buffer ลงบนวุ้นที่แข็งตัวให้พอท่วม ใช้พลาสติกคลุมเพื่อป้องกันฝุ่นละอองต่างๆ

5. ดึงหวีออก นำถาดที่มีเจลอยู่ ใส่เครื่อง Electrophoresis แล้วเท TBE 1X Buffer ให้ท่วมเจลประมาณ 2-3 มิลลิเมตร

6. นำ PCR product ที่ได้ในขั้นตอนที่ 3 ปริมาณ 20 µl (1 rxn) ผสมกับ Loading buffer ประมาณ 1-2 µl แล้วค่อยๆหยอดลงในช่องของแผ่นเจลที่เตรียมไว้ โดยเว้นไว้ 1 ช่องริมสุดด้านใดด้านหนึ่งสำหรับใส่ Ladder

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

7. ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่อง Electrophoresis ปรับให้มีความต่างศักย์ไฟฟ้า เป็น 90 โวลต์ เปิดสวิตซ์ให้เครื่องทำงานประมาณ 5 นาที แล้วเปลี่ยนให้มีความต่างศักย์ไฟฟ้าเป็น 75 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

8. นำเจลไปตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต แล้วถ่ายภาพเก็บไว้

9. ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ ที่ผ่านการแยกขนาด โดยเปรียบเทียบขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ ระหว่างชุดควบคุม และชุดทดลองว่ามีตัวอย่างดีเอ็นเอของต้นใดที่ให้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่แตกต่างออกไป และมีขนาดเท่าใด บันทึกผล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved