บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องมือ

1.1 เครื่องมือแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel electrophoresis)

1.2 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบปรับอุณหภูมิขึ้นลงต่อเนื่อง (Thermocycler)

1.3 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงชนิดรักษาอุณหภูมิต่ำ

1.4 เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง

1.5 อุปกรณ์ในการเตรียมตัวอย่าง ได้แก่ โกร่งบดยา กระติกน้ำแข็ง ถังใส่ไนโตรเจนเหลว อ่างควบคุมอุณหภูมิ

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่

- Sodium chloride
- Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)
- Polyvinylpyrrolidone (PVP)
- Tris- HCl pH8.0
- Ethylene diamine tetraacetate (EDTA) 0.5 M
- Isoamyl alcohol
- Chlorofrom
- 2-Mercaptoethanol
- Absolute ethanol
- Liquid nitrogen

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการกำจัดอาร์เอ็นเอ ได้แก่

- RNase
- Sodium acetate
- Absolute ethanol
- TE buffer

2.3 สารเคมีที่ใช้ในการทำอิเล็กโตรโฟริซีสด้วยอะกาโรสเจล

- Agarose gel
- Ethidium bromide
- 1×TAE buffer
- Loading dye
- DNA marker

2.4 สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)

- Taq DNA polymerase

- Magnesium chloride
- dNTPs

2.5 สารเคมีที่ใช้ในการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ

- QIAGEN® QIAprep Spin Miniprep Kit

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บใบยอดทุเรียนพันธุ์กบแม่เฒ่า กบชายน้ำ ย่ำมะหวาด ชะนี ก้านยาว ก้านยาวสีนาค อีลีบ กระดุม พวงมณี ทองย้อยฉัตร กระดุมทอง อีหนัก หมอนทอง กำปั่นเหลือง และอีด่าง พันธุ์ละ 4-5 ใบ อย่างละ 3 ต้น ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น ซับน้ำให้แห้งด้วยทิชชู ใส่ลงในถุงพลาสติก แล้วแช่ลงในถังน้ำแข็งทันที จากนั้นนำไปเก็บไว้ในตู้แช่ อุณหภูมิประมาณ -20 องศาเซลเซียส

2. การสกัดดีเอ็นเอ

นำใบยอดของทุเรียนแต่ละพันธุ์มาตัดก้านใบ และเส้นกลางใบออก แล้วตัดเป็นชิ้นเล็กๆ บดด้วยโกร่งบดยาที่เติมไนโตรเจนเหลวจนละเอียดเป็นผง แล้วชั่งผงใบทุเรียนที่ได้ 125 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลอง เติม CTAB buffer (4% CTAB, 1.4 M NaCl, 2% Polyvinylpyrrolidone,) CTAB, 1M Tris-HCl, 0.5 M EDTA) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และ 2% 2-Mercaptoethanol ปริมาตร 60 ไมโครลิตร จำนวน 4 หลอดต่อ 1 ตัวอย่าง แล้วบ่มไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที (เขย่าเบาๆ ทุก 10 นาที) จากนั้นนำตัวอย่างไปเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนที่เป็นน้ำใส ใส่ในหลอดใหม่โดยเติม ½ volume ของ Chloroform: Iso-amyl alcohol อัตราส่วน 24:1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนที่เป็นน้ำใสไปใส่ในหลอดใหม่ เติม 1/10 volume ของ 3 M sodium acetate (pH 5.2) และ 2 volume ของ cold absolute ethanol นำเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ล้าง DNA ที่ได้ด้วย 70% cold ethanol 3 ครั้ง โดยในแต่ละครั้งนำ DNA ที่ได้เข้าเครื่องเหวี่ยงความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีการสูญเสีย DNA เก็บ DNA ให้แห้งด้วยอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืน หลังจากนั้นเติม TE buffer (pH8.0) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร แล้วนำไปเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

3. การกำจัดอาร์เอ็นเอ

การกำจัดอาร์เอ็นเอโดยเอนไซม์ RNase เพื่อให้เหลือแต่ส่วนของดีเอ็นเอเท่านั้น เนื่องจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Sequencing นั้นจะต้องใช้ดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดี ไม่มีการปนเปื้อนจากสิ่งต่างๆ ทั้งนี้เพื่อป้องกันการผิดพลาด นำหลอดดีเอ็นเอจากขั้นตอนที่ 2 มาเติม RNase ปริมาตร 8 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ บ่มไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Sodium acetate ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และ absolute ethanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดึงตะกอนดีเอ็นเอใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี 75% ethanol ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง ทำให้ตะกอนแห้ง โดยเปิดฝาหลอด แล้ว

คว่ำลงบนกระดาษทิชชูสะอาด นาน 1 ชั่วโมง เมื่อตะกอนแห้งแล้วจึงเติม TE buffer (pH8.0) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร แล้วนำไปเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส จนพร้อมจะนำไปใช้

4. การออกแบบไพรเมอร์

หลังจากทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สนใจจากฐานข้อมูล GenBank แล้ว นำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเป็นต้นแบบในการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน โดยใช้โปรแกรม Primer 3 version 0.4.0 กำหนดให้อุณหภูมิในการเข้าจับกับแม่แบบ (Annealing) อยู่ระหว่าง 59 - 60 องศาเซลเซียส มีกลุ่มนิวคลีโอไทด์ CG เป็นส่วนประกอบประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ขนาดของผลผลิตอยู่ระหว่าง 200 - 300 bp และกำหนดให้โปรแกรมหลีกเลี่ยงการเลือกไพรเมอร์ที่มีการเข้าจับกันเอง (Self complementary) อุณหภูมิในการเข้าจับกับแม่แบบของไพรเมอร์ต่างกันไม่เกิน 1 องศาเซลเซียส และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ใช้เป็นต้นแบบการศึกษาด้วยโปรแกรม Blast

5. การเพิ่มปริมาณ DNA

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ให้ได้ความเข้มข้น 10-20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในตำแหน่งที่สนใจในหลอดทดลองด้วยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction) ซึ่งองค์ประกอบของปฏิกิริยาลูกโซ่จะประกอบด้วย Taq master mix 5 ไมโครลิตร ddH_2O 2.5 ไมโครลิตร Primer F (10 พิกกะโมล/ไมโครลิตร) 0.25 ไมโครลิตร Primer R (10 พิกกะโมล/ไมโครลิตร) 0.25 ไมโครลิตร และ DNA template 2 ไมโครลิตร สำหรับปริมาตรองค์ประกอบของปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ขั้นตอนการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ หรือเครื่องพีซีอาร์ โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้ (1) ขั้นตอน Denaturation เป็นขั้นตอนที่ทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบหรือ template ซึ่งเป็นดีเอ็นเอสายคู่ (Double strand) แยกตัวออกจากกันเป็นสายเดี่ยว (Single strand) โดยการใช้อุณหภูมิสูง 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที (2) ขั้นตอน Primer annealing หรือ annealing ใช้อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส 30 วินาที เป็นขั้นตอนที่ปล่อยให้มีการจับกันระหว่างดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่แยกได้จากขั้นตอนแรกกับสายไพรเมอร์ซึ่งเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์สายเดี่ยวขนาดสั้นๆ การจับกันนี้จะเป็นการจับกันตรงบริเวณที่มีเบสคู่สมกัน (Complementary base) ซึ่งเกิดขึ้นได้เมื่ออุณหภูมิของดีเอ็นเอลดลงจากขั้นตอนแรก (3) ขั้นตอน Primer extension หรือ extension ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที เป็นขั้นตอนที่มีการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้นมา โดยอาศัยดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่แยกออกจากกันทั้งสองสายเป็นแม่พิมพ์ ทั้งนี้อาศัยเอนไซม์ DNA polymerase และ dNTPs แล้วปล่อยให้เครื่องพีซีอาร์ทำซ้ำขั้นตอนที่กล่าวข้างต้นจนครบ 35 รอบ ก็จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็นล้านเท่า

6. การวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอในตำแหน่งที่สนใจ

นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์มาตรวจสอบด้วยอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ผลผลิตพีซีอาร์ 3 ไมโครลิตร ผสมกับ 6x loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เติมลงในช่องอะกาโรสเจลทีละตัวอย่างจนครบ และเปรียบเทียบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA maker) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่ทราบขนาดที่แน่นอนเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบขนาดของผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ จากนั้นทำการแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซีส โดยใช้แรงดันไฟฟ้า 75

โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที นำไปตรวจผลบนเครื่องฉาย UV (UV Transilluminator) และบันทึกภาพการเรืองแสงของดีเอ็นเอด้วยกล้อง polaroid camera

7. การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ

นำผลผลิตพีซีอาร์มาตัดเจลเฉพาะแถบที่ต้องการ แล้วสกัดเพื่อให้ผลผลิตมีความบริสุทธิ์ (Purified product) ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป QIAGEN® QIAprep Spin Miniprep Kit และนำไปหาลำดับเบส (Macrogen, ประเทศเกาหลี)

8. การทำ Phylogenetic tree

นำลำดับเบสที่ได้มาทำ alignment โดยใช้โปรแกรม Clustal X version 1.83 จากนั้นนำข้อมูลดังกล่าวมาสร้าง phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม Mega version 6 เพื่ออธิบายความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของทุเรียนนนทบุรีกับทุเรียนสปีชีส์อื่นๆ