บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการวิจัย

1. ชุดสกัดดีเอ็นเอ (GenUP™ Plant DNA Kit)
2. ชุดทำความสะอาดดีเอ็นเอจากเจล (GenUP™ PCR/Gel Cleanup Kit)
3. อะกาโรสเจล
4. 10X TBE Buffer
5. Ethanol
6. PCR Buffer
7. $MgCl_2$
8. dNTP Set
9. Taq DNA Polymerase, 5U/µl (500 U)
10. DNase/RNase Free Distilled Water
11. SYBR Safe DNA Gel Stain
12. 100 bp DNA Ladder with 6x loading Dye
13. 1 kb DNA Ladder with 6x loading Dye
14. เครื่องแก้วที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ

วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

1. ขั้นการสำรวจพื้นที่และลักษณะทางสัณฐานวิทยา

สำรวจพื้นที่ในวังสวนบ้านแก้ว เพื่อสังเกตสภาพพื้นที่และจำนวนต้นเงาะที่ปลูก ศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์และสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะของต้น การเรียงตัวของใบ ลักษณะของใบ ดอก ผลและเมล็ด เป็นต้น จากนั้นบันทึกภาพและข้อมูลทางพฤกษศาสตร์สำหรับจำแนกสายพันธุ์เบื้องต้นจากลักษณะภายนอกของต้นพืช ซึ่งต้นเงาะที่ราชินีในรัชกาลที่ 9 ทรงปลูกไว้บริเวณพระตำหนักเทา ไม่มีการระบุสายพันธุ์ที่แน่นอน จึงนำมาใช้เป็นตัวอย่างสำหรับการศึกษา นอกจากนี้ยังมีต้นเงาะที่ปลูกอยู่บริเวณสวนส่วนพระองค์ ด้านหน้าพระตำหนักแดง ซึ่งทราบสายพันธุ์การปลูกที่แน่นอน คือ เงาะพันธุ์โรงเรียน จึงนำเงาะพันธุ์โรงเรียนมาใช้เป็นตัวอย่างควบคุมการทดลอง

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

2. การออกแบบไพรเมอร์

ศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมในบริเวณส่วนของยีนกลุ่มเดียวกันของพืชในตระกูล (Family) ที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับเงาะมาออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Primer3 จากนั้นส่งข้อมูล

ให้บริษัท กิ๊บไทย จำกัด เป็นผู้สังเคราะห์ไพรเมอร์ให้ โดยงานวิจัยนี้ออกแบบไพรเมอร์จำนวน 2 ชุด ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ข้อมูลลำดับเบสของไพรเมอร์ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์

ชื่อบริเวณ	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส (5' --> 3')	ขนาดผลผลิตพีซีอาร์ (คู่เบส)
ITS ชุดที่ 1	IL	GTA GGT GAA CCT GCG AAA GG	IL+IR = 541
	IR	GAC TCT TAT TTG GGC CAA CC	
	IRC	CTC GCC GTT ACT AGG GGA AT	IL+IRC = 760
ITS ชุดที่ 2	IF3	GAC TGC GCC AAG GAA ACT T	IF3+IR3 = 425
	IR3	CGA GCT CGA GGT TTC TCA CT	
	ILF	GTT CGG TGG TGG AAA AAG TG	
	LF	GGA CCC GTT TCA CAC TCG	LF+LR = 747
	LR	GAA ATA TGA AAA ACA CAA ACA CCT TT	

3. การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอในการบ่งชี้สายพันธุ์เงาะ

3.1 การสกัดดีเอ็นเอของพืช

เก็บตัวอย่างใบอ่อนของเงาะในพื้นที่วังสวนบ้านแก้ว บริเวณตำหนักเทา (RB) เงาะพันธุ์โรงเรียนที่ปลูกในสวนส่วนพระองค์ของสมเด็จพระนางเจ้ารำไพพรรณี (SD) และเงาะสายพันธุ์พื้นเมืองที่รวบรวมไว้ในศูนย์วิจัยพืชสวนจันทบุรี จำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์น้ำตาลกรวด (N) พันธุ์เงาะสี (C) พันธุ์บางยี่ขัน (B) พันธุ์เงาะสีทอง (G) พันธุ์เจ๊ะมง (J1 และ J2) และพันธุ์เงาะโรงเรียน (S) นำล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น ซับให้แห้งและใส่ในถุงพลาสติก แช่ในน้ำแข็ง และนำมาสกัดดีเอ็นด้วยชุด Biotechrabbit™ GenUP Plant DNA Kit ในห้องปฏิบัติการ

3.2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก ดังนี้

3.2.1 ITS ชุดที่ 1 (ไพรเมอร์ IL, IR และ IRC)

3.2.1.1 ใน 1 ปฏิกิริยา มีปริมาตร 14 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

1. 2X PCR Master mix	7	ไมโครลิตร
2. 100 µM IL	0.5	ไมโครลิตร
3. 100 µM IR , IRC	0.5	ไมโครลิตร
4. DNA	2	ไมโครลิตร
5. dH_2O	4	ไมโครลิตร

รวมปริมาตร	14	ไมโครลิตร

3.2.1.2 โปรแกรมที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ประกอบด้วย

1. 94 °C 3 นาที
2. 94 °C 40 วินาที
3. 52 °C 45 วินาที
4. 72 °C 1 นาที (ทำปฏิกิริยาซ้ำในขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 35 รอบ)
5. 72 °C 5 นาที
6. 10 °C ∞

3.2.2 ITS ชุดที่ 2 (ไพรเมอร์ IF3, IR3 ใช้เทคนิคพีซีอาร์ ส่วนไพรเมอร์ LF และ ILF ใช้เทคนิค RAPD)

3.2.1 ไพรเมอร์ IF3 และ IR3 (เทคนิคพีซีอาร์)

ใน 1 ปฏิกิริยา มีปริมาตร 14 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

1. 2X PCR Master mix	7	ไมโครลิตร
2. 100 µM IF3	0.5	ไมโครลิตร
3. 100 µM IR3	0.5	ไมโครลิตร
4. DNA	2	ไมโครลิตร
5. dH_2O	4	ไมโครลิตร
รวมปริมาตร	14	ไมโครลิตร

โปรแกรมที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ประกอบด้วย

1. 94 °C 3 นาที
2. 94 °C 45 วินาที
3. 52 °C 30 วินาที
4. 72 °C 1 นาที (ทำปฏิกิริยาซ้ำในขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 35 รอบ)
5. 72 °C 5 นาที
6. 10 °C ∞

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

3.2.2 ไพรเมอร์ LF (เทคนิค RAPD)

ใน 1 ปฏิกิริยา มีปริมาตร 12 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

1. 2X PCR Master mix	6	ไมโครลิตร
2. 100 µM LF	0.1	ไมโครลิตร
3. DNA	2	ไมโครลิตร

4. dH_2O	3.9	ไมโครลิตร
รวมปริมาตร	12	ไมโครลิตร

โปรแกรมที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ประกอบด้วย

1. 94 °C 3 นาที
2. 94 °C 40 วินาที
3. 52 °C 30 วินาที
4. 72 °C 1 นาที (ทำปฏิกิริยาซ้ำในขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 30 รอบ)
5. 72 °C 5 นาที
6. 10 °C ∞

3.2.3 ไพรเมอร์ ILF (เทคนิค RAPD)

ใน 1 ปฏิกิริยา มีปริมาตร 12 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

1. 2X PCR Master mix	6	ไมโครลิตร
2. 100 µM ILF	0.5	ไมโครลิตร
3. DNA	3	ไมโครลิตร
4. dH_2O	2.5	ไมโครลิตร
รวมปริมาตร	12	ไมโครลิตร

โปรแกรมที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ประกอบด้วย

1. 94 °C 3 นาที
2. 94 °C 45 วินาที
3. 52 °C 40 วินาที
4. 72 °C 1 นาที (ทำปฏิกิริยาซ้ำในขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 35 รอบ)
5. 72 °C 5 นาที
6. 10 °C ∞

การตรวจสอบผลผลิตจากพีซีอาร์ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส

การตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ในงานวิจัยนี้ใช้อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีขั้นตอนการเตรียม ดังนี้

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

1. ชั่งผงอะกาโรสเจล 0.25 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่
2. เท 0.5X TBE Buffer ลงไป 25 มิลลิลิตร ปิดปากขวดด้วยพลาสติกห่ออาหารเจาะรู ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที เพื่อให้ผงวุ้นอิ่มตัว จากนั้นนำไปหลอมให้วุ้นละลายในไมโครเวฟ
3. เมื่อผงวุ้นละลายหมด ตั้งทิ้งไว้ให้พออุ่น แล้วเติม SYBR Safe DNA Gel Stain 3 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเทเจลลงถาดเตรียมเจลที่เสียบหวีไว้เรียบร้อยแล้ว ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ ตั้งทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว โดยหาอุปกรณ์ทึบแสงวางครอบไว้ เพื่อป้องกัน SYBR Safe DNA Gel Stain สลายตัว

4. หลังจากที่เจลแข็งตัวแล้ว ดึงหวีออกและนำถาดที่เทเจลออกไปวางไว้บนเครื่องแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า (Gel Electrophoresis Apparatus)

5. เท 0.5X TBE Buffer ลงในเครื่องรันเจลจนท่วมถาดเจลประมาณ 0.5 เซนติเมตร

6. ทำการผสมดีเอ็นเอใน 6X Loading Dye ในอัตราส่วนดีเอ็นเอ ต่อ 6X Loading Dye เท่ากับ 5 : 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

7. หยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA Ladder Plus หรือ 1 Kb Plus DNA Ladder) 5 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอตัวอย่างที่ผสมแล้วทั้งหมดลงในแต่ละช่องบนเจล

8. ประกอบเครื่องรันเจลเข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า โดยให้กระแสไฟฟ้าวิ่งจากขั้วลบไปขั้วบวก และตั้งค่าต่างศักย์ไฟฟ้าไว้ที่ 100 โวลต์ ใช้เวลา 30 นาที

9. นำเจลที่ได้ไปถ่ายรูปด้วยกล้องดิจิตอลภายใต้เครื่องฉายแสงยูวี

3.4 การหาลำดับเบสและการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม (GenBank)

ตัดชิ้นส่วนของแถบดีเอ็นเอบนแผ่นเจลมาสกัดเอาดีเอ็นเอออก (Gel Extraction) และทำให้บริสุทธิ์ (PCR Purification) ด้วยชุดทำความสะอาดดีเอ็นเอ (GenUP™ PCR/Gel Cleanup Kit) จากนั้นส่งตัวอย่างวิเคราะห์หาลำดับนิวคลิโอไทด์ที่บริษัท FirstBase (ประเทศมาเลเซีย) จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลิโอไทด์ที่ได้มาตรวจสอบความถูกต้องเบื้องต้นด้วยการเปรียบเทียบกับข้อมูลทางพันธุกรรมที่ปรากฏในฐานข้อมูลออนไลน์ของ NCBI ด้วยโปรแกรม Nucleotide BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) เพื่อเปรียบเทียบ (Alignment) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ *ITS* ด้วยคำสั่ง ClustalW Multiple Alignment ในโปรแกรม BioEdit เวอร์ชัน 7 และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยคำสั่ง Prodist --> Neighbor Phylogentic Tree ในโปรแกรม BioEdit (Version 7.0.5) โดยมีข้อมูลลำดับเบสของทุเรียน (*Durio zibethinus*) เป็น Outgroup ของบริเวณ ITS ในการเปรียบเทียบข้อมูล

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี