บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การรวบรวมพันธุ์ไหม

รวบรวมตัวเต็มวัยของพันธุ์ไหมไทยพื้นเมืองและไหมป่า (*Philosamia ricini*) จากสถานที่ต่าง ๆ ดังนี้

1.1 นางน้อยศรีสะเกษ 1 จากศูนย์วิจัยหม่อนไหมศรีสะเกษ

1.2 นางเหลือง จากศูนย์วิจัยหม่อนไหมศรีสะเกษ

1.3 นางลาย จากศูนย์วิจัยหม่อนไหมอุดรธานี

1.4 เขียวสกล จากศูนย์วิจัยหม่อนไหมอุดรธานี

1.5 โนนฤาษี จากศูนย์วิจัยหม่อนไหมอุดรธานี

1.6 ไหมป่า จากสถานีทดลองหม่อนไหมหนองคาย

โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพเนื้อเยื่อจนกว่าจะนำไปสกัดดีเอ็นเอต่อไป

2. การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอได้ทำการสกัดโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Tuda *et al.* (1995) และของวีณา และคณะ (2544ก)

2.1 นำตัวเต็มวัยของไหมมาตัดส่วนอก ใส่ลงในหลอด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 1 ตัวอย่าง เติม lysis buffer (50 mM Tris - HCl; pH 8.0, 10 mM EDTA, SDS 0.5 เปอร์เซ็นต์, Proteinase K 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, RNase A 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ใช้กรรไกรผ่าตัด ตัดตัวอย่างให้ละเอียด

2.2 นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง

2.3 เติม phenol–chloroform–isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) 1 เท่าของปริมาตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา เบา ๆ เป็นเวลา 10–15 นาที

2.4 ใส่ในเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วใช้ไมโครปิเปต ดูดสารละลายชั้นบนใส่หลอด 1.5 ไมโครลิตรหลอดใหม่ จากนั้น ทำซ้ำข้อ 2.3–2.4 อีกครั้ง

2.5 เติม chloroform–isoamyl alcohol (24 : 1) 1 เท่าของปริมาตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา เบา ๆ เป็นเวลา 10–15 นาที

2.6 ใส่ในเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วใช้ไมโครปิเปต ดูดสารละลายชั้นบนใส่หลอด 1.5 ไมโครลิตรหลอดใหม่

2.7 เติมสารละลาย 3 M sodium acetate ในปริมาตร 1 ต่อ 10 เท่าของปริมาตร

2.8 เติม absolute ethanol ที่แช่เย็น 2 เท่าของปริมาตร เก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

2.9 นำมาใส่ในเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาเทสารละลายออก

2.10 ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ที่เย็นจัด

2.11 ใส่ในเครื่องหมุนเหวี่ยง ที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาเทสารละลายออกและล้างอีกครั้งด้วยวิธีเดิม แล้วคว่ำหลอดไว้จนตะกอนดีเอ็นเอแห้ง

2.12 ละลายตะกอนด้วย TE buffer เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ต่อไป

3. ปฏิกิริยา PCR

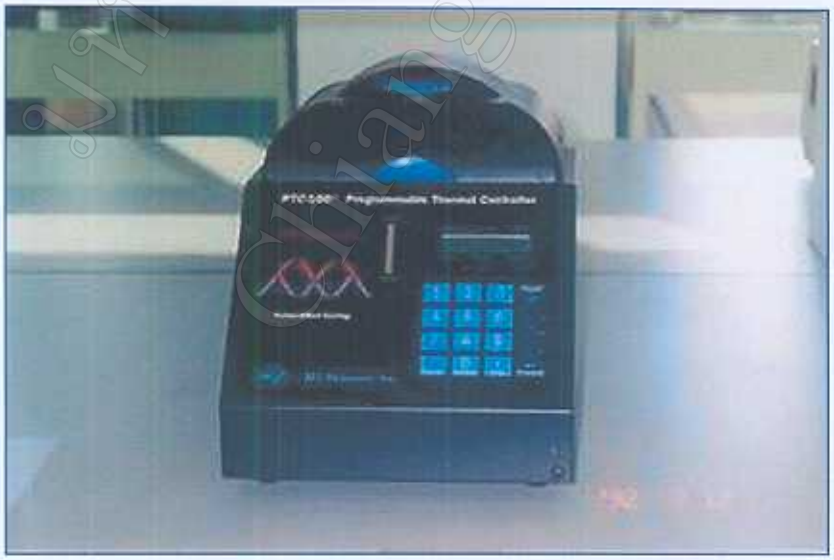
นำดีเอ็นเอที่ได้ทำ PCR โดยใช้ primer COI-RLR : 5′- TTG ATT TTT TGG TCA TCC AGA AGT -3′ ตำแหน่งที่ 2184 – 2207 และ primer COII-Croz : 5′- CCA CAA ATT TCT GAA CAT TGA CC -3′ ตำแหน่งที่ 3666 – 3688 ของ mtDNA gene จาก gene bank รหัส AY048187 (Lu *et al.*, 2001) การเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา (reaction mix) ในหลอด PCR tube ขนาด 0.2 มิลลิลิตร ตามลำดับดังนี้

	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว	13.8
10X QIAGEN PCR	2.7
dNTPs (1mM)	6.0
25 mM $MgCl_2$	1.8
primers COI-RLR (10 pmol/µl)	0.6
primers COII-Croz (10 pmol/µl)	0.6
0.5 ยูนิตของ Taq DNA polymerase	1.5
ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template)	3.0
ปริมาตรรวม	30

เมื่อผสมทุกอย่างครบแล้วนำหลอด PCR ที่เตรียมพร้อมแล้วใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (MJ Research รุ่น PTC–100) โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลา ตามวิธีการของวีณา และคณะ (2544 ข) แต่ละขั้นตอนดังนี้

1. predenaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที (จำนวน 1 รอบ)
2. denaturation ที่อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที
   primer annealing ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที
   extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที
   (ในข้อนี้ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ)
3. primer extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที (จำนวน 1 รอบ)

ภาพที่ 8 แผนที่แสดงตำแหน่งของ COI–COII ซึ่งแสดงตำแหน่งของ primer ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR



ภาพที่ 9 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (MJ Research รุ่น PTC 100)

4. PCR–RFLP

นำผลผลิตของ PCR มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 9 ชนิดคือ *Bfa* I, *Cla* I, *Hha* I, *Mbo* I, *Mse* I, *Msp* I, *Rsa* I, *Taq* I และ *Xmn* I ปริมาตรทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ใช้ปริมาณดีเอ็นเอ 10 ไมโครลิตร ในเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bfa* I, *Cla* I, *Hha* I, *Mbo* I, *Msp* I, *Rsa* I, *Taq* I และ *Xmn* I ส่วนในเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mse* I ใช้ปริมาณดีเอ็นเอ 15 ไมโครลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ตัดจำเพาะ 1-2 ยูนิตต่อปฏิกิริยา เวลาทำปฏิกิริยา 12 ชั่วโมง โดยใช้ไหมป่าเป็นตัวเปรียบเทียบนอกกลุ่ม

5. Gel Electrophoresis

5.1 อะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟรีซิส

5.1.1 การเตรียมแผ่นอะกาโรสเจลเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์

- ชั่งอะกาโรส 2 กรัม ผสมลงใน 1X TAE buffer 100 มิลลิลิตร นำไปเข้าไมโครเวฟที่กำลังไฟต่ำนาน 10 นาทีเพื่อให้อะกาโรสหลอมละลายเข้ากันดี
- ทำความสะอาดถาดเตรียมเจลและหวีเสียบ (comb) ให้สะอาด แล้วใส่ถาดเตรียมเจลและหวีเสียบลงในบล็อคที่เตรียมไว้
- เทอะกาโรสเจลที่หลอมละลายแล้วอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส ลงไประวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ
- เมื่ออะกาโรสเจลแข็งตัวแล้วดึงหวีเสียบออกอย่างระวัง แล้วเท 1X TAE buffer ให้ท่วมผิวหน้าของอะกาโรสเจลไว้เพื่อป้องกันเจลแห้ง

5.1.2 การแยกขนาดของดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า

- นำถาดอะกาโรสเจลที่เตรียมไว้วางลงในเครื่องอิเล็คโตรโฟรีซิส (Gelmate™ 102) ให้ด้านที่มีช่อง (well) ของหวีเสียบอยู่ด้านขั้วลบ
- เท 1X TAE buffer ลงไปให้ท่วมเจลพอสมควร
- ผสม loading buffer กับสารละลายดีเอ็นเอให้เข้ากัน ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายดีเอ็นเอที่ผสมกันดีแล้ว ค่อย ๆ หยอดลงในช่องของอะกาโรสเจล
- เมื่อหยอดเสร็จแล้วเปิดกระแสไฟฟ้า ใช้ความต่างศักดิ์ 100 โวลต์ ประมาณ 1 ชั่วโมง
- เมื่อเสร็จแล้วนำแผ่นเจลไปย้อมด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์ ส่องดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transilluminator พร้อมทั้งบันทึกภาพไว้ด้วยเครื่องถ่ายภาพ (Syngene) เพื่อนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์หาความแตกต่างต่อไป

ภาพที่ 10 เครื่องแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจล (Gelmate™ รุ่น 102)

5.2 อะคริลาไมด์เจลอิเล็คโตรโฟริซิส

5.2.1 การเตรียมอะคริลาไมด์เจลเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์

- เช็ดแผ่นกระจกสำหรับเตรียมอะคริลาไมด์เจลและหวีเสียบให้สะอาดด้วยเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์
- นำแผ่นกระจกมาประกบเข้าด้วยกันแล้วใส่ในกรอบสำหรับหนีบกระจกให้เข้ากัน นำไปวางไว้ในตัวกดที่มีแผ่นยางวางรองไว้ด้านล่าง
- ผสมสารสำหรับเตรียมอะคริลาไมด์เจล คือ น้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร สารละลายอะคริลาไมด์ 40 เปอร์เซ็นต์ 1.5 มิลลิลิตร 10X TAE buffer 0.5 มิลลิลิตร แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์ 7.5 ไมโครลิตร และ TEMD 5 ไมโครลิตร ให้เข้ากัน
- ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายที่ผสมกันดีแล้วหยอดลงในแผ่นกระจกให้เต็ม จากนั้นเสียบหวีลงไป
- ทิ้งเจลไว้ให้แข็งตัว แล้วนำไปประกอบเข้ากับเครื่อง Mini-Protein 3

5.2.2 การแยกขนาดของดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า

- เมื่อประกอบเครื่องเสร็จแล้วเท 1X TAE buffer ลงไปในแท็งค์
- ผสม loading buffer กับสารละลายดีเอ็นเอให้เข้ากัน ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายดีเอ็นเอที่ผสมกันดีแล้ว ค่อย ๆ หยอดลงในช่องของอะคริลาไมด์เจล
- เมื่อหยอดเสร็จแล้วเปิดกระแสไฟฟ้า ใช้ความต่างศักดิ์ 50 โวลต์ ประมาณ 4 ชั่วโมง

- เมื่อเสร็จแล้วนำแผ่นเจลไปย้อมด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์ ส่องดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV Transilluminator พร้อมทั้งบันทึกภาพไว้ด้วยเครื่องถ่ายภาพ (Syngene) เพื่อนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์หาความแตกต่างต่อไป

ภาพที่ 11 เครื่อง Mini-Protein 3 สำหรับแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยอะคริลาไมด์เจลซึ่งต่ออยู่กับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างพันธุ์คือ นางน้อยศรีสะเกษ 1 นางลาย โนนฤาษี เขียวสกล นางเหลือง และไหมป่า เมื่อทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วนำมาถ่ายรูปด้วยเครื่องถ่ายรูปเจล (syngene) แล้วนำภาพที่ถ่ายแล้วเก็บไว้ในเครื่องคอมพิวเตอร์เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยใช้โปรแกรมการวิเคราะห์ gene directory ด้วยวิธี UPGMA ของ Dice

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ภาพที่ 12 เครื่องถ่ายภาพเจลด้วยรังสียูวี (Syngene)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University