บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. วัสดุพืช

เก็บตัวอย่างดอก ใบและเมล็ดลองกอง ลางสาด และดูกู จากสถานที่ต่างๆดังนี้

- แปลงทดลองภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
- สวนเกษตรกร อ. ระแงะ จ.นราธิวาส
- สวนเกษตรกร อ.จะนะ จ.สงขลา

2. วัสดุสารเคมี

2.1 สารเคมีในการตัดเนื้อเยื่อ

- Formalin
- Acetic acid
- Buthyl alcohol
- Alcohol
- Xylene
- Safranin และ Fastgreen
- Clove oil
- Parafin oil
- Canada balsum
- Haupt' s adhesive

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

- CTAB (Hexadecyl trimethyl ammonium bromide)
- β-mercaptoethanol

- PVP-40 (Polyvinyl pyrrolidone)
- NaCl (Sodium chloride)
- Na_2EDTA (Disodium ethylene diaminetetraacetate)
- Tris-HCI pH 8.0
- Chloroform
- Isopropanal
- Ethanol
- Liquid nitrogen

2.3 สารเคมีสำหรับใช้ทำอิเลคโทรโฟรีซีส

- LE agarose (FMC Bioproduct, USA)
- Seakem agarose
- Glacial acetic acid
- Boric acid
- Tris-base
- Ethidium bromide
- Loading buffer
- Lamda DNA (λ DNA)
- 100 bp และ 500 bp DNA Ladder (Operon, USA)

2.4 สารเคมีที่ใช้ในการทำพีซีอาร์

- dNTP (dATP, dTTP, dCTP และ dGTP) (Promega, USA)
- Primer OPA-10, OPB-04, OPB-07, OPC-04, OPC-05, OPD-03, OPT-01, และ OPT-08 (Operon, USA)
- $MgCl_2$
- 10X *Taq* buffer (Promega, USA)
- *Taq* DNA Polymerase B (Promega, USA)

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในเก็บตัวอย่างพืช

- ถุงพลาสติก
- กรรไกร
- กรรไกรตัดกิ่ง
- กล่องโฟม
- ปากกาเขียนเครื่องแก้ว

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการตัดเนื้อเยื่อ

- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ
- เตาความร้อน
- ตะเกียง
- เครื่องตัดเนื้อเยื่อ
- เครื่องอุ่นสไลด์
- กล้องถ่ายรูปพร้อมฟิล์ม
- กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ
- สไลด์และแผ่นปิดสไลด์
- พาราฟิน
- เข็มเขี่ย
- อะลูมินัมฟอยด์
- ขวดย้อมสี

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ การทำอิเลคโทรโฟรีซีส และการทำพีซีอาร์

- ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง -30 องศาเซลเซียส
- เครื่องไมโครเซ็นตริฟิวก์
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง
- เครื่องคนสารละลายอัตโนมัติ
- แท่งแม่เหล็ก
- ปิเปตปรับปริมาตร
- เครื่องเขย่า (vortex)

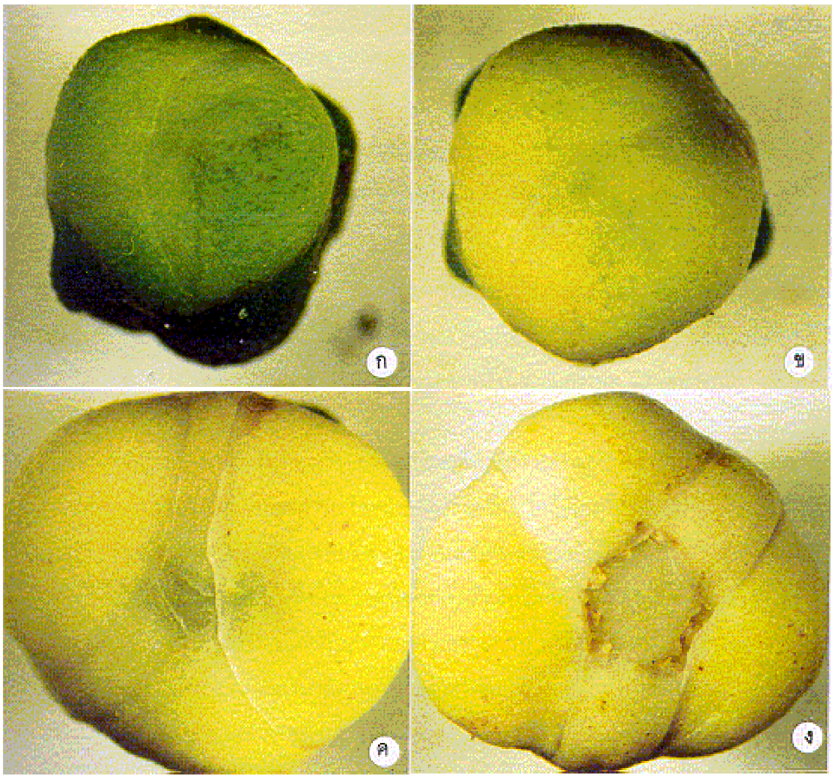
- หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
- ถังบรรจุไนโตรเจนเหลว
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
- เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซีส
- เครื่อง PCR
- โกร่งบดตัวอย่าง
- หลอดเอฟเพนดอร์ฟ
- ตู้ไมโครเวฟ
- UV transilluminator
- กล้องโพลารอยด์
- Gel Documentation
- Micropipette และ Tip
- น้ำแข็ง และกระติกน้ำแข็ง
- เครื่องแก้ว กระบอกตวง และขวดต่างๆ

วิธีการ

1. การศึกษาการพัฒนาทางเนื้อเยื่อวิทยาของรังไข่และออวุล

1.1 การเก็บตัวอย่างดอก

เก็บตัวอย่างดอกลองกอง ลางสาด และดูกูจากแปลงทดลองภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ โดยสุ่มเก็บตัวอย่าง 4 ระยะการเจริญของดอก ตามรายงานของอุไรวรรณ (2543) (ภาพที่ 3) คือ ระยะที่ 1 ลักษณะดอกเป็นตุ่มมีสีเขียวเข้มเห็นร่องกลีบเลี้ยง (ประมาณ 32-35 วันหลังดอกเริ่มยืด) ระยะที่ 2 ลักษณะดอกเป็นตุ่ม เริ่มเห็นกลีบดอกโผล่มีสีเหลืองครีม (2 วันหลังระยะที่ 1) ระยะที่ 3 ลักษณะดอกเริ่มบานมองเห็นกลีบดอกที่มีสีเหลืองครีมได้ชัดเจน (2 วันหลังระยะที่ 2) และระยะที่ 4 ลักษณะดอกบาน กลีบดอกมีสีเหลืองครีม มองเห็นส่วนอับเรณูครบทุกส่วนของดอก (2 วันหลังระยะที่ 3) เพื่อใช้เป็นตัวอย่างในการทำสไลด์ถาวรเพื่อศึกษาพัฒนาการของเนื้อเยื่อรังไข่และออวุล



ภาพที่ 3 ลักษณะการพัฒนาของดอก ระยะที่1 (ก) ระยะที่ 2 (ข) ระยะที่ 3 (ค) ระยะที่ 4 (ง) (30X)

ที่มา : อุไรวรรณ (2543)

1.2 การทำสไลด์ถาวรเพื่อศึกษาพัฒนาการของเนื้อเยื่อ

นำตัวอย่างดอกทุกระยะการพัฒนาของดอก มาทำตามวิธีการของภูวดล (2528) มีขั้นตอนดังนี้

1. การรักษาสภาพเซลล์ เก็บตัวอย่างดอกของพืชแต่ละชนิดในระยะพัฒนาของดอกต่างๆ ในน้ำยารักษาสภาพเซลล์ (FAA : ethyl alcohol 70% 90 มล. acetic acid 5 มล. และ formalin 5 มล.) เป็นเวลา 1 เดือน

2. การดึงน้ำออกจากเซลล์ เทน้ำยารักษาสภาพเซลล์ออกแล้วนำดอกไปเข้ากระบวนการดึงน้ำออกจากเซลล์ 8 ขั้นตอน ขั้นตอนละ 2 ชั่วโมง ยกเว้นขั้นตอนที่ 6 ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบต่างๆ ของสารดึงน้ำออกจากเซลล์

ขั้นตอน	ส่วนประกอบสารละลาย		
	น้ำ (มิลลิลิตร)	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ (มิลลิลิตร)	บิวธิลแอลกอฮอล์ (มิลลิลิตร)
1	50	40	10
2	30	50	20
3	15	50	35
4	5	40	55
5	0	25	75
6	บิวธิลแอลกอฮอล์ (ใส่สีอีโอซีน) ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง		
7	บิวธิลแอลกอฮอล์		
8	บิวธิลแอลกอฮอล์ 50 มิลลิลิตร + พาราฟินออย 50 มิลลิลิตร		

3. การฝังตัวอย่างในพาราฟิน เทพาราฟินที่หลอมให้ท่วมตัวอย่างดอก แช่ตัวอย่างดอกเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงเปลี่ยนพาราฟินใหม่ อีก 2 ครั้ง ทุก 2 ชั่วโมงหลังจากนั้นแช่ตัวอย่างดอกไว้นานอีก 24 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนพาราฟินใหม่อีกครั้ง แช่ตัวอย่างดอกต่อไปอีก 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเทพาราฟินพร้อมชิ้นส่วนดอกลงในกระทงที่ทำด้วยอะลูมินัมฟอยล์ จัดตำแหน่งชิ้นส่วนดอกตามที่ต้องการ ปล่อยไว้ให้เย็นจึงนำไปเข้าเครื่องตัดเนื้อเยื่อ

4. การตัดเนื้อเยื่อ ตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อ ความหนาประมาณ 7–8 ไมโครเมตร

5. การติดตัวอย่างบนแผ่นสไลด์ หยดสารยึดเซลล์ติดกับสไลด์ (haupt's adhesive) ลงบนสไลด์ทาให้ทั่ว วางบนเครื่องอุ่นสไลด์ประมาณ 3 นาที จึงนำชิ้นส่วนดอกที่ตัดวางบนสไลด์ อุ่นไว้ 7 วัน ที่อุณหภูมิ 40–45 องศาเซลเซียส จึงนำไปย้อมสี

6. การย้อมสี ย้อมด้วยสีแซฟฟรานิน และสีฟาสกรีน

7. บันทึกภาพเพื่อดูการพัฒนาภายในรังไข่ของส่วนตัวเมีย

2. การศึกษาลักษณะอะโพมิกซีสจากต้นกล้าลองกอง ลางสาด และดูกู ที่ได้จากการเพาะเมล็ดโดยใช้เทคนิคทางอาร์เอพีดี

2.1 การเก็บและการเพาะเมล็ด

เก็บรวบรวมเมล็ดพันธุ์จากต้นลองกอง ลางสาด และดูกู อย่างละ 3 ต้นจากแหล่งต่างๆ ดังตารางที่ 2 แต่ละต้นสุ่มเก็บเมล็ดให้ได้จำนวนอย่างน้อย 30 เมล็ด นำเมล็ดทั้งหมดมาเพาะในกระบะทรายที่ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เมื่อต้นกล้ามีใบจริง 2 ใบ ย้ายลงถุงพลาสติก และเมื่อต้นกล้ามีใบจริง 4-5 ใบจึงเก็บตัวอย่างใบจากต้นกล้าเพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอ ขณะเดียวกันทำการเก็บใบของต้นแม่เพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับต้นกล้า

ตารางที่ 2 จำนวนตัวอย่าง และสถานที่เก็บรวบรวมเมล็ดพันธุ์ของลองกอง ลางสาด และ ดูกู

ชนิด/สถานที่	**จำนวน (ต้น)**
ลองกอง	
สวนเกษตรกร อ.ระแงะ จ.นราธิวาส	2
สวนเกษตรกร อ.จะนะ จ.สงขลา	1
ลางสาด	
สวนเกษตรกร อ.ระแงะ จ.นราธิวาส	3
ดูกู	
สวนเกษตรกร อ.ระแงะ จ.นราธิวาส	3

2.2 วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบ

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนใบของต้นกล้าลองกอง ลางสาด และดูกู โดยใช้สารละลาย CTAB ซึ่งดัดแปลงจาก Doyle และ Dolye (1990) ใช้ตัวอย่างใบประมาณ 200 มิลลิกรัม

น้ำหนักสด ตัดชิ้นส่วนใบเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ในโกร่งที่แช่เย็น บดให้ละเอียดโดยใช้ไนโตรเจนเหลว จนตัวอย่างพืชละเอียดเป็นผง นำมาใส่หลอดเอฟเพนดอร์ฟขนาด 2 มิลลิลิตร เติมสารละลาย CTAB buffer (PVP-40, NaCl, Na_2EDTA 0.5 M pH 8.0, CTAB 2 %) ร่วมกับ β-mercaptoethanol เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กลับหลอดไปมาทุก 10-15 นาที นำมาเติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 800 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ได้สารละลายที่แยกชั้นน้ำและคลอโรฟอร์มออกจากกัน ดูดเอาเฉพาะสารละลายส่วนใสส่วนบนนำมาใส่หลอดใหม่ เติมไอโซโพรพานอลปริมาตร 750 ไมโครลิตร กลับหลอดขึ้นลงเบาๆ เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอทธานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง วางทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนด้วย TE buffer (Tris-HCl 1.0 M pH 7.5, Na_2EDTA 0.25 M pH 7.0) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บดีเอ็นเอที่สกัดไว้ที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

2.3 วิธีการตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอ

ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (แลมดา ดีเอ็นเอ) โดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซีสบนอะกาโรส Seakam LE (FMC Bioproduct, USA) เข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ ใช้แรงเคลื่อนกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ในสารละลาย TAE (Tris Base, Glacial acetic acid, Na_2EDTA 0.5 M pH 8.0) เป็นเวลา 20 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอที่ได้ด้วย เอธิเดียมโบรไมด์ แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต

2.4 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มโดยเทคนิคพีซีอาร์

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มโดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 8 ชนิด (สุวิมล, 2544) (ตารางที่ 3) สภาพที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จากปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ใช้ความเข้มข้นของสารละลายต่างๆ ดังนี้ ดีเอ็นเอแม่พิมพ์ 60 นาโนกรัม ไพรเมอร์เข้มข้น 0.3 ไมโครโมลาร์ บัฟเฟอร์เข้มข้น 10 เท่า แมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ดีออกซีนิวคลีโอไทด์เข้มข้นชนิดละ 100 มิลลิโมลาร์ เอ็นไซม์ *Taq* polymerase เข้มข้น 1.5 ยูนิต ตั้งอุณหภูมิเป็น 3 ระดับคือ อุณหภูมิเริ่มต้นใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ในขั้นตอนการจับคู่ระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที และขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที จำนวนทั้งสิ้น 39 รอบ ตามด้วยอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 1 นาที 37 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที อีก 1 รอบ ซึ่งการ

ทดสอบโดยการทำพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ชนิดต่างๆ ในการศึกษานี้ ทดลองทำซ้ำอย่างน้อยจำนวน 2 ครั้งเพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองที่ตรงกัน

ตารางที่ 3 รายละเอียดไพรเมอร์ และลำดับเบสของไพรเมอร์

ไพรเมอร์	ลำดับเบส 5/……………….3/
OPA-10	GTGATCGCAG
OPB-04	GGACTGGAGT
OPB-07	GGTGACGCAG
OPC-04	CCGCATCTAC
OPC-05	GATGACCGCC
OPD-03	GTCGCCGTGA
OPT-01	GGGCCACTCA
OPT-08	AAAGGCGACA

ที่มา : สุวิมล (2544)

2.5 การเตรียมอะกาโรสเจลเพื่อดูผลผลิตพีซีอาร์

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาแยกขนาดดีเอ็นเอโดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซีสบนตัวกลาง คือ อะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.50 เปอร์เซ็นต์ ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้า 100 โวลต์ ในสารละลาย TBE (Tris Base, Boric acid, Na_2EDTA 0.5 M pH 8.0) เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง 30 นาที แล้วจึงทำการย้อมแผ่นเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร ทำการย้อมโดยแช่แผ่นอะกาโรสเจลไว้ในที่มืดเป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยการแช่น้ำกลั่นเป็นเวลาประมาณ 30 นาที นำไปดูภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต และเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากแต่ละต้น

2.6 การตรวจสอบความแตกต่างของผลผลิตดีเอ็นเอ

ตรวจสอบความแตกต่างของชิ้นส่วนดีเอ็นเอภายใต้เครื่องเรืองแสงอุลตราไวโอเลต ทำการบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพโพลาลอยด์ หรือ Gel Documentation นำภาพถ่ายที่บันทึกแถบของดีเอ็นเอจากแต่ละต้นกล้าทำการศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอระหว่างต้นแม่กับต้นกล้า และระหว่างภายในกลุ่มต้นกล้าที่ได้จากต้นแม่เดียวกันแปลผลการทดลอง

โดยให้คะแนนการเกิดแถบดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่างในตำแหน่งเดียวกันเป็น "1" และให้คะแนน "0" เมื่อไม่มีแถบดีเอ็นเอ และคิดเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่มีความชัดเจนเท่านั้น