2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

2.1 วัสดุ

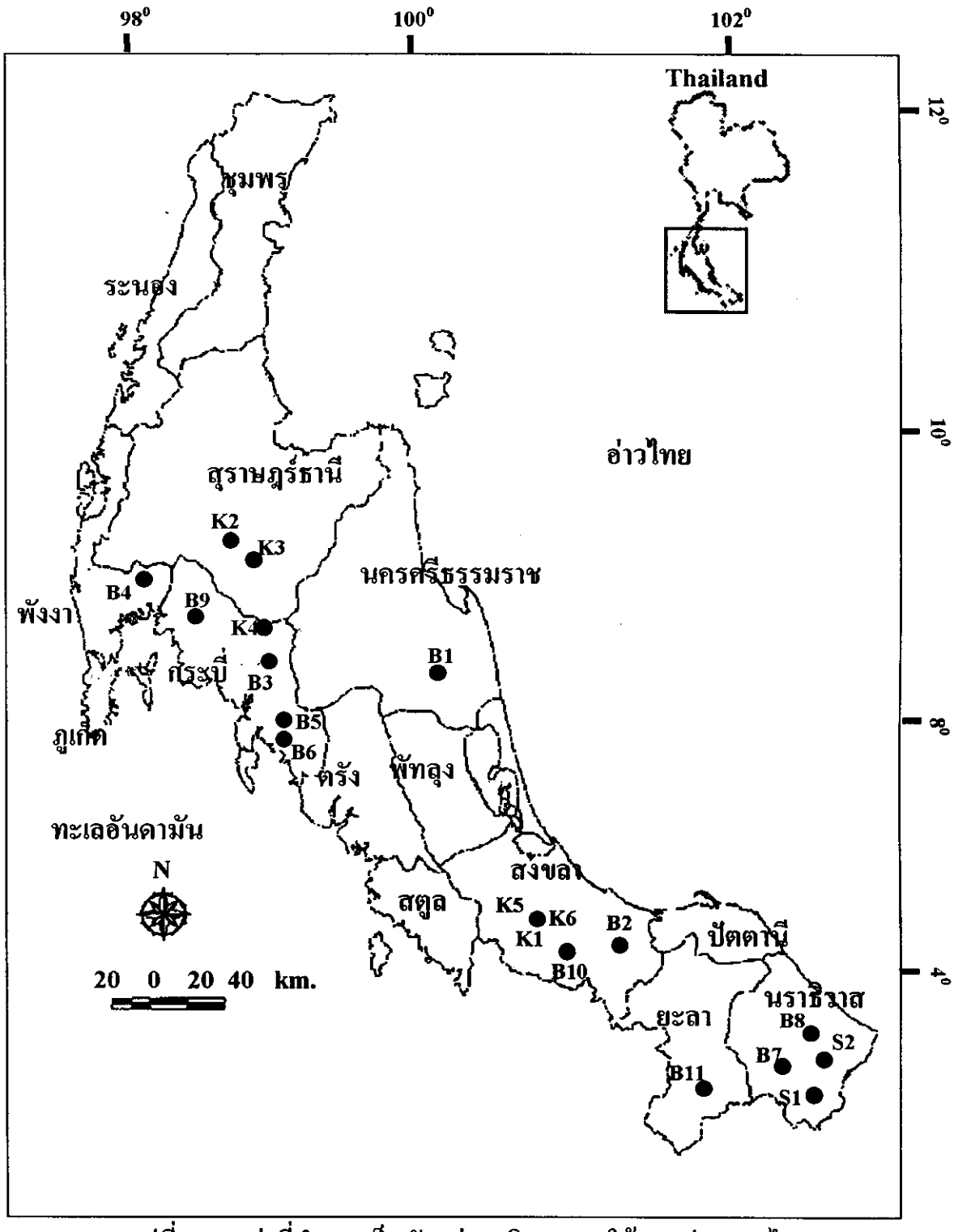
2.1.1 วัสดุพืชที่ใช้ในการศึกษา

สำรวจและเก็บตัวอย่างพันธุ์พืชที่ต้องการ ดังตารางที่3 จากบริเวณจังหวัดทางภาคใต้ของประเทศไทย ดังรูปที่ 30 เหง้าที่ได้นำมาปลูกในกระถางบริเวณเรือนเพาะชำ ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาวิทยาลัย สงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

ตารางที่ 3 ตัวอย่างพืชที่ใช้ในการศึกษา

ชนิด (Species)	จังหวัดที่เก็บตัวอย่าง	รูปที่	หน้า
สกุลกระชาย (*Boesenbergia*) 11 ชนิด			
1. *B. basispicata* (B1)	นครศรีธรรมราช	7	15
2. *B. curtisii* (black leaf-sheath) (B2)	สงขลา	9	15
3. B. *curtisii* (white leaf-sheath) (B3)	กระบี่	10	15
4. *B. longipes* (B4)	พังงา	8	15
5. *B. plicata* (red flower) (B5)	กระบี่	11	15
6.*B. plicata* (yellow flower) (B6)	ยะลา	12	15
7. *B. prainiana* (B7)	นราธิวาส	13	16
8. *B. pulcherrima* (B8)	นราธิวาส	14	16
9. *B. tenuispicata* (B9)	กระบี่	15	16
10 *B. rotunda* (B10)	สงขลา	16	16
11. *B. sp.* (B11)	ยะลา	17	16

ชนิด (Species)	จังหวัดที่เก็บตัวอย่าง	รูปที่	หน้า
สกุลเปราะ (*Kaempferia*) 6 ชนิด			
12. *K. angustifolia* (K1)	เรือนเพาะชำ	18	17
13. *K. elegans* (K2)	สุราษฎร์ธานี	19	17
14.*K. galanga* (K3)	สุราษฎร์ธานี	20	17
15.*K. pulchra* (K4)	กระบี่	21	17
16.*K. siamensis* (K5)	เรือนเพาะชำ	22	17
17.*K. roscoeana* (K6)	เรือนเพาะชำ	23	17
สกุล *Scaphochlamys* 2 ชนิด			
18 *S. biloba* (S1)	นราธิวาส	24	17
19. *S. perakensis* (S2)	นราธิวาส	25	17



รูปที่ 30 แหล่งที่ทำการเก็บตัวอย่างบริเวณภาคใต้ของประเทศไทย

2.1.2 วัสดุสารเคมี

2.1.2.1 สารเคมีที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นสารเคมีเกรดวิเคราะห์ แสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 สารเคมีเกรดวิเคราะห์ (analytical grade)

ชื่อสาร	บริษัทผู้ผลิต
Acetone	Sigma
Acrylamide	Merck
Ammonium persulphate	Carlo Erba
Benzidine	Fluka
Bis acrylamide	Merck
Bovine serum albumin	Sigma
Bromophenol Blue	Sigma
Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)	Sigma
Chloroform	J.T.Baker
DL-Dithiothreitol	Sigma
Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)	Fluka
[3-(4,5-Dimethythiazol-2-yl)- 2,5diphenyltetrazolium bromide] (MTT)	Sigma
Fast blue RR salt	Sigma
L-Glutamic acid	Sigma
Glycine	Fluka
HCl	Merck
H_2O_2	Merck
Liquid Nitrogen	ภาควิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์
$MnCl_2$	M&B
$MgCl_2$	M&B

ชื่อสาร	บริษัทผู้ผลิต
Methanol	Analyticals
2-Mercaptoethanol	Merck
Na Acetate	BDH
NaH_2PO_4	Ajax Chemicals
Na_2HPO_4	Fluka
o-Dianisidine	Sigma
α-Naphthyl acetate	Sigma
β-mercaptoethanol	Sigma
β-Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD)	Sigma
Nitro Blue Tetrazolium (NBT)	Sigma
Phenazinemethosulfate (PMS)	Sigma
N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine (TEMED)	Fluka
Shikimic acid	Sigma
Tris(hydroxymethyl) aminomethane	Sigma

2.1.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา RAPD เป็นเกรดอณูชีววิทยา แสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาอณูชีววิทยา (molecular biology grade)

ชื่อสาร	บริษัท
1 Kb DNA ladder	Promega
Agarose	Sigma
Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)	Promega
Ethidium bromide	Sigma
Reaction buffer	Promega
Rnase A	Sigma
Taq polymerase	Promega
Primer	Promega

2.2 อุปกรณ์

1. UV-VIS Spectrophotometer ของ Shimadzu รุ่น 160 A
2. Refrigerated susperspeed centrifuge ของ Beckman รุ่น JA-21
3. Micropipette ของ Eppendorf
4. Slab gel electrophoresis apparatus ของ Atto และของ Hoefer Scientific Instruments
5. Submarine electrophoresis apparatus ของ BIO-RAD
6. Centrifuge ของ Beckman รุ่น TJ-6
7. pH meter รุ่น PHM b1 ของ Radiometer Copenhagen
8. Vortex mixer ของ Scientific Industries
9. Heat block ของ Labline
10. Power supply ของ Biorad รุ่น 1000/500
11. Thermocycle ของ Hybaid thermocycler
12. กล้องถ่ายรูปของบริษัท Cannon รุ่น EOS500
13. กล้องถ่ายรูป Polaroid ของบริษัท Spectronic corporation รุ่น CH-1314
14. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง รุ่น P1210 ของ Mettler
15. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น H-10 ของ Mettler

2.3 วิธีการ

2.3.1 การศึกษาด้านสัณฐานวิทยา

ทำการตรวจสอบลักษณะทางพฤกษศาสตร์จากเอกสารอ้างอิง ติดป้ายสัญลักษณ์และบอกแหล่งที่มา ศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของพืชแต่ละชนิด บันทึกลักษณะต่างๆไว้และให้คะแนนลักษณะที่แตกต่างกัน เพื่อหาความสัมพันธ์ด้านสัณฐานวิทยา ถ่ายรูปลักษณะต้น ใบ และ ดอก ทำการอัดตัวอย่างให้แห้งพร้อมดองดอกด้วยแอลกอฮอล์ 70%

2.3.2 การศึกษาไอโซไซม์

2.3.2.1 การเก็บตัวอย่าง

การศึกษาไอโซไซม์ในพืชทำได้จากส่วนต่างๆเช่น ใบ ลำต้น และราก เป็นต้น จากการศึกษาของ Suvachittanont (1991) พบว่า ในกลุ่มของพืชวงศ์ขิงเอนไซม์ส่วนใหญ่จะพบมากที่ใบ ในการศึกษาครั้งนี้จึงสกัดไอโซไซม์จากใบโดยเก็บตัวอย่างจากใบอ่อนที่สมบรูณ์และเพิ่งแตกออกมีลักษณะไม่ม้วนงอจากต้นที่จะศึกษาในช่วงเช้ามา 1-2 ใบเพื่อให้ได้ตัวอย่างในการศึกษาประมาณ 1-2 กรัม

2.3.2.2 การสกัดเอนไซม์

การสกัดเอนไซม์ทำทุกๆ 3 เดือนดังนี้คือ ครั้งที่ 1 ในช่วงระหว่าง มิถุนายน 2543-สิงหาคม 2543 ครั้งที่ 2 ในช่วงระหว่าง กันยายน 2543-พฤศจิกายน 2543 ครั้งที่ 3 ในช่วง ระหว่างธันวาคม 2543-กุมภาพันธุ์ 2544 ครั้งที่ 4 ในช่วงระหว่าง มีนาคม 2544-พฤษภาคม 2544 โดยนำใบพืชมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น เช็ดให้สะอาด ชั่งน้ำหนัก 2 กรัม ตัดด้วยกรรไกรที่สะอาดให้เป็นฝอยเล็กๆ ใส่ในครกบดยา ใส่ไนโตรเจนเหลวขณะบดเพื่อช่วยให้เซลล์แข็งกรอบบดได้ง่ายยิ่งขึ้น และความเย็นยังช่วยรักษาสภาพของเอนไซม์ไว้ บดให้ละเอียดเติมบัฟเฟอร์สำหรับสกัดเอนไซม์ (Tris-HCl 0.1 M pH 7 ซึ่งมี 1 mM EDTA, 2 mM Dithiothreitol และ 1 mM β-Mercaptoethanol) 2 มิลลิลิตรต่อใบ 1 กรัมผสมให้เข้ากัน จากนั้นกรองด้วยผ้ากรอง 4 ชั้น นำของเหลวที่กรองได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสไว้เพื่อนำมาศึกษาไอโซไซม์ต่อไป เก็บส่วนใสนี้ไว้ที่ –20 °C เพื่อนำมาศึกษาได้ในภายหลังหากมีตัวอย่างมากและทำการศึกษาไม่ทัน แต่พบว่าหากศึกษาหลังจาก 1 เดือน เอนไซม์

จะเสียสภาพทางธรรมชาติและมีประสิทธิภาพการทำงานลดลงไม่เหมาะจะนำมาทำการศึกษาต่อไปได้ จึงได้พยายามทำการศึกษาไอโซไซม์ทันทีเป็นส่วนใหญ่

2.3.2.3 เอนไซม์ที่เลือกศึกษา

การเลือกเอนไซม์ที่จะนำมาศึกษาวิจัยส่วนใหญ่จะตรวจสอบจากงานวิจัยที่เคยมีผู้ก่อนหน้านี้ในกลุ่มของพืชวงศ์นี้ และคัดเลือกจากเอนไซม์ที่สามารถวิเคราะห์ผลได้ง่าย สารเคมีที่ใช้มีราคาไม่แพงมากนัก ในการทดลองนี้ได้เลือกเอนไซม์มา 9 ชนิดคือ

1. Acid phosphatase (ACP, E.C.3.1.3.2)
2. Alkaline phosphatase (ALP, E.C.3.1.3.1)
3. β-Esterase (β-EST, E.C.3.1.1-)
4. α-Esterase (α-EST, E.C.3.1.1-)
5. Glutamate dehydrogenase (GDH, E.C1.4.1.2)
6. Malate dehydrogenase (MDH, E.C.1.1.1.37)
7. Peroxidase (POX, E.C.1.11.1.7)
8. Shikimic dehydrogenase (SKD, E.C.1.1.1.25)
9. Superoxide dismutase (SOD, E.C.1.15.1.1)

2.3.2.4 การแยกไอโซไซม์โดยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิส

ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้ Polyacrylamide gel แบบ Discontinuous gel โดยมี stacking gel ประกอบด้วย Polyacrylamide 3.5% ใน Tris-HCl pH 6.8 0.125 M และ separating gel ซึ่งประกอบด้วย Polyacrylamide 7.5% ใน Tris-HCl pH 8.9 0.375 M เตรียมได้ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ส่วนประกอบที่ใช้ในการเตรียมโพลีอะคริลาไมด์เจล

สาร	Stacking gel (ml) 3.5% Acrylamide	Running gel (ml) 7.5% Acrylamide
Acrylamide-bis solution(%)	1.25	3.75
Stacking buffer	2.50	-
Resolving buffer	-	1.875
1.5% Ammoniumpersulphate	0.50	0.75
TEMED	0.01	0.02
H_2O	5.75	8.65
Total volume	10.00	15.00

ในการทำอิเล็กโตรโฟเรซิสอาศัยชุดเครื่องมืออิเล็กโตรโฟเรซิส Vertical Slab gel ของบริษัท Atto ในเจลแต่ละช่องจะใส่โปรตีน 15 μg โดยหาปริมาณโปรตีนในสารสกัดจากใบด้วยวิธีของ Lowry และคณะ (1951) ผสมตัวอย่างกับสี Bromophenol blue ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร เจลแต่ละแผ่นสามารถใส่ตัวอย่างได้ 12 ช่องหรือ 12 ตัวอย่าง ทำการทดลองพร้อมกันครั้งละ 2 แผ่น ใช้ 0.025M Tris-HCl 0.192 M Glycine pH 8.3 เป็นบัฟเฟอร์ให้กระแสไฟฟ้าคงที่ 15 mA ผ่านจนกระทั่ง Bromophenol blue เคลื่อนที่ถึงด้านล่างของแผ่นเจล ปิดเครื่องกำเนิดไฟฟ้า ทำการย้อมเอนไซม์ในแผ่นเจลต่อไป โดยนำแผ่นเจลที่ผ่านการทำอิเล็กโตรโฟเรซิสมาย้อมเอนไซม์แต่ละชนิดทั้ง 9 ชนิด ตามวิธีของ Vallejos (1983)

2.3.2.5 การย้อมสีไอโซไซม์

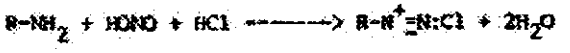
หลักการในการย้อมเอนไซม์ในกลุ่ม Hydrolase เช่น Alkaline phosphatase, Acid phosphatase และ Esterase จะต้องมีสารตั้งต้นของปฏิกิริยา เช่น เอสเทอร์ หรือเอไมด์ เมื่อปฏิกิริยาเกิดขึ้น โดยมีเอนไซม์เหล่านี้เป็นตัวเร่งมีผลผลิตของปฏิกิริยาเกิดขึ้น เช่น ในการศึกษาเอนไซม์ฟอสฟาเตส จะใช้ Arylphosphate เป็นสารตั้งต้น เมื่อ Arylphosphate ถูกย่อยทำให้เกิด HPO^{-}_{4} และ Arylalcohol การย้อม

เอนไซม์ฟอสฟาเตสจะทำได้โดยให้ Arylalcohol ทำปฏิกิริยาคู่ควบ (coupling reaction) กับ Diazonium salt เกิดเป็น Azo dye ที่มีสีขึ้นดังปฏิกิริยา

Diazonium Arylalcohol Azo dye

" Coupling reaction"

เนื่องจากเกลือ Diazonium มักไม่อยู่ตัวจึงต้องเตรียมขึ้นใหม่ๆก่อนใช้จากปฏิกิริยาดังนี้



2.3.2.5.1 Acid phosphatase เอนไซม์นี้จะเร่งปฏิกิริยา

Orthophosphomonoester + H_2O -------▶Alcohol + Orthophosphate

ในการย้อมเอนไซม์นี้ทำได้โดย นำเจลแช่ใน 50 mM Na Acetate pH 5.5 เวลาประมาณ 15 นาที เพื่อปรับ pH ให้เหมาะสมแล้ว จึงมาย้อมในสารที่เกิดจากการผสม Na Acetate 50 mM pH 5.5 ปริมาตร100 ml $MgCl_2$ 1 M 1 ml และ $MnCl_2$ 1 M 1 ml Fast blue RR salt 100 mg และα-Naphtyl acid phosphate 1% 3ml ที่เตรียมใน Acetone 50% การผสมต้องกระทำในที่มืด ทิ้งไว้ 1-7 ชม. จะเห็นแถบสีแดงหรือม่วงดำ

2.3.2.5.2 Alkaline phosphatase เอนไซม์นี้จะเร่งปฏิกิริยา

Orthophospho monoester + H_2O -------▶ Alcohol + Orthophosphate

ในการย้อมเอนไซม์นี้ใช้ส่วนผสมเช่นเดียวกับ Acid phosphataseแต่ใช้ Tris-HCl 50 mM pH 8.5 ปริมาตร100 ml แทน Na Acetate pH 5.5 และทำการย้อมเช่นเดียวกับ Acid phosphatase

2.3.2.5.3 α-Esterase เอนไซม์นี้จะเร่งปฏิกิริยา

α-Naphthyl acetate + H_2O-------▶ α-Naphthol +Acetate

ในการย้อมเอนไซม์นี้ใช้ Fast blue RR salt 0.05 g.ใน

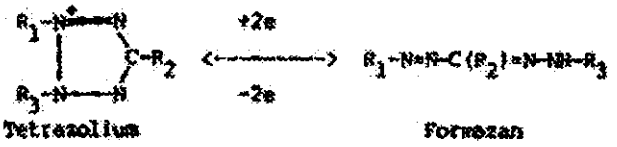
0.1 M Na phosphate buffer pH 6.2 ปริมาตร 100 ml.ผสมกับ α-Naphthyl acetate 0.03 g. ซึ่งเตรียมใน Acetone ปริมาตร 3 ml. ผสมกันเทลงบนแผ่นเจลในที่มืดเขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที

2.3.2.5.4 β-Esterase เอนไซม์นี้จะเร่งปฏิกิริยา

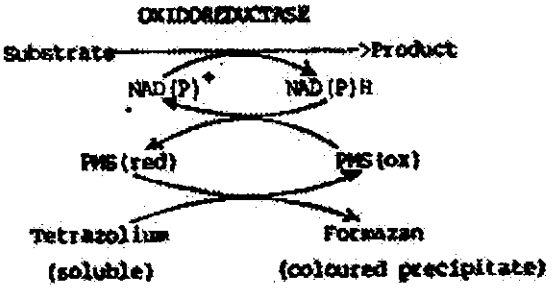
β-Naphthyl acetate + H_2O ------► β-Naphthol +Acetate

ในการย้อม β-Esterase ทำได้โดยใช้สารที่ย้อมเช่นเดียวกับการย้อม α-Esterase แต่ใช้ β-Naphthyl acetate เป็นสารตั้งต้นแทน α-Naphthyl acetate

เอนไซม์ในกลุ่ม ออกซิโดรีดัคเทส ซึ่งได้แก่ Glutamate dehydrogenase, Malate dehydrogenase และ Shikimate dehydrogenase เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะทำหน้าที่ส่งถ่ายอิเล็กตรอนจากสารตั้งต้น ในสภาวะรีดิวซ์ไปยังตัวกลางที่รับอิเล็กตรอนซึ่งมักจะเป็น NAD^+หรือ $NADP^+$ กลายเป็น NADH หรือ NADPH แล้วไปรีดิวซ์ เตตราโซเลียม (tetrazolium) ได้เป็นฟอร์มาแซน (formazan) ซึ่งเป็นสารประกอบวงแหวนที่มี C 1 ตัว กับ N 4 ตัวที่มีสีดังปฏิกิริยา



โดยสีในกลุ่มฟอร์มาแซนซึ่งเป็นดังบ่งบอกประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ ได้แก่ สีส้มแดง หรือ ม่วงดำ เป็นต้น และในปฏิกิริยาจะต้องมีตัวรับส่ง อิเล็กตรอนซึ่งส่วนใหญ่เป็น NAD(P^+) และ Phenazine methosulfate (PMS) ทำงานเป็นระบบดังปฏิกิริยา



เตตราโซเลียมที่ใช้ในการติดตามปฏิกิริยา Oxidoreductase มีหลายตัวเช่น 3-(4,5-Dimethythiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazolium bromide (MTT), Nitro Blue Tetrazolium (NBT), Triphenyl Tetrazolium chloride (TTC)

2.3.2.5.5 Glutamate dehydrogenase เอนไซม์นี้จะเร่งปฏิกิริยา

$$\text{L-Glutamate} + H_2O + NAD^+ \dashrightarrow \text{2-Oxo-glutarate} + NH_3 + NADH$$

ในการย้อมเอนไซม์นี้ใช้ส่วนผสมซึ่งประกอบด้วย 0.2 M. Phosphate pH 9.2 16 ml. ผสมกับ L-Glutamic acid 1.3 g.และน้ำ 11 ml. NAD 1% 3 ml. และNBT 1% 1 ml. ผสม PMS 1% 0.25 ml.ลงบนแผ่นเจลในที่มืด เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้จนมีแถบสีฟ้าน้ำเงิน

2.3.2.5.6 Malate dehydrogenase เอนไซม์นี้จะเร่งปฏิกิริยา

$$\text{L-Malate} + H_2O + NAD^+ \dashrightarrow \text{2-Oxaloacetate} + NADH$$

ในการย้อมเอนไซม์นี้ทำโดย ผสม 0.1 M Tris-HCl pH 7.5 100 ml. 1 M DL-Malic acid pH 7.5 3 ml.และ NAD 1% 3 ml. MTT 1% 2 ml. และ PMS 1% 0.40 ml. ลงบนแผ่นเจลในที่มืด เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 30-60 นาที จะเห็นแถบสีน้ำเงิน

2.3.2.5.7 Shikimate dehydrogenase เอนไซม์นี้จะเร่งปฏิกิริยา

$$\text{Shikimate} + NADP^+ \dashrightarrow \text{3-Dehydroshikimate} + NADPH$$

ในการย้อมเอนไซม์ ผสม 0.1 M Tris-HCl pH 7.5 100 ml. Shikimic Acid 100 mg $NADP^+$ 15 mg MTT 1% 2 ml PMS 1% 0.40 ml. เทลงบนแผ่นเจลในที่มืด เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 30-60 นาที จะเห็นแถบสีน้ำเงิน

2.3.2.5.8 Superoxide dismutase เอนไซม์นี้จะเร่งปฏิกิริยา

$$O_2^* + O_2^* + 2H^+ \dashrightarrow O_2 + H_2O_2$$

การย้อม Superoxide dismutase บริเวณที่เกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ไม่เกิดสี (negative stain) โดยแสงไฟส่องแผ่นเจลทำให้เกิด superoxide free radicals ไปรีดิวซ์เตตราโซเลียมให้เปลี่ยนเป็น ฟอร์มาแซน สีน้ำเงิน ยกเว้นบริเวณที่มี SOD จะไม่มี superoxide เกิดขึ้น เตตราโซเลียมจึงไม่เปลี่ยนเป็นฟอร์มาแซน บริเวณนั้นจึงใสไม่มีสีในการย้อมเอนไซม์นี้ทำได้โดยแช่เจลในสารผสมซึ่งประกอบด้วย

Tris-HCl 0.2 M. pH 8 40 ml. $MgCl_2$ 0.5 M. 0.2 ml. NBT 1% 1 ml. และ PMS 1% 1 ml. ที่อุณหภูมิห้องใต้แสงไฟนีออน เป็นเวลา 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง จะเกิดแถบใส ๆ บนแผ่นเจล โดยมีพื้นเป็นสีน้ำเงินฟ้า

2.3.2.5.9 Peroxidase เอนไซม์นี้จะเร่งปฏิกิริยา

$$\text{Donor} + H_2O_2 \dashrightarrow \text{Oxidized donor} + 2\ H_2O$$

การย้อม POX ทำได้โดยอาศัยปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของ aromatic amides เช่น *O*-Dianisidine เมื่อมี H_2O_2และ POX อยู่ด้วยทำให้เกิดสีน้ำตาลส้ม ทำได้โดยนำเจลที่ได้แช่ลงใน สารละลาย 0.5 % *O*-Dianisidine ใน Methanol 10 ml. ผสมกับ 0.05 M. Na acetate buffer pH 5.5 40 ml. เขย่าเบาให้เข้ากัน เติม H_2O_2 0.2 ml. เขย่าอีกเล็กน้อย เก็บในตู้มืด 30 นาที หรือเมื่อเห็นแถบชัด

2.3.2.6 การวิเคราะห์ข้อมูลไอโซไซม์

เมื่อย้อมเอนไซม์ชนิดต่างๆแล้ว นำแผ่นเจลที่ได้มาบันทึกผลทันที คำนวณหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์จาก

$$\text{การเคลื่อนที่สัมพัทธ์ } (R_f) = \frac{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีน}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของโบรโมฟีนอลบลู}}$$

เลือกแถบที่มีความคงที่และชัดเจนมาวิเคราะห์ โดยหากมีแถบปรากฏจะให้คะแนนเป็น 1 และหากไม่ปรากฏจะให้คะแนนเป็น 0 นำมาหาความสัมพันธ์เปรียบเทียบเป็นคู่ๆ (pairwise) โดยใช้ Dice similarity coefficients เป็นตัวแปรที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ (Nei *et al.*, 1979 ; Ludwig และ Reynolds, 1988)แล้วใช้โปรแกรม SPSS version 9.01ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ที่ได้และจัดให้อยู่ในรูปสายสัมพันธ์ โดยวิธี UPGMA (unweighted pair-group method algorithm) และรูปกลุ่มสัมพันธ์ (polar coordination) โดยวิธี Principal component analysis (PCA)

2.3.3 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดย RAPD

2.3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

นำใบอ่อนมาตัดด้วยกรรไกรให้ได้ 0.05 กรัม และบดให้ละเอียดในครกบดยาที่สะอาด มาสกัดดีเอ็นเอด้วย CTAB 500 µl บัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย Tris-HCl (pH 8) 50 mM, EDTA 10 mM, NaCl 0.7 M, CTAB 1.0% และ β- Mercaptoethanol 0.1% อุ่นที่อุณหภูมิ 60 °C ในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 ml 30 นาที กลับหลอดไปมาเบาๆ 2-3 ครั้งทุกๆ 10 นาที แล้วเติม Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol อัตราส่วน 25:24:1 500 µl กลับหลอดไปมาเบาๆประมาณ 20 ครั้ง ตั้งให้แยกชั้นแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดชั้นที่เป็นน้ำ (aqueous phase) ที่อยู่ด้านบน 500 µl ใส่ในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 ml เติม Rnase ความเข้มข้น 10 mg/ml 2.5 µl ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C 30 นาที แล้วสกัดดีเอ็นเอด้วย Phenol: Chloroform และ Isoamyl alcohol ซ้ำอีกรอบ ดูดชั้นที่เป็นน้ำประมาณ 300 µl นำไปตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม 0.6 volume Isopropanol (≈180 µl) ทิ้งไว้จนดีเอ็นเอตกตะกอน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ค่อยๆ เทชั้นน้ำที่อยู่ด้านบนทิ้งไป ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอทานอล 500 µl นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70% 500 µl ซ้ำอีกรอบ เทชั้นของของเหลวที่อยู่ด้านบนทิ้งไปอย่างระมัดระวัง คว่ำหลอดบนกระดาษทิชชูจนภายในหลอดแห้งสนิท และทำให้ตะกอนแห้งยิ่งขึ้นโดยอุ่นที่ 50 °C ประมาณ 10 นาที เก็บตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่ -20 °C เมื่อจะใช้จึงละลายดีเอ็นเอในน้ำปราศจากเชื้อ และขจัดไอออนออกแล้ว (sterile deionized water) ปริมาตร 30 µl

2.3.3.2 การตรวจคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ

การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอทำได้พร้อมๆกัน โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวช่วงคลื่นประมาณ 260 nm คำนวณหาปริมาณของกรดนิวคลีอิกได้ โดยสารละลายดีเอ็นเอ 50 µg /ml มีค่าดูดกลืนแสงที่ (O.D.) 260 nm (A_{260}) เท่ากับ 1 นอกจากนี้ยังตรวจคุณภาพได้โดยเปรียบเทียบค่า $O.D._{260}$ และ $O.D._{280}$ สารละลายดีเอ็นเอคุณภาพดีมีโปรตีนปนเปื้อนน้อยจะมีอัตราส่วนระหว่าง

$O.D._{260}/O.D._{280}$ ประมาณ 1.7-2.0 หรือตรวจสอบดีเอ็นเอโดยการทำอิเล็กโตรโฟเรซิส ตาม 2.3.3.4 ก็ได้

2.3.3.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

ในเบื้องต้นต้องเลือกหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากพืชตัวอย่างเป็นแม่แบบ การศึกษานี้ได้เลือกไพรเมอร์ที่มีผู้ใช้ในการศึกษา RAPD ของพืชในกลุ่มกระเจียว (Prathepha, 2000) ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

Primer Number	Nucleotide Sequence 5' to 3'	%GC
OPAM-01	TCACGTACGG	60
OPAM-03	CTTCCCTGTG	60
OPAM-12	TCTCACCGTC	60
OPAM-18	ACGGGACTCT	60
OPB-01	GTTTCGCTCC	60
OPB-14	TCCGCTCTGG	70
OPC-01	TTCGAGCCAT	60
OPC-05	GATGACCGCC	70
OPK-05	TCTGTCGAGG	60
OPZ-03	CAGCACCGCA	70

นำไพรเมอร์ในตารางนี้มาใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธี PCR ซึ่งมี *Taq* polymerase เป็นเอนไซม์เชื่อมต่อในปฏิกิริยา เลือกหาสภาวะที่เหมาะสมในสังเคราะห์เพื่อให้ได้สภาพที่เหมาะสมที่สุดในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยตรวจสอบดีเอ็นเอแม่แบบปริมาณต่างกันที่ 25 ng, 50 ng และ 100 ng ความเข้มข้นของแมกนีเซียมคลอไรด์ในปฏิกิริยาที่ 3 mM, 4mM และ 5 mM และจำนวนรอบในการทำ PCR พบสภาวะที่เหมาะสมและความเข้มข้นของสารต่างในปฏิกิริยาดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 สารผสมในปฏิกิริยา PCR

สารที่ใช้	ปริมาตร(µl)
1. DNA (200 ng/µl)	0.5
2. Reaction Buffer (10X) (100 mM Tris-HCl (pH 9), 500 mM KCl, 1% Triton X-100)	2.5
3. dNTP(10 mM)	4
4. $MgCl_2$ (25 mM)	5
5.primer (1 µm)	6
6. Taq polymerase (5 Unit/µl)	0.5
7.น้ำกลั่น	11.5
8. mineral oil	10
ปริมาตรรวม	30

โดยมีอุณหภูมิและเวลาในการสังเคราะห์ดังนี้คือขั้นที่1 อุ่น 4 นาที ที่ 94 °C (สำหรับ denature) ขั้นที่ 2 อุ่น 1 นาที ที่ 36 °C (สำหรับ annealing) 2 นาทีที่ 72 °C (สำหรับ primer extension) ทำซ้ำ 45 รอบ ขั้นที่ 3 อุ่นที่ 72 °C 4 นาทีเพื่อให้ primer extension สมบูรณ์ เก็บที่ 4°C เพื่อศึกษาดีเอ็นเอที่ได้โดยอิเล็กโตรโฟเรซิสต่อไป

2.3.3.4 การตรวจสอบดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิส

ตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้จาก PCR ในข้อ 2.3.3.3 หรือดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 2.3.3.1 โดยวิธีอิเล็กโตรโฟเรซิสบนอะกาโรสเจลตรวจสอบการแยกดีเอ็นเอที่เตรียมได้จากข้อ 2.3.3.3 ในอะกาโรสเจล 1.8% ย้อมดีเอ็นเอในเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ เมื่อนำไปส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตจะเกิดแถบที่เรืองแสง ส่วนดีเอ็นเอที่เตรียมจาก เนื้อเยื่อพืช (2.3.3.1) จะใช้อะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 %

2.3.3.5 การทำอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส

ชั่งอะกาโรส 0.8 กรัมหรือ 1.8 กรัม ขึ้นอยู่กับว่าจะเตรียม 0.8%หรือ 1.8 % เติม TAE 1X บัฟเฟอร์ 100 ml (Tris-base 1 M Glacial acetic acid 0.57 ml และ 0.5 M EDTA 1 ml) อุ่นให้ร้อนเขย่าเป็นครั้งคราวให้อะกาโรสละลายจนหมด ปล่อยให้เย็นลงถึง 50-55°C แล้วเทลงในถาดให้เจลหนาประมาณ 5 มิลลิเมตร เสียบหวีลงไปเพื่อทำให้เกิดร่องสำหรับหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอ ปล่อยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเจลแข็งตัวแล้วค่อยๆดึงหวีออก ใส่ในเครื่องสำหรับทำอิเล็กโตรโฟเรซิส ใส่ 1X TAE บัฟเฟอร์ให้ท่วมสูงกว่าผิวเจล 2-3 มิลลิเมตร นำสารละลายดีเอ็นเอหรือสารละลายที่ผ่านการทำ PCR จากข้อ 2.3.3.3 หรือจากพืชในข้อ 2.3.3.1 ปริมาตร 5 µl ผสมกับ loading buffer (Bromophenol blue 0.25%, Xylene Cyanol 0.25% และ Glycerol 30% 1 µl) แล้วใส่ในช่องของเจลที่เตรียมไว้ ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็กโตรโฟเรซิส ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าประมาณ 10 โวลต์ต่อเซนติเมตร ปล่อยให้ดีเอ็นเอเคลื่อนไปจนถึงปลายเจลโดยสังเกตจากสีส้มของ Xylene Cyanol ที่ผสมใน loading buffer แล้วจึงปิดเครื่อง

2.3.3.6 การย้อมดีเอ็นเอ

นำเจลมาย้อมในเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 µg /ml นาน 10-20 นาทีล้างเอธิเดียมโบรไมด์ออก โดยเปิดน้ำประปาให้ไหลผ่านเบาๆ ประมาณ 5-10 นาที ตรวจสอบดีเอ็นเอโดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต แล้วถ่ายภาพเก็บไว้ด้วยกล้องโพลารอยด์

2.3.3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล RAPD

เลือกแถบดีเอ็นเอที่มีความคงที่และชัดเจนมาวิเคราะห์หาขนาดโมเลกุลโดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ในการวิเคราะห์นั้นหากมีแถบปรากฏจะให้คะแนนเป็น 1 และหากไม่ปรากฏแถบในตัวอย่างจะให้คะแนนเป็น 0 เปรียบเทียบหาความสัมพันธ์ของตัวอย่างเป็นคู่ๆ โดยใช้ Dice similarity coefficients เป็นตัวแปรที่ใช้ในการศึกษาแล้วใช้โปรแกรม SPSS version 9.01ในการวิเคราะห์ นำความสัมพันธ์ที่ได้จัดให้อยู่ในรูปสายสัมพันธ์โดยวิธี UPGMA และรูปกลุ่มสัมพันธ์ PCA เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ผลจากไอโซไซม์อิเล็กโตรโฟเรซิส