บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

1. สารเคมี

1.1 สารเคมีชนิดเกรดวิเคราะห์ (analytical grade)

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Absolute ethanol	CARLO ERBA
Chloroform	Merck
CTAB	CARLO ERBA
EDTA	Merck
Isoamyl alcohol	CARLO ERBA
Lithium chloride	Merck
Magnesium chloride	Merck
β-Mercaptoethanol	Merck
Phenol	CARLO ERBA(rpe)
Polyvinyl pyrolidone (PVP)	Sigma
Sodium acetate	CARLO ERBA
Sodium chloride	Merck
Sodium citrate	CARLO ERBA
Sodium dodecyl sulfate	Riedel-de-Haën
Sodium hydroxide	CARLO ERBA
Tris(hydroxymethyl) aminomethane	Sigma

1.2 สารเคมีเกรดอณูชีววิทยา (Molecular biology grade)

สารเคมี	บริษัทที่ผลิต
Agarose	SeaKem®
Alu I (เอนไซม์)	Promega
Ampicillin	Sigma
Anti-DIG	Boeheringer Mannhem
Blocking reagent	Boeheringer Mannhem
BSA	Promega
Ethidium bromide	Sigma
Hae III (เอนไซม์)	Promega
Isopropanol	Sigma
Lysozyme	Sigma
Maleic acid	Sigma
NBT/BCIP	Boeheringer Mannhem
N-lauroyl sarcosine	Sigma
Nusieve agarose	FMC
Ribonuclease A	Sigma
Rsa I (เอนไซม์)	Promega
Taq DNA polymerase	QIAGEN
T4 DNA ligase	Promega

2. ตัวอย่างพืช

ใบปาล์มน้ำมันจากศูนย์วิจัยพืชสวนสุราษฎร์ธานี กรมวิชาการเกษตร จังหวัดสุราษฎร์ธานี คู่ผสม 105, 109, 110 และ 116 ซึ่งแต่ละ คู่ผสม ประกอบด้วย type ดูรา เทเนอรา และ พิสิเฟอรา โดยทำการเก็บรักษาใบปาล์มน้ำมันที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาสกัดดีเอ็นเอ

Central Library
Prince of Songkla University

3. แบคทีเรีย

E. coli Top 10 F′ มีลักษณะ Genotype : F′ [*pro*AB, *lac* I^q, *lacZ*ΔM15, Tn10(Tet^R) *mcr*A, Δ (*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC), ϕ80*lacZ*ΔM15, Δ*lac*X74, *deo*R, *rea*A1, *ara*Δ139, Δ(*ara-leu*)7697, *gal*U, *gal*K, *rps*L(Str^R), *end* A1, *nup*Gλ⁻] จาก บริษัท Invitrogen ประเทศเนเธอร์แลนด์

4. ดีเอ็นเอพาหะ

pGEM® - T Easy (Promega)

5. adapter

adapter ประกอบด้วย

5′-CTA AGG CCT TGC TAG CAG AAG C-3′

5′-GCT TCT GCT AGC AAG GCC TTA GAA AA-3′

6. ไพรเมอร์

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส 5′→3′
Forward primer สำหรับ adapter	CTA AGG CCT TGC TAG CAG AAG
UBC106	CGT CTG CCC G
UBC108	GTA TTG CCC T
UBC705	GGA GGA AGG G
UBC707	CCC AAC ACC C
UBC731	CCC ACA CCA C
UBC801	ATA TAT ATA TAT ATA TT
UBC802	ATA TAT ATA TAT ATA TG

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส 5′→3′
UBC803	ATA TAT ATA TAT ATA TC
UBC804	TAT ATA TAT ATA TAT AA
UBC805	TAT ATA TAT ATA TAT AC
UBC806	TAT ATA TAT ATA TAT AG
UBC807	AGA GAG AGA GAG AGA GT
UBC808	AGA GAG AGA GAG AGA GC
UBC809	AGA GAG AGA GAG AGA GG
UBC810	GAG AGA GAG AGA GAG AT
UBC811	GAG AGA GAG AGA GAG AC
UBC812	GAG AGA GAG AGA GAG AA
UBC813	CTC TCT CTC TCT CTC TT
UBC814	CTC TCT CTC TCT CTC TA
UBC817	CAC ACA CAC ACA CAC AA
UBC825	ACA CAC ACA CAC ACA CT
UBC833	ATA TAT ATA TAT ATA TYG
UBC837	TAT ATA TAT ATA TAT ART
UBC841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC
UBC842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG
OPC19	GTT GCC AGC C
OPC20	ACT TCG CCA C

หมายเหตุ Y = T, C

R = G, A

อุปกรณ์

1. เครื่อง Spectrophotometer รุ่น Ultrospec III (Pharmacia)
2. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่งรุ่น Junior 2000 C (Precisa)
3. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Sartorius)
4. เครื่อง Centrifuge รุ่น 5415C (eppendorf)
5. เครื่อง Centrifuge รุ่น H-1200 B (KOKUSAN)
6. เครื่องวัด pH รุ่น Model 25 (Denver Instrument)
7. เครื่องตรวจสอบดีเอ็นเอโดยวิธี Agarose gel electrophoresis (BIO-RAD)
8. หลอดสำหรับทำพีซีอาร์ ขนาด 0.2 , 0.5 มิลลิลิตร
9. เครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Labline)
10. เครื่องหมุนเหวี่ยงที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ รุ่น TLG 382K (Hermk)
11. เครื่องหมุนเหวี่ยงที่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ รุ่น 2K (Sigma)
12. ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส (WTC binder)
13. เครื่อง UV light transilluminator (UVP)
14. หม้อนึ่งความดันรุ่น HVE-50 (HICLAVE^{TM})
15. ตู้ปราศจากเชื้อ Larminar flow (NUAIRE)
16. เครื่องสังเคราะห์ดีเอ็นเอ Polymerase Chain Reaction (Hybraid)
17. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (BIO-RAD)
18. เครื่องดูดความชื้นสูญญากาศ (Vacuum dryer)
19. ตู้เย็นแช่แข็ง –70 องศาเซลเซียส (REVCO)

วิธีการ

1. การเตรียมโครโมโซมอลดีเอ็นเอ

1.1 การสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอโดยใช้ CTAB method (ดัดแปลงจาก Doyle and Doyle, 1990)

บดใบปาล์มประมาณ 0.5-1.0 กรัม ในไนโตรเจนเหลวโดยใช้โกร่งบด ขูดผงที่บดละเอียดใส่ในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร เติม CTAB buffer 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หรือจนกว่าเซลล์แตกจนหมด โดยสังเกตได้จากสารละลายมีสีเขียวเข้มและหนืด เขย่าเบาๆ เป็นครั้งคราว จากนั้นเติม phenol : chloroform : isoamyl alcohol ซึ่งมีอัตราส่วน 25:24:1 (v/v/v) 5 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ให้ทั่วถึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำส่วนใสเก็บไว้ในหลอดใหม่ เติม chloroform : isoamyl alcohol ซึ่งมีอัตราส่วน 24:1 (v/v) 5 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนใสไว้ในหลอดใหม่เติม isopropanol ที่แช่เย็น ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรส่วนใสที่ได้ ผสมเบาๆ ให้เข้ากันเพื่อตกตะกอน nucleic acid เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืนแล้วเก็บตะกอน nucleic acid โดยหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนใสออกเบาๆ เหลือตะกอนสีขาวบริเวณก้นหลอด จากนั้นเติม wash buffer ลงไปที่ตะกอน หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เก็บตะกอนและทำตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เติม RNase A ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร และตรวจคุณภาพของดีเอ็นเอด้วย อิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 1% ดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

1.2 การสกัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอโดยวิธีใช้ DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)

นำใบปาล์มที่บดด้วยไนโตรเจนเหลวเติมลงในหลอด microcentrifuge ที่มีบัฟเฟอร์ AP1 400 ไมโครลิตร และ RNase A 4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ระหว่างการอุ่นกลับหลอดไปมา 2-3 ครั้ง เติม บัฟเฟอร์

AP2 130 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาและนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 5 นาที นำส่วนใสลงในคอลัมน์ QIAshredder spin หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ย้ายคอลัมน์ลงในหลอดใหม่ เติมบัฟเฟอร์ AP3/E 1.5 เท่า นำส่วนใสที่ได้ลงคอลัมน์ DNeasy นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ย้ายคอลัมน์ลงในหลอดใหม่เติมบัฟเฟอร์ AW ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที 2 ครั้ง ย้ายคอลัมน์ลงในหลอดใหม่ ทำการชะโครโมโซมออกจากคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่นที่อุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1200 รอบต่อนาที นาน 1 นาที นำโครโมโซมที่สกัดได้ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร คำนวณหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอและตรวจคุณภาพ ของดีเอ็นเอด้วย อิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 1 % ดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

2. การคัดเลือกไมโครแซตเทลไลท์ดีเอ็นเอ

2.1 การเตรียมดีเอ็นเอสำหรับทำห้องสมุดดีเอ็นเอ

2.1.1 การเตรียมดีเอ็นเอ

นำโครโมโซมอลดีเอ็นเอ ที่สกัดจากใบปาล์ม 3 ชนิด คือ ดูรา (D79), เทเนอรา (T65) และ พิสิเฟอรา (P466) มาผสมรวมกันคิดเป็นปริมาณดีเอ็นเอรวม 90 ไมโครกรัม ใส่ sodium acetate ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.3 โมลาร์ จากนั้นใส่ absolute ethanol ที่เย็นจัดปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรทั้งหมด ผสมให้เข้ากัน เก็บที่ –20 องศาเซลเซียส นาน 1-2 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จะเห็นตะกอนใสที่ก้นหลอด เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ 10,000 รอบต่อนาที 10 นาที ค่อยๆ เทส่วนใสทิ้งระวังอย่าให้ตะกอนหลุดจากก้นหลอด นำไปทำให้แห้งโดยใช้ vacuum dryer ละลายตะกอนในน้ำกลั่น 150 ไมโครลิตร

2.1.2 การตัดโครโมโซมอลดีเอ็นเอและการคัดเลือกขนาดดีเอ็นเอ

ผสมดีเอ็นเอ (90 ไมโครกรัม) 150 ไมโครลิตร กับ 10X buffer C 35 ไมโครลิตร, เอนไซม์ *Rsa* I, *Alu* I และ *Hae* III ชนิดละ 2 ไมโครลิตร, BSA (100X) 2 ไมโครลิตร และ น้ำกลั่น 157 ไมโครลิตร ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 350 ไมโครลิตร บ่มสารละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการตัดดีเอ็นเอด้วย อิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 1% และ NuSieve agarose 1% ย้อมเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และส่องภายใต้แสง UV สกัดดีเอ็นเอขนาดเล็กกว่า 500 เบส ออกจากเจลโดยใช้ QIAguickGel Extraction Kit (QIAGEN)

2.1.3 การเชื่อม adapter (ดัดแปลงจาก Perera , *et al.*, 1999)

ผสมสารละลาย adapter ที่มีลักษณะเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว 2 สาย ซึ่งเป็นคู่สมกัน ชนิดละ 3 ไมโครกรัม จะได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 14.77 ไมโครลิตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที และปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้องอย่างช้าๆ เพื่อให้เกิดการจับกันของ oligomer เติมดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันในขั้นตอนที่ 2.1.2 ปริมาตร 45 ไมโครลิตร ในสารละลาย adapter (3 ไมโครกรัม) 5 ไมโครลิตร, 10X ligation buffer 10 ไมโครลิตร และ T4 DNA ligase (500 U) 3 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้เท่ากับ 100 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชม. หยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

2.1.4 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ผสมดีเอ็นเอในขั้นตอนที่ 2.1.3 10 ไมโครลิตร กับ forward ไพรเมอร์ (10 ไมโครโมลาร์) 4 ไมโครลิตร, dNTPs (10 มิลลิโมลาร์) 1 ไมโครลิตร, 10X buffer 5 ไมโครลิตร, *Taq* DNA polymerase 0.4 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ (20 มิลลิโมลาร์) 3 ไมโครลิตร และ น้ำกลั่น 26.6 ไมโครลิตร ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครลิตร โดยชุดควบคุมใช้ น้ำกลั่นใส่แทนดีเอ็นเอ และเทียบระหว่างดีเอ็นเอที่ไม่เจือจาง กับดีเอ็นเอที่เจือจาง 10 เท่า

นำสารละลายไปทำพีซีอาร์ โดยมีสภาวะการทำงานดังต่อไปนี้ 96 องศาเซลเซียส 5 นาที รอบแรก และ 96 องศาเซลเซียส 45 วินาที, 60 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที อีก 40 รอบ นำผลจากการทำพีซีอาร์ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 1.8 %

2.2 การคัดเลือกไมโครแซตเทลไลท์โดยใช้ Streptavidin magnetic beads (ดัดแปลงจาก Kijas, *et al.*, 1994 ; Fischer and Bachmann, 1998)

2.2.1 การเตรียม Streptavidin magnetic beads

นำ streptavidin magnetic beads (Promega) 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ล้างด้วย 0.5X SSC 3 ครั้ง ตามด้วย 6X SSC อีก 1 ครั้ง ใส่ oligomer 1 ไมโครกรัม [5′-biotin-$(CA)_{15}$ หรือ 5′-biotin-$(GA)_{15}$ ในสารละลาย 6X SSC ปรับปริมาตรรวมให้เป็น 100 ไมโครลิตร] นำตัวอย่างไปเขย่าที่อุณหภูมิห้อง หรือ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที นำเฉพาะส่วนที่เป็น magnetic beads มาล้างด้วย 6X SSC 100 ไมโครลิตร 3 ครั้ง และล้างอีกครั้งด้วย 10X SSC ปริมาตร 35 ไมโครลิตร

2.2.2 การ hybridization เพื่อคัดเลือกไมโครแซทเทลไลท์โดยใช้ Streptavidin magnetic beads

นำดีเอ็นเอจากข้อ 2.1.4 ปริมาตร 65 ไมโครลิตร (4 ไมโครกรัม) ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งแล้วเติมสารละลายดีเอ็นเอลงใน bead ที่เตรียมไว้ในข้อ 2.2.1 เขย่าตลอดเวลาที่อุณหภูมิห้อง หรือ 65 องศาเซลเซียส นำเฉพาะ bead มาล้าง ด้วย 100 ไมโครลิตร ของ 2X SSC 4 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และล้างด้วย 100 ไมโครลิตร ของ 1X SSC อีก 4 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ชะดีเอ็นเอโดยใช้ T-dot-E 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เก็บส่วนใสนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)

2.2.3 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์

ผสมตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากขั้นที่ 2.2.2 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, 10X buffer 5 ไมโครลิตร, *Taq* DNA polymerase 0.4 ไมโครลิตร, forward primer (10 ไมโครโมลาร์) 4 ไมโครลิตร, dNTPs (10 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ (25 มิลลิโมลาร์) 3 ไมโครลิตร และ น้ำกลั่น 31.6 ไมโครลิตร นำสารละลายไปทำพีซีอาร์โดยมีสภาวะการทำงานดังต่อไปนี้ 96 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ และ 96 องศาเซลเซียส 45 วินาที, 60 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที อีก 40 รอบ นำตัวอย่างที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) ตรวจสอบผลด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล 1.8 % ใน 0.5X TAE buffer และหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง 260 นาโนเมตร

2.3 การโคลนไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ7

2.3.1 การเชื่อมดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอพาหะ

เชื่อมตัวอย่างดีเอ็นเอจากข้อ 2.2.3 กับดีเอ็นเอพาหะ pGEM®-T Easy ในอัตราส่วน 1:1 โดยผสมสารละลายดังต่อไปนี้ T4 DNA ligase 1 ไมโครลิตร, 2X ligation buffer 5 ไมโครลิตร, pGEM®-T Easy (100 นาโนกรัม) 2 ไมโครลิตร, ดีเอ็นเอ (250 นาโนกรัม) 1 ไมโครลิตร และ น้ำกลั่น 1 ไมโครลิตร ซึ่งจะได้ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

2.3.2 การนำดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* Top 10F′ (ดัดแปลงจากวิธีการของ Maniatis, *et al.*, 1982)

ผสม competent cell 200 ไมโครลิตร กับ ดีเอ็นเอลูกผสมปริมาตร 5 ไมโครลิตร วางบนน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที ทำการ heat shock ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ปริมาตร 800 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปเลี้ยงบนอาหาร LB agar ที่มี

ampicillin ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

2.3.3 การสกัดพลาสมิดเพื่อตรวจหาดีเอ็นเอลูกผสม (ดัดแปลงจาก Holmes และ Quigley, 1981)

นำแบคทีเรียที่เจริญบนจานอาหารแต่ละโคโลนีไปเลี้ยงในอาหาร LB broth ที่มี ampicillin ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเลี้ยงในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดพลาสมิด โดยดูดเชื้อมา 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที จึงเทส่วนใสทิ้ง และเก็บตะกอนเซลล์ไว้ และเติม STET buffer 350 ไมโครลิตร นำไปเขย่าให้ตะกอนละลาย ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จึงนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 45 วินาที เมื่อครบเวลานำไปวางบนน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ใช้ไม้จิ้มฟันที่ปลอดเชื้อเขี่ยเอาตะกอนสีขาวของโปรตีนและโครโมโซมออก เติม isopropanol 350 ไมโครลิตร และตกตะกอนพลาสมิดที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที 10 นาที เพื่อให้ตะกอนตกลงมาที่ก้นหลอด เทส่วนใสทิ้ง และทำตะกอนให้แห้งโดยใช้สูญญากาศ ละลายตะกอนในน้ำกลั่น 30 ไมโครลิตร กำจัด RNA ด้วย RNase A ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

2.4 การตรวจหาพลาสมิดที่มีไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอด้วยวิธี dot blot hybridization (Boehringer Mannheim)

2.4.1 การติดฉลากดีเอ็นเอตรวจจับด้วยไบโอติน

ผสม Oligonucleotide (CA_{15} หรือ GA_{15} 1 ไมโครกรัม) 1.5 ไมโครลิตร, 5X Reaction buffer 4 ไมโครลิตร, $CoCl_2$ solution 4 ไมโครลิตร, DIG-ddUTP 1 ไมโครลิตร, Terminal transferase 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 8.5 ไมโครลิตร จะได้ปริมาตรรวมเป็น 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-20 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 2 ไมโครลิตร ของสารละลายผสมระหว่าง glycol solution 1

ไมโครลิตร กับ 0.2 โมลาร์ EDTA 200 ไมโครลิตร ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย LiCl 4 โมลาร์ ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร และ absolute ethanol ที่เย็น ปริมาตร 75 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง และล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทำตะกอนให้แห้งโดยใช้สูญญากาศและละลายตะกอนในน้ำกลั่น ปริมาตร 30 ไมโครลิตร นำไปเก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

2.4.2 การ hybridization ในการทำ dot blot hybridization

ใช้พลาสมิดจากข้อ 2.3.3 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ที่ผ่านการต้มและแช่น้ำแข็งทันทีมาหยดลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรน ตรึงดีเอ็นเอด้วย UV cross link นาน 5 นาที นำแผ่นไนลอนเมมเบรนที่มีดีเอ็นเอติดอยู่ไปบ่มในสารละลาย prehybridization (5X SSC, 1% (w/v) blocking reagent, 0.1% N-lauroylsacosine, 0.2% SDS) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วบ่มต่อในสารละลาย hybridization (มีส่วนผสมเช่นเดียวกับสารละลาย prehybridization แต่มีดีเอ็นเอตรวจจับจากขั้นตอนที่ 2.4.1) ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำแผ่นเมมเบรนมาล้างด้วยสารละลาย washing I (2X SSC, 0.1% SDS) 4 ครั้งๆ ละ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยสารละลาย washing II (0.1X SSC, 0.1% SDS) 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ปล่อยให้แผ่นเมมเบรนแห้งที่อุณหภูมิห้อง

2.4.3 การตรวจผลการ hybridization ในการทำ dot blot hybridization

นำไนลอนเมมเบรนที่ได้จากขั้นตอนที่ 2.4.2 มาล้างในสารละลาย washing buffer (maleic acid buffer, Tween®20 3% (v/v)) เป็นเวลา 1-5 นาที บ่มในสารละลายแอนติบอดี (anti-DIG-AP conjugate 1:2,500 ในสารละลาย blocking) 10 มิลลิลิตร นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลาย washing buffer 10 มิลลิลิตร 2 ครั้งๆ ละ 30 นาที ล้างด้วยสารละลาย detection buffer (0.1 M Tris pH 9.5, 0.1 M Sodium chloride, 0.05 M Magnesium chloride) 20 มิลลิลิตร นาน 5 นาที แล้วนำมาแช่ในสารละลาย color

substrate (NBT/BCIP 200 ไมโครลิตรใน detection buffer 10 มิลลิลิตร) วางไว้ในที่มืด เมื่อปรากฏสีน้ำเงินม่วงของดีเอ็นเอหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น

2.5 การหาลำดับเบสของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ

คัดเลือกโคลนที่ให้ผลบวกในการทดลองขั้นตอนที่ 2.4.3 ทำการสกัดพลาสมิดโดยใช้ QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN) และหาลำดับเบสโดย BigDye™ Terminator Cycle Sequencing kits และเครื่อง Biosystems 377 sequencer (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) ตรวจสอบผลการเรียงลำดับเบสว่าเป็นไมโครแซทเทลไลท์หรือไม่กับข้อมูลของธนาคารยีน

2.6 การออกแบบไพรเมอร์

นำลำดับเบสที่เป็นไมโครแซทเทลไลท์มาออกแบบไพรเมอร์แบบจำเพาะโดยใช้โปรแกรม Vector NTI 5

3. การศึกษา polymorphic DNA ของปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์

นำไพรเมอร์ที่ได้จากขั้นตอนที่ 2.6 ทั้งหมดไปทำพีซีอาร์กับปาล์มน้ำมันคู่ผสม 105, 109, 110 และ 116 โดยนำดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันพันธุ์ต่างๆ 2 ไมโครลิตร ผสมกับ 10X buffer 2.5 ไมโครลิตร, *Taq* DNA polymerase 0.1 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ที่ออกแบบ 2 ไมโครลิตร, dNTP mix (10 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ (25 มิลลิโมลาร์) 1.5 ไมโครลิตร และ น้ำกลั่น 14.4 ไมโครลิตร ทำพีซีอาร์ โดยมีสภาวะการทำงานคือ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 45 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที อีก 35 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที 1 รอบ นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำการแยกด้วยอิเล็คโทรโฟรีซิสบนโพลีอะคริลาไมด์เจล 8% และย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบแบบแผนที่เกิดขึ้น

3.1 การทำ polyacrylamide gel electrophoresis

ผสมสารดังต่อไปนี้ในบีกเกอร์ 30% acrylamide 3.2 มิลลิลิตร, 10X TBE 0.6 มิลลิลิตร, น้ำกลั่น 8.2 มิลลิลิตร, 10% APS 180 ไมโครลิตร และ TEMED 12 ไมโครลิตร คนให้เข้ากันแล้วเทลงในถาดทำอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบแนวนอน ปะกบผิวเจลด้วยแผ่นปิดเจลตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เมื่อจะใช้นำไปผ่านกระแสไฟฟ้า 100 โวลล์ ใน 0.5X TBE buffer

4. การศึกษา polymorphic DNA ของปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิค EPIC

ใช้ไพรเมอร์สำหรับยีน Alcohol dehydrogenase (*Adh*), Calmodulin (*Cal*) และGlyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*G3pdh*) (Strand, *et al.*, 1997) ตามตาราง 1 ไปทำพีซีอาร์กับปาล์มน้ำมันคู่ผสม 105, 109, 110 และ 116 โดยนำดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันพันธุ์ต่างๆ 2 ไมโครลิตร ผสมกับ 10X buffer 2.5 ไมโครลิตร, *Taq* DNA polymerase 0.1 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ 2 ไมโครลิตร, dNTP mix (10 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ (25 มิลลิโมลาร์) 1.5 ไมโครลิตร และ น้ำกลั่น 14.4 ไมโครลิตร ซึ่งจะได้ปริมาตรสุดท้าย 25 ไมโครลิตร ทำพีซีอาร์โดยมีสภาวะการทำงานดังต่อไปนี้ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 45 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที อีก 35 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที นำสารละลายที่ได้มาทำการแยกด้วยอิเล็คโทรโฟรีซิสบนโพลีอะคริลาไมด์เจล 8% และย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบแบบแผนที่เกิดขึ้น

ตาราง 1 ไพรเมอร์ที่ออกแบบและลำดับเบสในการใช้เทคนิค EPIC

Table 1 Primer designations and their sequences for oligonucleotides designed for EPIC

Gene	Primer Name	Sequence 5′→3′
Alcohol dehydrogenase (*Adh*)	ADMX2F	TACTTITGGGAACGIAAGGTA
	ADMX2R	TCICCIACACTCTCIACAAT
Calmodulin (*Cal*)	CAMXIF	AGCCTNTTCGACAAGGATGG
	CAMXIR	AGTGANCGCATCACAGTT
Glyceraldehyde 3-phosphate	GPDX7F	GATAGATTTGGAATTGTTGAGG
dehydrogenase (*G3pdh*)	GPDX9R	AAGCAATTCCAGCCTTGG

5. การศึกษา polymorphic DNA ของปาล์มน้ำมันโดยใช้เทคนิค RAPD

นำชุดไพรเมอร์ UBC106, UBC108, UBC705, UBC707, UBC731, UBC801-814, UBC817, UBC825, UBC833, UBC837, UBC841, UBC842, OPC19 และ OPC20 ไปทำ พีซีอาร์กับปาล์มน้ำมันคู่ผสม 105, 109, 110 และ 116 โดยนำดีเอ็นเอของปาล์มน้ำมันพันธุ์ต่างๆ 1 ไมโครลิตร ผสมกับ 10X buffer 2.5 ไมโครลิตร, *Taq* DNA polymerase 0.2 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ 2 ไมโครลิตร, dNTP mix (10 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ (25 มิลลิโมลาร์) 1.5 ไมโครลิตร และ น้ำกลั่น 17.3 ไมโครลิตร ซึ่งจะได้ปริมาตรสุดท้าย 25 ไมโครลิตร ทำพีซีอาร์ โดยมีสภาวะการทำงานดังต่อไปนี้ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที รอบแรก 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 45 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที อีก 35 รอบ (ramp time 0.3 ^{o}C/sec) และ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที นำสารละลายที่ได้มาทำการแยกด้วยอิเล็คโทรโฟรีซิสบนโพลีอะคริลาไมด์เจล 8% และย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบแบบแผนที่เกิดขึ้น