บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของแมลงบั่วและการกระจายตัว

เก็บตัวอย่างแมลงบั่วตัวเต็มวัยในพื้นที่ 9 จังหวัดภาคเหนือ ทั้งหมด 16 กลุ่มประชากร แบ่งเป็น 2 ลักษณะของกลุ่มประชากร คือ ประชากรที่ได้จากการเลี้ยงในโรงเรือน กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และประชากรที่เก็บได้จากสภาพธรรมชาติ (ตาราง 1) รวมทั้งการสำรวจพืชอาหารในบริเวณรัศมี 3 กิโลเมตร และความสูงจากระดับน้ำทะเลปานกลาง เก็บรักษาตัวอย่างแมลงที่ –80 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพความสดของแมลง นำมาศึกษาแมลงตัวอย่างดังนี้

3.1.1 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก

ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกที่สำคัญ ได้แก่ อวัยวะสืบพันธุ์ อวัยวะช่วยประสาน ปาก (palp), tarsi และหนวด โดยใช้กล้องบันทึกภาพกำลังขยายขนาดสูงและวัดขนาดความกว้างและความยาวปีก ทำการเปรียบเทียบสรุปผล

3.1.2 การศึกษาการกระจายตัวของแมลงบั่วในแต่ละพื้นที่

ศึกษาการกระจายตัวของแมลงบั่วในแต่ละพื้นที่ภาคเหนือตอนบน (ภาพ 1) โดยอาศัยความสัมพันธ์ระหว่างอัตราความยาวกับความกว้างปีก, อัตราส่วนความยาวต่อความกว้างปีกกับจำนวนชนิดของพืชอาหาร และอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างปีกกับความสูงจากระดับน้ำทะเลปานกลาง

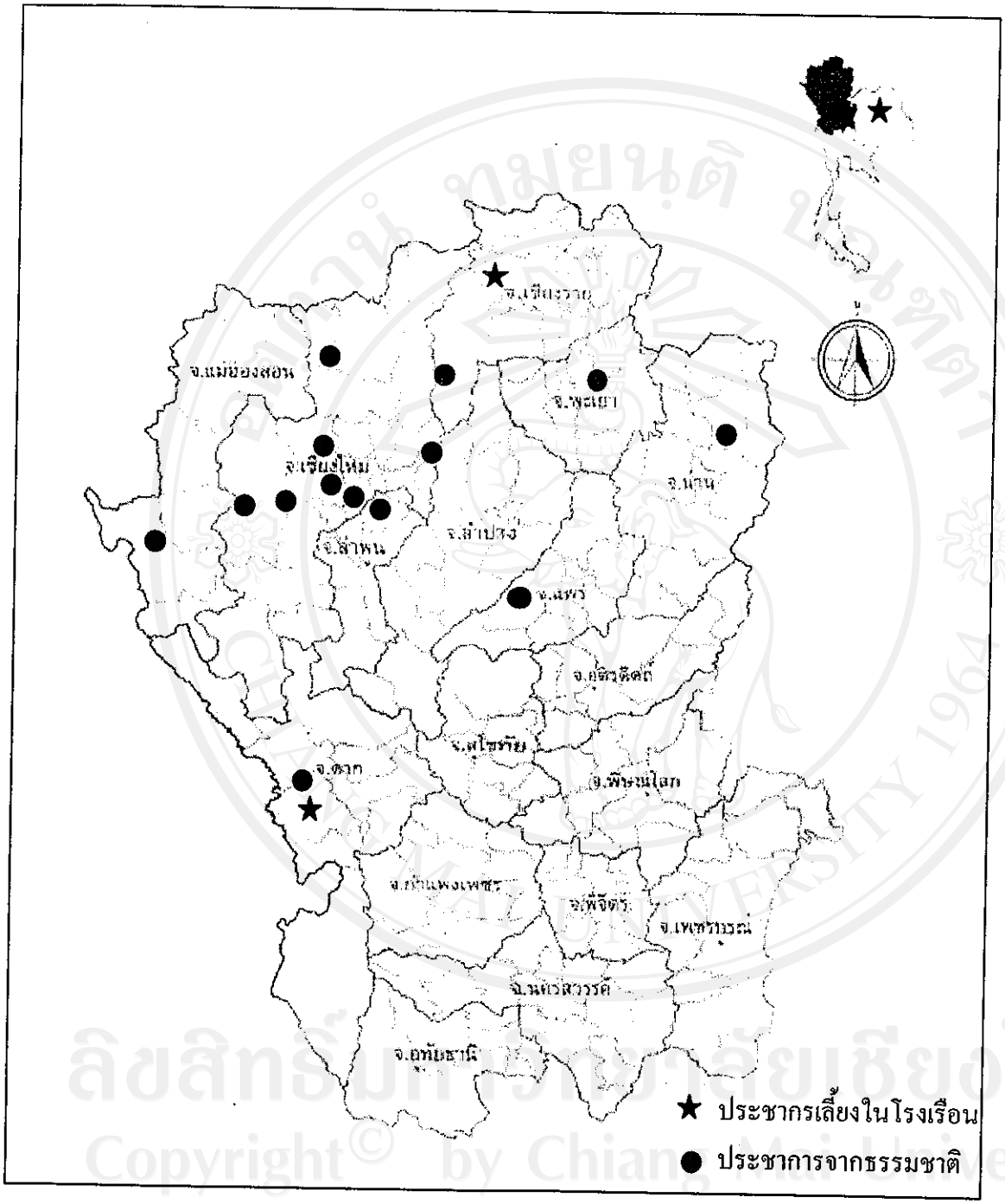
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1 แหล่งที่มา และพืชอาหารของประชากรแมลงบั่วที่ใช้ในการศึกษา และระดับความสูงจากระดับน้ำทะเลปานกลาง

ประชากรแมลงบั่ว	แหล่งที่มา	พืชอาหาร	สายพันธุ์	ความสูงจากระดับน้ำทะเลปานกลาง (เมตร)*
ประชากรเลี้ยง (กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพมหานคร)				
	จ. เชียงราย	*Orysa sativa* L.	กข. 4	1
	จ. ตาก	*Orysa sativa* L.	กข. 4	1
	จ. อุบลราชธานี	*Orysa sativa* L.	กข. 4	1
ประชากรที่เก็บจากสภาพธรรมชาติ				
	อ. เชียงดาว จ. เชียงใหม่	*Orysa sativa* L.	สันป่าตอง 1, เหมยนอง	620
	อ. แม่แจ่ม จ. เชียงใหม่	*Orysa sativa* L.	กข.6, สันป่าตอง 1 และเหมยนอง	620
	อ. แม่วาง จ. เชียงใหม่	*Orysa sativa* L.	กข.6,สันป่าตอง 1	420
	อ. แม่ริม จ. เชียงใหม่	*Orysa sativa* L.	สันป่าตอง 1	310
	อ. เมือง จ. เชียงใหม่	*Orysa sativa* L.	สันป่าตอง 1	300
ประชากรที่เก็บจากสภาพธรรมชาติ				
	อ. สันป่าตอง จ. เชียงใหม่	*Orysa sativa* L.	สันป่าตอง 1	300
	อ. แม่จัน จ. เชียงราย	*Orysa sativa* L.	สันป่าตอง 1	397
	อ. ห้างฉัตร จ. ลำปาง	*Orysa sativa* L.	สันป่าตอง 1	500
	อ. เมือง จ. ลำพูน	*Orysa sativa* L.	สันป่าตอง 1	300
	อ. แม่สะเรียง จ. แม่ฮ่องสอน	*Orysa sativa* L.	สันป่าตอง 1	314
	อ. ปัว จ. น่าน	*Orysa sativa* L.	สันป่าตอง 1	400
	อ. เมือง จ. พะเยา	*Orysa sativa* L.	สันป่าตอง 1	397
	อ. เมือง จ. แพร่	*Orysa sativa* L.	สันป่าตอง 1	162
	อ. แม่สอด จ. ตาก	*Orysa sativa* L.	กข.6, สันป่าตอง 1	220

* กรมแผนที่ทหาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 1 แผนที่แสดงการกระจายตัวของแมลงบั่วจากแหล่งต่างๆ ในภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 การสกัด การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอ

สกัดด้วยวิธี complex method ดัดแปลงจากวิธีการของ Reineke *et al.* (1998)

1) นำแมลงบั่วตัวเต็มวัย 20 ตัว บดด้วย โกร่ง พร้อมด้วยไนโตรเจนเหลว

2) เติม extraction buffer (ประกอบด้วย 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 M NaCl, 0.1 M EDTA, 5% SDS, Proteinase K 1 mg/ml และ RNaseA 2.5 mg/ml) 1 มิลลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกับชิ้นส่วนของแมลง

3) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

4) นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เก็บสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่

5) สกัดดีเอ็นเอด้วย phenol ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายใส นำหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายใสใส่หลอดใหม่

6) สกัดดีเอ็นเอด้วย สกัดด้วย Chloroform : iso-amyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่า นำใส่เครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายใสใส่หลอดใหม่

7) ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยการเติม 1/10 เท่าของ 3M NaOAc และเติม Absolute ethanol 2 เท่า จากนั้นนำไปแช่ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง หรือข้ามคืน

8) นำมาใส่เครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เทออก

9) ล้างด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำใส่เครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 7,500 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทออก ล้างด้วย 70% ethanol ทำซ้ำข้อ 9 อีกครั้ง

10) นำดีเอ็นเอที่ได้ตากไว้ที่อุณหภูมิห้องปล่อยให้แห้ง

11) ละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer แล้วเก็บไว้ที่อุณภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยใช้ Lamda DNA marker เปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอ โดยนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ผสมกับ loading buffer แล้วหยดลงใน 1.0% agarose gel electrophoresis ที่อยู่ใน 1X TAE buffer ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลท์ เป็นเวลา 20 นาที นำแผ่น agarose gel ไปย้อมด้วย ethidium bromide เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างแผ่นเจลด้วยน้ำเปล่า เป็นเวลา 10 นาที จึงนำแผ่นเจลไปตรวจดูภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

3.3.1 การใช้เทคนิค AFLP

นำสารละลายดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร มาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค AFLP ตามวิธีของ Kartiyar *et al.* (2000); Wimmer *et al.* (2002) และ อัญชลี (2548) ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1) การตัดชิ้นดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) และการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอ (Ligation)

นำดีเอ็นเอความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ปริมาตร 5.0 ไมโครลิตร (500 ng) ละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 15 ไมโครลิตร จากนั้นเติม *Mse*I restriction buffer 5.0 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ส่วนประกอบของ *Mse*I restriction buffer ดังนี้

10X buffer	2.5 ไมโครลิตร
*Mse*I (10 unit)	1.0 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	1.5 ไมโครลิตร

จากนั้นเติม *Pst*I restriction buffer 15.0 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ปริมาตรรวมทั้งหมด 40 ไมโครลิตร

ส่วนประกอบของ *Pst*I restriction buffer ดังนี้

10X buffer	1.5 ไมโครลิตร
*Pst*I (10 unit)	1.0 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	12.5 ไมโครลิตร

จากนั้นเติม ligation buffer 10.0 ไมโครลิตร เพื่อทำการเชื่อมต่อ *Mse*I adapter และ *Pst*I adapter (ตาราง 2) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ส่วนประกอบของ ligation buffer ดังนี้

10X buffer ligation	2.5 ไมโครลิตร
50 µM *Mse*I adapter	1.0 ไมโครลิตร
10 µM *Pst*I adapter	2.0 ไมโครลิตร
T4 DNA ligation (1 unit)	0.3 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	4.2 ไมโครลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ของ adapter ที่ใช้ในการ ligation

Adapter	ลำดับนิวคลีโอไทด์(nucleotide)
*Pst*I adapter	5'-CTCGTAGACTGCGTACATGCA-3'
	3'-CATCTGACGCATGT-5'
*Mse*I adapter	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'
	3'-TACTCAGGACTCAT-5'

นำดีเอ็นเอที่ผ่านการ digest และ ligate แล้ว มาทำเจือจางลง 5 เท่า ด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (template) ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR) ต่อไป

2) ปฏิกิริยาพีซีอาร์

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ครั้งแรก (pre-amplification) นำดีเอ็นเอต้นแบบที่เจือจางแล้วมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยามีดังนี้

ดีเอ็นเอต้นแบบที่เจือจางแล้ว	5.0 ไมโครลิตร
10X buffer	2.5 ไมโครลิตร
10 pmol *Pst*I primer	0.4 ไมโครลิตร
10 pmol *Mse*I primer	0.4 ไมโครลิตร
2.5 mM dNTPs	0.5 ไมโครลิตร
25 mM $MgCl_2$	1.5 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	14.6 ไมโครลิตร
5 unit Taq DNA polymerase	0.1 ไมโครลิตร

ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ครั้งแรก จะมีลำดับเบสเข้าชุดกับ adapter แต่ยาวกว่าลำดับเบสของ adapter ที่ปลาย 3' อยู่ 1 เบส คือ *Pst*I-A และ *Mse*I- A ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ (ตาราง 3) นำส่วนประกอบทั้งหมดใส่ในหลอดทดลองขนาด 200 ไมโครลิตร จากนั้น นำมาทำปฏิกิริยาในเครื่องพีซีอาร์ โดยกำหนดเวลา อุณหภูมิ และจำนวนรอบแต่ละขั้นตอนดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยเทคนิค AFLP

Primer		ลำดับของนิวคลีโอไทด์ (nucleotides)
Pre-amplification	*Pst*I primer-A	5'-CTCGTAGACTGCGTACATGCA-3'
	*Mse*I primer-A	5'-GACGATGAGTCCTGAGTAA-3'
Selective amplification	1. *Pst*I primer-CCA	5'-GACTGCGTACATGCACCA-3'
	2. *Pst*I primer-GTT	5'-GACTGCGTACATGCAGTT-3'
	1. *Mse*I primer-CAC	5'-GATGACTCCTGACTAACAC-3'
	2. *Mse*I primer-ACC	5'-GATGAGTCCTGAGTAAACC-3'
	3. *Mse*I primer-CCA	5'-GATGAGTCCTGAGTAACCA-3'
	4. *Mse*I primer-CAA	5'-GATGAGTCCTGAGTAACAA-3'
	5. *Mse*I primer-ACG	5'-GATGAGTCCTGAGTAAACG-3'
	6. *Mse*I primer-CGA	5'-GATGAGTCCTGAGTAACGA-3'
	7. *Mse*I primer-CGT	5'-GATGAGTCCTGAGTAACGT-3'
	8. *Mse*I primer-CCT	5'-GATGAGTCCTGAGTAACCT-3'

รอบที่ 1	Predenaturation	94 องศาเซลเซียส 4.0 นาที	
รอบที่ 2	Denaturation	94 องศาเซลเซียส 0.30 นาที	จำนวน 2 รอบ
	Anaealing	60 องศาเซลเซียส 1.0 นาที	
	Extension	72 องศาเซลเซียส 1.0 นาที	
รอบที่ 3	Denaturation	94 องศาเซลเซียส 0.30 นาที	จำนวน 2 รอบ
	Anaealing	58 องศาเซลเซียส 1.0 นาที	
	Extension	72 องศาเซลเซียส 1.0 นาที	
รอบที่ 4	Denaturation	94 องศาเซลเซียส 0.30 นาที	จำนวน 20 รอบ
	Anaealing	56 องศาเซลเซียส 1.0 นาที	
	Extension	72 องศาเซลเซียส 1.0 นาที	
รอบที่ 5	Primer extension	72 องศาเซลเซียส 5.0 นาที	

ปฏิกิริยาพีซีอาร์ครั้งที่สอง (selective amplification) นำ PCR product ที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ครั้งที่หนึ่ง นำมาเจือจาง 20 เท่าด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ และใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยามีดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ดีเอ็นเอต้นแบบ	2.5 ไมโครลิตร
10X buffer	1.25 ไมโครลิตร
10 pmol *Pst*I-XXX primer	0.4 ไมโครลิตร
10 pmol MseI-XXX primer	0.4 ไมโครลิตร
2.5 mM dNTPs	0.5 ไมโครลิตร
25 mM $MgCl_2$	0.72 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นบริสุทธิ์	6.68 ไมโครลิตร
5 unit Taq DNA polymerase	0.05 ไมโครลิตร

ไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ครั้งที่สอง จะมีการคัดเลือกเบสด้านปลาย 3' อยู่ 3 เบส (ตาราง 3) นำส่วนประกอบทั้งหมดใส่ในหลอดทดลองขนาด 200 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยาในเครื่องพีซีอาร์ โดยกำหนดเวลา อุณหภูมิ และจำนวนรอบแต่ละขั้นตอนดังนี้

รอบที่ 1	Predenaturation	94 องศาเซลเซียส	4.0 นาที	
รอบที่ 2	Denaturation	94 องศาเซลเซียส	0.30 นาที	จำนวน 3 รอบ
	Anaealing	62 องศาเซลเซียส	1.0 นาที	
	Extension	72 องศาเซลเซียส	1.0 นาที	
รอบที่ 3	Denaturation	94 องศาเซลเซียส	0.30 นาที	จำนวน 3 รอบ
	Anaealing	60 องศาเซลเซียส	1.0 นาที	
	Extension	72 องศาเซลเซียส	1.0 นาที	
รอบที่ 4	Denaturation	94 องศาเซลเซียส	0.30 นาที	จำนวน 3 รอบ
	Anaealing	58 องศาเซลเซียส	1.0 นาที	
	Extension	72 องศาเซลเซียส	1.0 นาที	
รอบที่ 5	Denaturation	94 องศาเซลเซียส	0.30 นาที	จำนวน 3 รอบ
	Anaealing	56 องศาเซลเซียส	1.0 นาที	
	Extension	72 องศาเซลเซียส	1.0 นาที	
รอบที่ 6	Denaturation	94 องศาเซลเซียส	0.30 นาที	จำนวน 3 รอบ
	Anaealing	54 องศาเซลเซียส	1.0 นาที	
	Extension	72 องศาเซลเซียส	1.0 นาที	

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

รอบที่ 7	Denaturation	94 องศาเซลเซียส 0.30 นาที	จำนวน 20 รอบ
	Anaealing	52 องศาเซลเซียส 1.0 นาที	
	Extension	72 องศาเซลเซียส 1.0 นาที	
รอบที่ 8	Primer extension	72 องศาเซลเซียส 5.0 นาที	

จากนั้นนำ PCR product ครั้งที่สองไปตรวจสอบหาแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis และย้อมสีดีเอ็นเอด้วยวิธีการ Silver strain

3) Gel electrophoresis

การเตรียมกระจก

เช็ดทำความสะอาดกระจกที่ใช้เตรียมเจล โดยใช้กระจก 2 แผ่น ประกบกัน (กระจกอีกแผ่นหนึ่งจะมีขนาดเล็กกว่ากระจกอีกแผ่นหนึ่ง จากนั้นนำไปผึ่งให้แห้ง เตรียมกระจกแผ่นเล็กโดยใช้ 95% alcohol เช็ดให้ทั่วกระจกจนสะอาด จากนั้นใส่ clear view เช็ดด้วยกระดาษคิมไวท์ให้ทั่ว แล้วเช็ดด้วย 95% alcohol อีกครั้งจนสะอาด เตรียมกระจกแผ่นใหญ่โดยใช้ 95% alcohol เช็ดให้ทั่ว จากนั้นทาด้วย Biselan ห่างจากขอบบนของกระจกแผ่นใหญ่ลงมาโดยเปรียบเทียบกับแผ่นเล็กประมาณ 0.5 เซนติเมตรของกระจกแผ่นเล็ก วางกระจกทั้งสองแผ่นใช้ spacer หนา 0.3 มิลลิเมตร กั้นด้านข้างทั้งสองด้าน ใช้ที่หนีบกระดาษหนีบด้านข้างไว้ทั้งสองด้าน เพื่อรอการเทเจลต่อไป

การเตรียมเจล (6% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis)

ชั่งยูเรีย 29.4 กรัม เติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์ 15 มิลลิลิตร ปั่นจนยูเรียละลาย จากนั้นเติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์อีก 15 มิลลิลิตร เติม 10X TBE 7.0 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 40% Polyacrylamide gel 10.5 มิลลิลิตร เติม ammonium per sulphate (APS) 400 ไมโครลิตร และเติม TEMED 30 ไมโครลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ให้ได้ปริมาตรสุดท้ายที่ 70.0 มิลลิลิตร ปั่นด้วย magnetic stirer ให้เข้ากัน จากนั้นนำมาเทลงในกระจกที่เตรียมไว้ โดยค่อยๆ เทให้เจลเข้าไปในกระจกอย่าให้ขาดตอน ถ้าเจลไหลลงไม่เท่ากันค่อยๆ ใช้มือเคาะกระจกเพื่อให้เจลไหลลงมาพร้อมกันจนเจลไหลไปถึงด้านล่างของกระจก เสียบหวีใส่ด้านบนของกระจก โดยด้านเรียบเรียบเสียบลงไป ทำแผ่นกระจกให้สมดุล ทิ้งไว้ให้แข็งตัว ประมาณ 30 นาที

การ run gel electrophoresis

นำกระจกที่เตรียมไว้มาประกอบลงบนเครื่อง Sequencing gel electrophoresis เติม 1X TBE buffer ต่อขั้วไฟฟ้า และเปิดสวิตซ์เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply) ใช้กระแสไฟ 0-2500 โวลท์ pre-run เป็นเวลา 30 นาที เพื่อไล่สารที่ไม่ต้องการออกไป ปิดเครื่องเมื่อครบกำหนด จากนั้นนำ PCR product ที่เติม loading dye 7.0 ไมโครลิตร นำไป denature ที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำมาแช่น้ำแข็ง จากนั้นนำมา load ลงบนกระจก โดยใช้ 100 bp marker เป็นตัวเปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอ ใช้กำลังไฟ 55 วัตต์ เป็นเวลาประมาณ 3.30 ชั่วโมง จากนั้นนำเจลไปย้อมสีด้วย silver staining

การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วย Silver stain

หลังจากทำอิเล็กโทรโฟรีซีสแล้ว ค่อยๆ แกะกระจกออก นำแผ่นเจลที่ติดกับกระจกอีกแผ่นหนึ่งมาแช่สาละลาย fixative 2 ชนิด คือ 10% acetic acid เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเทสารละลายออก แล้วแช่ด้วย 1% Nitric acid 20 นาที เทสารละลายออก ล้างด้วยน้ำกลั่น ประมาณ 10 นาที หรือจนแผ่นเจลสะอาด จากนั้นเติมซิลเวอร์ไนเตรท (0.1% silver nitrate และ 0.02% formaldehyde) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ขณะที่รอ เตรียมสารละลาย developer (3% sodium carbonate และ 0.1% formaldehyde) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร และแช่เย็นไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 20 นาที หลังจากนั้นแบ่ง developer มา 100 มิลลิลิตร ทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 300 มิลลิลิตร (1:2) เมื่อครบ 30 นาที เทสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทออก แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นแช่เย็นอย่างรวดเร็ว จากนั้นล้างซิลเวอร์ไนเตรทด้วย developter เจือจาง 2 ครั้ง ล้างด้วย developer ที่แช่เย็น ทำการเขย่าเบาๆ จนเห็นแถบของดีเอ็นเอปรากฏขึ้นชัดเจน หยุดปฏิกิริยาด้วย 10% acetic acid ประมาณ 10 วินาที จากนั้นล้างกรดด้วยน้ำกลั่นจนสะอาด ประกบกระดาษกับแผ่นเจลแล้วค่อยๆ ลอกแผ่นเจลออกจากกระจกให้แผ่นเจลติดกระดาษ จากนั้นจึงนำไปทำให้แผ่นเจลแห้ง ด้วยเครื่อง gel dryer และทำการวิเคราะห์ผลในขั้นตอนต่อไป

4) การวิเคราะห์ข้อมูล

นำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จาก AFLP เจล มาตรวจหาแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อแมลงบั่วในบางพื้นที่ จากนั้นนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ มาวิเคราะห์ค่าระยะห่างระหว่างพันธุกรรมและสัมประสิทธิ์ความคล้ายกันบนตาราง matrix โดยแต่ละแถบดีเอ็นเอ (band) จะนำมาวิเคราะห์เป็นหนึ่งลักษณะ (character) ซึ่งมีค่าเป็น 1 เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆ และมีค่าเป็น 0 เมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งนั้นๆ จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมชุดคอมพิวเตอร์ Numerical Taxonomy System (NTSYS) version 2.0 เปลี่ยนเป็น similarity matrix ด้วยโปรแกรม SIMQUAL (Similarity for Qualitative Data) โดยใช้ค่า Dice's similarity coefficient จากนั้นนำมาจัดกลุ่ม (cluster analysis) โดยวิธี Unweighted Pair Group Method by Arithmatic Mean (UPGMA)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.2 การใช้เทคนิค RAPD

นำสารละลายดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร มาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค RAPD ตามวิธีของ จารุวรรณ (2548) โดยมีรายละเอียดดังนี้

1) ปฏิกิริยาพีซีอาร์

สุ่มใช้ไพรเมอร์ arbitary primers ความยาว 10 นิวคลีโอไทด์ จากบริษัท Operon Technology Alamada Us ทั้งหมดจำนวน 10 ไพรเมอร์ (ตาราง 4)

ตาราง 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยเทคนิค RAPD

Primer	ลำดับของนิวคลีโอไทด์ (nucleotides)
OPA-02	5'-TCG CGA GCT G-3'
OPA-11	5'-CAA TCG CCG T-3'
OPA-15	5'-TTC CGA ACC C-3'
OPD-11	5'-GCA AGT CAC T-3'
OPM-18	5'-CAC CAT CCG T-3'
OPR-06	5'-GTC TAC GGC A-3'
OPS-03	5'-CAG AGG TCC C-3'
OPS-19	5'-GAG TCA GCA G-3'
OPT-17	5'-CCA ACG TCG T-3'
OPW-08	5'-GAC TGC CTC T-3'

ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยมีส่วนประกอบดังนี้

น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	2.0	ไมโครลิตร
Q solution	2.0	ไมโครลิตร
dNTPs (1 mM)	2.0	ไมโครลิตร
10X buffer	1.0	ไมโครลิตร
RAPD primer (0.04 mM)	0.8	ไมโครลิตร
0.5 unit Taq DNA polymerase	1.2	ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอต้นแบบ	1.0	ไมโครลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2) เงื่อนไขของปฏิกิริยาพีซีอาร์

นำสารละลายในข้อ 4.1 ที่ผสมเข้ากันดีแล้ว มาทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยการใช้เครื่องพีซีอาร์ รุ่น MJ merson โดยมีเงื่อนไขของปฏิกิริยาพีซีอาร์ดังต่อไปนี้

ขั้นตอนที่ 1	predenaturation	96 องศาเซลเซียส	1.0 นาที	จำนวน 1 รอบ
ขั้นตอนที่ 2	denaturation	95 องศาเซลเซียส	0.45 นาที	จำนวน 45 รอบ
	primer annealing	35 องศาเซลเซียส	0.45 นาที	
	extension	72 องศาเซลเซียส	2.30 นาที	
ขั้นตอนที่ 3	primer extension	72 องศาเซลเซียส	5.0 นาที	

3) การ run agarose gel electrophoresis

เตรียมถาดสำหรับเทเจลในแนวราบและหวีเสียบ ให้เรียบร้อยโดยเช็ดด้วย 70% ethanol นำสารละลายอะกาโรสความเข้ม 1.0 เปอร์เซ็นต์ ที่หลอมโดยใช้ไมโครเวฟ จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นลง ประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส แล้วเทลงบนถาดที่เตรียมไว้ เมื่อเจลแข็งตัว ดึงหวีเสียบออก แล้วนำมาใส่ในเครื่องสำหรับทำอิเล็คโตรโฟรีซีส เท 1X TAE buffer ให้ท่วม จากนั้นทำการ pre-run ที่ความต่างศักย์ 50 โวลท์ เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำ ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ (DNA product) มาผสมกับ loading buffer แล้วหยอดลงไปในช่องของแผ่นเจลที่เตรียมไว้ จากนั้นทำการ run electrophoresis เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบ 2 ชั่วโมง นำเจลที่ได้ไปแช่เอทธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำเปล่า เป็นเวลา 20 นาที จึงนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ด้วยเครื่อง UV transilluminator และถ่ายภาพเจลด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล (Gel documentation) พร้อมบันทึกภาพ

4) การวิเคราะห์ข้อมูล

นำลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จาก RAPD เจล มาตรวจหาแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อแมลงบั่วในบางพื้นที่ จากนั้นนำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ มาวิเคราะห์ค่าระยะห่างระหว่างพันธุกรรมและสัมประสิทธิ์ความคล้ายกันบนตาราง matrix โดยแต่ละแถบดีเอ็นเอ (band) จะนำมาวิเคราะห์เป็นหนึ่งลักษณะ (character) ซึ่งมีค่าเป็น 1 เมื่อปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่งๆ และมีค่าเป็น 0 เมื่อไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งนั้นๆ จากนั้นนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมชุดคอมพิวเตอร์ Numerical Taxonomy System (NTSYS) version 2.0 เปลี่ยนเป็น similarity matrix ด้วยโปรแกรม SIMQUAL (Similarity for Qualitative Data) โดยใช้ค่า Dice's similarity coefficient จากนั้นนำมาจัดกลุ่ม (cluster analysis) โดยวิธี Unweighted Pair Group Method by Arithmatic Mean (UPGMA)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4. สถานที่ในการดำเนินงานวิจัยและรวบรวมข้อมูล

4.1 สถาบันวิจัยข้าว กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ

4.2 ห้องปฏิบัติการกีฏวิทยา และห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

4.3 ห้องปฏิบัติการศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved