บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย

ตัวอย่างที่ใช้คือ ลีลาวดีจำนวน 50 ตัวอย่าง ที่สุ่มเก็บตัวอย่างมาจากในพื้นที่มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี กรุงเทพมหานคร และพื้นที่ใกล้เคียง โดยจะเก็บตัวอย่างเป็นใบอ่อนใบที่ 1-3 จากปลายยอด ใส่ไว้ในกล่องโฟมเก็บความเย็น และรีบนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้สกัดดีเอ็นเอ นอกจากนั้นในการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งต้องมีการจดบันทึกลักษณะทางกายภาพของต้นลีลาวดี คือ ลักษณะใบ ลักษณะดอก และสีดอก โดยลักษณะใบที่จดบันทึกจะเป็นใบที่เจริญเต็มที่แล้ว และมีลักษณะเหมือนกับใบส่วนใหญ่ทั้งต้น ส่วนลักษณะดอกและสีของดอก จะบันทึกลักษณะของดอกที่บานเต็มที่แล้ว

2. การสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนลีลาวดี

กระบวนการสกัดดีเอ็นเอจากใบอ่อนลีลาวดีดัดแปลงตามวิธีของ Doyle & Doyle (1987, pp. 11-15) โดยมีวิธีการดังนี้

1. นำใบอ่อนของลีลาวดีที่เก็บไว้จำนวน 250 mg ใส่ลงในโกร่งบดตัวอย่างเติมไนโตรเจนเหลวให้พอท่วม แล้วจึงบดตัวอย่างดังกล่าวให้ละเอียด ตักใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ขนาด 1.5 ml

2. เติม 2× CTAB buffer ปริมาตร 500 µl และเติม β-mercaptoethanol ปริมาตร 2 µl เขย่าให้สารละลายผสมกัน

3. บ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 60 นาที กลับหลอดไปมาทุก ๆ 10 นาที

4. เติม chloroform: isoamylalcohol (24: 1) ปริมาตร 500 µl กลับหลอดไปมา และนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์ ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

5. ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่เติม isopropanol ที่แช่เย็นไว้ประมาณ 1 เท่าของปริมาณสารละลายใส แล้วกลับหลอดไปมาเบา ๆ จนเห็นตะกอนดีเอ็นเอ

6. นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์ ที่ความเร็ว10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วเท isopropanol ทิ้งให้เหลือแต่ตะกอนดีเอ็นเอที่ก้นหลอด

7. เติม 70% ethanol ปริมาตร 1 ml เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ

มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี

8. นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์ ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทิ้งให้เหลือแต่ตะกอนดีเอ็นเอ

9. คว่ำหลอดให้แห้ง แล้วละลายตะกอนด้วย TE buffer ปริมาตร 20 µl จากนั้นเก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

3. การวัดปริมาณดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอทั้งหมดที่สกัดได้จากลีลาวดีทั้ง 50 ตัวอย่าง จะถูกนำมาตรวจสอบคุณภาพด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล โดยตรวจสอบใน 1% agarose gel คุณภาพของดีเอ็นเอสามารถตรวจสอบได้ด้วยการย้อมดีเอ็นเอใน ethidium bromide (1µg/ml) และตรวจดูแถบดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมดภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต นอกจากนั้นดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมดจะนำมาหาปริมาณความเข้มข้นโดยใช้เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมชนิดละเอียด (Nanodrop)

4. การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย RAPD

การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเครื่องหมาย RAPD ในขั้นแรก เครื่องหมาย RAPD จำนวน 20 เครื่องหมาย จะถูกคัดเลือกมาจากลำดับเบสที่มีการตีพิมพ์เผยแพร่ จากนั้นทำการสั่งสังเคราะห์ไพรเมอร์ทั้ง 20 เส้น ซึ่งลำดับเบสของไพรเมอร์แสดงดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย (Panyanitikoon, 2015, p. 17)

ลำดับที่	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส (5' - 3')	อุณหภูมิช่วง annealing (°C)
1	OPA-01	CAGGCCCTTC	35.4
2	OPA-09	GGGTAACGCC	35.4
3	OPAC-03	CACTGGCCCA	39.5
4	OPAC-04	ACGGGACCTG	43.6
5	OPAC-05	GTTAGTGCGG	39.5
6	OPAH-01	TCCGCAACCA	35.4
7	OPAH-02	CACTTCCGCT	35.5
8	OPAH-03	CTCCCCAGAC	39.5
9	OPAH-05	TTGCAGGCAG	39.5
10	OPB-01	GTTTCGCTCC	39.5

มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี

ตารางที่ 3.1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในงานวิจัย (ต่อ)

ลำดับที่	ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส (5' - 3')	อุณหภูมิช่วง annealing (°C)
11	OPB-04	GGACTGGAGT	35.4
12	OPB-05	TGCGCCCTTC	35.5
13	OPE-03	CCAGATGCAC	39.5
14	OPE-04	GTGACATGCC	43.6
15	OPE-05	TCAGGGAGGT	39.5
16	UPB-483	GCACTAAGAC	35.4
17	UPB-485	AGAATAGGGC	35.4
18	UPB-486	CCAGCATCAG	39.5
19	UPB-489	CGCACGCACA	43.6
20	UPB-499	GGCCGATGAT	39.5

จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทดสอบด้วยไพรเมอร์ จำนวน 20 เส้น ด้วยเทคนิค PCR โดยลีลาวดี 1 ตัวอย่างจะทำการทดสอบจำนวน 2 ซ้ำ ใน 1 ปฏิกิริยาของเทคนิค PCR ประกอบด้วยสารต่าง ๆ ดังนี้

ดีเอ็นเอต้นแบบ	50 ng
ไพรเมอร์	0.5 µM
buffer A	1 เท่า
dNTPs	0.2 mM
$MgCl_2$	2.5 mM
Taq DNA polymerase enzyme	1 unit

ปรับให้ได้ปริมาตร 10 µl ด้วยน้ำกลั่น

ทำปฏิกิริยา PCR ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ โดยใช้อุณหภูมิและเวลาสำหรับแต่ละปฏิกิริยาดังนี้

ช่วง pre-denaturation	ที่อุณหภูมิ 94°C	ใช้เวลา 3 นาที	
ช่วง denaturation	ที่อุณหภูมิ 94°C	ใช้เวลา 45 วินาที	40 รอบ
ช่วง annealing	แสดงในตารางที่ 3.1	ใช้เวลา 45 วินาที	
ช่วง extension	ที่อุณหภูมิ 72°C	ใช้เวลา 90 วินาที	

มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี

ช่วง final extension ที่อุณหภูมิ 72°C ใช้เวลา 5 นาที

ทำการตรวจสอบดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้จากเทคนิค PCR ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล โดยใช้ 1.5% agarose gel ใน 0.5×TBE Buffer โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นที่ได้ด้วยการเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp Gene Ruler™ Express DNA ladder) ย้อมเจลด้วย เอธิเดียมโบรไมด์ (1μg/ml) แล้วนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต แล้วบันทึกภาพ

5. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

ขนาดของดีเอ็นเอแต่ละชิ้นที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ของแต่ละตัวอย่างจะถูกนำมาแปลงเป็นข้อมูลแบบไบนารี คือ การปรากฏของแถบดีเอ็นเอให้คะแนนเป็น 1 และการไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอให้คะแนนเป็น 0 เมื่อให้คะแนนครบทุกเครื่องหมาย RAPD ของทุกตัวอย่างแล้ว นำข้อมูลมาคำนวณค่าสัมประสิทธ์ความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic similarity) ตามวิธีของ Jaccard (Nei & Li, 1979, pp. 5269-5273) จากนั้นนำค่าสัมประสิทธ์ความเหมือนทางพันธุกรรมที่ได้มาวิเคราะห์การจัดกลุ่ม (cluster analysis) เพื่อทำการจัดกลุ่มลีลาวดีโดยใช้วิธี UPGMA และวิเคราะห์ความน่าเชื่อถือของแต่ละกิ่งด้วยวิธี bootstrap จำนวน 10,000 ซ้ำ ด้วยโปรแกรม FreeTree (Hampl, Pavlicek & Flegr, 2001, pp. 731-735) วิเคราะห์การจัดกลุ่มความใกล้ชิดทางพันธุกรรมด้วยวิธี principle component analysis (PCA) ด้วยโปรแกรม Numerical Taxonomy System software, Version 2.1 (NTSYSpc, Exter Software, Setauket, New York, USA) (Rohlf, 2000, pp. 1-31) จากนั้นตรวจสอบความน่าเชื่อถือและการใช้ประโยชน์ได้ของเครื่องหมาย RAPD โดยประเมินค่าต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

5.1 ประเมินค่า polymorphism information content (PIC) (Roláng-Ruiz, Dendauw, Bockstaele, Depicker & De-Loose, 2000, pp. 125-135)

ตามสูตร $PIC_i = 2f_i(1-f_i)$

เมื่อ PIC_i คือ ค่า polymorphism information content ของไพรเมอร์ i ได้จากค่าเฉลี่ยของค่า PIC ในทุก ๆ แถบดีเอ็นเอที่สร้างได้ของไพรเมอร์ i โดยจะมีค่าระหว่าง 0-0.5

f_i คือ ความถี่ของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏของไพรเมอร์ i

$1-f_i$ คือ ความถี่ของแถบดีเอ็นเอที่ไม่ปรากฏของไพรเมอร์ i

5.2 ประเมินค่า resolving power (RP) (Prevost & Wilkinson, 1999, pp. 107-112)

ตามสูตร $RP = \Sigma I_b$

เมื่อ $I_b = 1 - [2\times|0.5 - p|]$

มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี

p คือ อัตราส่วนของจำนวนตัวอย่างที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอต่อจำนวนตัวอย่างทั้งหมด

5.3 ประเมินค่า effective multiplex ratio (EMR) (Chesnokov & Artemyeva, 2015, pp. 571-578)

ตามสูตร EMR = np(np/n)

เมื่อ np คือ จำนวนแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (polymorphic band)

n คือ จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมด

5.4 ประเมินค่า marker index (MI) (Chesnokov & Artemyeva, 2015, pp. 571-578)

ตามสูตร MI = PIC × EMR

มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี