บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1.1 ขวดแก้ว (Bottle)

3.1.1.2 บีกเกอร์ (Beaker)

3.1.1.3 โกร่งบดยา (Mortar)

3.1.1.4 หลอดทดลอง (Tube)

3.1.1.5 กระบอกตวง (Cylinder)

3.1.1.6 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)

3.1.1.7 ปิเปตต์ทิป (Pipette tip) บริษัท Axygen

3.1.1.8 หลอดพีซีอาร์ (PCR tubes) ขนาด 200 ไมโครลิตร บริษัท Axygen

3.1.1.9 หลอดไมโครเซนติฟิวส์ (Micro centrifuge tubes) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บริษัท Axygen

3.1.1.10 ไมโครปิเปตต์ (Automatic adjustable micropipette) บริษัท Gilson : P2 (0.1-2 ไมโครลิตร) P10 (0.5-10 ไมโครลิตร) P20 (5-20 ไมโครลิตร) P200 (20-200 ไมโครลิตร) P1000 (0.1-1 มิลลิลิตร)

3.1.1.11 ตู้เย็น – 20 องศาเซลเซียส บริษัท Sharp

3.1.1.12 ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส รุ่น SBC-2D บริษัท SANYO

3.1.1.13 ตู้เย็น – 80 องศาเซลเซียส (Ultra low temperature freezer) รุ่น U570 บริษัท New Brunswick Scientific

3.1.1.14 เครื่องชั่งละเอียด รุ่น Adventurer บริษัท OHAUS

3.1.1.15 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) รุ่น TC-459 บริษัท TA CHANG

3.1.1.16 อ่างควบคุมอุณหภูมิแบบแห้ง (Digital Dry Bath) รุ่น D1100 บริษัท Labnet

3.1.1.17 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น WB-710M บริษัท Optima

3.1.1.18 เครื่องปั่นเหวี่ยงสารปริมาณน้อย (Micro centrifuge) รุ่น CM-610T บริษัท HSLANGTAI

3.1.1.19 เครื่องปั่นเหวี่ยงสารปริมาณน้อยควบคุมอุณหภูมิ (Micro refrigerated centrifuge) รุ่น 3700 บริษัท KUBOTA

3.1.1.20 เครื่องเขย่าผสมสาร (Vortex Mixer) รุ่น VX-100 บริษัท Labnet

3.1.1.21 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Authorized thermal cycler) รุ่น TP 600 บริษัท TaKaRa

3.1.1.22 ชุดตรวจสอบดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้า (Electrophoresis chamber set) รุ่น Mupid-ex บริษัท Avance

3.1.1.23 เครื่องจ่ายไฟฟ้ากระแสตรง (Power supply) รุ่น AE-8130 my power 300 บริษัท ATTO

3.1.1.24 ไมโครเวฟ (Microwave) รุ่น MW-2020 บริษัท Turbora

3.1.1.25 เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV – Transilluminator) รุ่น TM-10E บริษัท UVP

3.1.1.26 ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow) รุ่น CLEAN บริษัท Lab Service

3.1.1.27 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) บริษัท Termaks

3.1.1.28 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-เบส (pH meter) รุ่น pH-2001 บริษัท J.P.SELECTA

3.1.1.29 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Shaking incubator) รุ่น VS-8480SFN บริษัท VISION Scientific

3.1.2 สารเคมี

3.1.2.1 Silica gel

3.1.2.2 Sterile distilled water

3.1.2.3 Polyvinylpyrolidone บริษัท Serva

3.1.2.4 Ascorbic acid บริษัท Serva

3.1.2.5 Tris-HCl (pH 8)

3.1.2.6 2-Mercaptoethanol บริษัท Sigma

3.1.2.7 CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) บริษัท Serva

3.1.2.8 EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid) บริษัท Scharlau

3.1.2.9 Sodium chloride บริษัท Scharlau

3.1.2.10 Chloroform บริษัท Merck

3.1.2.11 Isoamyl alcohol บริษัท Carloerba

3.1.2.12 Ethanol บริษัท Merck

3.1.2.13 RNase

3.1.2.14 20 % polyethylene glycol (PEG) บริษัท Serva

3.1.2.15 *Taq* DNA polymerase (recombinant) บริษัท Fermentas

3.1.2.16 BSA (Bovine serum albumin)

3.1.2.17 10X Tris Boric acid Disodium Ethylenediamine Tetracetic Acid (10X TBE buffer)

3.1.2.18 0.5X Tris Boric acid Disodium EthyleneDiamine Tetracetic Acid (0.5X TBE buffer)

3.1.2.19 Agarose molecular biology grade บริษัท ISC Bio Express

3.1.2.20 Ethidium bromide solution บริษัท Sigma

3.1.2.21 100 bp + 1.5 Kb DNA ladder บริษัท SibEnzyme

3.1.2.22 Strataprep PCR Purification Kit บริษัท Stratagene

3.1.2.23 PCR-Script™ Amp Cloning Kit บริษัท Stratagene

3.1.2.24 Tryptone บริษัท Scharlau

3.1.2.25 Agar

3.1.2.26 Ampicillin บริษัท T.P. Drug Laboratories

3.1.2.27 IPTG (Iso-propylthio-ß-galactoside) บริษัท Fermentas

3.1.2.28 X-gal บริษัท Fermentas

3.1.2.29 FastPlasmid™ Mini บริษัท eppendorf

3.1.2.30 Restriction enzyme (*Ssp* I, *Eco* RV, *Rsa* I, *Alu* I, *Hae* III) บริษัท Fermentas

3.1.2.31 Lambda DNA /*Hind* III ladder บริษัท SibEnzyme

3.1.2.32 DNA Ligation Kit Ver. 1 บริษัท TaKaRa

3.1.2.33 *TaKaRa LA Taq*™ บริษัท TaKaRa

3.1.2.34 Blunt adaptor บริษัท Bio Basic

3.1.2.35 Oligonucleotide primers บริษัท Sigma-Proligo

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การเก็บตัวอย่าง

สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างดอกเห็ดเผาะจากป่าเต็งรังแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย แหล่งละ 10 - 20 ดอก ได้แก่ จังหวัดตาก (T1-T20) จังหวัดน่าน (N1-N20) จังหวัดอุบลราชธานี (U1-U20) และจังหวัดชัยภูมิ (C1-C20) จากนั้นตัดเนื้อเยื่อของผนังชั้นในของชั้น peridium ของเห็ดเผาะแต่ละดอกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ในถุงพลาสติกที่บรรจุซิลิกาเจล เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2.2 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเห็ดเผาะ

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนตัวอย่างเห็ดด้วยวิธี cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) ของ Zhou และคณะ (1999) โดยนำชิ้นส่วนตัวอย่างที่เตรียมจากข้อ 3.2.1 จำนวน 20-50 มิลลิกรัม บดโดยใช้โกร่งจนละเอียดเติมสารละลาย washing buffer (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ถ่ายลงในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ ขนาด 1.5 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทของเหลวส่วนบนทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน เติมสารละลาย washing buffer ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตรและปั่นเหวี่ยงซ้ำเพื่อล้างตัวอย่าง จนของเหลวส่วนบนใส เติมสารละลาย 2X CTAB (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมสารละลาย chloroform / isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 24 : 1 (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที ถ่ายส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวส์หลอดใหม่ เติมสารละลาย chloroform / isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 24 : 1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร อีกครั้งผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที ถ่ายส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวส์หลอดใหม่ เติมสารละลาย isopropanol ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แช่ในน้ำเข็งเป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน เติมเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทิ้งตะกอนให้แห้งในอุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติม RNase (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลาย PEG (Polyethylene glycol) 20 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งให้เหลือตะกอนของดีเอ็นเอ เติมเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายออก ทิ้งตะกอนให้แห้งในอุณหภูมิห้อง เติมสารละลายบัฟเฟอร์ TE

(ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บตัวอย่างสารละลายดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.2.3 **การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งไอเอสเอสอาร์** (Inter-Simple Sequence Repeat, ISSR) **ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอร์เรส**

เลือกสารละลายดีเอ็นเอของเห็ดเผาะที่เตรียมได้จากข้อ 3.2.2 เพียงหนึ่งตัวอย่าง มาทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งไอเอสเอสอาร์ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอร์เรส ใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่มีลำดับเบสเป็นไมโครแซทเทลไลต์ ได้แก่ $(AG)_8T$ $(CA)_8G$ $(GT)_8C$ $AC(CA)_6CYG$ $CRN_2(CTT)_5$ $(CAA)_8$ $(GTC)_5$ $(GCT)_5$ และ $(AC)_{10}$ โดยมีลำดับเบสและอุณหภูมิในการเข้าจับ (T_m) ของแต่ละไพรเมอร์แสดงดังตารางที่ 3.2 เตรียมสารละลายพีซีอาร์ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วย 1x PCR buffer 2.5 มิลลิโมลาร์ของ $MgCl_2$ 1.2 ไมโครกรัมของ Bovine Serum Albumin (BSA) 0.2 มิลลิโมลาร์ของ dNTPs mix 1 ไมโครโมลาร์ของไพรเมอร์ 0.5 unit ของ *Taq* DNA polymerase (Fermentas) และสารละลายดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร จากนั้นนำสารละลายพีซีอาร์ไปทำการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งไอเอสเอสอาร์ ด้วยเครื่องเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (Authorized thermal cycler) รุ่น TP 600 (TaKaRa) โดยมีสภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอร์เรสดังนี้

Initial denaturation	95	องศาเซลเซียส	5 นาที	
Touch down				
Denaturation	95	องศาเซลเซียส	1 นาที	10 รอบ
Annealing *	T_m+4	องศาเซลเซียส	1 นาที	
Extension	72	องศาเซลเซียส	1 นาที	

* อุณหภูมิ Annealing ลดลง 0.5 องศาเซลเซียส ทุก ๆ รอบ เป็นจำนวน 10 รอบ

Amplification				
Denaturation	95	องศาเซลเซียส	1 นาที	30 รอบ
Annealing	T_m-1	องศาเซลเซียส	1 นาที	
Extension	72	องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final Extension	72	องศาเซลเซียส	15 นาที	
Hold	4	องศาเซลเซียส		

อุณหภูมิในการเข้าจับสายดีเอ็นเอ (T_m) ของไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลต์แต่ละไพรเมอร์แสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ลำดับเบสและอุณหภูมิในการเข้าจับสายดีเอ็นเอ(T_m) ของไพรเมอร์ไมโครแซเทลไลต์

ไพรเมอร์ไมโครแซเทลไลต์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5' – 3'	T_m (องศาเซลเซียส)
$(AG)_8T$	5'-AGAGAGAGAGAGAGT-3'	50
$(CA)_8G$	5'-CACACACACACACAG-3'	53
$(GT)_8C$	5'-GTGTGTGTGTGTGTC-3'	53
$AC(CA)_6CYG$	5'-ACCACACACACACACYG-3'	53
$CRN_2(CTT)_5$	5'-CRNNCTTCTTCTTCTTCTT-3'	53
$(CAA)_8$	5'-CAACAACAACAACAACAACAACAA-3'	53
$(GTC)_5$	5'-GTCGTCGTCGTCGTC-3'	60
$(GCT)_5$	5'-GCTGCTGCTGCTGCT-3'	60
$(AC)_{10}$	5'-ACACACACACACACACACAC-3'	56

หมายเหตุ : R = G หรือ A; N=A หรือ C หรือ G หรือ T

ตรวจสอบผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งไอเอสเอสอาร์ โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสบนอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ที่เติมเอธิเดียมโบรไมด์ 1 ไมโครลิตรต่ออะกาโรสเจล 30 มิลลิลิตร ในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลล์ เป็นเวลา 60 นาที และใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp + 1.5 kb DNA ladder ตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV – Transilluminator)

3.2.4 การโคลนหาลำดับเบสของชิ้นส่วนไอเอสเอสอาร์

เลือกผลิตผลพีซีอาร์ที่มีชิ้นส่วนไอเอสเอสอาร์ที่ได้จากข้อ 3.2.3 ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Strataprep PCR Purification Kit (Stratagene) (ภาคผนวก ข) เชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับพลาสมิด pPCR-Script™ Amp SK(+) cloning vector (Stratagene) และถ่ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *Escherichia coli* สายพันธุ์ XL10-Gold® Kan (Stratagene) ตามที่คู่มือแนะนำ (ภาคผนวก ข) ทำการเพิ่มจำนวน *E. coli* สายพันธุ์ XL10-Gold® Kan และคัดเลือกโคโลนีสีขาวบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB (ภาคผนวก ก) ที่มีส่วนผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเกลี่ย X-gal ที่มีความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 80 ไมโครลิตร และ IPTG ที่มีความเข้มข้น 0.25 กรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ต่อ 1 จานเพาะเชื้อ ตรวจสอบการเชื่อมต่อของชิ้นส่วนดีเอ็เอกับพลาสมิดด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอร์เรส โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะ

กับ pPCR-Script™ Amp SK(+) cloning vector จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุดสกัดพลาสมิด FastPlasmid™ Mini (eppendorf) (ภาคผนวก ข) หาลำดับเบสของชิ้นส่วนไอเอสเอสอาร์ ในพลาสมิดโดยส่งไปทำการวิเคราะห์หาลำดับเบสที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ โดยใช้ไพรเมอร์ T7 Promoter (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') ด้วยเครื่อง ABI 3730 XL automatic sequencer (Applied Biosystems)

3.2.5 การออกแบบไพรเมอร์บริเวณขนาบข้างของไมโครแซเทลไลต์

นำเอาข้อมูลของลำดับเบสของชิ้นส่วนไอเอสเอสอาร์ที่ได้จากข้อ 3.2.4 มาทำการออกแบบไพรเมอร์ตรงบริเวณตำแหน่งของเบสที่อยู่ใกล้กับตำแหน่งที่มีลำดับเบสเป็นไมโครแซเทลไลต์ของแต่ละตำแหน่ง จำนวน 2 ไพรเมอร์ ได้แก่ ไพรเมอร์ IP_1 (ISSR-specific primer 1) และไพรเมอร์ IP_2 (ISSR-specific primer 2) ตามลำดับ โดยไพรเมอร์ IP_1 มีความยาว 27 คู่เบส และไพรเมอร์ IP_2 มีความยาว 21 คู่เบส ออกแบบไพรเมอร์ IP_2 บริเวณตำแหน่งระหว่างไพรเมอร์ IP_1 กับตำแหน่งที่มีลำดับเบสเป็นไมโครแซเทลไลต์ของแต่ละตำแหน่ง

3.2.6 ออกแบบไพรเมอร์บริเวณขนาบข้างอีกด้านหนึ่งของไมโครแซเทลไลต์

3.2.6.1 การสร้างห้องสมุดดีเอ็นเอ (DNA Library)

นำจีโนมิกดีเอ็นเอของเห็ดเผาะที่สกัดได้จากตัวอย่างเดียวกันกับที่ใช้ในข้อ 3.2.3 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ได้แก่ *Ssp* I *Eco* RV *Rsa* I *Alu* I หรือ *Hae* III (Fermentas) โดยผสมส่วนประกอบในการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอของเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิดปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 1x บัฟเฟอร์ 0.2 unit ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ และจีโนมิกดีเอ็นเอ 2 นาโนกรัม เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อจนมีปริมาตร 50 ไมโครลิตร หลังจากนั้นบ่มส่วนประกอบการตัดจีโนมดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 150 ไมโครลิตร และสารละลาย chloroform / isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 24 : 1 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวส์หลอดใหม่ เติมสารละลาย 3 โมลาร์ของ NaOAc (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และเติมเอธานอล 99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็งอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทสารละลายทิ้ง เติมเอธานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายทิ้ง ทำตะกอนที่อยู่ก้นหลอดไมโครเซนติฟิวส์ให้แห้งในอุณหภูมิห้อง เติมสารละลายบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 20

ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอจากการตัดด้วยเอนไซม์ โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส โดยการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE เติมเอธิเดียมโบรไมด์ 1 ไมโครลิตรต่ออะกาโรสเจล 30 มิลลิลิตร ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลล์ เป็นเวลา 60 นาที และใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาตรฐาน Lambda DNA /*Hind* III ladder ตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต

3.2.6.2 เชื่อมดีเอ็นเอของเห็ดเผาะที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจากข้อ 3.2.6.1 กับ Blunt adaptor โดยเชื่อมปลาย 5' ด้วย ไพรเมอร์ 5'-GTAATACGACTCACT ATAGGGCACGCGTGGTCGACGGCCCGGGCTGGT-3' และเชื่อมปลาย 3' ด้วยไพรเมอร์ 5'-ACCAGCCC-NH_2-3' โดยใช้ DNA Ligation Kit Ver. 1 (TaKaRa) โดยผสมส่วนประกอบปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย จีโนมิกดีเอ็นเอของเห็ดเผาะที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจากข้อ 3.2.6.1 จำนวน 0.5 ไมโครกรัม สารละลาย A ปริมาตร 40 ไมโครลิตร สารละลาย B ปริมาตร 10 ไมโครลิตร สารละลาย adaptor 1.4 ไมโครกรัม เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อจนมีปริมาตร 60 ไมโครลิตร หลังจากนั้นบ่มส่วนประกอบทั้งหมดที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 140 ไมโครลิตร และสารละลาย chloroform / isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 24 : 1 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวส์หลอดใหม่ เติมสารละลาย 3 โมลาร์ของ NaOAc ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และเติมเอธานอล 99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็งอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทสารละลายทิ้ง เติมเอธานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายทิ้ง ทำตะกอนที่อยู่ก้นหลอดไมโครเซนติฟิวส์ให้แห้งในอุณหภูมิห้อง เติมสารละลายบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.2.6.3 การทำ DNA Walking

ทำ DNA Walking เพื่อให้ทราบลำดับเบสที่ขนาบข้างอีกด้านหนึ่งของไมโครแซเทลไลต์ ด้วยการทำ Nested PCR ทำพีซีอาร์ขั้นตอนแรกโดยใช้ดีเอ็นเอที่เชื่อมด้วย Blunt adaptor จากข้อ 3.2.6.2 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและใช้ไพรเมอร์ IP_1 ในแต่ละตำแหน่งกับไพรเมอร์ AP_1 (adaptor primer 1) ซึ่งมีลำดับเบสเป็น 5'-CCATCGTAATACGACTCACTATAGGGC-3' โดยทำสารละลายพีซีอาร์ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วย 1x LA PCR™ Buffer II 1 unit ของ *TaKaRa LA Taq*™ (TaKaRa) 2.5 มิลลิโมลาร์ของ $MgCl_2$ 2.5 มิลลิโมลาร์ของ dNTPs mix 1 ไมโครโมลาร์ของไพรเมอร์ AP_1 1 ไมโครโมลาร์ของไพรเมอร์ IP_1 และสารละลายดีเอ็นเอ 0.5 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อจนมีปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยมีสภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอร์เรสดังนี้

Initial denaturation	94	องศาเซลเซียส	1 นาที	
Denaturation	94	องศาเซลเซียส	1 นาที	35 รอบ
Annealing	T_m*	องศาเซลเซียส	30 วินาที	
Extension	72	องศาเซลเซียส	2 นาที	
Final Extension				
Denaturation	94	องศาเซลเซียส	1 นาที	1 รอบ
Annealing	T_m*	องศาเซลเซียส	30 วินาที	
Extension	72	องศาเซลเซียส	5 นาที	
Hold	4	องศาเซลเซียส		

* อุณหภูมิในการเข้าจับของไพรเมอร์ AP_1และ IP_1 ในแต่ละตำแหน่ง

ขั้นตอนที่ 2 ทำพีซีอาร์โดยใช้ผลิตผลพีซีอาร์ขั้นตอนแรกเจือจาง 100 เท่า เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและใช้ไพรเมอร์ IP_2 ในแต่ละตำแหน่งกับไพรเมอร์ AP_2 (adaptor primer-2) ซึ่งมีลำดับเบสเป็น 5'-CTATAGGGCACGCGTGGT-3' โดยทำสารละลายพีซีอาร์ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วย 1x LA PCR™ Buffer II 2.5 มิลลิโมลาร์ของ $MgCl_2$ 2.5 มิลลิโมลาร์ของ dNTPs mix 1 ไมโครโมลาร์ของไพรเมอร์ AP_2 1 ไมโครโมลาร์ของไพรเมอร์ IP_2 1 unit ของ *TaKaRa LA Taq*™ (TaKaRa) และสารละลายดีเอ็นเอ 0.5 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อจนมีปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยมีสภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอร์เรสดังนี้

Initial denaturation	94	องศาเซลเซียส	1 นาที	
Denaturation	94	องศาเซลเซียส	1 นาที	35 รอบ
Annealing	T_m*	องศาเซลเซียส	30 วินาที	
Extension	72	องศาเซลเซียส	2 นาที	

Final Extension				
Denaturation	94	องศาเซลเซียส	1 นาที	1 รอบ
Annealing	T_m*	องศาเซลเซียส	30 วินาที	
Extension	72	องศาเซลเซียส	5 นาที	
Hold	4	องศาเซลเซียส		

* อุณหภูมิในการเข้าจับของไพรเมอร์ AP_2และ IP_2 ในแต่ละตำแหน่ง

ตรวจสอบผลพีซีอาร์โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส โดยการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE เติมเอธิเดียมโบรไมด์ 1 ไมโครลิตรต่ออะกาโรสเจล 30 มิลลิลิตร ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลล์ เป็นเวลา 40 นาที และใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp + 1.5 kb DNA ladder ตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต

เลือกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว (single-banded fragments) โคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าวด้วยการเชื่อมกับพลาสมิด pPCR-Script™ Amp SK(+) cloning vector (Stratagene) และถ่ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* สายพันธุ์ XL10-Gold® Kan (Stratagene) ตามที่คู่มือแนะนำ (ภาคผนวก ข) ทำการเพิ่มจำนวน *E. coli* สายพันธุ์ XL10-Gold® Kan และคัดเลือกโคโลนีสีขาวบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มีส่วนผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเกลี่ย X-gal ที่มีความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 80 ไมโครลิตร และ IPTG ที่มีความเข้มข้น 0.25 กรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อ 1 จานเพาะเชื้อ ตรวจสอบว่ามีชิ้นส่วนดีเอ็เอเข้าไปหรือไม่ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอร์เรส โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ pPCR-Script™ Amp SK(+) cloning vector จากนั้นทำการสกัด พลาสมิดโดยใช้ชุดสกัดพลาสมิด FastPlasmid™ Mini ของบริษัท eppendorf (ภาคผนวก ข) และหาลำดับเบสใน พลาสมิดโดยส่งไปทำการวิเคราะห์หาลำดับเบสที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ โดยใช้ไพรเมอร์ T7 Promoter (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') ด้วยเครื่อง ABI 3730 XL automatic sequencer (Applied Biosystems) นำเอาลำดับเบสที่ได้มาออกแบบไพรเมอร์ให้เข้าจับกับบริเวณขนาบข้างอีกด้านหนึ่งของไมโครแซทเทลไลต์ (ISSR-specific primer 3, IP_3) ในแต่ละตำแหน่งของไมโครแซทเทลไลต์

3.2.7 การคัดเลือกไพรเมอร์และตรวจสอบการมีโพลีมอร์ฟิซึม

3.2.7.1 นำดีเอ็นเอที่สกัดจากชิ้นส่วนตัวอย่างดอกเห็ดเผาะแห้งที่เก็บรวบรวมจากป่าเต็งรังแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดน่าน จังหวัดตาก จังหวัดอุบลราชธานี จังหวัดชัยภูมิ มาเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอตรงบริเวณไมโครแซทเทลไลต์โดยใช้ไพรเมอร์ IP_1 กับไพรเมอร์ IP_3 หรือ

ไพรเมอร์ IP_2 กับไพรเมอร์ IP_3 ที่ออกแบบ เพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มจำนวนไมโครแซเทลไลต์ได้ โดยทำการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่งไมโครแซเทลไลต์ ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยมีปริมาตรรวมเป็น 10 ไมโครลิตร ประกอบไปด้วย 1x LA PCR™ Buffer II 2.5 มิลลิโมลาร์ของ $MgCl_2$ 2.5 มิลลิโมลาร์ของ dNTPs mix 1 ไมโครโมลาร์ของ primer (IP_1 หรือ IP_2) 1 ไมโครโมลาร์ของ primer (IP_3) 1 unit ของ *TaKaRa LA Taq*™ (TaKaRa) และสารละลายดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร สภาวะของปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส มีดังนี้

Initial denaturation	94	องศาเซลเซียส	1 นาที	
Denaturation	94	องศาเซลเซียส	30 วินาที	29 รอบ
Annealing	T_m*	องศาเซลเซียส	30 วินาที	
Extension	72	องศาเซลเซียส	30 วินาที	
Final Extension				
Denaturation	94	องศาเซลเซียส	30 วินาที	1 รอบ
Annealing	T_m*	องศาเซลเซียส	30 วินาที	
Extension	72	องศาเซลเซียส	5 นาที	
Hold	4	องศาเซลเซียส		

* อุณหภูมิในการเข้าจับของไพรเมอร์ IP_1 กับไพรเมอร์ IP_3 หรือไพรเมอร์ IP_2 กับไพรเมอร์ IP_3 ในแต่ละตำแหน่ง

ตรวจสอบผลพีซีอาร์โดยวีธีอิเล็กโตรโฟรีซีส โดยการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE เติมเอธิเดียมโบรไมด์ 1 ไมโครลิตรต่ออะกาโรสเจล 30 มิลลิลิตร ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลล์ เป็นเวลา 40 นาที และใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp + 1.5 kb DNA ladder ตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต

3.2.7.2 ตรวจสอบโพลีมอร์ฟิซึมที่เกิดขึ้นจากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอตำแหน่งไมโครแซเทลไลต์ของเห็ดเผาะที่เก็บรวบรวมจากป่าเต็งรังแหล่งต่าง ๆ โดยใช้ผลิตผลพีซีอาร์ที่เพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอตรงบริเวณไมโครแซเทลไลต์ของดีเอ็นเอ ที่สกัดจากชิ้นส่วนตัวอย่างเห็ดเผาะแห้งที่เก็บรวบรวมจากป่าเต็งรังแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทยจำนวน 4 ประชากร รวมทั้งหมด 40 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ โดยคัดเลือกผลิตผลพีซีอาร์ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเพื่อหาขนาดของชิ้นส่วนผลิตผลพีซีอาร์ที่แน่นอนบน sequencing gel 6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งประกอบด้วย 6 เปอร์เซ็นต์ของ Longer Ranger

(FMC Bioproducts) 6.1 โมลาร์ของยูเรีย และ1.2X TBE โดยใช้เครื่อง SQ-5500 sequence (Hitachi) วิเคราะห์รูปแบบของแถบดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Fraglys version 3 (Hitachi)

3.2.8 **ศึกษาลักษณะเฉพาะของตำแหน่งไมโครแซเทลไลต์ของเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ที่พัฒนาขึ้น**

จากข้อมูลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่บริเวณไมโครแซเทลไลต์ของไพรเมอร์ แต่ละคู่ที่ทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบน sequencing gel 6 เปอร์เซ็นต์ หาจำนวนและความถี่ของอัลลีลที่เกิดขึ้นของเห็ดเผาะจำนวน 4 ประชากร รวมทั้งหมด 40 ตัวอย่าง จากนั้นประเมินความถี่อัลลีล คำนวณค่าเฮเทโรไซโกซิตีที่คาดหมาย (expected heterozygosity, H_e) และค่าเฮเทโรไซโกซิตีที่คำนวณได้ (observed heterozygosity, H_o) โดยใช้โปรแกรม Cervus version 2.0 (Marshall และคณะ, 1998) ตรวจสอบความเบี่ยงเบนจาก Hardy-Weinberg equilibrium และตรวจสอบค่า linkage disequilibrium (LD) ระหว่างตำแหน่งของไมโครแซเทลไลต์ โดยใช้โปรแกรม GENPOP version 3.4 (Raymond และ Russet, 1995) เพื่อศึกษาลักษณะเฉพาะของตำแหน่งไมโครแซเทลไลต์ของเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ที่พัฒนาขึ้นในแต่ละตำแหน่ง เพื่อเป็นประโยชน์ในการคัดเลือกเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ที่พัฒนาขึ้นนี้ให้เหมาะสมกับการนำไปใช้ในด้านต่าง ๆ

สูตรการคำนวณ ค่าความถี่ของอัลลีล คือ

$$x_i = n_i / 2n$$

โดย x_i คือ ความถี่ของอัลลีลที่ i

n_i คือ จำนวนชุดของอัลลีลที่ i ระหว่างตัวอย่างที่วิเคราะห์

n คือ จำนวนตัวอย่าง

สูตรการคำนวณค่าเฮเทโรไซโกซิตีที่คาดหมาย (expected heterozygosity, H_e) คือ

$$H_e = 1 - \Sigma x_i^2$$

ค่าเฮเทโรไซโกซิตีที่คำนวณได้ (observed heterozygosity, H_o) คำนวณได้จากข้อมูลจริงโดยการนับเฮเทโรไซกัสจีโนไทป์

3.2.9 **ทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์**

โดยใช้ดีเอ็นของเห็ดเอคโตไมคอร์ไรซาชนิดอื่น ๆ จำนวน 9 ตัวอย่าง ได้แก่ *Russula viscica Scleroderma sinnamariense Lactarius deliciosus Lactarius piperatus Amanita* sp. *Lactarius* sp.1 *Lactarius* sp. 2 *Lactarius* sp.3 และ *Pisolithus abditus* ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากนางสาวสุนัดดา โยมญาติ โดยใช้ไพรเมอร์ที่ขนาบข้างบริเวณไมโครแซเทลไลต์ซึ่งออกแบบจากเห็ดเผาะในแต่ละตำแหน่ง ในปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้สภาวะเดียวกับการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอตรงบริเวณไมโครแซเทลไลต์ในข้อ 3.2.7.1 ตรวจสอบผลพีซีอาร์โดย

วิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส โดยการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE เติมเอธิเดียมโบรไมด์ 1 ไมโครลิตรต่ออะกาโรสเจล 30 มิลลิลิตร ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลล์ เป็นเวลา 40 นาที และใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp + 1.5 kb DNA ladder ตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตด้วยเครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต