บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 ตัวอย่างมะละกอ, ผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปและผลไม้ต่างๆ

3.1.1.1 ตัวอย่างมะละกอทั้งสายพันธุ์ท้องถิ่นและสายพันธุ์ sunrise ได้จากตลาดนัดจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตลาดสามย่าน และจากสวนเจริญพีระวัฒน์ อ.แกลง จ.ระยอง

3.1.1.2 ตัวควบคุมบวก (positive control) ส่วนของเนื้อเยื่อมะละกอดัดแปรพันธุกรรมได้จากห้างสรรพสินค้าแห่งหนึ่งในมลรัฐอิลินอย ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.1.3 ผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปได้จากห้างสรรพสินค้าหลายแห่งในกรุงเทพมหานคร (ซึ่งมีรายละเอียดดังแสดงในภาคผนวก)

3.1.1.4 ผลไม้ต่างชนิด ได้แก่ สตรอเบอรี่ ฝรั่ง ส้ม สับปะรด สาลี่ ได้จากตลาดสดในเขตกรุงเทพมหานคร

3.1.1.5 ผลิตภัณฑ์ต่างชนิด ได้แก่ ถั่วเหลือง ข้าวโพด จากตลาดสดในเขตกรุงเทพมหานคร

3.1.2 ตัวอย่างสายพันธุ์ไวรัสใบจุดวงแหวนในมะละกอสายพันธุ์ที่ติดเชื้อในบวบเหลี่ยม ได้รับการอนุเคราะห์จากหน่วยวิจัยไวรัสวิทยา กองโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

3.1.3 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ 35S promoter และ NOS terminator ได้จากผงถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรมมาตรฐาน (Fluka)

3.1.4 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย

- ขวดรูปชมพู่ ขนาด 100, 200, 250 มิลลิลิตร
- หลอดทดลองฝาเกลียว

- กระบอกตวง
- จานเพาะเชื้อ
- ห่วงเขี่ยเชื้อ
- โกร่ง
- บิกเกอร์
- หลอด microcentrifuge
- หลอด PCR
- เครื่องชั่งไฟฟ้า (LIBROR EL-12OHA(SHIMADZU))
- ตู้เขี่ยเชื้อ (AUGUSTA SAFETY CABINET (LIO LAB Co,.Ltd.)
- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR) (BIO RAD Gene Cycler™)
- เครื่องปั่นตกตะกอน (MIKRO 12-24 Hettich Zentrifugen)
- เครื่องอิเล็กโทรฟอเรซิส (Mupid Advance Co,. LTD)
- เครื่องฉาย UV (ULTRA LUM El.aectronic Dual Light™ Transillumination)

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากมะละกอ ผลิตภัณฑ์มะละกอ

การสกัดดีเอ็นเอจากมะละกอ ผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูป ตามวิธีมาตรฐานของรัฐบาลเยอรมันโดยใช้ CTAB (Meyer, 1999) เป็นวิธีหลักในกระบวนการสกัด ยกเว้นผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปสกัดดีเอ็นเอตามวิธีมาตรฐานของรัฐบาลสวิสเซอร์แลนด์ (Spoth และ Strauss, 2000) โดยการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB ใช้ปริมาณตัวอย่างที่สุ่มขึ้นมาได้ตัวอย่างละ 300 มิลลิกรัม ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยจำนวนซ้ำ 3 ซ้ำ ขณะที่ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดด้วยวิธีมาตรฐานของรัฐบาลสวิสเซอร์แลนด์ได้จากการสุ่มตัวอย่างเมื่อนำผลิตภัณฑ์ทั้งหมดไปทำให้แห้งภายใต้

อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (Freeze dry) (Ministry of health, Labour and welfare Japan, 2001) ใช้ตัวอย่างเริ่มต้น 300 มิลลิกรัมของน้ำหนักแห้งและทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำเช่นกัน

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบมะละกอจากแปลงปลูก ใช้ตัวอย่างใบมะละกอ 200 มิลลิกรัม สกัดดีเอ็นเอตามวิธีที่อธิบายในคู่มือการใช้งาน Genome Direct to View (ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์, 2546)

ดีเอ็นเอจากผงตัวอย่างถั่วเหลืองดัดแปรพันธุกรรม (Fluka) ได้จากการสกัดวิธีมาตรฐานของรัฐบาลสวิสเซอร์แลนด์ ใช้ผงถั่วเหลือง 300 มิลลิกรัม

การสกัดอาร์เอ็นเอจากไวรัสใบจุดวงแหวนมะละกออยู่บนพื้นฐานของวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอ (Hanahan, 1984) โดยใช้ตัวอย่างขนาด 1 กรัม นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาสังเคราะห์ cDNA สายแรกด้วยเอนไซม์ MMLV โดยใช้อาร์เอ็นเอรวม 2 ไมโครกรัม และปฏิกิริยาตามที่แนะนำในคู่มือการใช้งาน ทำปฏิกิริยาที่ 42 ^{0}C 60 นาที และ 90^{0}C 10 นาที

สำหรับการสกัดตัวอย่างดีเอ็นเอจากผลไม้และผลิตภัณฑ์อื่นใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีมาตรฐานของรัฐบาลเยอรมัน โดยใช้ตัวอย่างสด 300 มิลลิกรัม

เก็บรักษาทั้งดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างข้างต้นที่อุณหภูมิ –70^{0}C เพื่อใช้งานในขั้นต่อไป

การตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอได้จากการนำดีเอ็นเอส่วนหนึ่งที่สกัดได้มาแยกด้วยสนามไฟฟ้าด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรฟอเรซิสโดยใช้อะกาโรสเจล 0.8% ใน 1XTBE buffer

3.2.2 การตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอที่สกัดได้

ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance, A) เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยตรวจสอบที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่กรดนิวคลีอิกสามารถดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตได้สูงสุด 280 นาโนเมตร และ 320 นาโนเมตร คำนวณปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบสัดส่วนของปริมาณดีเอ็นเอ สัดส่วนของ OD_{260}/OD_{280} ตามที่รายงานไว้ใน Sambrook

และคณะ (1989) สำหรับดีเอ็นเอที่สกัดได้จากชุดสำเร็จรูป genome direct to view ไม่ได้อยู่ในรูปของดีเอ็นเอที่สามารถตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสงได้จึงไม่ได้ทำการตรวจสอบ

3.2.3 การพัฒนาระบบการตรวจสอบรีคอมบิแนนต์ดีเอ็นเอ

3.2.3.1 ศึกษาโครงสร้างของชุดยีนที่พบ รวบรวมและตรวจเอกสารที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างของยีนที่เกี่ยวข้องในมะละกอดัดแปรพันธุกรรมเท่าที่มีรายงานจนถึงปัจจุบัน โดยสรุปโครงสร้างเหล่านั้นและนำมาเปรียบเทียบในรูปตารางและแผนภาพ

3.2.3.2 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องหลักในชุดโครงสร้าง เนื่องจากการเปรียบเทียบโครงสร้างและลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 35S promoter ได้มีผู้ศึกษาและนำมาใช้งานก่อนหน้านี้แล้ว (Wolf และคณะ, 2000) ดังนั้นการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จึงเจาะจงลงไปที่ยีนที่เกี่ยวข้อง 2 ชนิด ได้แก่ พาเพนซึ่งเป็นยีนเฉพาะที่พบว่ามีการแสดงออกในมะละกอเท่านั้นและเป็นยีนหลักที่จะตรวจพบในมะละกอ ผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูปทุกชนิด และการศึกษาเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์ในยีนโปรตีนเปลือกหุ้มไวรัสใบจุดวงแหวน เริ่มจากการตรวจเอกสารโดยรวบรวมลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ได้จากการหาข้อมูลดีเอ็นเอโดยวิธีค้นหา sequence retrieval system (SRS) บนฐานข้อมูล ncbi และ ddbj นำข้อมูลที่ได้มาจัดรูปให้อยู่ในรูป FASTA format และนำไปวิเคราะห์โดยการทำ nucleotide alignment ด้วยโปรแกรม clustal W เปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อหาขอบเขตบริเวณ sequence (โดเมนที่มีความเหมาะสมในการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการตรวจสอบ) ทำการตรวจสอบไพรเมอร์ที่ได้ด้วยโปรแกรม oligo version 4.0 พร้อมกับตรวจสอบความจำเพาะโดยการทำ local alignment search ด้วยโปรแกรม Blast n ข้อมูลไพรเมอร์ที่ได้ส่งไปสังเคราะห์ที่บริษัท oligo ตรวจสอบยืนยันผลความเฉพาะเจาะจงของไพรเมอร์ที่ได้กับดีเอ็นเอเป้าหมาย รวบรวมข้อมูลและนำเสนอในรูปแบบของแผนภาพและตาราง

3.2.3.3 ตรวจสอบปฏิกิริยาของไพรเมอร์ที่ได้ นำไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ได้มาทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ความเข้มข้นตามที่แนะนำไว้ใน Sambrook และคณะ (1989)สำหรับคู่ไพรเมอร์พาเพนใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจากมะละกอสายพันธุ์ sunrise คู่ไพรเมอร์ที่เป็นโปรตีนเปลือกหุ้มใช้ดีเอ็นเอแม่แบบจาก cDNA ในข้อ 3.2.1

ศึกษาภาวะเหมาะสม 2 ประการในการปรับปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส คือ

1. การปรับอุณหภูมิ annealing ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยภาวะมาตรฐานตามที่รายงานใน Sambrook และคณะ (1989) โดยใช้ดีเอ็นเอแม่แบบคงที่ 2 นาโนกรัม และความเข้มข้นของไพรเมอร์ 10 pmole โดยแปรผันอุณหภูมิ annealing ทั้งหมด 4 ระดับ คือ 50°C 52°C 55°C และ 58°C ใช้เวลา 2 นาทีทดลองระดับละ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำแยกทำการทดลอง โดยใช้ภาวะปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่เหลือ ได้แก่ อุณหภูมิขั้น denature 93°C 1 นาที และอุณหภูมิขั้น extension 73°C 3 นาที จำนวน 40 รอบ ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้นำไปตรวจสอบโดยการแยกขนาดด้วยสนามไฟฟ้าด้วยเทคนิคอิเล็กโทรฟอเรซิสโดยใช้อะกาโรสเจล 1.5% ใน 1XTBE buffer ย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

2. การศึกษาอิทธิพลของโครงสร้างของเกลือแมกเนเซียมไอออน ต่อความสำเร็จของปฏิกิริยา ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ตามมาตรฐานของ Sambrook และคณะ (1989) โดยปรับระดับความเข้มข้นของเกลือแมกเนเซียมไอออน 5 ระดับ คือ 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 µmole ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ภาวะของปฏิกิริยาและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนพาเพนและโปรตีนเปลือกหุ้มใช้คู่ไพรเมอร์และดีเอ็นเอแม่แบบในรูปแบบเดียวกับข้อ 1. ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้นำไปตรวจสอบโดยการแยกขนาดด้วยสนามไฟฟ้าด้วยเทคนิคอิเล็กโทรฟอเรซิสโดยใช้อะกาโรสเจล 1.5% ใน 1XTBE buffer ย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

จากการศึกษาภาวะที่เหมาะสมทั้งอุณหภูมิในขั้น annealing และความเข้มข้นของแมกเนเซียมไอออน เลือกภาวะที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.2.3.4 การประเมินศักยภาพของวิธีการตรวจสอบ ตรวจสอบและประเมินผลวิธีการตรวจสอบบนพื้นฐานปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จากการศึกษาลักษณะจำเพาะ ได้แก่

1. ความจำเพาะของวิธีการตรวจ (specificity) ศึกษาความจำเพาะของผลการตรวจโดยคู่ไพรเมอร์พาเพนและคู่ไพรเมอร์โปรตีนเปลือกหุ้ม โดยนำดีเอ็นเอจากมะละกอ ผลไม้ต่างๆ ดีเอ็นเอที่ได้จากผลิตภัณฑ์และเนื้อเยื่อมะละกอ โดยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ด้วยปฏิกิริยามาตรฐานภายใต้ภาวะที่ได้ในข้อ 3.2.3.3 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้นำไปตรวจสอบโดยการแยกขนาดด้วยสนามไฟฟ้าด้วยเทคนิคอิเล็กโทรฟอเรซิสโดยใช้อะกาโรสเจล 1.5% ใน 1XTBE buffer ย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต บันทึกผลการทดลอง

2. ตรวจสอบความไวของปฏิกิริยา (sensitivity) แปรผันความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากทั้งมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอตามความเข้มข้นจากมากไปน้อยต่างกัน ระดับละ 10 เท่า 6 ระดับ ระดับละ 3 ซ้ำ ทดสอบโดยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ด้วยปฏิกิริยามาตรฐานภายใต้ภาวะที่ได้ในข้อ 3.2.3.3 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้นำไปตรวจสอบโดยการแยกขนาดด้วยสนามไฟฟ้าด้วยเทคนิคอิเล็กโทรฟอเรซิสโดยใช้อะกาโรสเจล 1.5% ใน 1XTBE buffer ย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต บันทึกผลการทดลอง

3. ตรวจสอบความน่าเชื่อถือในรูปทำซ้ำ (reproducibility) ใช้คู่ไพรเมอร์ทั้งสองเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแม่แบบที่สกัดได้จากตัวอย่างต่างๆ ทั้งตัวอย่างที่เป็นมะละกอสด ผลิตภัณฑ์มะละกอแปรรูป และเนื้อเยื่อมะละกอสด โดยครอบคลุมทั้งหมด 5 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 200 ซ้ำ ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเงื่อนไขเดียวกับที่ระบุไว้ในข้อ 3.2.3.3 ตรวจและประเมินผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยดูจากการปรากฏหรือไม่ปรากฏของแถบดีเอ็นเอโดยการแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยสนามไฟฟ้าด้วยเทคนิคอิเล็กโทรฟอเรซิสโดยใช้อะกาโรสเจล 1.5% ใน 1XTBE buffer ย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต บันทึกค่าคะแนนลงในตาราง

3.2.3.4 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอโมเลกุลเพื่อใช้เป็นโมเลกุลดีเอ็นเออ้างอิงมาตรฐาน

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอโมเลกุลเพื่อใช้เป็นโมเลกุลดีเอ็นเออ้างอิงมาตรฐานประกอบไปด้วยส่วนของ ยีนพาเพน 35S promoter ยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม และส่วนที่เป็นเทอร์มิเนเตอร์โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากแม่แบบ ดังต่อไปนี้

1. ชิ้นส่วนของยีนพาเพน เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากชิ้นส่วนมะละกอที่สกัดได้จากสายพันธุ์ sunrise ด้วยคู่ไพรเมอร์พาเพน ตามรายละเอียดในข้อ 3.2.3.3 ซึ่งทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 280 นิวคลีโอไทด์

2. ชิ้นส่วนของ 35S promoter ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอครอบคลุมส่วน 35S promoter มีขนาด 400 นิวคลีโอไทด์ ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากแม่แบบ pCAMBIA 1301 ด้วยไพรเมอร์จำเพาะ

3. ชิ้นส่วนของโปรตีนเปลือกหุ้ม ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้แม่แบบจากปฏิกิริยา cDNA สายแรกด้วยไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบไว้ตามภาวะของปฏิกิริยาในข้อ 3.2.3.3

4. ชิ้นส่วนของเทอร์มิเนเตอร์ ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนเทอร์มิเนเตอร์ด้วยพลาสมิด pBICP ด้วยไพรเมอร์จำเพาะ

นำชิ้นส่วนที่ได้ทั้งหมดสกัดด้วยฟีนอลและตกตะกอนตามวิธีของ Sambrook และคณะ (1989) นำดีเอ็นเอที่ได้ในแต่ละผลิตภัณฑ์มาทำปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ T_4 polymerase ตามวิธีที่รายงานในเอกสารกำกับ (Pharmacia) โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25^0C 5 นาที นำแต่ละผลิตภัณฑ์มาสกัดด้วยฟีนอลและตกตะกอนอีกครั้งตามวิธีของ Sambrook และคณะ (1989) นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากยีนพาเพนและ 35S promoter มาเชื่อมต่อกันด้วยเอนไซม์ไลเกสโดยใช้สัดส่วนดีเอ็นเอทั้งสองอย่างละ 50 nmole ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 16^0C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำมาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ ได้แก่ 5' Papain กับ 3' Bics เพื่อคัดเลือกและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำเพาะชิ้นส่วนที่มีการเชื่อมต่อในทิศทางยีนพาเพน 35S promoter ทำนองเดียวกันนำชิ้นส่วนของ 35S promoter และยีนโปรตีนเปลือกหุ้มมาเชื่อมต่อกันด้วยวิธีการเดียวกับการเชื่อมต่อชิ้นส่วนยีนพาเพนกับ 35S promoter ภายหลังการเชื่อมด้วยเอนไซม์ไลเกสเพื่อคัดเลือกและเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ 5' Bics กับ 3' CP ดังสำหรับชิ้นส่วนสุดท้าย ได้แก่ ยีนโปรตีนเปลือกหุ้มและเทอร์มิเนเตอร์ ได้จากการนำชิ้นส่วนของยีนโปรตีนเปลือกหุ้มและเทอร์มิเนเตอร์มาเชื่อมต่อในทำนองเดียวกันและเลือกใช้คู่ไพรเมอร์จำเพาะในการคัดเลือกและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้แก่ 5' CP กับ 3' Ter นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสทั้งสามมาผสมเข้าด้วยกันด้วยอัตราจำนวนโมล 50 nmole : 50 nmole : 50 nmole หรือ 1:1:1 และนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์จำเพาะ 5' Papain กับ 3' Ter เพื่อให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดใหญ่ที่ครอบคลุมชิ้นส่วน ยีนพาเพน 35S promoter ยีนโปรตีนเปลือกหุ้ม และเทอร์มิเนเตอร์ นำชิ้นส่วนที่ได้โคลนใส่ PCR script II (Invitrogent) โดยใช้หลักการ TA cloning ตามคำแนะนำในคู่มือการใช้งาน นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ถ่ายเข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ Top ten ตามวิธีของ Sambrook และคณะ (1989) คัดเลือกเฉพาะโคโลนีที่ต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซินและมีชิ้นส่วนของยีนปรากฏ

3.2.3.5 การนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้มาใช้เป็นชุดควบคุมบวก (positive control) ทำการตรวจสอบและประเมินผลบนพื้นฐานปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จากการศึกษา

ลักษณะจำเพาะ คือตรวจสอบความไวของปฏิกิริยา (sensitivity) แปรผันความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเอตามความเข้มข้นจากมากไปน้อยต่างกัน ระดับละ 10 เท่า 6 ระดับ ระดับละ 3 ซ้ำ ทดสอบโดยการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ด้วยปฏิกิริยามาตรฐานภายใต้ภาวะที่ได้ในข้อ 3.2.3.3 ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ได้นำไปตรวจสอบโดยการแยกขนาดด้วยสนามไฟฟ้าด้วยเทคนิคอิเล็กโทรฟอเรซิสโดยใช้อะกาโรสเจล 1.5% ใน 1XTBE buffer ย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต สรุปและบันทึกผลการทดลอง

นำวิธีการที่ได้จากข้อ 3.2.3.3 ร่วมกับโมเลกุลดีเอ็นเอจากข้อ 3.2.3.4 มาประกอบกันแล้วนำไปตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้จากมะละกอและผลิตภัณฑ์มะละกอที่สุ่มตัวอย่างได้จากท้องตลาดและจากการประเมินที่สวนเจริญพีระวัฒน์ จำนวน 3000 ตัวอย่าง (รายละเอียดดูจากภาคผนวก) ผลการตรวจวิเคราะห์สรุปผลเป็นตาราง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย