บทที่3
อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างพืชเพื่อใช้ในการทดลอง

1.1 เก็บตัวอย่างลำไยที่แสดงอาการพุ่มไม้กวาดในแปลงปลูกของเกษตรกรในเขตอำเภอป่าเหว จังหวัดลำพูน

1.2 ตัวอย่างที่แสดงอาการพุ่มไม้กวาดจากการดูดกินของไร

1.3 ฝอยทองที่ใช้ถ่ายทอดเชื้อสาเหตุ

1.4 ตัวอย่างแพงพวยที่เสียบกิ่งจากลำไยที่แสดงอาการพุ่มไม้กวาด

จากนั้นนำตัวอย่างพืชมาล้างน้ำให้สะอาด และตัดเป็นชิ้นเล็กๆ โดยจะใช้ส่วนของก้านใบหรือส่วนที่เป็นท่อลำเลียงของพืช ซึ่งเป็นบริเวณที่เชื้อไฟโตพลาสมาเพิ่มปริมาณอยู่ภายในเซลล์ท่อลำเลียงอาหารจากพืช จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียสเพื่อทำการสกัดดีเอ็นเอต่อไป

2. การตรวจวินิจฉัยโรคพุ่มไม้กวาดของลำไย

2.1. สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืช โดยวิธี การสกัดดีเอ็นเอมะม่วง(ดร.จุลภาค : ติดต่อส่วนตัว) นำตัวอย่างพืช 0.050 กรัมตัดเป็นชิ้นเล็กๆ และบดด้วยแท่งแก้วจนละเอียดใน extraction buffer (2 เปอร์เซ็นต์CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, PVP, 1.0 Sodium metabisulfite, 100mM Tris-HCl, pH 8.0) ปริมาณ 250 มิลิลิตร ที่อุ่นในอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 นาที ผสมกับ β-mercaptonal (7 µl/หลอด) จากนั้นเติม extraction buffer อีก 500 µl บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม chorofrom : Isoamyl (24 :1) ปริมาตร 750 µl (เท่ากับปริมาณของ buffer) ผสมให้เข้ากัน หมุนเหวี่ยงที่ 50,000 rpm 10 นาที เก็บน้ำใสใส่หลอดใหม่ แล้วเติม isopropanol ซึ่งแช่เย็นไว้ลงไปเท่าตัว กลับหลอดเบาๆเพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน หมุนเหวี่ยง 10,000 rpm 10 นาที เก็บตะกอนและล้างตะกอนด้วย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ 500 µl หมุนเหวี่ยง 10,000 rpm 5 นาที 3 ครั้ง ทำตะกอนให้แห้งในระบบสูญญากาศ ละลายดีเอ็นเอกับน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 20 µl

2.3. การติดตามและการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา โดยใช้ DNA probe ด้วยเทคนิค Dot Blot Hybridization

ตัดแผ่นเมมเบรน(nitrocellulose membrane) ขนาด 5×9 เซนติเมตร โดยเว้นระยะห่างกันประมาณ 1 เซนติเมตร ใช้คีมจับกระดาษเสมอ กำหนดจุดหยด positive control(periwinkle viresence) และ negative control (distilled water) โดยใช้ดินสอดำ แช่แผ่นเมมเบรนลงในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้เปียกชุ่ม จากนั้นย้ายลงในสารละลาย 20 ×SS (20×SS ; 3M NaCl, 0.3 M Tris-Sodium citrate) นาน 15 นาที นำแผ่นเมมเบรนที่ได้ขึ้นจากสารละลาย SCC วางลงบนแผ่นกระดาษธรรมดารอจนแห้งซึ่งใช้เวลาประมาณ 5 นาที จากนั้นหยดดีเอ็นเอ 1 µl ผสมกับ denature solution (0.125xSSC, 0.125 M NaCl) 1 µl หยดลงบนแผ่นเมมเบรน นำแผ่นเมมเบรนไปฉายด้วยแสง Ultra -Violet ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร นาน 30 นาที เพื่อตรึงตัวอย่างดีเอ็นเอให้ติดแน่นบนแผ่นเมมเบรน เก็บแผ่นเมมเบรนที่ได้ใส่ลงในถุงพลาสติกปิดมิดชิด เพื่อที่จะนำไปทดสอบการ ไฮบริไดซ์ (hybridize) ต่อไป

2.4. การทำ Hybridization

เตรียมสารละลาย hybridization solution [5×SSC 1 เปอร์เซ็นต์ blocking agent 0.1 เปอร์เซ็นต์ N-lauroylsarcosine Na-Salt 0.02 เปอร์เซ็นต์ sodium dodecyl sulface (SDS)] ซึ่งยังไม่มีการเติมดีเอ็นเอตัวตรวจ ควรเตรียมสารละลายล่วงหน้าอย่างน้อย 1 ชั่วโมง โดยผสมสารทั้งหมดที่อุณหภูมิ 50-70 องศาเซลเซียสได้สารละลายสีขาวขุ่น และเริ่ม hybridize โดยนำแผ่นเมมเบรนใส่ลงในพลาสติกที่ทนร้อนให้มีขนาดพอดีกับแผ่นกระดาษเมมเบรน เติมสารละลาย hybridization solution ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ต่อแผ่นเมมเบรนขนาด 100 ตารางเซนติเมตรปิดปากถุงให้สนิท นำไปเขย่าที่ 68 องศาเซลเซียส นาน 1-2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเทสารละลายดังกล่าวออกจากถุงพลาสติก แล้วเติม hybridization solution ที่มีดีเอ็นเอตัวตรวจสอบลงไป โดยแบ่งดีเอ็นเอตัวตรวจสอบ(16sSE) 5 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอด microcentrifuge นำไปต้มที่ 100 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้วนำมาแช่เย็นจัดทันทีและเติม hybridization solution ลงไป 1.5 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันดีแล้วเติม hybridization solution นี้ลงในถุงเมมเบรน ปิดปากถุงให้สนิท ก่อนนำไปเขย่าที่ 68 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน ล้างแผ่นเมมเบรนเพื่อกำจัดดีเอ็นเอตัวตรวจสอบที่เหลืออยู่ด้วย 20 ×SSC ที่เติม 0.01 เปอร์เซ็นต์ SDS นาน 10 นาที ที่ 25 องศาเซลเซียส 2 ครั้งแล้วล้างด้วยสารละลาย 0.1 ×SSที่เติม 0.01 เปอร์เซ็นต์ SDS นาน 10 นาทีที่ 68 องศาเซลเซียส 2 ครั้ง

2.5. การตรวจสอบผลของปฏิกิริยา hybridization

การตรวจผลปฏิกิริยา hybridization แช่แผ่นเมมเบรน ใน Buffer 1 (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5) ให้เปียกทั่วแผ่นเมมเบรน จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนแช่ลงใน buffer 2 (1 เปอร์เซ็นต์ blocking reagent (w/v) ละลายใน buffer 1) นาน 30 นาที เจือจาง antibody conjugate 1:5,000 (50ไมโครลิตร/มิลลิลิตร) ใน buffer 2 ในปริมาณ 20 มิลลิลิตร แล้วแช่แผ่นเมมเบรนไว้นาน 30 นาที ล้างเมมเบรนด้วย buffer 1 นาน 15 นาที 2 ครั้ง (100 มิลลิลิตร หรือแช่ให้ท่วมแผ่น) แช่เมมเบรนใน buffer 3 (100 mM Tris-HCl , 100 mM MaCl, 50 mM $MgCl_2$, pH 9.5) นาน 2 นาที แช่แผ่นเมมเบรนในภาชนะที่ปิดกั้นได้ หรือใส่ในถุงพลาสติกขนาดใหญ่กว่าดเมมเบรนแล้วย้ายลงในที่มืด หยดสารละลายสีซึ่ง (เตรียมทันทีก่อนใช้ โดยเติม nitroblue tetrazolium salt 45 ไมโครลิตร ใน buffer 3 ผสมให้เข้ากัน เติม X- phosphate 35 ไมโครลิตร) ลงบนแผ่นเมมเบรน โดยเก็บไว้ในที่มืดและนิ่งใช้เวลานาน 1-5 ชั่วโมงเพื่อให้เกิดสีม่วงบนหยดตัวอย่าง หยุดปฏิกิริยาโดยแช่แผ่นเมมเบรนใน buffer 4 (10 mM Tris-HCl , 1 mM EDTA , pH8.0) อย่างน้อย 5 นาที บันทึกผลแล้วเก็บแผ่นเมมเบรนโดยผึ่งให้แห้งในอากาศ

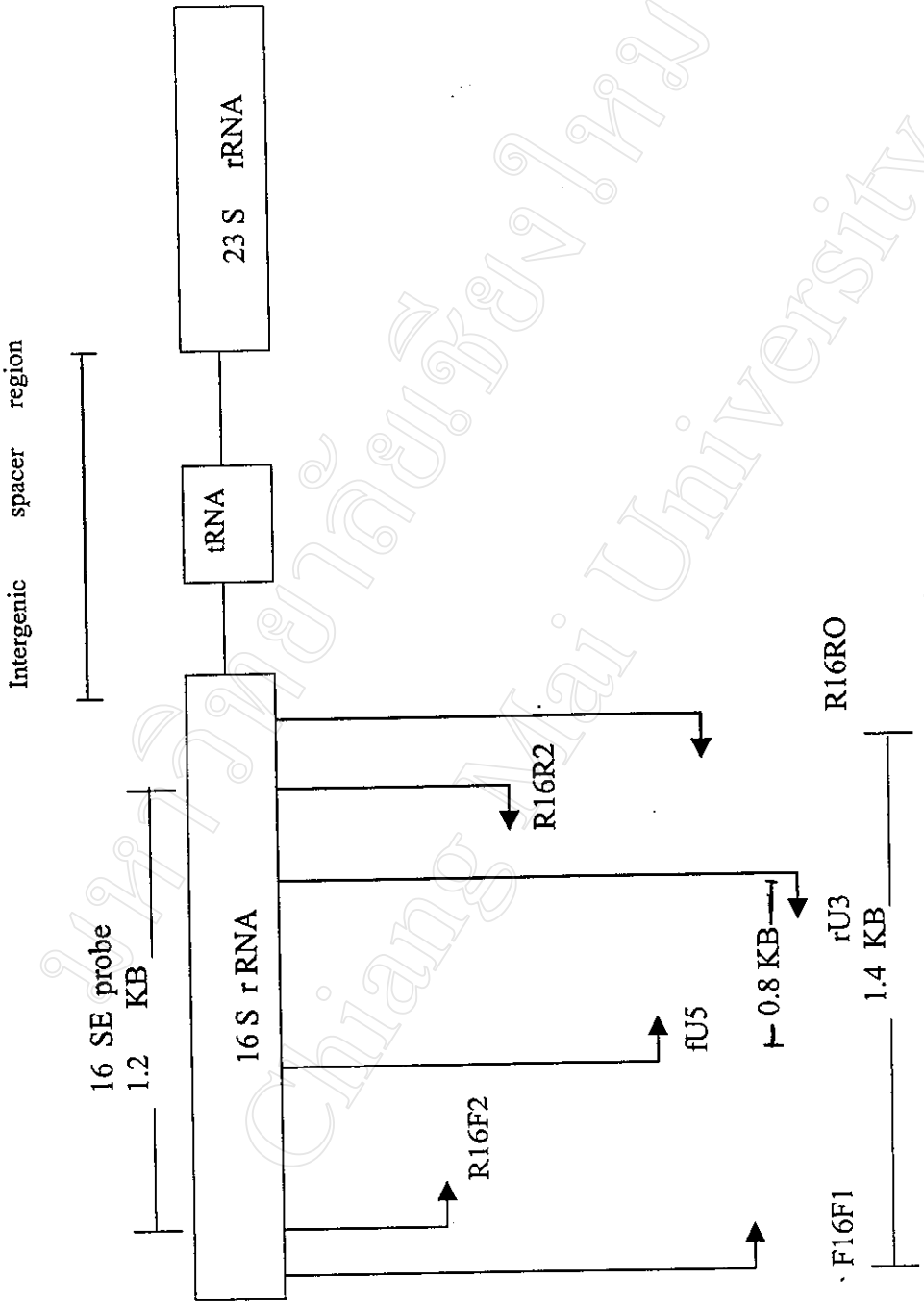
3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชเป็นโรคด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

3.1 การคัดเลือก Primer

Primer ที่ใช้ตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวอย่างพืช (ภาพที่ 4) มีดังนี้

3.1.2 universal primer (F16F2/F16R2) เป็น primer ที่เฉพาะเจาะจงสำหรับเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมามีลำดับเบสดังนี้ forward primer (5'- GAA AC G ACT G CTA AGA CTG G -3') และ reverse primer R16 R2 (5'- TGA CGG GTG TGT ACA ACC CCC G-3')(Lee *et al.*, 1993)

3.1.2. universal primer (fU5/rU3) เป็น primer ที่เฉพาะเจาะจงสำหรับเพิ่มปริมาณยีน 16 S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาในกลุ่มของไม้ผล ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ forward primer fU5(5' - CGG CAA TGG AGG AAA CT-3 ') และ reverse primer rU3 (5'-TTC AGC TAC TCT TTG TAACA-3') (Lorenz, *et al.*, 1995 ; Lee *et al.*, 1993)



ภาพที่ 2. แผนที่แสดงตำแหน่งของ primer ที่ใช้ในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มไม้กวาดของลำไย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

3.1.3. universal primer (F16F1/F16RO) เป็น primer ที่ออกแบบให้เฉพาะเจาะจงสำหรับเพิ่มปริมาณยีน 16 S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมา ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ forward primer R16F1 (5' AGG ACG AGG ATA ACA GTT CG-3') และ reverse primer R16 RO (5'- GGGA TAC ACG ACT TAA CCC C-3') (Lorenz, *et al.*, 1995)

3.2. นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างพืชมาใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค PCR ตามวิธีของ Lee *et al.*, (1993) โดยใช้ forward primer R16 F2 และ reverse primer R16 R2 ส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยา PCR 20 µl ประกอบด้วย 10 ×buffer 2 µl , (25 mM)MgCl 0.4 µl (10 mM) deoxynucleotide triphosphate (dNTP) 1.6 µl forward primer R16F1 และ reverse primer R16R2 (20 pmol) อย่างละ 0.6 µl *Taq* DNA polymerase(5 unit/1µl) 0.1 µl และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 15.7 µl และดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดจากตัวอย่างพืช 1 µl

ปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอมีขั้นตอนดังนี้ first denaturing 94 องศาเซลเซียส 2 นาที 1 รอบ Denature 94 องศาเซลเซียส 10 นาที annealing 50 องศาเซลเซียส 2 นาที Extension 72 องศาเซลเซียส 3 นาที จำนวน 35 รอบ แล้วตามด้วย final extension 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที อีก 1 รอบ โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycle (PCT-100, MJ Research Inc., Watertown , MA) นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ด้วย 0.8 เปอร์เซ็นต์ agarose gel eletrophoresis โดยแบ่ง PCR product ที่ได้มา 5 µl ผสมกับ loading dye (0.25 เปอร์เซ็นต์ bromphenol blue 40 เปอร์เซ็นต์ Ficoll 400 0.5 เปอร์เซ็นต์ SDS) จำนวน 1 µl ใช้ ½TBE buffer และผ่านกระแสไฟฟ้ากระแสตรง (DC) ความต่างศักย์ 110 โวลท์ เป็นเวลา 25 นาที แล้วนำแผ่น agarose gel ย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจดูแถบดีเอ็นภายใต้แสง UV และบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel Document (BIO-RAD,USA)

3.3. นำดีเอ็นเอที่ได้จากจากตัวอย่างพืชที่เป็นโรคและพืชปกติ มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในการทำ PCR โดยวิธีของ (Lorenz *et al.*, 1995 ; Lee *et al.*, 1993) โดยใช้ universal primer ของเชื้อไฟโตพลาสมา forward primer fU5 และ reverse primer rU3 โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยาและการตรวจผลผลิต PCR เหมือนข้อ 1.2

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชที่เป็นโรค ด้วยเทคนิค Nested Polymerase Chain Reaction (Nested PCR)

นำดีเอ็นเอที่ได้จากตัวอย่างพืชที่เป็นโรคและพืชปกติ มาใช้เป็นแม่แบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมา โดยเทคนิค PCR ตามวิธีของ Lee *et al.*, (1993) โดยใช้ primer ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 2 ครั้ง และใช้ universal primer คู่แรกคือ forward primer R16F1 และ reverse primer R16 RO โดยมี ส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยา PCR 20 µl ประกอบด้วย 10 ×buffer 2 µl , $MgCl_2$ (25 mM) 0.4 µl (10 mM) deoxynucleotide triphosphate (dNTP) 1.6 µl forward primer R16F1 และ reverse primer R16R2 (20 pmol) อย่างละ 0.6 µl *Taq* DNA polymerase (5Unit/1µ) 0.1 µl และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 15.7 µl และดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดจากตัวอย่างพืช 1 µl จากนั้นนำเอา PCR product ที่ได้มาเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR อีกครั้ง และนำเอาดีเอ็นเอดังกล่าวมาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ โดยใช้ primer R16F2/R16R2 และมีส่วนผสมของปฏิกิริยาเหมือนเดิม แต่ปรับเปลี่ยนอุณหภูมิในช่วงปฏิกิริยา annealing จากอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เปลี่ยนเป็น 60 องศาเซลเซียส นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ด้วย 0.8 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis โดยแบ่ง PCR product ที่ได้มา 5 µl ผสมกับ loading dye จำนวน 1 µl ใช้ไฟฟ้ากระแสตรง (DC) ความต่างศักย์ 110 โวลท์ใช้เวลา 25 นาที ใน ½ TBE buffer แล้วนำแผ่น agarose gel มาย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV และบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel Document (BIO-RAD,USA)

5. การตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรอยด์

5.1. การสกัดอาร์เอ็นเอตามวิธีของ Semancik และคณะ (1987) นำตัวอย่างพืชจำนวน 5 กรัม บดให้ละเอียด เติม EM-1 buffer 6 มิลลิลิตรและฟีนอล (pH 8.0) 15 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างแต่ละหลอด นำไปปั่นให้ละเอียดโดยใช้เครื่อง homogenizer นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 7,500 รอบ เป็นเวลา 35 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บน้ำใสเติม ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 3 เท่าของน้ำใส เติม 3 M sodium acetate 10 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรของน้ำใสเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 7,500 รอบ เวลา 35 นาทีที่ 4 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนด้วย 1 xTKM buffer 1 มิลลิลิตร แล้วนำไป dialysis ใน 1x TKM buffer ทิ้งไว้ข้ามคืน เทสารละลายใส่หลอดใหม่เติม 4 M LiCl เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,50O รอบ นาน 35 นาทีที่ 4 องศาเซลเซียส เก็บน้ำใสเติม ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ 3 เท่าของปริมาตรน้ำใส เก็บไว้ที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส เวลา 1 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 7,500 รอบ เป็นเวลา 40 นาทีที่ 4 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนด้วย 1xTKM buffer มิลลิลิตร ปรับปริมาตรของสารละลายด้วย ethanol 35 เปอร์เซ็นต์ ใน 1xSTE buffer นำตัวอย่างไปผ่าน CF-11 cellulose chromatography column ล้างด้วย ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ ใน 1x STE ปริมาตร 2 มิลลิลิตร 3 ครั้ง ล้างด้วย 1xSTE buffer 300 µl เปลี่ยนหลอดใหม่เพื่อเก็บอาร์เอ็นเอจากการ elute ด้วย 1xSTE buffer ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เติม 3M sodium acetate กับ ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที ละลายตะกอนด้วย 1xTKM buffer แล้วย้ายลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อตกตะกอนอาร์เอ็นเอ โดยเติม ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 3 เท่าของสารละลาย เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,2000 รอบ นาน 35 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนด้วย 1xTKM buffer ปริมาตร 100 µl เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

5.1. การตรวจหาไวรอยด์โดยใช้ sequential polyacrylamide gel electrophoresis (sPAGE) ตัวอย่าง อาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบด้วยเพื่อตรวจสอบว่ามี single- stranded circular RNA ของไวรอยด์ในตัวอย่างพืช โดยเตรียมเจลที่ 1 คือ sPAGE (nondenature gel)ด้วย 5 เปอร์เซ็นต์ polyacrylamide ใส่ตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ลงไปตามช่องเจล ตัวอย่างละ 35 ไมโครลิตร และ migration tracking dyes 8µl และผสมให้เข้ากัน โดยใช้กระแสไฟฟ้า 54 มิลิแอมแปร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมงใน 1xTAE buffer pH 7.2 เมื่อครบตามกำหนดเวลา นำแผ่นเจลแช่ในสารละลายเอธิเดียมโปรไมด์นาน 10 นาที เพื่อตรวจดู บริเวณ 7S RNA โดยผ่านแสง UV ตัดเจลเหนือบริเวณ 7 S RNA เล็กน้อย นำไปวางบน gel ที่สองโดยใช้กระแสไฟฟ้า 16 มิลิแอมแปร์ ที่อุณหภูมิห้อง ใน 1x STE pH 8.3 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำไปย้อม silver nitrate

6. การตรวจสอบเชื้อไรอยด์โดยใช้วิธี RT-PCR (Reverse transcription Polymerase Chain Reaction)

6.1 คัดเลือก primer จาก cDNA – specific primers ที่สร้างจากส่วนที่เป็น complementary กับ conserved domain sequence ของไวรอยด์ ในกลุ่มต่างๆดังนี้ (ภาพที่5-10)

6.1.1. CE primer ของเชื้อไวรอยด์ในกลุ่ม CEVd (citrus exocortis viroid) มีลำดับเบสดังนี้ cCE (5' CCG GGG ATC CCT GAA GTA C 3') และ hCE (5' GGA AAC CTG GAG GTA G 3')

6.1.2. ASBV primer ของเชื้อไวรอยด์ในกลุ่ม ASBVd (avocado sun blotch viroid) มีลำดับเบสดังนี้ cASBV(5' TCC CTG AGG AGA AGT A3') และ hASBV (5' AAG ATG GGA AGA ACA CTG A 3')

6.1.3 HS primer ของเชื้อไวรอยด์ในกลุ่ม HSVd (hop stunt viroid) มีลำดับเบสดังนี้ cHS(5' GTT GCC CCG GGG CTG CT 3') และ hHS (5' TCT TGT CAG AAT CCA GCG 3')

6.1.4. PS primer ของเชื้อไวรอยด์ในกลุ่ม PSTVd (potato spindle tuber viroid) มีลำดับเบสดังนี้ cPS (5' CGG GGA TCC CTG AAG 3') และ hPS (5' GGA AAC CTG GAG CGA ACT G 3')

1 CGGGATCTTT CTTGAGGTTC CTCGTGGTGCT CACCTGACCC TGCAGGCAGG AAAAGAAAAA 60
61 AGAGGCGGCG GGGGAAGAAG TCCTTCAGGG ATCCCCGG 98 GG AAACCTGGAG 110 GAAGTCGAGG 120
121 TCGGGGGGGA CAGCTGCTTC GGTCGCCGCG AGTCACTGGC GTCCAGCGGA AAAACAGGAG 180
181 CTCGTCTCCT TCCTTTCGCT GCTGGCTCCA CATCCGATCG TCGCTTGAAGC GCCTCGCCCC 240
241 CTCGCCCGGA GCTTCTCTCT GGATATACTA CGGTGGAAAC AACTGAAGCT TCAACCCCAA 300
301 ACCGCTTTTC TTATATCTTC ACTGCTCTCC GGGCGAGGGT GAAAGCCCTC GGAACCCTAG 360
361 ATTGGGTCCC 370

ภาพที่ 5. Complete genome ของเชื้อไวรอยด์ Citrus exocortis viroid

____ คือ ตำแหน่ง primer CEVd

1 TTTATTAGAA CAAGAAGTGA GGATATGATT AAACTTTGTT TGACGAAACC AGGTCTGTTC 60
61 CGACTTTCCG ACTCTGAGTT TCGACTTGTG AGAGAAGGAG GAGTCGGTGGT GAACTTTTAT 120
121 TAAAAAAATT AGTTCACTCT TCTTCAATCT CTTGATCACT TCGTCTCTTC AGGG 174 AAAGAT 180
181 GGGAAGAACA CTGA 194 TGAGTC TCGCAAGGTT TACTCCTCTA TCTTCATTGT TTTTTTACAA 240
241 AATCTTG 247

ภาพที่ 6. Complete genome ของเชื้อไวรอยด์ Avocado sunblotch viroid

____ คือ ตำแหน่ง primer hASBV

[1]CTGGGAATTC TCGATTGCC GCATGGGCAA GCAAAGAAAA AACAAGGCAG GGAGGAGACT[60]
[61]AAGGAGCCCC GGGGCAACTC T[81]TCTCAGAAT CCAGCGAGAG[100]GCGTAGGAGA GAGGGCCGCG[120]
[121]CGATGAGGCT TCTTGCTTCG AAACACCATC GATCGTCCCT TCTTCTTTTA CCTTCTCCTG[180]
[181]GCGAGACGCG ACCGGTGGCA TCACCTTCCG GTTCGTCTTC CAACCTGCTT TTTGTCGTACG[240]
[241]TAAAGCGGATC CTCTCTTGAG CCCCT[265]

ภาพที่ 7. Complete genome ของเชื้อไวรอยด์ HSVd (hop stunt viroid)
_____ คือ ตำแหน่ง primer hHSVd

[1]CGGAACTAAA CTCGTGGTTC CTGTGGTTCA CACCTGACCT CCTGAGCAGA AAAGAAAAAA[60]
[61]GAAGGCGCT CGGAGGAGCG CTTCAGGGAT CCCCGG[96]GGAA ACCTGGAGCG[110] AACTGGCAAA[120]
[61]AAAGGACGGT GGGGAGTGCC CAGCGGCCGA CAGGAGTAAT TCCCGCCGAA ACAGGGTTTT[180]
[181]CACCCTTCCT TTCTTCGGGT GTCCTTCCTC GCGCCCGCAG GACCACCCCT CGCCCCCTTT[240]
[241]GCGCTGTCGC TTCGGCTACT ACCCGGTGGA AACAACTGAA GCTCCCGAGA ACCGCTTTTT[300]
[301]CTCTATCTTA CTTGCTTCGG GGCGAGGGTG TTTAGCCCTT GGAACCGAG TTGGTTCCT[359]

ภาพที่ 8. Complete genome ของเชื้อไวรอยด์ PSTVd (potato spindle tuber viroid)
_____ คือ ตำแหน่ง primer hPSVd

1GGTAAACACC GTGCGGTTCC TGTGGTTCGC CCCGCCACG CAGATAGATA AAGAAACGGA60
61GGAGAAGAAG GAACTCACCT G81TCGTCGTCG ACGAAG96GCCG GTGAGAAAGG AGCTGCCAGC120
121ACTAACCGGA CGGCGCCCTC GCACCAGTTC CGCTGTGGGT TCGCCTACAA GAACGTACGG180
181TGTTGAGGCC CTGTCCGCCG CTGCGCTGCC ACCTACTCTC GCGCCGCTAG TCGAGCGGAC240
241TCCGGGTGGA GCCCCCTGTT CTCTCACGGCT CTTTTTCTTT GACGCAGCGG GGGGTGGGTT300
301CCCAGGGGTAA AACACAATAG GTGTTTCCC329

ภาพที่ 9. Complete genome ของเชื้อไวรอยด์ ASSVd (apple scar skin viroid)
_____ คือ ตำแหน่ง primer hASSVd

1CTGGGGAAAT CTACAGGGCA CCCCAAAAAC CAGGCCGGA GAGGCCGCTT GAGGGATCCC60
61CGGGAAACG TCAAGCGAAT CTGGGAAGGG AGCGTACCTG GGTCGATCGT GCGCGTTGGA120
121GGAGACTCCT TCGTAGCTTC GACGCCCGGC CGCCCCTCCT CGACCCGCTTG GCGCGTTGGA180
181CGGTG186GATAC AACTCACGCG GCT103CTTACCT GTTGTTAGTA AAAAAAGGTG TCCCTTTGTA240
241GCTCCCT246

ภาพที่ 10. Complete genome ของเชื้อไวรอยด์ CCCVd (coconut cadang cadang)
_____ คือ ตำแหน่ง primer hCCCVd

6.1.5. ASSVd primer ของเชื้อไวรอยด์ในกลุ่ม ASSVd (apple scar skin viroid) มีลำดับเบสดังนี้ cASS (5' CCT TCG TCG ACG ACG A 3') และ hASS (5' TCG TCG TCG ACG AAG G 3')

6.1.6. CCCVd primer ของเชื้อไวรอยด์ในกลุ่ม CCCVd (coconut cadang cadang) มีลำดับเบสดังนี้ cCC (5' CAC CGG GTA GTC TCC CAA G 3') และ hCC(5' GAT ACA ACT CAC GCG GCT 3')

6.2 นำอาร์เอ็นเอจากพืชที่สกัด มาตรวจหาไวรอยด์ โดยวิธี RT-PCR ผสมตัวอย่างอาร์เอ็นเอปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ cDNA primer ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อไวรอยด์ในข้อที่6.1 700 นาโนกรัม และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้วผสมให้เข้ากัน นำเข้าเครื่อง PCR ใช้อุณหภูมิ 80 นาน 3 นาที ตามด้วย 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เมื่อครบเวลาเติม RT-buffer ปริมาตร 4 µl dNTP 5 mM ปริมาตร 4 µl และ RT-enzyme ผสมให้เข้ากัน นำเข้าเครื่อง PCR อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที ขั้นตอนดังกล่าวเป็นการเพิ่ม ดีเอ็นเอสายลบ จากนั้นนำ cDNA ที่ได้จากปฏิกิริยา revere transcription จำนวน 1 µl มาเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นโดยวิธี PCR มีส่วนผสมของปฏิกิริยา 20 µl ประกอบด้วย 10 ×Buffer 2 µl , (50 mM)MgCl 0.8 µl ,(10 mM) deoxynucleotide triphosphate (dNTP) , 0.5 µl cDNA (100ng) 1 µl และ homologue DNA (100ng) อย่างละ 1µl *Taq* DNA polymerase 0.5 µl และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 14.2 µl โดยใช้อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส 30 วินาที 55 องศาเซลเซียส 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จนครบ 35 รอบ นำผลไปตรวจสอบบน agarose gel 2 เปอร์เซ็นต์ ใน 1xTBE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลล์ เวลา 20 นาทีย้อมเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เวลา 10 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV และถ่ายรูปด้วยเครื่อง Gel Document (BIO-RAD, USA)