บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาลักษณะอาการของโรคฮวงลองบิง (HLB)

ทำการศึกษาลักษณะอาการของโรค HLB ในสวนส้มที่ปลูกส้มพันธุ์โชกุน (สายน้ำผึ้ง) ใน 4 อำเภอของ 2 จังหวัดของภาคเหนือ ได้แก่ อ.เวียงป่าเป้า จ.เชียงราย อ.ฝาง อ.สันทราย อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่ และในสวนส้มที่ปลูกพันธุ์เขียวหวานใน อ.วังชิ้น อ.ลอง จ.แพร่ และเก็บตัวอย่างใบที่แสดงอาการของโรคมาประมาณ 20-40 ใบ/ต้น เพื่อใช้ในการศึกษาถึงเชื้อสาเหตุโรค

2. การศึกษาทาง ultrastructure ของใบส้มที่เป็นโรค

ทำการศึกษาลักษณะทาง ultrastructure ของใบส้มที่เป็นโรค โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Trasmission Electron Microscopy; TEM) เพื่อตรวจหาเชื้อสาเหตุในบริเวณเซลล์ท่อลำเลียงอาหารและเซลล์ข้างเคียง วิธีการเตรียมตัวอย่างจากใบส้มโดยได้ดัดแปลงจากวิธีของ Hong-Ji และ An-Li (1990) มีขั้นตอนดังนี้ นำใบที่แสดงอาการของโรคมาล้างให้สะอาด ตัดเส้นกลางใบ (midrib) ด้วยมีดที่ฆ่าเชื้อแล้วให้มีขนาดประมาณ 2-3 มิลลิเมตร จากนั้นทำการรักษาสภาพเนื้อเยื่อ (prefixation) ของชิ้นพืช โดยนำมาแช่ในน้ำยารักษาสภาพ (prefixative solution) 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงล้างออกด้วย phosphate buffer saline (PBS) จากนั้นทำการรักษาสภาพเนื้อเยื่อครั้งที่สองด้วย 1% osmium tetraoxide นาน 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS นำชิ้นพืชไปกำจัดน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) ด้วย ethanol และ acetone โดยแช่ใน ethanol ที่มีความเข้มข้น 30% 50% 70% 90% และ 95% อย่างละ 1 ครั้งๆ ละ 30 นาที และแช่ใน 100% ethanol โดย แช่ 2 ครั้งๆ ละ 30 นาที จากนั้นจึงแช่ใน acetone 2 ครั้ง ๆ ละ 30 นาที ทำการหล่อบล็อกเนื้อเยื่อพืชที่ได้ในเรซิน (embedding) โดยการให้สารเรซินแทรกซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อ (infiltration) ซึ่งจะค่อยๆ เพิ่มความเข้มข้นของเรซินใน acetone ตามลำดับดังนี้ acetone:Spurr's resin (3:1) นาน 3-5 ชั่วโมง acetone:Spurr's resin (1:1) นาน 3-5 ชั่วโมง และ acetone:Spurr's resin (1:3) ทิ้งไว้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ข้ามคืน จากนั้นทำ pure resin นาน 3-5 ชั่วโมง ทำ 2 ครั้ง จึงนำเรซินที่มีชิ้นพืชอยู่ใส่ใน rubber mould ที่เป็นเป้าหล่อบล็อก แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมงเพื่อให้เรซินแข็งตัว (polymerization) จากนั้นทำการตัดเนื้อเยื่อ (section) ในเรซินให้เป็นแผ่นบาง ๆ โดยเครื่องมือที่ใช้ตัดเรียกว่า Ultramicrotome (Reichert ultracut) โดยทำการตัดเนื้อเยื่อในเรซินให้มีความหนาประมาณ 0.5 ไมโครเมตร โดยใช้มีดกระจก (glass knife) จึงย้อมตัวอย่างที่ตัดได้ด้วยสี toluidine blue แล้วนำไปตรวจดูภายใต้กล้อง light compound microscope เพื่อตรวจดูลักษณะของเนื้อเยื่อ แล้วจึงทำการ block trimming ในส่วนของเนื้อเยื่อที่ไม่ต้องการออกให้เหลือเฉพาะส่วนของเนื้อเยื่อที่สนใจ และให้มีส่วนของเรซินน้อยที่สุด แล้วจึงตัดเนื้อเยื่ออีกครั้งโดยให้มีความหนาประมาณ 80 นาโนเมตร แล้วเก็บ section นั้นด้วย กริดทองแดง (copper grid) จากนั้นทำการย้อมแผ่นเนื้อเยื่อด้วยโลหะหนัก โดยนำแผ่นเนื้อเยื่อที่อยู่บนกริดมาย้อมด้วย uranyl acetate (saturated uranyl ใน 50 % alcohol) นาน 45 นาที และย้อมด้วย lead citrate ในภาชนะที่ปราศจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ นาน 10 นาที จากนั้นนำไปตรวจดูลักษณะของเชื้อสาเหตุในบริเวณเซลล์ท่ออาหารและเซลล์ใกล้เคียงภายใต้กล้อง TEM (Jeol Jem 1200 Ex)

3. การเก็บรักษาตัวอย่างใบส้มที่แสดงอาการของโรคด้วยวิธีต่าง ๆ

นำใบส้มที่แสดงอาการของโรคมาล้างให้สะอาดจากนั้นผึ่งให้แห้ง แล้วนำไปเก็บรักษาโดยเปรียบเทียบ 4 วิธีคือ เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ – 80 องศาเซลเซียส เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง และการทำให้แห้งโดยการเก็บในกล่องพลาสติกที่มี silica gel จากนั้นทำการตรวจหาเชื้อสาเหตุด้วยวิธี PCR ทุกๆ เดือน เพื่อเปรียบเทียบว่าวิธีใดที่สามารถเก็บรักษาตัวอย่างได้นาน มีความเหมาะสม และยังสามารถตรวจพบเชื้อสาเหตุได้

4. การตรวจสอบเชื้อสาเหตุโดยวิธี PCR

4.1 การแยกสกัดดีเอ็นเอ

นำใบส้มที่แสดงอาการของโรคมาตัดเอาเฉพาะเส้นกลางใบ แล้วนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide) ที่ดัดแปลงมาจาก Dellaportta (1983) มีขั้นตอนดังนี้ นำใบส้มที่แสดงอาการมาล้างให้สะอาด ตัดเอาเฉพาะเส้นกลางใบมา 0.5 กรัม แล้วตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ด้วยกรรไกรที่สะอาด นำไปใส่ในโกร่งที่แช่เย็นแล้วเติม grinding buffer (ภาคผนวก) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10-20 นาที แล้วจึงบดให้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ละเอียด เทน้ำคั้นที่ได้ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายที่ได้ใส่ในหลอดใหม่ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 g นาน 25 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเทสารละลายทิ้ง เก็บตะกอน แล้วเติมสารละลาย CTAB (ภาคผนวก) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ละลายตะกอนให้หมดโดยนำไป vortex แล้งจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นเติมสารละลาย chloroform/isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 g นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ได้สารละลายแยกเป็น 2 ชั้น ให้เก็บสารละลายใสส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ เติม isopropanol ปริมาตรที่เท่ากัน ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 g นาน 15 นาที จากนั้นเทสารละลายทิ้ง แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 g นาน 5 นาที ดูดเอา ethanol ออก และทำตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 25 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4.2 การทำปฏิกิริยา PCR

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย specific primer ที่จำเพาะกับบริเวณ 16S ribosomal DNA gene (rDNA) ด้วย forward primer OI1 (5'-GCGCGTATGCAAGAGCGGCA-3') และ reverse primer OI2c (5'-GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT- 3') การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอประกอบด้วยสารละลายปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ดังนี้

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	17.15	-
dNTPs	1.00	0.2 มิลลิโมลาร์
10X PCR buffer	2.50	1X
50 mM $MgCl_2$	1.25	2.5 มิลลิโมลาร์
primer OI2c	1.00	1.0 ไมโครโมลาร์
primer OI1	1.00	1.0 ไมโครโมลาร์
Taq DNA polymerase (Invitrogen)	0.10	0.5 Unit
ดีเอ็นเอต้นแบบ	1.00	undiluted extracted DNA

ผสมส่วนประกอบดังกล่าวให้เข้ากันแล้วนำเข้าเครื่อง Programable Thermal Controller PTC-100^{TM} (MJ Research) โดยมีเงื่อนไขในการทำปฏิกิริยา ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1. initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที	
2. denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 60 วินาที	จำนวน 35 รอบ
annealing	ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที	
extension	ที่อุณหภูมิ72 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที	
3. final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที	

ทำการตรวจวิเคราะห์ผลด้วยวิธี Gel electrophoresis บน 1% agarose gel

นอกจากนี้ได้ใช้ primer ที่แยกความแตกต่างของเชื้อสาเหตุทั้งสองชนิดด้วย forward primer A2 (5'-TATAAAGGTTGACCTTTCGAGTTT-3') และ reverse primer J5 (5'-ACAAAAGCAGAAATAGCACGAACAA-3') ซึ่งจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณยีน ribosomal protein (*rplAJ*) (ภาคผนวก) ของเชื้อสาเหตุ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ประกอบด้วยสารละลายปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ดังนี้

ส่วนประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	16.65	-
dNTPs	1.00	0.2 มิลลิโมลาร์
10X PCR buffer	2.50	1X
50 mM $MgCl_2$	1.25	2.5 มิลลิโมลาร์
primer A2	1.25	1.0 ไมโครโมลาร์
primer J5	1.25	1.0 ไมโครโมลาร์
Taq DNA polymerase (Invitrogen)	0.10	0.5 Unit
ดีเอ็นเอต้นแบบ	1.00	undiluted extracted DNA

ผสมส่วนประกอบให้เข้ากันจากนั้นนำเข้าเครื่อง Programable Thermal Controller PTC-100^{TM} (MJ Research) ซึ่งมีเงื่อนไขในการทำปฏิกิริยา ดังนี้

1. initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที	
2. denaturation	ที่อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที	จำนวน 35 รอบ
annealing	ที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที	
extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที	
3. final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที	

จากนั้นทำการตรวจวิเคราะห์ผลด้วยวิธี Gel electrophoresis บน 1% agarose gel

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4.3 การตรวจวิเคราะห์ผลผลิตจากการทำ PCR (PCR product)

ทำการตรวจวิเคราะห์ผลด้วยวิธี Gel electrophoresis โดยนำผลผลิตจากการทำ PCR มา 9 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 1 ไมโครลิตร แล้วแยกขนาดของดีเอ็นเอบน 1 % agarose gel electrophoresis ใน 0.5X TBE buffer ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลท์ นาน 40 นาที จากนั้นย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำนาน 10 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต และบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel documentation (SYNGRNE ; Gene Genius Bio Imaging System)

5. การพัฒนาการตรวจสอบเชื้อสาเหตุด้วยวิธี PCR

5.1 พัฒนาวิธีการแยกสกัดกรดนิวคลีอิก

ทำการเปรียบเทียบวิธีการแยกสกัดกรดนิวคลีอิก 5 วิธี ได้แก่ วิธีที่ 1 ดัดแปลงมาจากวิธีของ Jagoueix *et al.* (1996) วิธีที่ 2 ดัดแปลงมาจากวิธีของ Jagoueix *et al.* (1996) วิธีที่ 3 ดัดแปลงมาจากวิธีของ Hung *et al.* (1999) วิธีที่ 4 ดัดแปลงมาจากวิธีของ Dellaporta *et al.* (1983) และวิธีที่ 5 ดัดแปลงมาจากวิธีของ Nakashima *et al.* (1995) เพื่อเปรียบเทียบว่าวิธีใดมีความสะดวก รวดเร็ว มีประสิทธิภาพสูง และประหยัด ดังนี้

วิธีที่ 1 ดัดแปลงมาจากวิธีของ Jagoueix *et al.* (1996)

ตัดเส้นกลางใบส้มจากใบที่แสดงอาการมา 0.5 กรัม จากนั้นตัดเป็นชิ้นขนาดเล็กบดในโกร่งแช่เย็นที่เติม NaCl ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นย้ายน้ำคั้นที่ได้ใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 16,000 g นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทสารละลายทิ้ง เก็บตะกอน แล้วละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 25 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีที่ 2 ดัดแปลงมาจากวิธีของ Jagoueix *et al.* (1996)

ตัดเส้นกลางใบส้มจากใบที่แสดงอาการมา 0.5 กรัม ตัดเป็นชิ้นขนาดเล็ก บดในโกร่งแช่เย็นที่เติมสารละลาย TE buffer (ภาคผนวก) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเทน้ำคั้นใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 g นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นดูดสารละลายใส่ในหลอดใหม่ เติมสารละลาย chloroform/isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 g นาน 5 นาที ที่

อุณหภูมิห้อง ได้สารละลายแยกเป็น 2 ชั้น ให้เก็บสารละลายใสส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ เติม isopropanol ปริมาตรที่เท่ากัน ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 g นาน 15 นาที เทสารละลายทิ้ง แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 g นาน 5 นาที ดูดเอา ethanol ออก ทำตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 25 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

วิธีที่ 3 ดัดแปลงมาจากวิธีของ Hung *et al.* (1999)

ตัดเส้นกลางใบส้มจากใบที่แสดงอาการมา 0.5 กรัม ตัดเป็นชิ้นขนาดเล็ก บดในโกร่งแช่เย็นที่เติมสารละลาย DNA extraction buffer (ภาคผนวก) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บดให้ละเอียด เทน้ำคั้นลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 g นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บสารละลายใสใส่ในหลอดใหม่ แล้วเติมสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาตร 0.125 เท่า และสารละลาย 10% CTAB ใน NaCl 0.7 โมลาร์ (ภาคผนวก) ปริมาตร 0.125 เท่า ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นเติม chloroform/isoamyl alcohol (24 :1) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 g นาน 5 นาที สารละลายแยกเป็น 2 ชั้น ให้ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ และเติม chloroform/isoamyl alcohol (24 : 1) ในปริมาตรเท่ากับสารละลายใสที่ได้ ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 g นาน 5 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ เติม isopropanol ปริมาตร 0.6 เท่า ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเทสารละลายทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 g นาน 5 นาที ดูดเอา ethanol ออก ทำตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 25 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีที่ 4 ดัดแปลงมาจากวิธีของ Dellaporta *et al.* (1983)

วิธีการแยกสกัดทำเหมือนในการทดลองที่ 4.1

วิธีที่ 5 ดัดแปลงมาจากวิธีของ Nakashima *et al.* (1995)

ตัดเส้นกลางใบส้มจากใบที่แสดงอาการมา 0.5 กรัม ตัดเป็นชิ้นขนาดเล็กอย่างละเอียด แบ่งใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด จากนั้นเติมสารละลาย CTAB (ภาคผนวก) ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร นำไปเขย่านาน 3 ครั้ง/5 นาที โดยใช้ vortex จึงเติมสารละลาย

chloroform/isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 g นาน 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง สารละลายแยกเป็น 2 ชั้น ให้ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ เติมสารละลาย isopropanol ปริมาตร 0.7 เท่า ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 g นาน 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เทสารละลายใสทิ้ง ทำตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 25 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

เมื่อทำการสกัดดีเอ็นเอครบทั้ง 5 วิธีแล้วนำดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยการทำเจลอิเลคโตรโฟรีซิสบน 1% agarose gel ใช้ความ ต่างศักย์ไฟฟ้า 50 โวลท์ นาน 20 นาที และวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260/280 นาโนเมตร

5.2 การทำปฏิกิริยา PCR

ในการทำปฏิกิริยา PCR ในขั้นตอนนี้ ใช้ specific primer ด้วย forward primer OI1 และ reverse primer OI2c และใช้ primer ที่แยกความความแตกต่างของเชื้อสาเหตุทั้งสองชนิดด้วย forward primer A2 และ reverse primer J5 ซึ่งในการทำปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยสารละลายปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตรเช่นเดียวกับการทดลองที่ 4.2 ใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต้นแบบ 100 นาโนกรัม

5.3 การตรวจวิเคราะห์ผลผลิตจากการทำ PCR (PCR product)

ทำการตรวจวิเคราะห์ผลด้วยวิธี Gel electrophoresis โดยนำผลผลิตจากการทำ PCR มา 9 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 1 ไมโครลิตร แล้วแยกขนาดของดีเอ็นเอบน 1 % agarose gel electrophoresis ใน 0.5X TBE buffer ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลท์ นาน 40 นาที จากนั้นย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำนาน 10 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต และบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel documentation (SYNGRNE ; Gene Genius Bio Imaging System)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

5.4 การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing)

ทำการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ ribosomal protein gene ของ β-operon ของเชื้อสาเหตุ โดยนำ PCR product จาก 3 แหล่ง คือ จากเชียงใหม่ (HLB-CM)

เชียงราย (HLB-CR) และแพร่ (HLB-P) มาวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Sanger method โดยใช้ความเข้มข้นของ PCR product ในแต่ละตัวอย่างประมาณ 200-500 นาโนกรัมต่อ 50 ไมโครลิตร และใช้ความเข้มข้นของ primer A2/J5 อย่างละ 10 พิโคโมลต่อ 20 ไมโครลิตร โดยใช้ PRISM Ready Reaction Dye Termination Cycle Sequencing kit และใช้เครื่อง ABI Model 3100 version 3.7 automated DNA sequencer (Perkin Elmer) เป็นตัวช่วยอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์

5.5 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากทั้งสามตัวอย่างมาเปรียบเทียบกัน ด้วยโปรมแกรม BLAST 2 SEQUENCES (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI), USA หรือโปรแกรม clustalW จาก European Bioinformatic Institute (EMBL-EBI) (http://www.ebi.ac. uk/clustalw/)

จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำ sequence alignment เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI ด้วยโปรมแกรม BLAST เข้าไปในส่วนของ Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn) หรือใช้โปรแกรม ClustalW

นอกจากนี้นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปทำการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม ORF Finder (Open Reading Frame Finder) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf /gorf.html) และนำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนที่ทำการแปลรหัสได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลของลำดับกรดอะมิโนที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI ด้วยโปรมแกรม BLAST หรือโปรแกรม ClustalW

สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

6.1 ห้องปฏิบัติการวิจัยและเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

6.2 ห้องปฏิบัติการกลาง โครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ระยะเวลาทำการวิจัย

เดือนพฤษภาคม 2546 – กรกฎาคม 2548

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved