บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

1. สำรวจ และเก็บรวบรวมตัวอย่างพืชที่ถูกเชื้อราแป้งใน genus *Oidium* subgenus *Pseudoidium* เข้าทำลาย ที่พบในจังหวัดเชียงใหม่ ระหว่างปี พ.ศ. 2546-2547

ออกสำรวจ และเก็บตัวอย่างพืชอาศัยที่ถูกเชื้อราแป้งเข้าทำลาย โดยพืชที่ถูกเชื้อราแป้งเข้าทำลายจะมีลักษณะเป็นผงสีขาวคล้ายแป้งปกคลุมอยู่บนส่วนต่าง ๆ ของใบพืช เนื่องจากราแป้ง subgenus *Pseudoidium* นี้มีเส้นใยเจริญอยู่ภายนอกเซลล์พืช จากนั้นนำตัวอย่างใบพืชใส่ถุงพลาสติกปิดปากถุงให้แน่น และนำมาตรวจดูลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราแป้งทันที หากไม่สามารถตรวจดูภายในวันเดียวได้ ให้แบ่งทำตัวอย่างแห้ง (herbarium) ไว้ส่วนหนึ่ง และอีกส่วนหนึ่งนำใส่ถุงพลาสติกและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการตรวจสอบในวันต่อไป

2. ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราแป้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ทำความสะอาดเครื่องมือและอุปกรณ์ทุกอย่างด้วย 70% alcohol จากนั้นเลือกตัวอย่างพืชที่มีโคโลนีของเชื้อราแป้งที่ไม่มีเชื้ออื่นปนเปื้อน โดยสังเกตได้จากโคโลนีใหม่ๆ ที่มีสีขาวสะอาด นำเทปใสกดลงบนโคโลนีของเชื้อราแป้งที่เลือกไว้ วางบนสไลด์ที่มีน้ำกลั่นหยดอยู่ 1 หยด ไล่ฟองอากาศออก จากนั้นนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 200 และ 400 เท่า ตามลำดับ หากไม่สามารถมองเห็นโครงสร้างต่าง ๆ ของเชื้อราแป้งได้อย่างชัดเจนเนื่องจากมีเส้นใยและสปอร์หนาแน่นเกินไป ควรแก้ไขโดยนำเทปใสแผ่นใหม่กดลงบนโคโลนีของเชื้อราแป้งตรงตำแหน่งเดิมอีกครั้ง นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่าง ๆ เช่น conidia, conidiophore, mycelium, appressorium และ germination type จากนั้นทำการวัดขนาดความกว้าง และความยาวของ conidia, conidiophore, foot cell, mother cell และ mycelium cell จำนวน 30 เซลล์ต่อหนึ่งตัวอย่าง และบันทึกผลการทดลอง

3. การตรวจสอบรูปแบบการงอกของ conidia (germination type)

การตรวจสอบรูปแบบการงอกของ conidia ใช้วิธีการตรวจสอบตามวิธีของ Hirata (1942) ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1. นำหอมหัวใหญ่มาผ่าแบ่งออกเป็น 4 ส่วน ลอกเอากลีบหัวหอมออกเป็นชิ้นๆ แล้วใช้มีดกรีดตรงผิวด้านในให้เป็นตารางสี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาดประมาณ 1x1 เซนติเมตร
2. ใช้ปากคีบลอกเซลล์ผิว (epidermal cell) ออกเป็นแผ่นบางๆ นำมาแช่ใน 80% alcohol ในขวดที่ปิดฝาสนิท ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาไม่น้อยกว่า 2 สัปดาห์
3. นำแผ่นเซลล์เยื่อหอมมาล้างโดยปล่อยให้น้ำไหลผ่าน (ใช้บีกเกอร์ปิดฝาด้วยผ้าขาวบาง) เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวางบนสไลด์ ซับน้ำส่วนที่เหลือด้วยกระดาษกรอง
4. ทำการปลูกเชื้อด้วย conidia ของเชื้อราแป้ง โดยย้ายเซลล์เยื่อหอมมาวางบนกระจกสไลด์ จากนั้นนำกระจกสไลด์ที่มีแผ่นเยื่อหอมอยู่มากดทับลงบนโคโลนีของเชื้อราแป้ง (conidia จะติดบนแผ่นเยื่อหอมนั้น) จากนั้นจึงใช้ปากคีบค่อยๆ เขี่ยเยื่อหอมดังกล่าวออกไปลอยบนผิวน้ำในจานเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง โดยไม่ปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ (หากปิดฝาจานจะทำให้มีความชื้นภายในจานสูงเกินไป ซึ่งไม่เหมาะต่อการเจริญของเชื้อราแป้ง)
5. นำมาตรวจผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า โดยย้ายเยื่อหอมมาวางบนกระจกสไลด์ ซับน้ำส่วนเกินออกด้วยกระดาษกรอง หยดน้ำกลั่นลงบนเยื่อหอม 1 หยด ปิดทับด้วย cover slip แล้วตรวจสอบและบันทึกผล

4. การเก็บตัวอย่างเชื้อราในรูปตัวอย่างแห้ง (herbarium)

นำตัวอย่างใบพืชที่เป็นโรคมาวางบนกระดาษหนังสือพิมพ์ (2 แผ่น) โดยนำตัวอย่างพืชแต่ละตัวอย่างเรียงซ้อนกันประมาณ 5-10 ตัวอย่าง นำใส่ถุงพลาสติกขนาดใหญ่ ใส่ silica gel เพื่อดูดความชื้นออกจากตัวอย่างเก็บที่อุณหภูมิห้องหรือที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หมั่นตรวจดูหาก silica gel เปลี่ยนสีจากน้ำเงินเป็นชมพู ให้ทำการเปลี่ยน silica gel ใหม่ สังเกตจากสีของ silica gel ที่ไม่เปลี่ยนแปลง (สีน้ำเงิน) แสดงว่าตัวอย่างใบพืชนั้นๆ แห้งสนิท นำตัวอย่างถ่ายใส่ซองกระดาษบันทึกรายละเอียดของตัวอย่าง เช่น ชื่อพืช (ชื่อสามัญ และชื่อวิทยาศาสตร์), ชื่อผู้เก็บ, สถานที่เก็บ และวัน เดือน ปีที่เก็บ นำเก็บในกล่องพลาสติกปิดฝาภายในบรรจุ naphthalene เพื่อป้องกันไม่ให้แมลงเข้าทำลายตัวอย่างได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

5. การสกัดดีเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณ rDNA ด้วยเทคนิค PCR

5.1 การสกัดดีเอ็นเอ

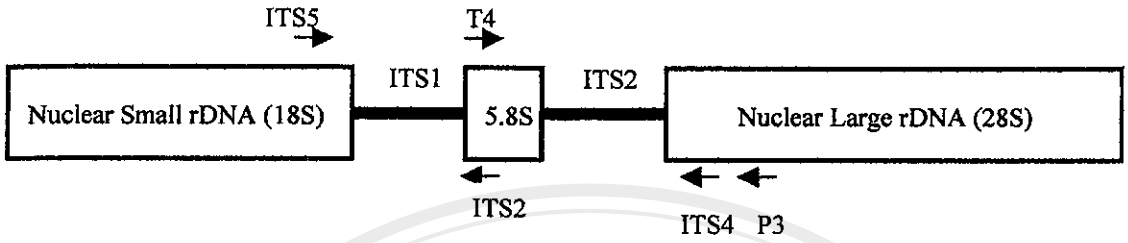
1. คัดเลือก conidia ของเชื้อราแป้งที่ต้องการสกัดดีเอ็นเอมาประมาณ 10-15 conidia โดยเตรียม water agar (WA) ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นตัดชิ้นวุ้นให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาดประมาณ 2x2 เซนติเมตร แล้วนำชิ้นวุ้นที่ตัดแล้วไปวางบนสไลด์ นำตัวอย่างพืชที่มี conidia ของเชื้อราแป้งมากดทับลงบนชิ้นวุ้น และนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ใช้เข็มเขี่ยที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ด้วยการจุ่ม alcohol และลนไฟ เขี่ย conidia ให้ได้ conidia เดี่ยว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ใส่ลงในหลอด eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ภายในบรรจุ extract buffer จำนวน 50 ไมโครลิตร (Chelex® 100, 5% ในน้ำกลั่น)
2. นำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที โดยเมื่อต้มครั้งแรกแล้วให้นำมาเข้าเครื่องเขย่า (Vortex) จากนั้นนำไปปั่นเพื่อดึงของเหลวลงสู่ก้นหลอด แล้วจึงนำไปต้มอีกครั้ง นำเข้าเครื่องเขย่าและเครื่องปั่นตามลำดับ
3. นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มปริมาณตรงตำแหน่ง rDNA หรืออาจเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

5.2 การเพิ่มปริมาณของ rDNA โดยวิธีการ PCR

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ในข้อ 5.1 มาทำการเพิ่มปริมาณตรงตำแหน่ง rDNA ซึ่งประกอบด้วยส่วนของ ITS1, 5.8S และ ITS2 สองครั้งโดยใช้ nested primer คือ ครั้งที่หนึ่งใช้ primer ITS5 (5′-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3′) และ P3 (5′-GCCCTTCACTCGCC-GTTAC-3′) และครั้งที่สองใช้ primer ITS5 (5′-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3′) และ ITS4 (5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′) ดังแสดงในภาพที่ 2

สำหรับลำดับเบสของ primer ชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลองนี้ (รวมถึง primer ที่ใช้ในการหาลำดับเบส) แสดงในตารางที่ 5

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 2 แผนที่แสดงตำแหน่งของ ribosomal DNA ที่ประกอบด้วย ITS1 ITS2 และ 5.8S rDNA ซึ่งแสดงตำแหน่งของ primer ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR (Hirata and Takamatsu, 1996)

ตารางที่ 5 ลำดับเบสของ primer ชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ rDNA และการหาลำดับเบส

Primer	Nucleotide sequence
ITS2	5′-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3′
ITS4	5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′
ITS5	5′-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3′
P3	5′-GCCGCTTCACTCGCCGTTAC-3′
T4	5′-TCAACAACGGATCTCTTGGC-3′

องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมีดังต่อไปนี้

	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว	37.8
10X PCR buffer	5
dNTP mix (2.5mM)	4
Primer ITS5 (20 pmol/μl)	1
Primer P3 (20 pmol/μl)	1
DNA template	1
Taq DNA polymerase	0.2
ปริมาตรรวม	**50**

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สำหรับขั้นตอนในการทำ PCR นั้นโดยเริ่มจากนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากขั้นตอนที่ 5.1 มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR (ใช้ primer ITS5 และ P3) ตามขั้นตอนต่อไปนี้

ขั้นตอนที่ 1 pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 1.30 นาที จำนวน 1 รอบ

ขั้นตอนที่ 2 template denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที

primer annealing ที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที

extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที

ในขั้นตอนนี้ทำซ้ำจำนวน 30 รอบ

ขั้นตอนที่ 3 primer ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 6.30 นาที จำนวน 1 รอบ

หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วควรนำผลผลิตของ PCR ที่ได้ไปหาลำดับเบสในทันที หรือนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปหาลำดับเบสในขั้นต่อไป (ไม่ควรเก็บไว้หลายวัน)

6. การตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณ ของผลผลิต PCR

6.1 การเตรียมแผ่น agarose gel

เตรียม agarose gel เข้มข้น 1.5% โดยชั่ง agarose 0.75 กรัม ผสมลงใน 1X TAE buffer 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปหลอมละลายใน microwave จนผง agarose ละลายจนหมด ปล่อยให้ agarose เย็นลง (อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส) แล้วจึงเติม ethidium bromide 50 ไมโครลิตร คนให้เข้ากันและนำไปเทลงถาดเจล จากนั้นจึงใส่หวีที่ปลายข้างหนึ่งของถาดเจลเพื่อให้เกิดช่องเล็ก (well) สำหรับใส่ตัวอย่าง เมื่อ agarose แข็งตัวแล้วจึงดึงหวีออกแล้วนำไปตรวจสอบคุณภาพและปริมาณโดยวิธี electrophoresis ต่อไป

6.2 การทำ electrophoresis

นำแผ่น agarose ที่เตรียมไว้วางลงในกล่อง electrophoresis โดยให้ด้านที่มีช่องสำหรับหยอดตัวอย่างอยู่ใกล้ขั้วลบ เติม 1X TAE buffer ลงในกล่องให้ท่วมแผ่น agarose (ให้ผิวของ agarose อยู่ใต้ 1X TAE buffer ประมาณ 1-3 มิลลิลิตร) ผสม loading buffer กับสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบให้เข้ากัน โดยใช้ loading buffer 1 ไมโครลิตร ผสมกับดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตรแล้วใช้ micropipet ดูดสารละลายค่อย ๆ ใส่ลงในช่องตัวอย่างของ agarose ที่เตรียมไว้ ปิดฝากล่องและเปิดสวิตซ์เครื่อง ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางที่เป็นเจลจากขั้วลบไปขั้วบวก โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที หรือเมื่อสังเกตสีของ loading buffer เคลื่อนไปอยู่ที่ปลายของแผ่น agarose จึงปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า นำแผ่น agarose gel ไปตรวจดูแถบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ดีเอ็นเอ โดยย้อมสี ethidium bromide แล้วส่องดูด้วย UV transilluminator แถบดีเอ็นเอจะเรืองแสงเป็นแถบสว่าง สำหรับการตรวจสอบปริมาณของผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้วิธีตรวจจากค่าการดูดซับแสงที่ช่วงคลื่น 270 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectophotometer

7. การแยกผลผลิต ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR

เมื่อนำผลิตผลจากการทำ PCR มาแยกโดยวิธี electrophoresis นำไปตรวจภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเล็ต จะปรากฏแถบของดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 600-700 คู่เบส จากนั้นจึงทำการตัดเจลในส่วนที่มีแถบดีเอ็นเอที่เป็นแถบเรืองแสง แล้วนำมาแยกสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ JETSORB kit (Genomed) โดยดำเนินการตามคู่มือที่แนบมากับ kit ดังต่อไปนี้

ขั้นตอนที่ 1 การสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล agarose

ชั่งน้ำหนักเจลที่มีแถบดีเอ็นเอที่เรืองแสง นำมาใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย A1 buffer (ภาคผนวก) อัตราส่วน 1:3 (น้ำหนักเจลต่อปริมาตรของสารละลาย A1) จากนั้นเติม JETSORB ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ในขั้นตอนนี้เจลจะละลายและปลดปล่อยดีเอ็นเอออกมาเกาะติดกับอนุภาคของ JETSORB จากนั้นจึงนำเข้าเครื่องปั่นเพื่อแยกให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายส่วนบนทิ้งไป ทำการล้างตะกอนด้วยการเติมสารละลาย A1 buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ลงไปผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง

ขั้นตอนที่ 2 ล้างตะกอนด้วย low salt buffer

เติมสารละลาย A2 buffer (ภาคผนวก) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นแยกให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง นำเข้าเครื่อง vacuum เพื่อให้ตะกอนแห้ง เป็นเวลา 15-20 นาที

ขั้นตอนที่ 3 การสกัดแยกดีเอ็นเอออกจาก JETSORB

เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมลงในตะกอนดีเอ็นเอที่แห้งแล้วให้เข้ากัน จากนั้นนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ในขั้นตอนนี้ดีเอ็นเอที่ถูกดูดซับโดย JETSORB จะละลายออกมา จากนั้นจึงแยก JETSORB

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โดยนำไปปั่นให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที แยกสารละลายส่วนบน (ดีเอ็นเอ) เก็บไว้

ขั้นตอนที่ 4 การปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการหาลำดับเบส

หลังจากแยกดีเอ็นเอออกจาก JETSORB แล้วจะทำการเพิ่มความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอโดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

- เติม 3M sodium acetate (pH 5.2) ในอัตราส่วน 1/10 vol. (ปริมาตร 5 ไมโครลิตร)
- เติม glycogen (20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
- เติม 100% ethanol ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปต
- เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
- นำเข้าเครื่องปั่นด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทของเหลวทิ้ง และนำเข้าเครื่อง vacuum เป็นเวลา 5 นาที
- เติม 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และนำไปปั่นด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทของเหลวทิ้ง นำเข้าเครื่อง vacuum เป็นเวลา 5 นาที
- เติมน้ำกลั่นเพื่อละลายตะกอน ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ

สำหรับขั้นตอนนี้ การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอทำเหมือนกับการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอในข้อ 6 แต่เปลี่ยนความเข้มข้นของ agarose gel เป็น 1% เตรียมโดยชั่ง agarose 0.50 กรัมผสมลงใน 1X TAE buffer 50 มิลลิลิตร นำไปหลอมละลาย และตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส แล้วนำไปเทในถาดเจลต่อไป (ไม่เติม ethidium bromide)

8. การหาลำดับเบสบน rDNA (rDNA sequencing)

นำผลผลิต PCR ที่ได้จากข้อ 7 มาหาลำดับการเรียงตัวของเบสตรงตำแหน่ง ITS1-5.8S-ITS2 โดยใช้ PRISM Dye Terminator cycle sequencing kit ที่ผลิตโดยบริษัท Applied Biosystems Inc., Japan โดยทำการหาลำดับเบสตัวอย่างละ 4 ซ้ำโดยใช้ primer 4 ชนิดคือ ITS5 (5′-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3′), ITS4 (5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′),

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ITS2 (5′-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3′) และ T4 (5′-TCAACAACGGATCTCTTGGC-3′) ซึ่ง primer ทั้ง 4 จะใช้หาลำดับการเรียงตัวของเบสตามตำแหน่งต่าง ๆ ดังแสดงในภาพที่ 2

8.1 การหาลำดับเบสจากปฏิกิริยา PCR

เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา (reaction mix) ในหลอด eppendorf ขนาด 0.5 มิลลิลิตรตามลำดับต่อไปนี้

	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
Premix	3
Primer (4 pmol/μl)	1
DNA template	3
น้ำกลั่น	7
ปริมาตรรวม	**14**

นำสารละลายที่ได้ไป incubate เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับทำปฏิกิริยา โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาแต่ละขั้นตอนดังนี้

1. predenaturation ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที
2. template denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที
   primer annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที
   extension ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที
   ในขั้นตอนนี้ทำซ้ำจำนวน 30 รอบ

หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วเตรียมสารละลายเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร (ประกอบด้วย 3M sodium acetate ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, 100 mM EDTA ปริมาตร 2 ไมโครลิตรและ 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของ glycogen ปริมาตร 1 ไมโครลิตร) ใน eppendorf tube หลอดใหม่ที่มีขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายเพื่อหยุดปฏิกิริยา ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

- ดูดสารละลายที่ได้จากปฏิกิริยา PCR (ปริมาตร 14 ไมโครลิตร) ลงใน appendorf tube หลอดใหม่ซึ่งมีสารละลายเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ (ปริมาตร 5 ไมโครลิตร) อยู่
- เติม 100% ethanol ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- นำไปปั่นด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทของเหลวทิ้ง
- เติม 70% ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร
- นำไปปั่นด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทของเหลวทิ้ง
- นำเข้าเครื่อง vacuum เพื่อให้ตะกอนแห้ง เป็นเวลา 5 นาที
- เติมสารละลาย Sodium Lauryl Sulfate (SLS) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เขย่าหลอดเพื่อให้ตะกอนละลาย
- นำไปปั่นด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- นำสารละลายที่ได้ไปตรวจหาลำดับเบสต่อไป หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียสภายใต้สภาพไม่มีแสง ซึ่งสามารถเก็บได้นานประมาณหนึ่งเดือน

8.2 การหาลำดับเบสด้วยเครื่อง CEQ 2000 (BECKMAN COULTER)

นำผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ในข้อ 8.2 มาหาลำดับเบสด้วยเครื่อง CEQ 2000 ที่ผลิตโดยบริษัท BECMAN COULTER โดยการตั้งค่าต่าง ๆ ให้ปฏิบัติตามคู่มือการใช้ที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำไว้ในหนังสือคู่มือสำหรับการหาลำดับเบสนี้เป็นแบบอัตโนมัติ และบันทึกผลโดยเครื่องคอมพิวเตอร์ที่ต่อกับเครื่องหาลำดับเบส ซึ่งเมื่อเสร็จสิ้นการทำงานของเครื่องแล้ว สามารถนำข้อมูลออกจากเครื่องคอมพิวเตอร์ได้โดยถ่ายข้อมูลดังกล่าวลงสู่แผ่นดิสเก็ต แล้วนำมาวิเคราะห์ผลต่อไปในห้องปฏิบัติการ

9. การวิเคราะห์ลำดับเบสเพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

นำลำดับเบสที่ได้มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยใช้คอมพิวเตอร์โปรแกรม GENETYX-MAC (Software Development) และเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับข้อมูลจาก the DNA Databank of Japan (DDBJ) ด้วยโปรแกรม Clustal V (Higgins *et al.*, 1992) จากนั้นทำการสร้าง phylogenetic tree โดยอาศัยโปรแกรม PAUP version 4.0 ซึ่งการวิเคราะห์หา tree จะใช้หลักการของ Distance method และ Maximum parsimony หาค่าความเชื่อมั่นโดยคำนวณค่า bootstrap จากการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง เพื่อหาความสัมพันธ์ภายในตัวอย่างเชื้อราแป้งในgenus *Oidium* subgenus *Pseudoidium* ที่พบบนพืชอาศัยชนิดต่าง ๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved