บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 การศึกษาฤดูกาลแพร่กระจายของประชากรเพลี้ยไก่แจ้ส้มในจังหวัดเชียงใหม่

แปลงปลูกส้ม : สวนส้มที่เลือกเป็นพื้นที่ทดลองตั้งอยู่ที่มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ มีพื้นที่ปลูก 10 ไร่ ส้มที่ปลูกเป็นส้มโชกุนอายุประมาณ 5-6 ปี จำนวน 500 ต้น ทำการสำรวจประชากรเพลี้ยไก่แจ้ส้ม ในรอบ 1 ปี ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม 2546 ถึงมิถุนายน 2547 โดยสำรวจเดือนละ 1 ครั้ง แต่ละครั้งสุ่มต้นส้มจำนวน 10-20 ต้นต่อสวน ซึ่งแต่ละต้นทำการสุ่มนับประชากรเพลี้ยไก่แจ้ส้มทั้ง 4 ทิศ (ทิศเหนือ ทิศตะวันออก ทิศใต้ และทิศตะวันตก) ทิศละ 1 ยอด นับจำนวนแมลงจากปลายยอดลงมายาว 5 เซนติเมตร ซึ่งตัวเต็มวัยเพลี้ยไก่แจ้ส้มทำการนับด้วยตาเปล่าบนต้น ส่วนไข่และตัวอ่อนของเพลี้ยไก่แจ้ส้ม ทำการตัดยอดส้มแต่ละยอดใส่กล่องที่ใช้สำหรับบรรจุฟิล์มถ่ายรูป โดยใช้เข็มเจาะฝาเป็นรูขนาดเล็ก 10-20 รู สำหรับระบายอากาศ จากนั้นนำตัวอย่างทั้งหมดใส่ในกล่องแช่เย็น (ice box) เพื่อนำแมลงมาตรวจนับภายใต้กล้องสเตอริโอไมโครสโคปภายในห้องปฏิบัติการ นำข้อมูลที่ได้มาหาจำนวนประชากรเพลี้ยไก่แจ้ส้มเฉลี่ยต่อต้นในแต่ละเดือน และเปรียบเทียบความแตกต่างของประชากรในแต่ละทิศด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD) (Gomez and Gomez, 1984)

การสำรวจปริมาณเพลี้ยไก่แจ้ส้มระยะตัวเต็มวัยอีกวิธีหนึ่ง คือ การใช้กับดักกาวเหนียวสีเหลือง โดยในแต่ละเดือนได้ทำการแขวนกับดักกาวเหนียวสีเหลืองรูปทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 นิ้ว สูง 12 นิ้ว (ภาพ 6) แขวนบนกิ่งส้มสูงจากพื้นดินประมาณ 1.5-2 เมตร แถวละ 3 กับดัก ระยะห่างระหว่างกับดักประมาณ 7 เมตร ทำการแขวนบนต้นส้มจำนวน 10 แถว รวมทั้งหมดเป็น 30 กับดัก และเปลี่ยนกับดักกาวเหนียวทุกเดือน

ทำการบันทึกการแตกยอดอ่อนของส้มด้วยการใช้กรอบสี่เหลี่ยมซึ่งมีพื้นที่ 2500 ตารางเซนติเมตร (50x50 เซนติเมตร) วางเทียบกับต้นส้มแต่ละต้นแล้วทำการนับช่อที่แตกยอดในจำนวนช่อทั้งหมดแล้วนำมาหาค่าเปอร์เซ็นต์การแตกยอดเฉลี่ยในแต่ละเดือน และทำการบันทึกอุณหภูมิ ความชื้น และปริมาณน้ำฝน เพื่อนำมาหาค่าสหสัมพันธ์ (correlation) กับจำนวนประชากรเพลี้ยไก่แจ้ส้ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 6 กับดักกาวเหนียวสีเหลืองรูปทรงกระบอก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 นิ้ว สูง 12 นิ้ว แขวนไว้บนทรงพุ่มเหนือพื้นดิน 1.5 – 2 เมตร เพื่อการสำรวจปริมาณเพลี้ยไก่แจ้ส้มระยะตัวเต็มวัยในสภาพสวน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

โรงเรือนเพาะชำ : อยู่ที่ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ส้มที่ปลูกเป็นส้มโชกุนอายุประมาณ 2-3 ปี จำนวน 100 ต้น ปลูกในกระถางดินเผาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 นิ้ว สูง14 นิ้ว ทำการสำรวจประชากรเดือนละ 2 ครั้ง แต่ละครั้งสุ่มนับจำนวนแมลงบนต้นส้ม 10 ซึ่งแต่ละต้นทำการสุ่มนับประชากรเพลี้ยไก่แจ้ส้ม จำนวน 3 ยอด มีความยาวยอดละ 5 เซนติเมตร นำข้อมูลที่ได้มาหาจำนวนประชากรเพลี้ยไก่แจ้ส้มเฉลี่ยต่อต้นในแต่ละเดือน พร้อมทั้งบันทึกการแตกยอดอ่อน และทำการบันทึกอุณหภูมิ ความชื้น และปริมาณน้ำฝน เพื่อนำมาหาค่าสหสัมพันธ์ (correlation) กับจำนวนประชากรเพลี้ยไก่แจ้ส้ม

ลานปลูกต้นแก้ว : อยู่ที่บริเวณทิศเหนือของคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งปลูกเป็นไม้ประดับ เลือกสุ่มจำนวน 5 ต้น สำรวจเดือนละ 2 ครั้ง ซึ่งแต่ละต้นทำการสุ่มนับประชากรเพลี้ยไก่แจ้ส้มทั้ง 4 ทิศ (ทิศเหนือ ทิศตะวันออก ทิศใต้ และทิศตะวันตก) ทิศละ 5 ยอด มีความยาวยอดละ 5 เซนติเมตร นำข้อมูลที่ได้มาหาจำนวนประชากรเพลี้ยไก่แจ้ส้มเฉลี่ยต่อต้นในแต่ละเดือน และเปรียบเทียบความแตกต่างของประชากรแต่ละทิศด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD) พร้อมทั้งบันทึกการแตกยอดอ่อนด้วยการทำกรอบสี่เหลี่ยมซึ่งมีพื้นที่ 2500 ตารางเซนติเมตร วางเทียบกับต้นแก้วแต่ละต้น และทำการบันทึกอุณหภูมิ ความชื้น และปริมาณน้ำฝน เพื่อนำมาหาค่าสหสัมพันธ์ (correlation) กับจำนวนประชากรเพลี้ยไก่แจ้ส้ม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 การศึกษาประสิทธิภาพของสารเคมีที่ใช้ในการควบคุมเพลี้ยไก่แจ้ส้ม (*Diaphorina citri* Kuwayama) ในสภาพห้องปฏิบัติการและในสภาพสวน

3.2.1 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีที่ใช้ในการควบคุมเพลี้ยไก่แจ้ส้มในระยะตัวอ่อนในห้องปฏิบัติการ

ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการกีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยทำการสุ่มตัดยอดของต้นแก้วที่มีตัวอ่อนของเพลี้ยไก่แจ้ส้มวัย 3-5 ลงทำลายในปริมาณใกล้เคียงกัน ยอดต้นแก้วที่เก็บมาได้นำมาปักบนวัสดุที่ใช้ปักดอกไม้เพื่อให้ความชื้น (Fora cell หรือ oasis) ขนาด 2 ลูกบาศก์เซนติเมตร จากนั้นนำไปใส่ไว้ในกล่องพลาสติกทรงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร สูง 4.5 เซนติเมตร บันทึกจำนวนตัวอ่อนเพลี้ยไก่แจ้ส้มแต่ละยอดก่อนพ่นสารเคมีทดลองด้วยเครื่องมือพ่นฝอยละเอียด (air brush) วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) มีจำนวน 7 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีทำ 4 ซ้ำ สารเคมีในแต่ละกรรมวิธีที่ทำการทดลองซึ่งใช้ตามอัตราที่แนะนำมีดังต่อไปนี้

กรรมวิธีที่ 1	ไซเพอร์เมทริน (cypermethrin) 25%EC	อัตรา 4 มิลลิลิตร	ต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 2	อิมิดาโคลพริด (imidacloprid) 10%SL	อัตรา 8 มิลลิลิตร	ต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 3	อิมิดาโคลพริด (imidacloprid) 5%EC	อัตรา 15 มิลลิลิตร	ต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 4	น้ำมันปิโตรเลียม (petrolium oil) 83.9%EC	อัตรา 70 มิลลิลิตร	ต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 5	โพรฟีโนฟอส (profenofos) 50%EC	อัตรา 80 มิลลิลิตร	ต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 6	ไดโนทีฟูเรน (dinotefuran) 10%WP	อัตรา 13 กรัม	ต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 7	น้ำเปล่า (untreated check)		

ทำการบันทึกจำนวนตัวอ่อนเพลี้ยไก่แจ้ส้มที่ตายภายหลังจากพ่นสาร 24 ชั่วโมง แล้วนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การตายของตัวอ่อน นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม SX 4.0 (Statistix Version 4) เมื่อหาค่าเปอร์เซ็นต์การตายในสารเคมีแต่ละกรรมวิธีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Least Significant Difference

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีที่ใช้ในการควบคุมเพลี้ยไก่แจ้ส้มในระยะตัวเต็มวัยในห้องปฏิบัติการ

ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการกีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยทำการสุ่มตัดยอดของต้นแก้วที่มีตัวเต็มวัยของเพลี้ยไก่แจ้ส้มจำนวน 10-20 ตัวต่อยอด ยอดต้นแก้วที่เก็บมาได้นำมาปักบน Fora cell (oasis) ขนาด 2 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำไปใส่ไว้ในกล่องพลาสติกทรงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร สูง 4.5 เซนติเมตร บันทึกจำนวนตัวเต็มวัยเพลี้ยไก่แจ้ส้มแต่ละยอดก่อนพ่นสารเคมีทดลองด้วยเครื่องมือพ่นฝอยละเอียด (air brush) วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) มีจำนวน 7 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีทำ 4 ซ้ำ สารเคมีในแต่ละกรรมวิธีที่ทำการทดลองซึ่งใช้ตามอัตราที่แนะนำมีดังต่อไปนี้

กรรมวิธีที่ 1	ไซเพอร์เมทริน (cypermethrin) 25%EC	อัตรา 4	มิลลิลิตร	ต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 2	อิมิดาโคลพริด (imidacloprid) 10%SL	อัตรา 8	มิลลิลิตร	ต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 3	อิมิดาโคลพริด (imidacloprid) 5%EC	อัตรา 15	มิลลิลิตร	ต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 4	น้ำมันปิโตรเลียม (petrolium oil) 83.9%EC	อัตรา 70	มิลลิลิตร	ต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 5	โพรฟีโนฟอส (profenofos) 50%EC	อัตรา 80	มิลลิลิตร	ต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 6	ไดโนทีฟูเรน (dinotefuran) 10%WP	อัตรา 13	กรัม	ต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 7	น้ำเปล่า (untreated check)			

ทำการบันทึกจำนวนตัวอ่อนเพลี้ยไก่แจ้ส้มที่ตายภายหลังจากพ่นสาร 24 ชั่วโมง แล้วนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การตายของตัวอ่อน นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม SX 4.0 เมื่อหาค่าเปอร์เซ็นต์การตายในสารเคมีแต่ละกรรมวิธีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Least Significant Difference

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีที่ใช้ในการควบคุมตัวอ่อนเพลี้ยไก่แจ้ส้ม ในสภาพสวน

ทำการทดลองที่สวนส้มมหาวิทยาลัยแม่โจ้ ตำบลหนองหาร อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่ โดยทำการคัดเลือกต้นส้มโชกุนที่มีตัวอ่อนของเพลี้ยไก่แจ้ส้มวัยที่ 3-5 ลงทำลาย จำนวน 6 ต้น แล้วในแต่ละต้นคัดเลือกยอดอ่อนที่มีตัวอ่อนเพลี้ยไก่แจ้ส้ม จำนวน 4 ยอด บันทึกผลก่อนการทดลองโดยตรวจนับจำนวนตัวอ่อนในแต่ละยอด จากนั้นทำการเตรียมสารเคมีในแต่ละกรรมวิธีที่กำหนดไว้ ทำการพ่นสารเคมีทดลองด้วยเครื่องพ่นแบบสูบโยกสะพายหลัง พ่นให้ทั่วทั้งต้น วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) มีจำนวน 6 กรรมวิธี แต่ละกรรมวิธีทำ 4 ซ้ำ (1 ยอด = 1 ซ้ำ) สารเคมีในแต่ละกรรมวิธีที่ทำการทดลองซึ่งใช้ตามอัตราที่แนะนำมีดังต่อไปนี้

กรรมวิธีที่ 1	ไซเพอร์เมทริน (cypermethrin) 25%EC	อัตรา	4 มิลลิลิตร	ต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 2	อิมิดาโคลพริด (imidacloprid) 10%SL	อัตรา	8 มิลลิลิตร	ต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 3	อิมิดาโคลพริด (imidacloprid) 5%EC	อัตรา	15 มิลลิลิตร	ต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 4	น้ำมันปิโตรเลียม (petrolium oil) 83.9%EC	อัตรา	70 มิลลิลิตร	ต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 5	โพรฟีโนฟอส (profenofos) 50%EC	อัตรา	80 มิลลิลิตร	ต่อน้ำ 20 ลิตร
กรรมวิธีที่ 6	น้ำเปล่า (untreated check)			

ทำการบันทึกผลหลังจากพ่นสารเคมีทดลอง 24 และ 48 ชั่วโมง โดยนับจำนวนตัวอ่อนเพลี้ยไก่แจ้ส้มที่ยังมีชีวิตรอด จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาหาค่าเปอร์เซ็นต์การตายของตัวอ่อนเพลี้ยไก่แจ้ส้ม และนำค่าดังกล่าวมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ เมื่อค่าเปอร์เซ็นต์การตายในสารเคมีในแต่ละกรรมวิธีมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Least Significant Difference

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3 การตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคกรีนนิ่งในต้นส้มและต้นแก้วพร้อมทั้งเพลี้ยไก่แจ้ส้มด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction, PCR)

3.3.1 การเก็บตัวอย่างใบพืชที่แสดงอาการของโรคกรีนนิ่งและเพลี้ยไก่แจ้ส้ม

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างใบพืชและเพลี้ยไก่แจ้ส้ม ใน 2 พื้นที่ คือ สวนส้มโชกุนมหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ และลานปลูกต้นแก้ว คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งในแต่ละต้นทำการเก็บใบพืชที่เจริญเต็มที่ที่แสดงอาการของโรคกรีนนิ่ง พร้อมทั้งจับตัวเต็มวัยเพลี้ยไก่แจ้ส้มขณะดูดกินน้ำเลี้ยงบนต้นดังกล่าว รวมทั้งหมดมีจำนวน 12 ตัวอย่าง ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

ลำดับ	ตัวอย่าง	แหล่งที่มา
1	ใบของต้นแก้ว ต้นที่ 2 (จำนวน 40 ใบ)	คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2	เพลี้ยไก่แจ้ส้มบนต้นแก้ว ต้นที่ 2 (จำนวน 10 ตัว)	คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3	ใบของต้นแก้ว ต้นที่ 5 (จำนวน 40 ใบ)	คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
4	เพลี้ยไก่แจ้ส้มบนต้นแก้ว ต้นที่ 5 (จำนวน 10 ตัว)	คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
5	ใบของต้นแก้ว ต้นที่ 3 (จำนวน 40 ใบ)	คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
6	เพลี้ยไก่แจ้ส้มบนต้นแก้ว ต้นที่ 3	คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
7	เพลี้ยไก่แจ้ส้มบนต้นส้ม ต้นที่ 7 ในแถวที่ 5 (จำนวน 35 ตัว)	สวนส้มโชกุนมหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่
8	ใบของต้นส้ม ต้นที่ 7 ในแถวที่ 5 (จำนวน 20 ใบ)	สวนส้มโชกุนมหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่
9	ใบของต้นส้ม ต้นที่ 12 ในแถวที่ 8 (จำนวน 20 ใบ)	สวนส้มโชกุนมหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่
10	เพลี้ยไก่แจ้ส้มบนต้นส้มต้นที่ 12 ในแถวที่ 8 (จำนวน 27 ตัว)	สวนส้มโชกุนมหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

11	ใบของต้นส้ม ต้นที่ 9 ในแถวที่ 4 (จำนวน 20 ใบ)	สวนส้มโชกุนมหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่
12	เพลี้ยไก่แจ้ส้มบนต้นส้ม ต้นที่ 9 ในแถวที่ 4 (จำนวน 20 ตัว)	สวนส้มโชกุนมหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่

3.3.2 การสกัดดีเอ็นเอจากใบพืชและตัวอย่างเพลี้ยไก่แจ้ส้ม

การสกัดดีเอ็นเอจากใบพืชและตัวอย่างเพลี้ยไก่แจ้ส้ม (ดัดแปลงจาก Dellaporta, 1983) ใช้มีดผ่าตัดกรีดเอาเฉพาะเส้นกลางใบของพืช (midrib) ให้ได้ประมาณ 0.5 กรัม หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ใส่ในโกร่งที่แช่เย็น เติม grinding buffer ลงไป 5 มิลลิลิตร เก็บไว้ในตู้เย็นประมาณ 10 นาที จึงนำออกมาทำการบดให้ละเอียด เทของเหลวที่บดได้ใส่หลอด eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

สำหรับเพลี้ยไก่แจ้ส้มนำมาบดในหลอด eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ด้วย grinding buffer 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำตัวอย่างพืชและแมลงไปเข้าเครื่องเหวี่ยง (centifuge) ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ในขั้นตอนแรกของเหลวจะแยกเป็น 2 ชั้น ชั้นบนเป็นของเหลวใส ส่วนชั้นล่างเป็นตะกอนที่ไม่ต้องการใช้ปิเปตดูดของเหลวใสด้านบนเก็บไว้ในหลอด eppendorf อันใหม่ จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 25 นาที จึงเทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้งไปจะสังเกตเห็นตะกอนอยู่บริเวณก้นหลอด

ขั้นตอนต่อมาเติม CTAB buffer ลงไป 0.7 มิลลิลิตร เขย่าตะกอนด้วย vortex นำไปอุ่นใน heat block ที่ 60 องศาเซลเซียส 30 นาที เพื่อช่วยให้ตะกอนที่ได้ละลายได้ดีขึ้น ระหว่างนี้เขย่าหลอดทดลองทุก ๆ 5 นาที หลังจากตะกอนละลายแล้วจึงเติม chloform/isoamyl alcohol 0.7 มิลลิลิตร นำมาเข้าเครื่องเหวี่ยงด้วยความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที ของเหลวในหลอดทดลองจะแยกเป็น 2 ชั้น ชั้นล่างเป็น chloform/isoamyl alcohol ชั้นบนเป็นของเหลวที่ต้องดูดเก็บใส่หลอด eppendorf อันใหม่ (ต้องทราบปริมาตรที่ดูดออกมา เพื่อที่จะเติม isopropanol ลงไปเท่ากับปริมาตรที่ดูดได้) จากนั้นนำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 15 นาที ค่อย ๆ เทของเหลวส่วนบนทิ้งไปจะได้ตะกอนดีเอ็นเอที่ติดอยู่ก้นหลอด ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 70% เอธานอล 50 ไมโครลิตร นำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ประมาณ 5 นาที เทเอธานอลทิ้งไป แล้วทำตะกอนให้แห้งโดยนำหลอดทดลองไปไว้ใน vacuum ประมาณ 15-30 นาที เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 20 ไมโครลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เพื่อเก็บตะกอนดีเอ็นเอ หลังจากนี้จะนำเอาตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจคุณภาพและปริมาณด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

3.3.3 Gel electrophoresis เพื่อการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ

3.3.3.1 การเตรียม agarose gel

ใส่ agarose gel 0.3 กรัม และ0.5xTBE buffer 30 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ นำไปหลอมให้เจลละลายโดยใช้ไมโครเวฟจนกระทั่งได้สารละลายใส รอจนอุณหภูมิขวดเจลลดลงจึงเทเจลที่ได้บน gel tray จากนั้นเสียบ comb ขนาด 8-18 well ลงไป เมื่อเจลแข็งตัวดึง comb ออก ย้ายเจลที่ได้ไปใส่ใน electrophoresis gel tank เติม 0.5xTBE buffer ให้ท่วมเจลเล็กน้อย

3.3.3.2 Gel loading

ใช้ micropipette ดูดดีเอ็นเอที่สกัดได้ 8 ไมโครลิตร ผสมกับ loading buffer 2 ไมโครลิตร ดูดขึ้นลงให้สารผสมเข้ากัน เติม DNA marker ในช่องแรกของเจล ตามด้วยตัวอย่างของดีเอ็นเอ

3.3.3.3 Gel running

ปิดฝา gel tank ตั้งเครื่องที่ 50 โวลต์ เวลา 90 นาที

3.3.3.4 การปรากฏแถบดีเอ็นเอบนเจล

เมื่อเครื่องทำงานเสร็จ นำเจลไปแช่สารละลาย ethidium bromide (ethidium bromide ความเข้มข้น 1 mg/ml จำนวน 20 ไมโครลิตรต่อน้ำกลั่นบริสุทธิ์ (deionize water) 1 ลิตร) ประมาณ 5 นาที แล้วล้างเจลด้วยน้ำสะอาดก่อนที่จะนำเจลไปใส่ในเครื่อง gel document จะปรากฏรูปของเจล และแถบ DNA ที่เรืองแสงภายใต้ UV ผ่านจอคอมพิวเตอร์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.3.4 การเพิ่มปริมาณกรีนนิ่งดีเอ็นเอโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (PCR)

เมื่อนำดีเอ็นเอไปตรวจสอบคุณภาพและปริมาณแล้วพบการปรากฏแถบของดีเอ็นเอบน agarose gel ที่เรืองแสงภายใต้ยูวี ผ่านจอคอมพิวเตอร์ หลังจากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อกรีนนิ่ง (ดัดแปลงจาก Sdoodee, 1999) โดยขั้นแรกจะเตรียม PCR tube เติม mastermix หลอดละ 24 ไมโครลิตร นำดีเอ็นเอที่สกัดมาได้เติมลงไป 1 ไมโครลิตร ส่วนหลอดที่เหลือจะเติมดีเอ็นเอของเชื้อกรีนนิ่งและน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 1 ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็น positive check และ negative check ตามลำดับ นำหลอดทดลองที่เตรียมไว้ใส่ใน thermal cycler โดยโปรแกรมการทำงานแต่ละรอบของเครื่องในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อกรีนนิ่ง (ตาราง 1)

ตาราง 1 โปรแกรมการทำงานของเครื่องในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อกรีนนิ่ง

Cycle	Step	Time	Temp (°C)
1	Intial denaturation	3 min	94
2-35	Denaturation	1 min	94
	Annealing	30 sec	55
	Extention	1.5 min	72
36	Denaturation	1 min	94
	Annealing	30 sec	55
	Extention	10 min	72
	Incubate	Hold	4

หลังจากที่ได้ PCR product มา จะนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gel electrophoresis ซึ่งจะใช้กระแสไฟฟ้าทำการแยกขนาดของดีเอ็นเอบน agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำ agarose gel ไปย้อมด้วย ethidium bromide แล้วนำไปเข้าเครื่อง gel document เพื่อแสดงผลของแถบของดีเอ็นเอที่ต้องการและตรงตามตำแหน่ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved