บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

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

สำรวจ และเก็บตัวอย่างพืชที่เป็นโรคราแป้งในจังหวัดเชียงใหม่ โดยพืชที่ถูกเชื้อราแป้งเข้าทำลายจะพบโคโลนีสีขาวคล้ายผงแป้งบนส่วนต่างๆของพืช และบางครั้งอาจปกคลุมทั่วทั้งต้นพืช ในการเก็บตัวอย่าง เก็บส่วนที่เป็นโรคใส่ถุงพลาสติกพับปากถุงเท่านั้น จากนั้นนำมาตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราแป้ง หากตรวจสอบไม่เสร็จภายในวันเดียว ให้แบ่งตัวอย่างออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนหนึ่งเก็บเป็นตัวอย่างแห้ง (herbarium) ทันที และอีกส่วนเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถนำมาใช้ศึกษาต่อไปได้ประมาณ 1 สัปดาห์

2. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราแป้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ทำความสะอาดเครื่องมือ และอุปกรณ์ทุกอย่างด้วย alcohol 70% จากนั้นเลือกโคโลนีของเชื้อราแป้งที่ไม่มีเชื้ออื่นปนเปื้อน ซึ่งสังเกตได้จากลักษณะโคโลนีที่มีสีขาว หรือโคโลนีที่เกิดใหม่ นำเทปใสกดลงบนโคโลนี ทำให้ได้เส้นใย และ conidia ของเชื้อราแป้ง แต่มีปริมาณมากเกินไป ทำให้ไม่สามารถเห็นโครงสร้างต่างๆของเชื้อราแป้งได้อย่างชัดเจน จึงต้องกดลงบนโคโลนีนั้นอีกครั้งแต่บนเทปใสที่ตำแหน่งต่างกัน จะทำให้ได้เส้นใย และ conidia ของเชื้อราแป้งที่อยู่ห่างกัน จึงง่ายแก่การตรวจสอบ โดยตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่างๆ เช่น ลักษณะของ conidia, conidiophore, mycelium cell, appressorium และ foot cell เป็นต้น จากนั้นวัดขนาดของ conidia, conidiophore, mycelium cell, mother cell และ foot cell จำนวน 30 อันต่อ 1 ตัวอย่าง

3. การตรวจสอบรูปแบบการงอกของ conidia (germination type) โดยวิธีของ Hirata (1942)

1. นำหอมหัวใหญ่มาผ่าแบ่งออกเป็น 4 ส่วน ลอกเอากลีบหัวหอมออกเป็นชิ้นๆ แล้วใช้มีดกรีดตรงผิวด้านใน ให้เป็นตารางสี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาดประมาณ 1 x 1 cm.
2. ใช้ปากคีบลอก epidermal cell ออกเป็นแผ่นบางๆ นำมาแช่ใน alcohol 80% ในขวดที่ปิดฝาสนิท ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาไม่น้อยกว่า 2 สัปดาห์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. นำแผ่นเยื่อหอมมาล้างโดยปล่อยให้น้ำไหลผ่าน เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวางบนสไลด์ ซับน้ำส่วนที่เหลือด้วยกระดาษกรอง
4. ทำการปลูกเชื้อด้วย conidia ของเชื้อราแป้ง โดยย้ายแผ่นเยื่อหอมมาวางบนกระจกสไลด์ จากนั้นนำกระจกสไลด์ที่มีแผ่นเยื่อหอมอยู่มากดทับลงบนโคโลนีของเชื้อราแป้ง ซึ่ง conidia จะติดบนแผ่นเยื่อหอมนั้น จากนั้นจึงใช้ปากคีบค่อยๆ เขี่ยแผ่นเยื่อหอมดังกล่าวออกไปลอยบนผิวน้ำในจานเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง โดยไม่ปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ ซึ่งถ้าหากปิดฝาจะทำให้มีความชื้นภายในจานสูงเกินไป ไม่เหมาะต่อการเจริญของเชื้อราแป้ง
5. นำมาตรวจผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า โดยย้ายแผ่นเยื่อหอมมาวางบนกระจกสไลด์ ซับน้ำส่วนเกินออกด้วยกระดาษกรอง หยดน้ำกลั่นลงบนแผ่นเยื่อหอม 1 หยด ปิดทับด้วย cover slip แล้วตรวจสอบ และบันทึกผล

4. การเก็บตัวอย่างเชื้อราในรูปตัวอย่างแห้ง (herbarium)

นำตัวอย่างพืชที่เป็นโรค 1 ชนิด วางบนกระดาษหนังสือพิมพ์ 1 คู่ จากนั้นวางเรียงซ้อนกัน ประมาณ 5-10 ตัวอย่าง ใส่ในถุงพลาสติกขนาดใหญ่ ภายในมี silica gel เพื่อดูดความชื้นออกจากตัวอย่าง เก็บที่อุณหภูมิห้อง หรือที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส หาก silica gel เปลี่ยนสีจากน้ำเงินเป็นชมพู ให้เปลี่ยน silica gel ใหม่ และถ้าสีของ silica gel ไม่เปลี่ยน แสดงว่าตัวอย่างพืชแห้งสนิท จากนั้นนำตัวอย่างเปลี่ยนใส่ซองกระดาษ บันทึกรายละเอียดของตัวอย่าง เช่น ชื่อพืช (ชื่อสามัญและชื่อวิทยาศาสตร์), ชื่อผู้เก็บ, สถานที่เก็บ และวัน เดือน ปีที่เก็บ นำเก็บในกล่องพลาสติกปิดฝาภายในบรรจุ naphthalene (ลูกเหม็น) เพื่อป้องกันไม่ให้แมลงเข้าทำลายตัวอย่างได้

5. การสกัด DNA และการเพิ่มปริมาณ rDNA ด้วยเทคนิค PCR

5.1 การสกัด DNA

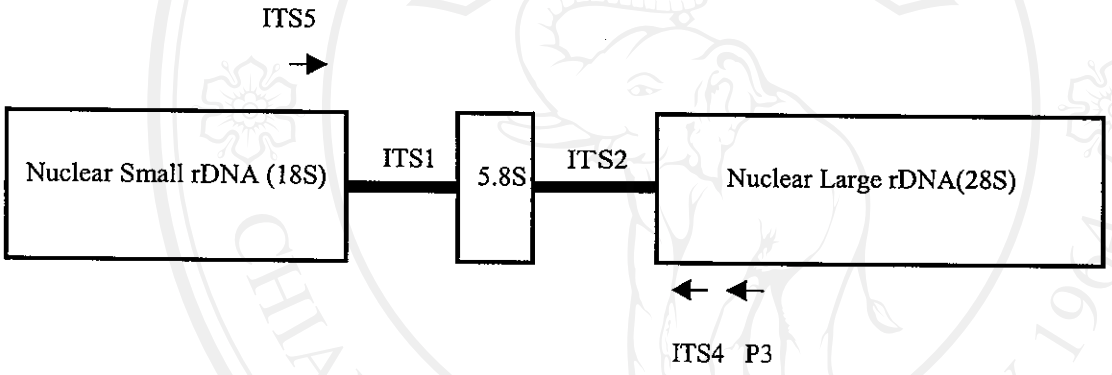
1. ใช้เข็มเขี่ยที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ด้วยการจุ่ม alcohol และลนไฟ เขี่ย conidia และเส้นใย ใส่ลงในหลอด Eppendorf tube ขนาด 1.50 ml. ภายในบรรจุ extract buffer จำนวน 50 µl. (Chelex® 100, 5% ในน้ำกลั่น)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2. นำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที โดยเมื่อต้มครั้งแรกแล้วให้นำมาเข้าเครื่องเขย่า (Vortex) จากนั้นนำไปปั่นเพื่อดึงของเหลวลงสู่ก้นหลอด แล้วจึงนำไปต้มอีกครั้ง นำเข้าเครื่องเขย่า และเครื่องปั่นตามลำดับ
3. นำสารละลาย DNA ที่ได้ไปเพิ่มปริมาณตรงตำแหน่ง rDNA หรืออาจเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

5.2 การเพิ่มปริมาณของ rDNA โดยวิธีการ PCR

นำ DNA ที่สกัดได้ในข้อ 5.1 มาทำการเพิ่มปริมาณตรงตำแหน่ง rDNA ซึ่งประกอบด้วยส่วนของ ITS1, 5.8S และ ITS2 2 ครั้งโดยใช้ nested primer คือ ครั้งที่ 1 ใช้ primer ITS5 และ P3และครั้งที่ 2 ใช้ primer ITS5 และ ITS4 ดังแสดงในภาพที่ 10



ภาพที่ 10 แผนที่แสดงตำแหน่งของ ribosomal DNA ที่ประกอบด้วย 18S, ITS1, 5.8S และ ITS2 rDNA ซึ่งแสดงตำแหน่งของ primer ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค PCR (Hirata and Takamatsu, 1996)

สำหรับขั้นตอนในการทำ PCR นั้นโดยเริ่มจากนำ DNA ที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณตรงตำแหน่ง rDNA ตามขั้นตอน ดังต่อไปนี้

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA ครั้งที่ 1 มีดังต่อไปนี้

	ปริมาตร (µl.)
น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว	28.8
10X PCR buffer	5
dNTP mix (2.5 mM)	4
Primer ITS5 (20 pmol/µl.)	1
Primer P3 (20 pmol/µl.)	1
DNA template	10
Taq DNA polymerase	0.2
ปริมาตรรวม	**50**

องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณ DNA ครั้งที่ 2 มีดังต่อไปนี้

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

หลังจากทำการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธี PCR จากนั้นตรวจสอบผลผลิต DNA ด้วยวิธี gel electrophoresis ซึ่งโดยปกติปริมาณ rDNA ที่ได้จะไม่เพียงพอต่อการนำไปหาลำดับเบส จึงต้องนำผลผลิต DNA ที่ได้ไปเพิ่มปริมาณ DNA อีกครั้งด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ nested primer ซึ่งขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR เหมือนกับการทำครั้งแรก เมื่อได้ผลผลิต DNA ที่มีปริมาณเพียงพอแล้ว ควรนำไปหาลำดับเบสในทันที หรือนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปหาลำดับเบสในขั้นต่อไป แต่ไม่ควรเก็บไว้หลายวัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

6. การตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณ ของผลผลิต PCR

6.1 การเตรียมแผ่น agarose gel

เตรียม agarose gel เข้มข้น 1.5% ใน 1 % TAE buffer โดยชั่ง agarose 1.5 g. ผสมลงใน 1X TAE buffer 100 ml. นำไปหลอมละลาย จนผง agarose ละลายหมด ปล่อยให้เย็นลง อุณหภูมิ ประมาณ 60 องศาเซลเซียส แล้วเติม 1X EtBr (Ethidium bromide) 50 µl. คนให้เข้ากัน และนำไปเทลงในถาด agarose gel ให้มีความหนา ประมาณ 0.4 cm. จากนั้นจึงใส่หวีที่ปลายข้างใดข้างหนึ่งของถาด agarose gel เพื่อให้เกิดช่องเล็กๆ (well) สำหรับใส่ตัวอย่าง เมื่อ agarose gel แข็งตัวแล้ว จึงดึงหวีออก

6.2 การทำ electrophoresis

นำแผ่น agarose gel ที่เตรียมไว้วางลงในกล่อง electrophoresis โดยให้ด้านที่มีช่องสำหรับหยอดตัวอย่างอยู่ใกล้ขั้วลบ เติม 1X TAE buffer ลงในกล่องให้ท่วมแผ่น agarose gel โดยให้ผิวของ agarose gel อยู่ใต้ 1X TAE buffer ประมาณ 1-3 ml. จากนั้นผสม loading buffer กับสารละลาย DNA ที่ต้องการตรวจสอบให้เข้ากัน โดยใช้ loading buffer 1 µl. ผสมกับ DNA 5 µl. แล้วใช้ micropipet ดูดสารละลายใส่ลงในช่องตัวอย่างของ agarose gel ที่เตรียมไว้ ปิดฝากล่อง และเปิดสวิตซ์เครื่อง DNA จะเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางที่เป็น gel จากขั้วลบไปขั้วบวก โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที หรือเมื่อสังเกตสีของ loading buffer เคลื่อนไปอยู่ที่ปลายของแผ่น agarose gel จึงปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า จากนั้นนำแผ่น agarose gel ไปตรวจดูแถบ DNA โดยย้อมสีด้วยการนำไปแช่ในสารละลาย ethidium bromide นาน 25-30 นาที แล้วส่องดูด้วย UV transilluminator แถบ DNA จะเรืองแสงเป็นแถบสว่าง

7. การแยกผลผลิต DNA จากปฏิกิริยา PCR

เมื่อนำผลิตผลจากการทำ PCR มาแยกโดยวิธี electrophoresis นำไปตรวจภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเล็ต จะปรากฏแถบของ DNA ที่มีขนาดประมาณ 450-500 คู่เบส จากนั้นทำการตัด agarose gel ในส่วนที่มีแถบ DNA ที่เป็นแถบเรืองแสง แล้วนำมาแยกสกัด DNA ออกจาก agarose gel โดยใช้ JETSORB kit (Genomed) โดยดำเนินการตามคู่มือที่แนบมากับ kit ดังต่อไปนี้

7.1 การสกัด DNA ออกจาก agarose gel

ชั่งน้ำหนัก agarose gel ที่มีแถบ DNA ที่เรืองแสง นำมาใส่หลอด Eppendorf tube ขนาด 1.5 ml. แล้วเติมสารละลาย A1 buffer (ภาคผนวก) อัตราส่วน 1:3 (น้ำหนัก agarose gel ต่อปริมาตรของสารละลาย A1) จากนั้นเติม JETSORB ปริมาตร 10 µl.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผสมให้เข้ากัน นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ในขั้นตอนนี้ agarose gel จะละลาย และปลดปล่อย DNA ออกมาเกาะติดกับอนุภาคของ JETSORB จากนั้นจึงนำเข้าเครื่องปั่นเพื่อแยกให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เทสารละลายส่วนบนทิ้งไป

7.2 ล้างตะกอนด้วย low salt buffer

เติมสารละลาย A2 buffer (ภาคผนวก) ปริมาตร 500 µl. ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นแยกให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง นำเข้าเครื่อง vacuum เพื่อทำให้ตะกอนแห้ง นาน 1 นาที ที่ระดับความดัน 70 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว

7.3 การสกัดแยก DNA ออกจาก JETSORB

เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 µl. ผสมลงในตะกอน DNA ที่แห้งให้เข้ากัน จากนั้นนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ในขั้นตอนนี้ DNA ที่ถูกดูดซับโดย JETSORB จะละลายออกมา จากนั้นจึงแยก JETSORB ออกโดยนำไปปั่นให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที แยกสารละลายส่วนบน (DNA) เก็บไว้

7.4 การปรับความเข้มข้นของ DNA เพื่อใช้ในการหาลำดับเบส

หลังจากแยก DNA ออกจาก JETSORB ต่อมาทำการเพิ่มความเข้มข้นของปริมาณ DNA โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

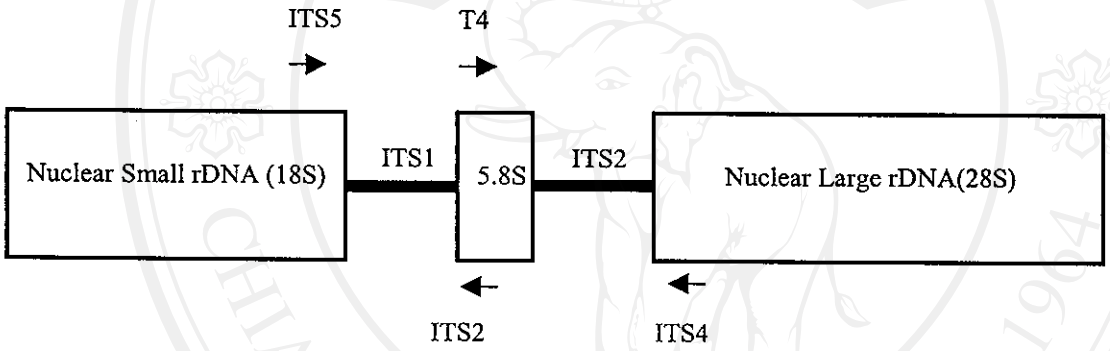
- เติม 3M sodium acetate (pH 5.2) ในอัตราส่วน 1/10 ของปริมาตร (ปริมาตร 5 µl.)
- เติม glycogen (20 mg./ml.) ปริมาตร 1 µl.
- เติม ethanol 100 % ปริมาตร 125 µl. ผสมให้เข้ากัน
- เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 20-30 นาที
- นำเข้าเครื่องปั่นด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทของเหลวทิ้ง
- เติม ethanol 70 % ปริมาตร 500 µl. และนำไปปั่นทันทีด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทของเหลวทิ้ง นำเข้าเครื่อง vacuum นาน 5 นาที ที่ระดับความดัน 50 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว
- เติมน้ำกลั่นเพื่อละลายตะกอน ปริมาตร 20 µl. จากนั้นนำไปตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณของ DNA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สำหรับขั้นตอนนี้ การตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณของ DNA ทำเหมือนกับการตรวจสอบคุณภาพของ DNA ในข้อ 6 แต่เปลี่ยนความเข้มข้นของ agarose gel เป็น 1.5 % เตรียมโดยชั่งผง agarose 1.8 g. ผสมลงใน 1X TAE buffer 120 ml. นำไปหลอมละลาย และตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายมีอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส แล้วนำไปเทในถาด agarose gel ต่อไป โดยไม่เติม ethidium bromide

8. การหาลำดับเบสบน rDNA (rDNA sequencing)

นำผลผลิต PCR ที่ได้จากข้อ 7 มาหาลำดับการเรียงตัวของเบสตรงตำแหน่ง ITS1, 5.8S และ ITS2 โดยใช้ PRISM Dye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems Inc., Japan) โดยทำการหาลำดับเบสตัวอย่างละ 4 ซ้ำโดยใช้ primer 4 ชนิดคือ ITS5, ITS4, ITS2 และ T4 ดังแสดงในภาพที่ 11



ภาพที่ 11 แผนที่แสดงตำแหน่งของ ribosomal DNA ที่ประกอบด้วย 18S, ITS1, 5.8S และ ITS2 rDNA ซึ่งแสดงตำแหน่งของ primer ที่ใช้ในการหาลำดับเบสบน rDNA

8.1 การหาลำดับเบสจากปฏิกิริยา PCR

เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา (reaction mix) ในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 ml. ตามลำดับต่อไปนี้

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

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำสารละลายที่ได้ไป incubate เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับทำปฏิกิริยา โดยกำหนดอุณหภูมิ และเวลาแต่ละขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที

ขั้นตอนที่ 2 template denaturation ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส นาน 20 วินาที
primer annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 20 วินาที
extension ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที
ในขั้นตอนนี้ทำซ้ำจำนวน 30 รอบ

หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วเตรียมสารละลาย เพื่อตกตะกอน DNA ปริมาตร 5 µl. ประกอบด้วย 3M sodium acetate ปริมาตร 2 µl. 100 mM EDTA ปริมาตร 2 µl. และ 20 mg./ml. ของ glycogen ปริมาตร 1 µl. ใน Eppendorf tube หลอดใหม่ที่มีขนาด 1.5 ml. จากนั้นเติมสารละลายเพื่อหยุดปฏิกิริยา ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

- นำสารละลายที่ได้จากปฏิกิริยา PCR (ปริมาตร 14 µl.) ถ่ายลงใน Eppendorf tube หลอดใหม่ซึ่งมีสารละลายเพื่อตกตะกอน DNA (ปริมาตร 5 µl.)
- เติม ethanol 100% ปริมาตร 50 µl. ผสมให้เข้ากัน
- นำไปปั่นด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทของเหลวทิ้ง
- เติม ethanol 70% ปริมาตร 200 µl.
- นำไปปั่นด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทของเหลวทิ้ง
- นำเข้าเครื่อง vacuum เพื่อให้ตะกอนแห้ง นาน 5 นาที ที่ระดับความดัน 50 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว
- เติมสารละลาย Sodium Lauryl Sulfate (SLS) ปริมาตร 30 µl. เขย่าหลอดเพื่อให้ตะกอนละลาย
- นำไปปั่นด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- นำสารละลายที่ได้ไปตรวจหาลำดับเบสต่อไป หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาพไม่มีแสงซึ่งสามารถเก็บได้นานประมาณ 1 เดือน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

8.2 การหาลำดับเบสด้วยเครื่อง CEQ 2000 (BECKMAN COULTER)

นำผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ในข้อ 8.2 มาหาลำดับเบสด้วยเครื่อง CEQ 2000 (Beckman coulter, U.S.A.) โดยการตั้งค่าต่างๆให้ปฏิบัติตามคู่มือการใช้ที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำไว้ในหนังสือคู่มือสำหรับการหาลำดับเบสนี้เป็นแบบอัตโนมัติ และบันทึกผลโดยเครื่องคอมพิวเตอร์ที่ต่อกับเครื่องหาลำดับเบส ซึ่งเมื่อเสร็จสิ้นการทำงานของเครื่องแล้วสามารถนำข้อมูลออกจากเครื่องคอมพิวเตอร์ได้โดยบันทึกข้อมูลลงสู่แผ่นดิสเก็ต แล้วนำมาวิเคราะห์ผลต่อไปในห้องปฏิบัติการ

9. การวิเคราะห์ลำดับเบสเพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

นำลำดับเบสที่ได้มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยใช้คอมพิวเตอร์โปรแกรม GENETYX-MAC 8.0 (Software Development) และเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับข้อมูลจาก the DNA Databank of Japan (DDBJ) ด้วยโปรแกรม clustal X จากนั้นสร้าง phylogenetic tree โดยอาศัยโปรแกรม PAUP version 4.0 ซึ่งการวิเคราะห์ tree ใช้หลักการของ Maximum parsimony และหาค่าความเชื่อมั่นโดยคำนวณค่า bootstrap จากการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง หลังจากนั้นทำการคำนวณค่า genetic distance โดยใช้โปรแกรม PAUP version 3.1 เพื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมภายในตัวอย่างเชื้อราแป้งใน genus *Oidium* subgenus *Fibroidium* ที่พบบนพืชอาศัยชนิดต่าง ๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved