บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สำรวจ และเก็บรวบรวมเชื้อราแป้งใน Tribe Phylactinieae ที่พบบนพืชอาศัยชนิดต่าง ๆ ในเขตภาคเหนือของประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2546-2548

ออกสำรวจ และเก็บตัวอย่างพืชอาศัยที่ถูกเชื้อราแป้งเข้าทำลายโดยมุ่งเน้นหาลักษณะอาการที่เชื้อราแป้งอยู่ด้านใต้ใบ หรืออยู่ทั้งสองด้าน เนื่องจากเชื้อราแป้งชนิดนี้ conidiophore จะเจริญออกมาทางปากใบจึงพบที่ใต้ใบเป็นส่วนมาก จากนั้นนำตัวอย่างใบพืชใส่ถุงพลาสติกปิดปากถุงให้แน่น และรีบนำมาตรวจดูลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราแป้งทันที หากไม่สามารถตรวจดูภายในวันเดียวได้ ให้แบ่งทำ herbarium ไว้ส่วนหนึ่ง และอีกส่วนหนึ่งนำใส่ถุงพลาสติก เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการตรวจสอบในวันต่อไป การทำงานควรทำให้เสร็จในวันรุ่งขึ้น เนื่องจากหากเก็บไว้นานจะทำให้ลักษณะของเชื้อราแป้งเปลี่ยนแปลงไป

2. ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อราแป้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2.1 ทำความสะอาดเครื่องมือและอุปกรณ์ทุกอย่างด้วย 70% ethanol จากนั้นเลือกตัวอย่างพืชที่มีโคโลนีของเชื้อราแป้งที่ไม่มีเชื้ออื่นปนเปื้อน โดยสังเกตโคโลนีใหม่ ๆ ที่มีสีขาวสะอาด นำเทปใสกดลงบนโคโลนีของเชื้อราแป้งที่เลือกไว้ ซึ่งจะได้เส้นใยและ conidia ของเชื้อราแป้งแต่จะมีปริมาณมากเกินไป ทำให้ไม่สามารถมองเห็นโครงสร้างต่าง ๆ ของเชื้อราแป้งได้อย่างชัดเจน จึงต้องกดลงบนโคโลนีเดิมอีกครั้งหนึ่งบนเทปใสที่ตำแหน่งต่างกันจะทำให้ได้เส้นใยและ conidia ของเชื้อราแป้งที่อยู่ห่างกัน จึงง่ายแก่การตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาต่าง ๆ จากนั้นวางบนหยดน้ำกลั่นบนสไลด์ ไล่ฟองอากาศออก นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100, 200 และ 400 เท่า ตามลำดับ สังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาต่าง ๆ ได้แก่ conidia, conidiophore, mycelium, appressorium และ germination type

2.2 วัดขนาดความกว้างและความยาวของ conidia, conidiophore, foot cell, mother cell, mycelium cell และส่วนที่แตกแขนงออกมาจากเส้นใยตรงตำแหน่งของ conidiophore จำนวน 30 เซลล์ต่อหนึ่งตัวอย่าง และทำการคำนวณหาค่าเฉลี่ย ตลอดจนนับจำนวนเซลล์ของ conidiophore จำนวน 30 ก้าน

3. การตรวจสอบรูปแบบการงอกของ conidia (germination type)

การตรวจสอบรูปแบบการงอกของ conidia ใช้วิธีการตรวจสอบตามวิธีของ Hirata (1942) มีวิธีการดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1. นำหัวหอมใหญ่มาผ่าแบ่งออกเป็น 4 ส่วน ลอกเอากลีบหัวหอมออกเป็นชิ้น ๆ แล้วใช้มีดกรีดตรงผิวด้านในให้เป็นตารางสี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาดประมาณ 1x1 เซนติเมตร
2. ใช้ปากคีบลอกเซลล์ผิว (epidermal cell) เป็นแผ่นบาง ๆ ออกมาแช่ใน 80% ethanol ในขวดที่ปิดฝาสนิท ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาไม่น้อยกว่า 2 สัปดาห์
3. นำแผ่นเซลล์เยื่อหอมมาล้างโดยปล่อยให้น้ำไหลผ่าน (ใช้บีกเกอร์ปิดฝาด้วยผ้าขาวบาง) เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 2 ชั่วโมง
4. นำเซลล์เยื่อหอมมาวางบนสไลด์ ซับน้ำส่วนที่เหลือด้วยกระดาษกรอง
5. ทำการปลูกเชื้อด้วย conidia ของเชื้อราแป้ง โดยการนำเยื่อหอมมาวางบนกระจกสไลด์ จากนั้นนำกระจกสไลด์ที่มีเยื่อหอมอยู่มากดทับลงบนโคโลนีของเชื้อราแป้ง (conidia จะติดบนแผ่นเยื่อหอมนั้น)
6. ใช้ปากคีบค่อย ๆ คีบนำเยื่อหอมดังกล่าวไปลอยบนผิวน้ำในจานเลี้ยงเชื้อ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง โดยไม่ปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ (หากปิดฝาจะทำให้มีความชื้นภายในจานเลี้ยงเชื้อสูงเกินไป) ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ
7. นำมาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า โดยย้ายเยื่อหอมมาวางบนกระจกสไลด์ ซับน้ำส่วนเกินออกด้วยกระดาษกรอง หยดน้ำกลั่นลงบนเยื่อหอม 1 หยด ปิดทับด้วย cover slip แล้วตรวจสอบ และบันทึกผล

4. การเก็บตัวอย่างเชื้อราในรูปตัวอย่างแห้ง (herbarium)

นำตัวอย่างใบพืชที่เป็นโรคมาสอดใส่เข้าไปในระหว่างคู่ของกระดาษหนังสือพิมพ์ พยายามคลี่ใบพืชออกโดยเฉพาะใบที่เป็นกระจุกซ้อนกันอยู่ แล้ววางทับด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์อีก 1 คู่ เพื่อช่วยในการดูดซับความชื้น จากนั้นนำตัวอย่างพืชแต่ละตัวอย่างเรียงซ้อนกันประมาณ 5-10 ตัวอย่าง เขียนรายละเอียดเกี่ยวกับตัวอย่างไว้ที่กระดาษ แล้วนำใส่ถุงพลาสติกขนาดใหญ่ ใส่ silica gel เพื่อดูดความชื้นออกจากตัวอย่างเก็บที่อุณหภูมิห้อง หรือที่อุณหภูมิ –4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน หมั่นตรวจดูหาก silica gel เปลี่ยนสีจากน้ำเงินเป็นชมพู ให้ทำการเปลี่ยน silica gel ใหม่ สังเกตหากสีของ silica gel ไม่เปลี่ยนแปลง (สีน้ำเงิน) แสดงว่าตัวอย่างใบพืชนั้น ๆ แห้งสนิท แล้วให้นำตัวอย่างถ่ายใส่ซองกระดาษ โดยใช้กระดาษขนาด A3 มาพับให้เป็นซองแล้วเหลือส่วนที่เป็นขอบไว้ประมาณ 1-1 ½ เซนติเมตร เพื่อพับเป็นปากของซอง บันทึกรายละเอียดของตัวอย่าง เช่น ชื่อพืช (ชื่อสามัญ และชื่อวิทยาศาสตร์), ชื่อผู้เก็บ, สถานที่เก็บ และวัน เดือน ปีที่เก็บ นำเก็บในกล่องพลาสติกปิดฝาภายในบรรจุ naphthalene เพื่อป้องกันไม่ให้แมลงเข้าทำลายตัวอย่างได้

สำหรับตัวอย่างที่ต้องการจัดทำ herbarium เพื่อเก็บไว้ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อราแป้งนั้น ทำโดยใช้กระดาษขนาด A3 พับเป็นซองดังที่กล่าวไว้แล้วข้างต้น นำตัวอย่างใส่ลงในซอง ใส่ silica gel

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ลงในกล่องพลาสติก แล้วนำซองตัวอย่างวางบน silica gel ปิดฝากล่องให้สนิท แล้วนำไปเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ –4 องศาเซลเซียส หมั่นตรวจดูสีของ silica gel เช่นเดียวกัน เมื่อตัวอย่างแห้งสนิทแล้วให้เปลี่ยนใส่ซองใหม่ จากนั้นทำตามขั้นตอนเช่นเดียวกับข้างต้น แล้วเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง

5. การสกัดดีเอ็นเอจาก conidia หรือ ascomata ของเชื้อราแป้ง และการเพิ่มปริมาณ rDNA ด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

5.1 การสกัดดีเอ็นเอ

5.1.1 ทำการฆ่าเชื้อเครื่องมือและอุปกรณ์ทุกอย่าง จากนั้นเตรียมแผ่นกระจกสไลด์มาหยดด้วย Rain X แล้วใช้สไลด์อีกแผ่นหนึ่งมาปิดทับประกบไว้เป็นคู่ Rain X จะแผ่กระจายไปทั่ว ๆ แผ่นกระจกสไลด์

5.1.2 เตรียม water agar (WA) ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นตัดชิ้นวุ้นให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาดประมาณ 1 x 1 เซนติเมตร แล้วนำชิ้นวุ้นที่ตัดแล้ววางลงบนสไลด์ แล้วนำตัวอย่างพืชที่มี conidia ของเชื้อราแป้งมากดทับลงบนชิ้นวุ้น นำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นใช้เข็มเขี่ยที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาเขี่ยเฉพาะ conidia ของเชื้อราแป้ง (ในกรณีที่ไม่พบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ) ให้ได้ conidia เดี่ยว ๆ คัดเลือก conidia ของเชื้อราแป้งที่ต้องการสกัดดีเอ็นเอมาประมาณ 10 – 15 conidia ใส่ลงในหลอด Eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งภายในบรรจุ extraction buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (5% Chelex@ 100 ในน้ำกลั่น, เตรียมโดยนำน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วมา 100 มิลลิลิตร จากนั้นชั่งสาร Chelex@ 100 จำนวน 5 กรัม เติมลงไปพร้อมเขย่าให้ละลายบางส่วน แบ่งเก็บใส่หลอด Eppendorf tube หลอดละ 2 มิลลิลิตร)

ในกรณีที่หากพบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อราแป้ง ให้เขี่ยเฉพาะ ascomata จำนวน 20 – 30 ascomata วางลงบนหยด methyl alcohol (absolute alcohol) บนกระจกสไลด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเคลือบด้วย Rain X แล้ว จากนั้นใช้แผ่นสไลด์อีกแผ่นหนึ่งมากดทับ บดให้ ascoma แตกและปลดปล่อย asci และ ascospore ออกมา ทิ้งไว้จนกระทั่งแอลกอฮอล์ระเหยหมด จึงใช้เข็มเขี่ยค่อย ๆ เขี่ย asci, ascospore ตลอดจนชิ้นส่วนของ ascoma ที่แตกนั้นใส่ลงในสารละลาย 5% Chelex@ 100, ปริมาตร 300 ไมโครลิตรที่บรรจุอยู่ภายในหลอด Eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

5.1.3 นำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำไปเขย่าด้วยเครื่อง Vortex ดึงของเหลวลงสู่ก้นหลอด โดยนำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง จากนั้นจึงนำไปต้มอีกครั้งเป็นเวลา 10 นาที นำเข้าเครื่องเขย่า และเครื่องหมุนเหวี่ยง ตามลำดับ สารละลายที่ได้จะมีดีเอ็นเอของเชื้อราแป้งที่สามารถนำไปวิเคราะห์ในขั้นต่อไปได้

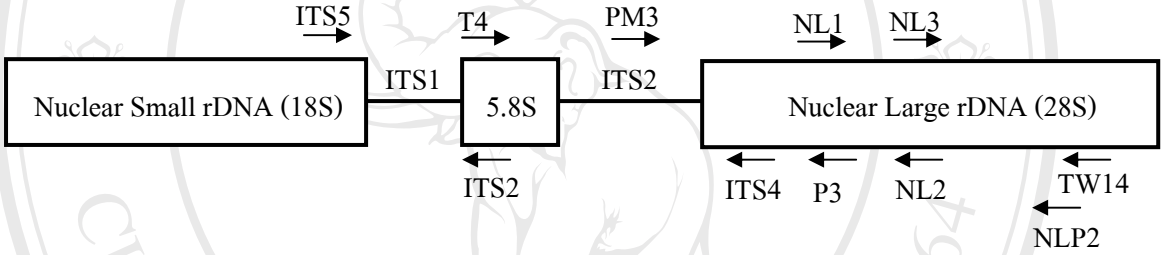
5.1.4 นำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มปริมาณตรงตำแหน่ง rDNA หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ-20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

5.2 การเพิ่มปริมาณ DNA ตรงตำแหน่ง rDNA ด้วยเทคนิค PCR

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ในข้อ 5.1 มาทำการเพิ่มปริมาณตรงตำแหน่ง rDNA ซึ่งประกอบด้วยส่วนของ ITS1, 5.8S, ITS2 และ 28S สองครั้ง โดยใช้ nested primer กล่าวคือ ในส่วนของ ITS1, 5.8S และ ITS2 ทำการเพิ่มปริมาณโดยใช้ primer 3 ชนิด โดยครั้งที่หนึ่งใช้ primer ITS5 (White *et al.,* 1990) และ P3 (Kusaba and Tsuge, 1995) ครั้งที่สองใช้ primer ITS5 และ ITS4 (White *et al.,* 1990) และที่ตำแหน่ง 28S ทำการเพิ่มปริมาณโดยใช้ primer 3 ชนิด ครั้งที่หนึ่งใช้ primer PM3 (Takamutsu and Kano, 2001) และ TW14 (Mori *et al*., 2000) ครั้งที่สองใช้ primer PM3 และ NLP2 (Mori *et al*., 2000) ดังแสดงในภาพที่ 6

สำหรับลำดับเบสของ primer ชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง รวมทั้ง primer ที่ใช้ในการหาลำดับเบส แสดงดังตารางที่ 3



ภาพที่ 6 แผนที่แสดงตำแหน่งของ ribosomal DNA ที่ประกอบด้วย 18S, ITS1, 5.8S, ITS2 และ 28S rDNA ซึ่งแสดงตำแหน่งของ primer ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR (Hirata and Takamatsu, 1996)

องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอครั้งที่หนึ่ง มีดังต่อไปนี้

	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
dH_2O	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**

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3 ลำดับเบสของ primer ชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ rDNA และการหาลำดับเบส

Primer	Nucleotide sequence
P3	5´-GCC GCT TCA CTC GCC GTT AC-3´
ITS2	5´-GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC-3´
ITS4	5´-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3´
ITS5	5´-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3´
T4	5´-TCA ACA ACG GAT CTC TTG GC-3´
PM3	5´-GK*G CTY* TM*C GCG TAG T-3´
NL1	5´-AGT AAC GGC GAG TGA AGC GG-3´
NL2	5´-TAC TTG TTC GCT ATC GGT CT-3´
NL3	5´-AGA CCG ATA GCG AAC AAG TA-3´
NLP2	5´-GGT CCC AAC AGC TAT GCT CT-3´
TW14	5´-GCT ATC CTG AGG GAA ACT TC-3´

* K= G/T, Y= C/T, M= A/C

องค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอครั้งที่สอง มีดังต่อไปนี้

	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
dH_2O	37.8
10X PCR buffer	5
dNTP mix (2.5 mM)	4
Primer ITS5 (20 pmol/µl)	1
Primer ITS4 (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 นั้น เริ่มจากการนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากขั้นตอนที่ 5.1 มาทำการเพิ่มปริมาณตรงตำแหน่ง rDNA ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. pre-denaturation เป็นการแยกสายคู่ของดีเอ็นเอต้นแบบให้เป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 1.30 นาที จำนวน 1 รอบ

2. การเพิ่มปริมาณ rDNA ซึ่งประกอบด้วย
    a. template denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที
    b. primer annealing เป็นการลดอุณหภูมิลงมาที่ 52 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที เพื่อให้ primer จับกับดีเอ็นเอต้นแบบ
    c. extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 30 วินาที

    ในขั้นตอนนี้ทำซ้ำจำนวน 30 รอบ
3. primer extension เป็นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่จากจุดที่ primer เข้าไปจับกับดีเอ็นเอต้นแบบ โดยอาศัยเอ็นไซม์ *Taq* DNA polymerase โดยใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 6.30 นาที จำนวน 1 รอบ

หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วนำไปตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอด้วยวิธี gel electrophoresis ซึ่งโดยปกติปริมาณ rDNA ที่ได้จะไม่เพียงพอต่อการนำไปหาลำดับเบสจึงต้องนำ PCR product ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออีกครั้งด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ nested primer ซึ่งขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR เหมือนกับการทำครั้งแรก หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วควรนำผลผลิตของ PCR ที่ได้ไปหาลำดับเบสในทันที หรือนำไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปหาลำดับเบสในขั้นต่อไป (ไม่ควรเก็บไว้หลายวัน)

6. การตรวจสอบคุณภาพ และปริมาณของผลผลิต PCR

6.1. การเตรียมแผ่น agarose gel

เตรียม agarose gel เข้มข้น 1.5% ใน 1X TAE buffer โดยชั่ง agarose 1.5 กรัม ผสมลงใน 1X TAE buffer 100 มิลลิลิตร นำไปหลอมละลายในเครื่อง microwave จนผง agarose ละลายหมด ปล่อยให้เย็นลง อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส แล้วเติม 1X EtBr (ethidium bromide) 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปเทลงในถาดเจลให้มีความหนาประมาณ 0.4 เซนติเมตร จากนั้นจึงใส่หวีที่ปลายข้างหนึ่งของถาดเจล เพื่อให้เกิดช่องเล็ก ๆ (well) สำหรับใส่ตัวอย่าง เมื่อเจลแข็งตัวแล้วจึงดึงหวีออกแล้วนำไปตรวจสอบคุณภาพและปริมาณโดยวิธี electrophoresis ต่อไป

6.2. การทำ electrophoresis

นำแผ่น agarose gel ที่เตรียมไว้วางลงในกล่อง electrophoresis โดยให้ด้านที่มีช่องสำหรับหยอดตัวอย่างอยู่ใกล้ขั้วลบ เติม 1X TAE buffer ลงในกล่องให้ท่วมแผ่นเจลประมาณ 1-3 มิลลิเมตร จากนั้นผสม loading buffer กับสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบให้เข้ากัน โดยใช้ loading buffer 1 ไมโครลิตร ผสมกับดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร แล้วใช้ micropipette ดูดสารละลายค่อย ๆ หยอดใส่ลงในช่องใส่ตัวอย่างของเจลที่เตรียมไว้ ปิดฝากล่อง และเปิดสวิตซ์เครื่อง ดีเอนเอจะเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางที่เป็นเจลจากขั้วลบไปขั้วบวก โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที หรือสังเกตเมื่อสีของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

loading buffer เคลื่อนไปอยู่ที่ปลายแผ่น agarose จึงปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า นำแผ่น agrarose gel ไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอ โดยย้อมสีด้วยการนำไปแช่ในสารละลาย ethidium bromide เวลา 25-30 นาที แล้วส่องดูด้วย UV transilluminator แถบดีเอ็นเอจะเรืองแสงเป็นแถบสว่าง สำหรับการตรวจสอบปริมาณของผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้วิธีตรวจจากค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 270 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectophotometer

7. การแยกผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR

เมื่อนำผลิตผลจากการทำปฏิกิริยา PCR มาแยกโดยวิธี electrophoresis แล้วนำไปตรวจภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเล็ต จะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 600-700 คู่เบส จากนั้นทำการตัดเจลในส่วนที่มีแถบดีเอ็นเอเรืองแสงอยู่ นำมาแยกสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ JETSORB kit (GENOMED) โดยดำเนินการตามคู่มือที่แนบมา ดังต่อไปนี้

7.1. การสกัดดีเอ็นเอออกจาก agarose gel

หลังจากตัดเจลที่มีแถบดีเอ็นเอที่เรืองแสงแล้ว นำมาใส่หลอด Eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชั่งน้ำหนักเจล แล้วเติมสารละลาย A1 buffer (ภาคผนวก) อัตราส่วน 1:3 (น้ำหนักเจลต่อปริมาตรของสารละลาย A1) จากนั้นเติม JETSORB ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ในขั้นตอนนี้เจลจะละลาย และปลดปล่อยดีเอ็นเอออกมาเกาะติดกับอนุภาคของ JETSORB จากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นเพื่อแยกให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง

7.2. การล้างตะกอนด้วย low salt buffer

เติมสารละลาย A2 buffer (ภาคผนวก) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นแยกให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง นำเข้าเครื่อง vacuum ที่ระดับความดัน 70 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 1 นาที เพื่อทำให้ตะกอนแห้ง

7.3. การสกัดแยกดีเอ็นเอออกจาก JETSORB

เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมลงในตะกอนดีเอ็นเอที่แห้งแล้วให้เข้ากัน จากนั้นนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ในขั้นตอนนี้ดีเอ็นเอที่ถูกดูดซับโดย JETSORB จะละลายออกมา จากนั้นจึงแยก JETSORB ออก โดยนำไปปั่นให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที แยกสารละลายส่วนบนซึ่งเป็นส่วนของดีเอ็นเอเก็บไว้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

7.4. การปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการหาลำดับเบส

หลังจากแยกดีเอ็นเอออกจาก JETSORB ทำการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

- เติม 3M sodium acetate (pH 5.2) ในอัตราส่วน 1/10 vol. (ปริมาตร 5 ไมโครลิตร)
- เติม glycogen (20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
- เติม absolute ethanol ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
- เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-30 นาที
- นำเข้าเครื่องปั่นที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทของเหลวทิ้ง
- เติม 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และนำไปปั่นทันทีด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา10 นาที เทของเหลวทิ้ง นำเข้าเครื่อง vacuum เป็นเวลา 5 นาที ที่ระดับความดัน 50 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว
- เติมน้ำกลั่น เพื่อละลายตะกอนปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ

สำหรับขั้นตอนนี้ การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอทำเหมือนกับการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอในขั้นตอนที่ 5 แต่จะใช้ agarose gel ที่มีความเข้มข้น 1.5% ซึ่งเตรียมโดยการชั่ง agarose 1.8 กรัม ผสมลงใน 1X TAE buffer 120 มิลลิลิตร นำไปหลอมละลาย และตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายมีอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำไปเทใส่ในถาดเจลต่อไป (ไม่เติม ethidium bromide)

8. การหาลำดับเบสบน rDNA (rDNA sequencing)

นำผลผลิต PCR ที่ได้ในขั้นตอนที่ 6 มาทำการหาลำดับการเรียงตัวของเบสตรงตำแหน่ง ITS1-5.8S-ITS2 และ 28S โดยใช้ Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Inc., Japan) โดยทำการหาลำดับเบสตัวอย่างละ 4 ซ้ำ (สำหรับตำแหน่ง ITS1-5.8S-ITS2) โดยใช้ primer 4 ชนิด คือ ITS2, ITS4, ITS5 และ T4 (Hirata and Takamutsu, 1996) ส่วนที่ตำแหน่ง 28S ทำการหาลำดับเบสตัวอย่างละ 5 ซ้ำ โดยใช้ primer 5 ชนิด คือ PM3 (Takamutsu and Kano, 2001), NL1, NL2, NL3 และ NLP2 (Mori *et al*., 2000) ซึ่ง primer ดังกล่าวจะใช้หาลำดับการเรียงตัวของเบสตามตำแหน่งต่าง ๆ และลำดับเบสของ primer ที่ใช้ ดังแสดงในภาพที่ 6 และตารางที่ 3 ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

8.1. การหาลำดับเบสจากปฏิกิริยา PCR

เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา (reaction mix) ในหลอด Eppendorf tube ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ตามลำดับต่อไปนี้

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

ผสมสารดังกล่าวให้เข้ากัน เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับปฏิกิริยา PCR โดยมีขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

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

หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาแล้วเตรียมสารละลาย เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ปริมาตร 5 ไมโครลิตรซึ่งประกอบด้วย 3M sodium acetate ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, 100 mM EDTA ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ glycogen 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ใส่ลงใน Eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายเพื่อหยุดปฏิกิริยา ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

- ดูดสารละลายที่ได้จากปฏิกิริยา PCR 14 ไมโครลิตร ลงใน Eppendorf tube ซึ่งมีสารละลายเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเออยู่ปริมาตร 5 ไมโครลิตร
- เติม absolute ethanol ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
- 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 เพื่อทำให้ตะกอนแห้ง ที่ระดับความดัน 50 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 5 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

- เติมสารละลาย sodium lauryl sulfate (SLS) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เขย่าเพื่อให้ตะกอนละลาย
- นำไปปั่นที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- นำสารละลายที่ได้ไปตรวจหาลำดับเบสต่อไป หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาพที่ไม่มีแสง ซึ่งสามารถเก็บได้นานประมาณหนึ่งเดือน

8.2. การหาลำดับเบสด้วยเครื่อง CEQ 2000 (BECKMAN COULTER)

นำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ในข้อ 8.1 มาหาลำดับเบสด้วยเครื่อง BECKMAN COULTER CEQ 2000 DNA Sequencer โดยการตั้งค่าต่าง ๆ ตามคู่มือการใช้ที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำไว้ในหนังสือคู่มือ สำหรับการหาลำดับเบสนี้เป็นแบบอัตโนมัติ และบันทึกผลโดยเครื่องคอมพิวเตอร์ที่ต่อกับเครื่องหาลำดับเบส ซึ่งเมื่อเสร็จสิ้นการทำงานของเครื่องแล้วสามารถนำข้อมูลออกจากเครื่องคอมพิวเตอร์ได้โดยการถ่ายข้อมูลดังกล่าวลงสู่แผ่นดิสเก็ต แล้วนำข้อมูลมาวิเคราะห์ผลต่อไป

9. การวิเคราะห์ลำดับเบสเพื่อหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

นำลำดับเบสที่ได้มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยใช้เครื่องคอมพิวเตอร์โปรแกรม GENETYX-MAC (Software Development) และเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับข้อมูลจาก The DNA Databank of Japan (DDBJ) ด้วยโปรแกรม Clustal X (Thomson *et al.,* 1997) จากนั้นทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยสร้าง phylogenetic tree ซึ่งอาศัยโปแกรม PAUP version 4.0a8, 4.0b8 (Swofford, 2001) และ PAUP Mac Rat ซึ่งการวิเคราะห์หา tree จะใช้วิธีการ Maximum Parsimony (MP) และ Neighbor-Joining (NJ) method (Saitou and Nei, 1987) ส่วนการหาความคล้ายคลึงกันของลำดับเบสใช้ Model test 3.06 (Posoda and Coandall, 1998) สำหรับ parsimony analysis ใช้ Maximum Parsimony (MP) method โดยใช้ heuristic search ในการหา tree 100 ครั้ง และเลือกใช้ stepwise addition option โดยอาศัยหลักการ likelihood (Yang, 1994) เพื่อทำการหา parsimonious tree และหาค่าความเชื่อมั่นโดยคำนวณ bootstrap analysis (Felsenstein, 1985) จากการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง ในการสนับสนุน tree ที่หามาได้ และทำการหา tree ที่ดีที่สุดโดยวิธี Kishino-Hasegawa (KH) test (Kishino and Hasegawa, 1989) เลือกตั้งค่า test distribution option เป็น “normal” ใน KH test และ “RELL” ใน SH test, และเลือก one-tailed test ในการวิเคราะห์ค่าทั้งสอง เพื่อหาความสัมพันธ์ภายในตัวอย่างเชื้อราแป้งใน Tribe Phyllactinieae ที่พบบนพืชอาศัยชนิดต่าง ๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved