# บทที่ 3

# อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

**1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างเสาวรส**

เก็บตัวอย่างเสาวรสที่มีอาการใบด่าง ในแหล่งปลูกเสาวรสของจังหวัดเชียงใหม่ โดยเฉพาะพื้นที่ที่มีการระบาดของโรครุนแรง คือ แหล่งเพาะปลูกในสถานีเกษตรหลวงปางดะ อ.สะเมิง จ.เชียงใหม่ บันทึกลักษณะอาการที่พบ แล้วนำตัวอย่างมาตรวจวินิจฉัยโรคด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยาและการทดสอบพืชอาศัย ซึ่งพืชอาศัยที่นำมาทดสอบ 6 วงศ์ 14 ชนิด ได้แก่ ถั่วพุ่ม (*Vigna sinensis* (L.) Savex-Hassk), ถั่วแดงหลวง (*Phaseolus vulgaris* cv. Red Kidney), ถั่วเขียว (*Phaseolus aureus* L.), แตงกวา (*Cucumber sativas* cv. Parisienne), แตงกวา (*Cucumis sativus* L.), ฟักทอง *(Cucurbita moschata* (Duch.) Poir), กวางตุ้งดอก (*Brassica campestris var.chinensis*), คะน้ายอด (*Brassica oleracea* var. *alvoglaba*), บานไม่รู้โรย *(Gomphrena globosa*, L.), คีโนโปเดียม *(Chenopodium amaranticolor*), คีโนโปเดียม (*Chenopodium murale*), ขี้เหล็กเทศ (*Cassia occidentalis*), ยาสูบ (*Nicotiana rustica*) และยาสูบใบใหญ่ (*Nicotiana tabacum* cv. White Burley) (Plant Viruses Online, 2003) ปลูกเชื้อโดยวิธีกล (mechanical transmission) โดยนำใบเสาวรสที่แสดงอาการใบด่างมาบดกับ 100 mM phosphate buffer pH 7.0 ในอัตราส่วนใบพืช 1 กรัม : phosphate buffer 2 มิลลิลิตร ทาน้ำคั้นจากใบพืชลงบนใบพืชทดสอบที่โรยผงคาร์โบรันดัมขนาด 600 mesh ส่วนชุดควบคุมทำเช่นเดียวกันแต่ใช้บัฟเฟอร์เพียงอย่างเดียวแทนน้ำคั้น เก็บพืชเหล่านี้ไว้ในโรงเรือนกันแมลงเพื่อตรวจดูลักษณะอาการ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไวรัสสาเหตุอาการใบด่างของเสาวรส**

**2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาคไวรัสสาเหตุอาการใบด่างของเสาวรสจากใบพืชสดด้วยวิธี dip preparation**

นำใบเสาวรสที่แสดงอาการใบด่างประมาณ 1 กรัม มาบดในโกร่งที่มี 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0 โดยนำน้ำคั้นที่ได้หยดลงบนกริด(grid) ที่มี foamvar และ carbon เคลือบอยู่ ทิ้งไว้ 5 นาที นำกระดาษกรองที่ตัดเป็นรูปสามเหลี่ยมแตะบริเวณขอบกริดจนแห้ง แล้วย้อมสีแบบ negative stains โดยหยด 2% phosphotungstic acid, pH 7.0 ลงบนกริด 1 หยด ประมาณ 1 นาที จึงซับออก ทิ้งให้แห้ง แล้วนำไปตรวจดูอนุภาคไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscopy, JEOL JEM 1200EX)

**2.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาคไวรัสสาเหตุอาการใบด่างของเสาวรสจากสารละลายไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ด้วยวิธี dip preparation**

นำสารละลายไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ที่ได้จากการเตรียมไวรัสบริสุทธิ์ มาหยดลงบนกริดที่มี foamvar และ carbon เคลือบอยู่ ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที นำกระดาษกรองที่ตัดเป็นรูปสามเหลี่ยมแตะบริเวณขอบกริดจนแห้ง จากนั้นย้อมสีแบบ negative stains โดยหยด 2 % phosphotungstic acid, pH 7.0 ลงบนกริด 1 หยด ประมาณ 1 นาที จึงซับออก ทิ้งให้แห้ง จากนั้นนำไปตรวจดูอนุภาคไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน

**2.2.1 การเตรียมไวรัสบริสุทธิ์**

นำตัวอย่างใบเสาวรสที่มีลักษณะอาการใบด่างจากแหล่งเพาะปลูกที่มีการระบาดของโรคมาทำการเตรียมไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ (partial purification) โดยการนำใบเสาวรสที่แสดงอาการของโรค 360 กรัม มาปั่นด้วย blender ที่มี 100 mM borate buffer, pH 9.0 ในอัตราส่วนใบพืชแช่แข็ง 10 กรัม : borate buffer 95 มิลลิลิตร จากนั้นกรองน้ำคั้นด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น แล้วเติม chloroform : butanol : diethyl ether (อัตราส่วน 2 : 2 : 1 โดยปริมาตร) ปริมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรน้ำคั้น เขย่าอย่างแรง 15 นาที นำไปใส่เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 45,000g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำตะกอนที่ได้ละลายใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 แล้วทำให้ตะกอนละลายด้วยการ vortex นำไปเก็บข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปหมุน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เหวี่ยงที่ความเร็ว 4,100g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บน้ำใสครั้งที่ 1 จากนั้นทำซ้ำขั้นตอนนี้อีก 2 รอบ เพื่อเก็บน้ำใสครั้งที่ 2 และ 3 เมื่อเก็บน้ำใสครบ 3 ครั้ง นำน้ำใสมารวมกันเพื่อตกตะกอนไวรัส โดยเติมให้ได้ความเข้มข้นของน้ำใสเท่ากับ 0.5 M NaCl และเติม polyethylene glycol (PEG) 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรน้ำใส จากนั้นกวนด้วย magnetic stirrer ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที ละลายตะกอนที่ได้ใน 20 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0 ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จะได้สารละลายไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ นำสารละลายไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ต่อไป

**3. การตรวจสอบโปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิก (coat protein subunit) ของไวรัสสาเหตุอาการใบด่างของเสาวรส**

นำสารละลายไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์มาทำการศึกษาขนาดของโปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิกของไวรัสโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิสในอะคริลาไมด์เจล (SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (stacking gel) และ 12 เปอร์เซ็นต์ (resolving gel) โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนที่สกัดได้จากพืชปกติและพืชเป็นโรค

**การสกัดโปรตีนพืช**

ทำการสกัดโปรตีนจากพืชปกติและพืชที่แสดงอาการของโรค โดยนำใบพืชสด 0.5 กรัม บดด้วยโกร่งที่มี extraction buffer (ประกอบด้วย 100 mM Tris-HCl pH 7.0, 1 mM EDTA, 2 mM Dithiothreitol (DTT), 10 mM 2-mercaptoethanol, 0.005% phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) และ 4% SDS) ที่แช่เย็นปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปใส่ในเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนของเหลวใส (supernatant) ซึ่งเป็นสารละลายโปรตีนพืช แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**3.1 การเตรียมอะคริลาไมด์เจล**

3.1.1 เช็ดกระจกสำหรับเตรียมอะคริลาไมด์เจลและหวีเสียบให้สะอาดด้วย 95% ethanol

3.1.2 นำแผ่นกระจกมาประกบเข้าด้วยกันแล้วใส่ในกรอบสำหรับหนีบกระจกให้เข้ากัน นำไปวางในตัวกดที่มีแผ่นยางวางรองไว้ด้านล่าง

3.1.3 ผสมสารสำหรับเตรียมอะคริลาไมด์เจลเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ คือ ProtoGel® 30% (w/v) Acrylamide : 0.8% Bis- Acrylamide Stock Solution (37.5:1) 1.4 มิลลิลิตร, 1.5 M Tris-HCl pH 8.8 875ไมโครลิตร, น้ำกลั่น 1.152 มิลลิลิตร, 10% SDS 35 ไมโครลิตร, 10% Ammonium persulfate 35 ไมโครลิตร และ TEMED 3.5 ไมโครลิตร ให้เข้ากัน

3.1.4 ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายที่ผสมกันดีแล้วเทลงใน Mini-PROTEIN 3 casting and frame ประมาณ 2/3 ของแผ่นกระจก ทิ้งไว้สักครู่ ค่อย ๆ เติมน้ำบนส่วนของ Resolving gel

3.1.5 เตรียมส่วนผสมของอะคริลาไมด์เจลเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ คือ ProtoGel® 30% (w/v) Acrylamide : 0.8% Bis- Acrylamide Stock Solution (37.5:1) 325ไมโครลิตร, 1.5 M Tris-HCl pH 6.8 625ไมโครลิตร, น้ำกลั่น 1.525 มิลลิลิตร, 10% SDS 25 ไมโครลิตร, 10% Ammonium persulfate 12.5ไมโครลิตร และ TEMED 2.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นซับน้ำกลั่นที่เติมไว้ให้แห้งด้วยกระดาษกรอง แล้วค่อย ๆ ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายที่เตรียมไว้เทลงบนชั้น resolving gel เสียบหวีลงบนชั้นของ stacking gel ทิ้งไว้ให้แข็งตัวประมาณ 20- 30 นาที เมื่อเจลแข็งตัวจะเห็นรอยต่อระหว่างเจลอย่างชัดเจน

**3.2 การแยกขนาดของโปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิกของไวรัสด้วยกระแสไฟฟ้า**

3.2.1 เมื่อประกอบชุดสำหรับทำอิเลคโตรโฟรีซิสแบบ vertical slab gel กับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply) เสร็จแล้ว เท 1X Tris-glycine buffer ลงไปในแทงค์

3.2.2 ผสมสารตัวอย่าง (สารละลายไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ สารละลายโปรตีนที่สกัดจากพืชปกติ และสารละลายโปรตีนที่สกัดได้จากพืชเป็นโรค) กับ sample buffer ในอัตรา 1:1 โดยปริมาตร (สำหรับโปรตีนมาตรฐานที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ทราบน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight marker) เตรียมเช่นเดียวกับสารตัวอย่าง) ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายให้เข้ากัน ต้มสารละลายที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปใส่ในช่องบนเจล โดยใช้ไมโคร ปิเปตค่อย ๆ หยอดผ่าน buffer ลงในช่องของอะคริลาไมด์เจล

3.2.3 เปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า ใช้ความต่างศักย์ 20 mA จนกระทั่งสีของ bromophenol blue เคลื่อนที่ไปยังส่วนล่างของเจล

3.2.4 เมื่อเสร็จแล้วนำแผ่นเจลไปย้อมด้วย staining solution (0.025% Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% methanol และ 10% acetic acid) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.2.5 ล้างแผ่นเจลด้วย destaining solution (25% methanol และ 7.5% acetic acid) จนกว่าจะเห็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีนอย่างชัดเจน

**4. การตรวจสอบไวรัสสาเหตุอาการใบด่างของเสาวรสด้วยเทคนิค RT-PCR**

**4.1 การสกัดอาร์เอ็นเอ**

**วิธีที่ 1: SDS-phenol**

ใช้วิธีการซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Nagata *et al*. (2001) ดังนี้นำใบเสาวรสที่แสดงอาการใบด่างประมาณ 2 กรัม บดในโกร่งที่มี extraction buffer (phenol • chloroform และ 10% mercaptoethanol) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เทของเหลวที่ได้ใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตรนำไปใส่เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,600g เป็นเวลา 10 นาที แยกของเหลวใสที่อยู่ด้านบนถ่ายลงในหลอดใหม่ จากนั้นเติม 5 M LiCl ปริมาตร 0.05 เท่าของสารละลาย และ absolute ethanol ที่แช่เย็นปริมาตร 2.5 เท่าของสารละลาย ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปใส่เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,600g เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนของตะกอน นำมาเติม 70% ethanol ที่แช่เย็น 500 ไมโครลิตร นำไปใส่เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,600g อีกครั้งเป็นเวลา 2 นาที เก็บตะกอนแล้วเติมสารละลาย A (ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA และ 0.1% SDS) จำนวน 600ไมโครลิตร และเติม 5 M LiCl จำนวน 400 ไมโครลิตร จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-16 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,600g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เก็บส่วนของตะกอนแล้วละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 3 M sodium acetate

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

pH 5.2 จำนวน 10ไมโครลิตร และเติม absolute ethanol ที่แช่เย็น 275 ไมโครลิตร นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปใส่เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,600g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ล้างตะกอนด้วยการเติม 70% ethanol ที่แช่เย็น นำไปใส่เครื่องหมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 13,600g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

**วิธีที่ 2: CF-11 cellulose**

ใช้วิธีการซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Jordan and Dodds (1985) นำใบเสาวรสที่แสดงอาการใบด่างมา 6 กรัม บดด้วยโกร่งแช่เย็นที่มี extraction buffer (ประกอบด้วย 2X STE buffer, 2% SDS และ 1% PVP-40) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เทของเหลวที่ได้ใส่ในหลอดทดลอง (centrifuge tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร เติม phenol 4 มิลลิลิตร และ chloroform : pentanol (24:1) 2 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากันประมาณ 20-30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปใส่เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000g เป็นเวลา 20 นาที แยกของเหลวใสที่อยู่ด้านบนถ่ายลงในหลอดทดลองใหม่ เก็บส่วนของเหลวใส แล้วปรับให้ของเหลวใสมีความเข้มข้นเท่ากับ 16% ethanol จากนั้นเติม cellulose จำนวน 1 กรัม แล้วนำหลอดทดลองไปทำการผสมให้เข้ากันโดย vortex จำนวน 3 ครั้งในเวลา 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเก็บส่วนของตะกอน cellulose ต่อมาทำการล้างตะกอนด้วย 1X STE ที่มี 16% ethanol ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการ vortex แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000g เป็นเวลา 10 นาที ทำขั้นตอนนี้ซ้ำอีกครั้ง หลังจากล้างตะกอนครั้งสุดท้ายแล้ว ทำการชะ (eluted) dsRNA ด้วยการเติม 1X STE ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในตะกอน cellulose แล้ว vortex ให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000g เป็นเวลา 20 นาที ถ่ายส่วนของของเหลวใสที่มี dsRNA ลงในหลอดใหม่ จากนั้นตกตะกอน dsRNA ด้วยการปรับให้สารละลายมีความเข้มข้นเท่ากับ 67% ethanol (v/v) และปรับให้ของเหลวใสมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 mM sodium acetate แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส อย่างน้อยที่สุดเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ต่อจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000g เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะได้ตะกอน dsRNA ละลายตะกอนที่ได้ในน้ำกลั่นปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**วิธีที่ 3: Guanidine thiocyanate (Institute of Plant Biology, University of Zürich, 2004)**

นำใบเสาวรสที่แสดงอาการของโรค (ที่แช่แข็งข้ามคืน) จำนวน 2 กรัม บดในโกร่งแช่เย็นที่มีสารละลาย D (ดูในภาคผนวก) จำนวน 10 มิลลิลิตร เติม 2 M sodium acetate pH 4.1 จำนวน 1 มิลลิลิตร, phenol 10 มิลลิลิตร และ chloroform : isoamyl alcohol (49 : 1) 2 มิลลิลิตร เขย่าผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ถ่ายส่วนของเหลวใสลงในหลอดทดลองใหม่ จากนั้นตกตะกอนด้วยการเติม isopropanol จำนวน 10 มิลลิลิตร นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ละลายตะกอนในสารละลาย D จำนวน 3 มิลลิลิตร และเติม isopropanol 3 มิลลิลิตร จากนั้นตกตะกอนโดยนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการล้างตะกอนด้วยการเติม 75% ethanol นำไปหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง เทส่วนใสทิ้งไป แล้วทิ้งตะกอนให้แห้งประมาณ 10 นาที จึงทำการละลายตะกอนในน้ำกลั่นปริมาตร 300 ไมโครลิตร นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

**วิธีที่ 4: Plant RNA Isolation kit (UltraClean™, MO BIO Laboratories, Inc., USA)**

ทำการสกัดอาร์เอ็นเอตามวิธีที่แนะนำในคู่มือ (Instructional manual) ดังนี้ บดใบเสาวรสที่แสดงอาการใบด่าง 0.1 กรัม ในโกร่งที่มีสารละลาย PMR 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ถ่ายของเหลวที่ได้ลงใน collection tube นำไปใส่ในเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000g เป็นเวลา 3 นาที แล้วใช้ไมโครปิเปตดูดส่วนใสปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงใน collection tube ใหม่ จากนั้นเติมสารละลาย PMR 2 ปริมาตร 500ไมโครลิตร และ PMR 3 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดทดลองไปมา 5 ครั้ง แล้วแช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที จากนั้นนำไปใส่เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000g เป็นเวลา 10 นาที ย้ายของเหลวใสใส่ลงใน collection tube ใหม่ โดยขั้นตอนนี้ต้องระวังอย่าให้ตะกอนฟุ้ง จากนั้นเติมสารละลาย PMR 4 ลงในของเหลวปริมาตร 800 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงให้เข้ากัน แล้วใช้ปิเปตดูดของเหลวที่ผสมกันดีแล้วปริมาตร 650 ไมโครลิตร ถ่ายลงใน spin filter จากนั้นนำไปใส่ในเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

10,000g เป็นเวลา 30 วินาที นำส่วนของ spin filter basket ออกก่อน แล้วเทส่วนของเหลวใสทิ้งไป นำ spin filter basket ใส่ไว้ที่เดิม จึงนำของเหลวที่เหลือเทลงใน spin filter อันเดิม นำไปใส่เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000g นาน 30 วินาที ทำแบบนี้ครบ 3 รอบ เติมสารละลาย PMR 5 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงใน spin filter นำไปใส่เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000g นาน 30 วินาที เทส่วนของเหลวทิ้งไป นำไป centrifuge อีกครั้งเป็นเวลา 1 นาที เพื่อกำจัด residual wash solution จากนั้นย้าย spin filter basket ลงใน collection tube อันใหม่ เติมสารละลาย PMR 6 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปใส่ในเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000g นาน 30 วินาที นำส่วนของ spin filter basket ทิ้งไป จะได้สารละลายที่มีอาร์เอ็นเออยู่ใน collection tube นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

เมื่อสกัดอาร์เอ็นเอทั้ง 4 วิธีแล้วทำการตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอด้วยเครื่อง spectrophotometer และตรวจสอบ RNA degradation ด้วยการทำเจลอิเลคโตรโฟรีซิสบน 1% agarose gel (ขั้นตอนนี้อุปกรณ์ที่ใช้ต้องเตรียมด้วย DEPC-treated $H_2O$ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเอนไซม์ RNase) (Protocol online, 2004)

**4.2 การออกแบบไพรเมอร์ (degenerate primers)**

ทำการศึกษาบริเวณอนุรักษ์ (conserved sequences) จากกรดอะมิโน (amino acid) ของลำดับเบสอาร์เอ็นเอในส่วนที่แปลรหัสเป็นโปรตีนห่อหุ้ม (CP gene) ของไวรัสในกลุ่ม *Potyvirus* จากหลาย ๆ สายพันธุ์ (โดยยึด PWV เป็นหลัก) ที่มีรายงานไว้จากฐานข้อมูล GenBank ผ่านระบบเครือข่ายอินเตอร์เน็ต http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/ แล้วจึงทำการคัดเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอนุรักษ์ที่ได้จากการศึกษาลำดับกรดอะมิโนโดยนำไปเปรียบเทียบความเหมือนด้วยการใช้โปรแกรม ClustalW ผ่านเครือข่ายอินเตอร์เน็ตจาก http://www.ebi.ac.uk/clustalw/ เพื่อเลือกตำแหน่งอนุรักษ์ที่พบใน CP gene บน ssRNA ของไวรัส เพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์โดยเลือกตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน VWCI(E/D)NG และ QMK(A/T)AAL (ภาพ 1) ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนดังกล่าวมาจากการเปรียบเทียบความเหมือนของไวรัสกลุ่ม *Potyvirus* ที่มีรายงานจากประเทศต่าง ๆ จำนวน 11 สายพันธุ์โดยการใช้โปรแกรม clustalW เช่นกัน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

```
AAR89898   FEAIKEEYELDEDKMGVIMNGFMVWCIENGTSPDVNGVWTMMDGDEQVEFPLKPIVENAK 160
AAR08937   FEAIKEEYELDEDKMGVIMNRFMVWCIENGTSPDVNGVWTMMDGDEQVEFPLKPIVENAK 160
AAS60103   FEAIKEEYELDEDKMGVIMNRFMVWCIENGTSPDVNGVWTMMDGDEQVEFPLKPIVENAK 160
AAB81115   YDAVKEEYELTDDQMGVVMNGFMVWCIDNGTSPDINGVWVMMDGDEQVEYPLKPMVENAK 167
AAG43495   YSAVQREYELDDNQMSVIMNGFMVWCIDNGTSPNVNGTWVMMDGEEQIEYPLKPLVENAQ 340
BAA24530   YSAVQREYELDDNQMSVIMNGFMVWCIDNGTSPNVNGTWVMMDGEGQIEYPLKPLVENAQ 327
BAD83868   YSAVQKEYELDDNQMSVIMNGFMVWCIDNGTSPNINGMWVMMDGDEQIEYPLKPLVENAQ 212
NP_734222  FEGVMADYELTEDKMQIILNGLMVWCIENGTSPNINGMWVMMDGDDQVEFPIKPLIDHAK 174
AAW28831   YEAVRMAYDIGETEMPTVMNGLMVWCIENGTSPNVNGVWVMMDGNEQVEYPLKPIVENAK 153
NP_945133  YNAVKDEYGLNDESMALAMNGLMVWCIENGTSPNVNGVWLMMDGDQQVEFPLRPILEHAK 2982
AAP04521   FEAIKEEYELDEDKMGVIMNGFMVWCIENGTSPDVNGVWTMMDGDEQVEFPLKPIVENAK 164
           :.:   * : : .*   :* :***** *****::** * ****: *:*:*::*::::*:

AAR89898   PTLRQIMHHFSDAAEAYIEMRNSEGFYMPRYGLLRNLRDKSLARYAFDFYEVTSKTSDRA 220
AAR08937   PTLRQIMHHFSDAAEAYIEMRNSEGFYMPRYGLLRNLRDKSLARYAFDFYEVTSKTSDRA 220
AAS60103   PTLRQIMHHFSDAAEAYIEMRNSEGFYMPRYGLLRNLRDKSLARYAFDFYEVTSKTSDRA 220
AAB81115   PTLRQIMHHFSDAAEAYIEMRCASGPYMPRYGLLRNLRDKNLARYAFDFYEVNAKTSDRA 227
AAG43495   PTLRQIMHHFSDAAEAYIEMRNSKEPYMPRYGTLRNLRDLSLARYAFDSYEVTSKTPNRA 400
BAA24530   PTLRQIMHHFSDAAEAYIEMRNSKEPYMPRYGTLRNLRDLSLARYAFDFYEVTSKTPNRA 387
BAD83868   PTLRQIMHHFSDAAEAYIEMRNSKEPYMPRYGTLRNLRDLSLARYAFDFYEVTSKTPNRA 272
NP_734222  PTFRQIMAHFSDVAEAYIEKRNQDRPYMPRYGLQRNLTDMSLARYAFDFYEMTSRTPIRA 234
AAW28831   PTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKKEPYMPRYGLIRNLRDVGLARYAFDFYEVTSRTPVRA 213
NP_945133  PTLRQIMAHFSNLAEAYIEKQNLEKPYMPRYGLQRNLTDFNLARFAFDFYEVTSRTPARA 3042
AAP04521   PTLRQIMHHFSDAAEAYIEMRNSEGFHMPRYGLLRNLRDKSLARYAFDFYEVTSKTSERA 224
           **:**** ***: ****** :  .  :*****  *** * .***:*** **:.::*. **

AAR89898   REAIAQMKAAALANVNTRMFGLDGNVATTSENTERHTATDVSQNMHSLLGMTHGQ----- 275
AAR08937   REAIAQMKAAALANVNTRMFGLDGNVATTSENTERHTATDVSQNMHSLLGMTHGQ----- 275
AAS60103   REAIAQMKAAALANVNTRMFGSDGNVATTSENTERHTATDVNQNMHSLLGMTHGQ----- 275
AAB81115   REAVAQMKAAALSNVTNKLFGLDGNVATISEDNERHIARDVNQNMHSLLGYPGHVILELK 287
AAG43495   REAVAQMKAAALANVSTRLFGLDGNVSTTGENTERHTARDVNQNMHTLLGMNSPQ----- 455
BAA24530   REAVAQMKAAALANVSTRLFGLDGNVSTTGENTERHTARDVNQNMHTLLGMNSQQ----- 442
BAD83868   REAVAQMKAAALANVSTRLFGLDGNVSTNSENTERHTARDVNQNMHTLLGMGPPQ----- 327
NP_734222  REAHIQMKAAALRGANNNLFGLDGNVGTTVENTERHTTEDVNRNMHNLLGVQGL------ 288
AAW28831   REAHIQMKAAALKSAQPRLFGLDGGISTQEENTERHTTEDVSPSMHTLLGVKNL------ 267
NP_945133  KEAHFQMKTAALRGKQSKLFGLDGKVNTQDEDTERHTADDVNKNMHSLLGISM------- 3095
AAP04521   REAIAQMKAAALANVNTRMFGLDGNVATTSENTERHTATDVNQNMHSLLGMTHGQ----- 279
           :**  ***:***.  .:** ** : *  *:.*** : **. .**.***
```

ภาพ 1 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนบริเวณ CP gene ของไวรัสกลุ่ม *Potyvirus* ด้วยโปรแกรม clustalWจาก *Potyvirus* 11 สายพันธุ์ โดยอักษรตัวหนาแสดงตำแหน่งลำดับกรดอะมิโนที่นำไปใช้ในการออกแบบไพรเมอร์

Accession No. AAR89898 คือ ลำดับกรดอะมิโนของ PWV Strain F-144 (บราซิล)

,, AAR08937 คือ ลำดับกรดอะมิโนของ PWV Strain F-M2 (บราซิล)

,, AAS60103 คือ ลำดับกรดอะมิโนของ PWV Strain M2 (บราซิล)

,, AAB81115 คือ ลำดับกรดอะมิโนของ PWV isolate University of Sydney (ออสเตรเลีย)

,, AAG43495 คือ ลำดับกรดอะมิโนของ PWV (ไต้หวัน)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Accession No. BAA24530 คือ ลำดับกรดอะมิโนของ PWV isolate AO (ญี่ปุ่น)
,, BAD83868 คือ ลำดับกรดอะมิโนของ PWV isolate IB (ญี่ปุ่น)
,, NP_734222 คือ ลำดับกรดอะมิโนของ Turnip mosaic virus
,, AAW28831 คือ ลำดับกรดอะมิโนของ Potato virus Y
,, NP_945133 คือ ลำดับกรดอะมิโนของ Lily mottle virus
,, AAP04521 คือ ลำดับกรดอะมิโนของ Cowpea aphid-borne mosaic virus

**4.3 การเพิ่มปริมาณกรดนิวคลิอิกด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์**

การเพิ่มปริมาณกรดนิวคลิอิกด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์แบบทำปฏิกิริยาในหลอดเดียว (One-Tube RT-PCR) โดยนำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ (total RNA) มา 2 ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็นอาร์เอ็นเอต้นแบบในการทำปฏิกิริยาโดยใช้ primer Pt 1 และ Pt 2 (ตาราง 2) ในปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 10x reaction buffer 2.5 ไมโครลิตร, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.4 mM dNTPs, primer Pt 1 และ Pt 2 ความเข้มข้นอย่างละ 1 µM, น้ำกลั่น จากนั้นเติม 5 ยูนิตของ Avian Myeloblastosis (AMV) Reverse Transcriptase และ 1.25 ยูนิตของ Dynazyme$^{TM}$ DNA Polymerase II (Finnzymes, Finland) ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากันในหลอดสำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยการ vortex หรือการใช้ไมโครปิเปตดูดขึ้น-ลง แล้วนำเข้าเครื่อง GeneAmp 2400 thermal Cycler (Perkin-Elmer) โดยใช้อุณหภูมิเริ่มต้นในการสังเคราะห์ cDNA (Reverse Transcription) 42 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที จากนั้นทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพธรรมชาติครั้งแรก (initial denaturation) 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที แล้วเข้าสู่วงรอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยแต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 20 วินาที annealing ที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที จำนวน 40 รอบ แล้วตามด้วย final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที สำหรับการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา RT-PCR โดยการใช้ความเข้มข้นขององค์ประกอบในการทำปฏิริยาที่แตกต่างกันด้วยการใช้อาร์เอ็น-เอแม่แบบที่มีความเข้มข้นต่างกัน (0.20-200 นาโนกรัม) การใช้ไพรเมอร์ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน (0.4-1 ไมโครกรัม) การใช้ $MgCl_2$ ที่มีความเข้มข้นต่างกัน (0.5–3 มิลลิโมลาร์)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำปฏิกิริยาดังกล่าว แล้วจึงตรวจสอบผลผลิตของ PCR ที่ได้โดยการทำเจลอิเลคโตรโฟรีซิสบน 1.5% agarose gel

**4.4 การตรวจผลโดยเจลอิเลคโตรโฟรีซิส**

นำถาดและหวีสำหรับเตรียมเจลประกอบเข้าด้วยกัน ละลาย agarose (Promega, USA) 0.45 กรัม ใน 0.5X TBE buffer 30 มิลลิลิตร (1.5% agarose gel) หลอมเจลด้วยไมโครเวฟ เขย่าเป็นครั้งคราวจนเจลละลายดี ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งเย็นลงที่อุณหภูมิประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส นำมาเทลงในถาดที่เตรียมไว้ ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณครึ่งชั่วโมง จึงเท 0.5X TBE buffer บนผิวหน้าเจลเล็กน้อย ค่อย ๆ ดึงหวีออก นำเจลใส่ลงในเครื่อง Gel MateTM-GEP102 (TOYOBO, Japan) เติม 0.5X TBE buffer จนท่วมผิวหน้าเจลประมาณ 1-3 มิลลิเมตร นำ 100 bp DNA Ladder (Invitrogen$^{TM}$, USA) เพื่อใช้เป็น molecular weight marker แล้วจึงนำ PCR-product 9 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 1 ไมโครลิตร หยอดลงในช่องถัดมาจนครบทุกตัวอย่าง ปิดฝาครอบ เปิดสวิทซ์ให้กระแสไฟฟ้าเข้าเครื่องโดยใช้ความต่างศักย์ที่ 100 โวลท์ จนกระทั่งสีของ loading dye ห่างจากขอบล่างของเจลประมาณ 1 นิ้ว จึงปิดสวิทซ์ นำเจลมาย้อมด้วย ethidium bromide ล้างด้วยน้ำเปล่าแล้วนำไปส่องดูด้วยแสง UV และบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel Documentation (SYNGRNE รุ่น Gene Genius Bio Imaging System)

**4.5 การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิต RT-PCR**

นำผลผลิตจากการทำ RT-PCR มาทำการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) โดยวิธี dideoxynucleotide termination cycle ด้วยเครื่อง ABI 377 Automated DNA Sequencer จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบความเหมือนกับข้อมูลลำดับเบสของ PWV ที่มีรายงานไว้ใน National Center for Biotechnology Information (NCBI), USA โดยใช้โปรแกรม BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) หรือโปรแกรม clustalW จาก European Bioinformatic Institute (EMBL-EBI) (http://www.ebi.ac.uk/clustalw/)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**5. สถานที่ดำเนินงานวิจัยและรวบรวมข้อมูล**

1. ห้องปฏิบัติการวิจัยและเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved