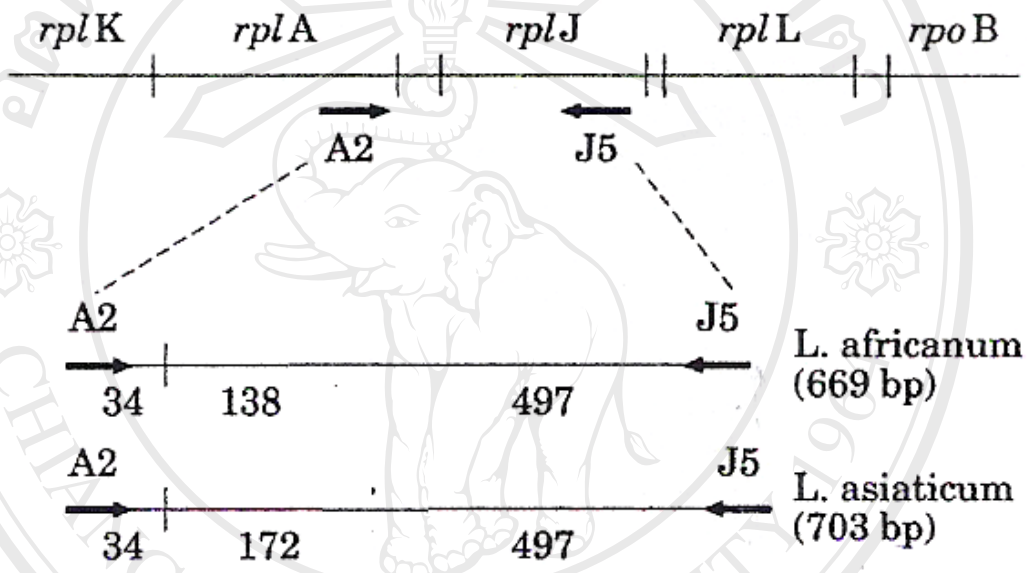
ภาคผนวก

การจัดเรียงของยีน ribosomal protein ใน *rpl*KAJL-*rpo*BC operon ของเชื้อ *Candidatus* Liberobacter spp.



Organization of the ribosomal protein gene in *rpl*KAJL-*rpo*BC operon of *Candidatus* Liberobacter spp. and positions of the oligonucleotides A2 and J5 (Hocquellet *et al*., 1999b)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการสกัดแยกดีเอ็นเอ

ในการเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการสกัดแยกดีเอ็นเอต้องเตรียม stock solution ก่อนดังนี้

5 M NaCl (50 มิลลิลิตร)

ชั่งสาร NaCl มาจำนวน 14.16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 50 มิลลิลิตร

0.5 M EDTA (pH 8.0) (100 มิลลิลิตร)

ชั่งสาร disodium ethylenediamine tetraacetate·$2H_2O$ (EDTA) มาจำนวน 18.612 กรัม ละลายในน้ำ 80 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 8.0 แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 ด้วยน้ำกลั่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

1 M Tris – HCl pH 8.0 (100 มิลลิลิตร)

ชั่งสาร Tris–HCl มาจำนวน 15.76 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 8.0 ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

Chloroform/isoamyl alcohol (24:1) (100 มิลลิลิตร)

ตวงสาร Chloroform ปริมาตร 96 มิลลิลิตร ผสมกับสาร isoamyl alcohol ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการสกัดแยกดีเอ็นเอตามวิธีของ Jagoeix *et al.* (1996): วิธีที่ 1

0.3 mM NaCl (100 มิลลิลิตร)

ดูดสารละลาย 5 M NaCl จาก stock solution มา 6 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 94 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการสกัดแยกดีเอ็นเอตามวิธีของ Jagoeix *et al.* (1996): วิธีที่ 2

TE buffer (100 มิลลิลิตร)

สารละลาย TE buffer ประกอบด้วยสารต่าง ๆ ดังนี้

Stock solution	**volume**	**: final concentration**
1.0 M Tris (pH 8.0)	1 มิลลิลิตร	10 mM Tris (pH 8.0)
0.5 M EDTA (pH 8.0)	80 มิลลิลิตร	400 mM EDTA (pH 8.0)
SDS	1 กรัม	1% SDS

มีขั้นตอนการเตรียม ดูดสารละลาย 1 M Tris (pH 8.0) จาก stock solution มา 1 มิลลิลิตร และดูดสารละลาย 0.5 M EDTA (pH 8.0) จาก stock solution มา 80 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นชั่งสาร SDS มา 1 กรัม ละลายในสารละลายที่เตรียมได้ แล้วปรับปริมาตรสารละลายให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการสกัดแยกดีเอ็นเอตามวิธีของ Hung *et al.* (1999): วิธีที่ 3

DNA extraction buffer (50 มิลลิลิตร)

สารละลาย DNA extraction buffer ประกอบด้วยสาร ต่าง ๆ ดังนี้

Stock solution	**volume**	**: final concentration**
1.0 M Tris – HCl (pH 8.0)	5.0 มิลลิลิตร	0.10 M Tris – HCl (pH 8.0)
0.5 M EDTA (pH 8.0)	5.0 มิลลิลิตร	0.05 M EDTA (pH 8.0)
5.0 M NaCl	5.0 มิลลิลิตร	0.50 M NaCl
N-lauroylsacosine	0.5 กรัม	1% N-lauroylsacosine

ขั้นตอนการเตรียม ดูดสารละลาย 1 M Tris – HCl (pH 8.0), 0.5 M EDTA (pH 8.0) และ 5 M NaCl และ จาก stock solution มาอย่างละ 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นชั่งสาร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

N-lauroylsacosine มา 0.5 กรัม ละลายในสารละลายที่เตรียมได้ จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้ครบ 50 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

10% CTAB in 0.7 M NaCl (50 มิลลิลิตร)

CTAB	5 กรัม
5 M NaCl	7 มิลลิลิตร

ชั่งสาร CTAB มา 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 30 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลาย 5 M NaCl จาก stock solution มา 7 มิลลิลิตร ผสมในสารละลายที่เตรียมได้ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อให้ครบ 50 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการสกัดแยกดีเอ็นเอตามวิธีของ Dellaporta *et al.* (1983): วิธีที่ 4

Grinding Buffer (1 ลิตร)

K_2HPO_4	16.7 กรัม
KH_2PO_4	4.1 กรัม
Sucrose	100.0 กรัม
PVP-10 หรือ PVP-40	5.0 กรัม
dH_2O	1.0 ลิตร

ชั่งสารดังกล่าวมาละลายในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นแบ่งใส่ขวดแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำสารละลายที่เตรียมนี้ไปใช้ให้เติม 100 mM Ascorbic acid จำนวน 100 ไมโครลิตรต่อสารละลายบัฟเฟอร์ 20 มิลลิลิตร และเติมสาร BSA (bovine serum albumin fraction V) จำนวน 30 มิลลิกรัมต่อสารละลายบัฟเฟอร์ 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาปรับ pH ให้เป็น 7.6

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2 % CTAB buffer (100 มิลลิลิตร)

CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide)	2.00 กรัม
NaCl	5.84 กรัม
Tris base	1.21 กรัม
EDTA	0.74 กรัม
1% PVP-40	0.50 กรัม
dH_2O	100.00 มิลลิลิตร

ชั่งสารดังกล่าวข้างต้นมาละลายในน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำมาใช้เติม 0.2 % Mercaptoethanol

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการสกัดแยกดีเอ็นเอตามวิธีของ Nakashima *et al.* (1995): วิธีที่ 5

2 % CTAB buffer (100 มิลลิลิตร)

CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide)	2.00 กรัม
NaCl	5.84 กรัม
Tris base	1.21 กรัม
EDTA	0.74 กรัม
1% PVP-40	0.50 กรัม
dH_2O	100.00 มิลลิลิตร

ชั่งสารดังกล่าวข้างต้นมาละลายในน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำมาใช้เติม 0.2 % Mercaptoethanol

การเตรียมสารละลายสำหรับเจลอิเลคโตรโฟรีซิส

5X TBE buffer (1 ลิตร)

Tris base	54.0 กรัม
Boric acid	27.5 กรัม
0.5 M EDTA pH 8.0	20.0 มิลลิลิตร

นำสาร Tris base และ Boric acid มาละลายในน้ำกลั่น จากนั้นเติม EDTA pH 8.0 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

1% อะกาโรสเจล (agarose gel) (30 มิลลิลิตร)

Agarose gel	0.3 กรัม
0.5X TBE buffer	30 มิลลิลิตร

ชั่งอะกาโรสเจล 0.3 กรัม ละลายใน 0.5X TBE buffer ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปหลอมละลายโดยใช้ไมโครเวฟ ทิ้งให้เย็นสักครู่จึงเทลงในถาดที่เตรียมไว้ ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณครึ่งชั่วโมง ค่อย ๆ ดึงหวีออก ย้ายแผ่นเจลใส่ในเครื่อง Gel MateTM-GEP102 (TOYOBO, Japan) แล้วเติม TBE buffer ให้ท่วมผิวหน้าเจล

Loading dye (10 มิลลิลิตร)

Bromophenol blue	0.25 %
Xylene cyanol	0.25 %
Glycerol	50.00 %
0.5 EDTA, pH 8	20.00 ไมโครลิตร

เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ค่าใช้จ่ายสารเคมีในการสกัดดีเอ็นเอของ 5 วิธี (ต่อ 1 ตัวอย่าง: 0.5 กรัม)

วิธีที่ 1 ดัดแปลงมาจากวิธีของ Jagoueix *et al.* (1996)

NaCl	2	บาท
รวมเป็นเงิน	**2**	**บาท**

วิธีที่ 2 ดัดแปลงมาจากวิธีของ Jagoueix *et al.* (1996)

Tris	2	บาท
EDTA	5	บาท
SDS	24	บาท
Chloroform	1	บาท
Isoamyl alcohol	1	บาท
Isopropanol	1	บาท
รวมเป็นเงิน	**34**	**บาท**

วิธีที่ 3 ดัดแปลงมาจากวิธีของ Hung *et al.* (1999)

Tris-HCl	1	บาท
EDTA	3	บาท
NaCl	2	บาท
N-Lauroylsarcosine	25	บาท
CTAB	1	บาท
Chloroform	2	บาท
isoamyl alcohol	2	บาท
isopropanol	1	บาท
ethanol	1	บาท
รวมเป็นเงิน	**37**	**บาท**

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีที่ 4 ดัดแปลงมาจากวิธีของ Dellaporta *et al.* (1983)

K_2HPO_4	2	บาท
KH_2PO_4	2	บาท
Sucrose	12	บาท
PVP-10 or PVP-40	3	บาท
Ascorbic acid	2	บาท
BSA (bovine serum albumin fraction V)	2	บาท
CTAB	1	บาท
NaCl	1	บาท
Tris base	4	บาท
EDTA	4	บาท
Mercaptoethanol	2	บาท
Chloroform	1	บาท
isoamyl alcohol	1	บาท
isopropanol	1	บาท
ethanol	1	บาท
รวมเป็นเงิน	**39**	**บาท**

วิธีที่ 5 ดัดแปลงมาจากวิธีของ Nakashima et al. (1995)

Mercaptoethanol	2	บาท
Tris HCl	2	บาท
NaCl	1	บาท
EDTA	4	บาท
PVP	3	บาท
CTAB	1	บาท
Chloroform	1	บาท
isoamyl alc.	1	บาท
isopropanol	1	บาท
รวมเป็นเงิน	**16**	**บาท**

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวอรอุมา เรืองวงษ์
วัน เดือน ปีเกิด	7 พฤษภาคม พ.ศ. 2523
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลายโรงเรียนแม่จันวิทยาคม จังหวัดเชียงราย ปีการศึกษา 2541 สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2545
ทุนการศึกษา	ได้รับทุนอุดหนุนบัณฑิตศึกษา โครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัย สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ประสบการณ์	- เข้าร่วมเสนอผลงานภาคโปสเตอร์ เรื่อง การตรวจสอบโรค Huanglongbing (Ex-Greening) ของส้ม ในการประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 4 ระหว่างวันที่ 10 -11 สิงหาคม 2547 ณ โรงแรมโลตัสปางสวนแก้ว จังหวัดเชียงใหม่ - เข้าร่วมเสนอผลงานภาคบรรยาย เรื่อง Ultrastructure ของส้มที่เป็นโรคฮวงลองบิง (กรีนนิ่ง) ในงานสัมมนาวิชาการเกษตร ครั้งที่ 2 วันที่ 20 สิงหาคม พ.ศ. 2547 คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ - เสนอผลงานภาคโปสเตอร์ เรื่อง การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์บนผิวใบเพื่อควบคุมโรคแคงเกอร์ของส้ม ในการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 5 ระหว่างวันที่ 27 -29 เมษายน 2548 ณ โรงแรมเวลคัมจอมเทียน-บีช พัทยา จังหวัดชลบุรี - เสนอผลงานภาคบรรยาย เรื่อง Methods for Diagnosis and detection of Candidatus Liberobacter spp. Associated with

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Citrus Huanglongbing Disease ระหว่างวันที่ 16 – 17 พฤษภาคม 2548 ณ ศูนย์วิจัยจุฬาภรณ์ กรุงเทพ

ผลงานวิจัย งานวิจัยปัญหาพิเศษระดับปริญญาโทเรื่อง “ การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์บนผิวใบเพื่อควบคุมโรคแคงเกอร์ของส้ม’’ ปีการศึกษา 2547

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved