บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาลักษณะอาการของโรคฮวงลองบิง (HLB) และโรคทริสเตซ่า (Tristeza)

ทำการศึกษาลักษณะอาการของโรคฮวงลองบิงและทริสเตซ่าในสวนส้มโอที่ปลูกเพื่อการส่งออกในพื้นที่จังหวัดเชียงราย โดยสุ่มเลือกสวนเกษตรกรจำนวน 5 ราย ได้แก่ สวนนายวรศักดิ์ เรียงยาย บ้านเลขที่ 183 หมู่ 1 ตำบลหล่ายงาว อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย สวนนายวัลลภ ใจกล้า บ้านเลขที่ 16/1 ม. 5 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย สวนนายประคอง บุดดี บ้านเลขที่ 18/1 ม. 2 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย สวนนายสมบัติ บุดดี บ้านเลขที่ 31/1ม. 1 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่นจังหวัดเชียงราย และ สวนด.ต. วุฒิพงษ์ คำลือ บ้านเลขที่ 18/1 ม. 2 ตำบลม่วงยาย อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย สุ่มเลือกตัวอย่างต้นส้มโอจากแต่ละสวน สวนละ 8 ตัวอย่าง รวม 40 ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างใบส้มโอจากแต่ละต้นโดยสุ่มเก็บตัวอย่างใบรอบต้นทั้ง 4 ทิศ มาประมาณ 50 ใบต่อต้น รวมถึงกิ่งพันธุ์ส้มโอและพืชตระกูลส้มที่ปลูกข้างสวนปลูกส้มโอของเกษตรกร จากนั้นนำมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่นและเช็ดให้แห้ง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาถึงเชื้อสาเหตุโรคต่อไป

2. การตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิง

2.1 การตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคฮวงลองบิงด้วยวิธี PCR

การแยกสกัดดีเอ็นเอ (ดัดแปลงจาก Dellaporta, 1983)

นำใบส้มโอที่แสดงอาการของโรคฮวงลองบิงมาตัดเอาเฉพาะเส้นกลางใบ ชั่งให้ได้น้ำหนัก 0.5 กรัม แล้วตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ด้วยกรรไกรที่สะอาด นำไปใส่ในโกร่งที่แช่เย็นแล้วเติม grinding buffer (ภาคผนวก) ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10-20 นาที แล้วจึงบดให้ละเอียด เทน้ำคั้นที่ได้ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 g นาน 5 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายที่ได้ใส่ในหลอดใหม่แล้วนำไปปั่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 g นาน 25 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเทสารละลายทิ้ง เก็บตะกอนแล้วเติมสารละลาย CTAB (ภาคผนวก) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ละลายตะกอนให้หมดโดยนำไป vortex แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นเติมสารละลาย chloroform / isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,000 g นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ได้สารละลายแยกเป็น 2 ชั้น ให้เก็บสารละลายใสส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ เติม isopropanol ปริมาตรที่เท่ากัน ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 g นาน 15 นาที จากนั้นเทสารละลายทิ้ง แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 g นาน 5 นาที ดูดเอา ethanol ออก และทำตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 25 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การทำปฏิกิริยา PCR

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย specific primers forward primer A2 (5'-TATAAAGGTTGACCTTTCGAGTTT-3') และ reverse primer J5 (5'-ACAAAAGCAGAAATAGCACGAACAA-3') ซึ่งจะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณยีน *rpl*KAJL-*rpro*BC operon ของเชื้อ *Candidatus* Liberibacter asiaticus การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR ประกอบด้วยสารละลายปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ดังนี้

ส่วนประกอบ	**ปริมาตร (ไมโครลิตร)**
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	16.65
5 mM dNTPs	1.00
10X PCR buffer	2.50
50mM $MgCl_2$	1.25
20 µM primer A2	1.25
20 µM primer J5	1.25
0.5 unit *Taq* DNA polymerase (Invitrogen)	0.10
ดีเอ็นเอต้นแบบ Undiluted extracted DNA	1.00

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผสมส่วนประกอบให้เข้ากันจากนั้นนำเข้าเครื่อง Programable Thermal Controller PTC-100™ (MJ Research) ซึ่งมีเงื่อนไขในการทำปฏิกิริยา ดังนี้

1. initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	นาน 3 นาที	
2. denaturation	ที่อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส	นาน 45 วินาที	จำนวน 35 รอบ
annealing	ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส	นาน 45 วินาที	
extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	นาน 90 วินาที	
3. final extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	นาน 5 นาที	

การตรวจวิเคราะห์ผลผลิตจากการทำ PCR (PCR product)

ทำการตรวจวิเคราะห์ผลด้วยวิธี Gel electrophoresis โดยนำผลผลิตจากการทำ PCR มา 10 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 2 ไมโครลิตร แล้วแยกขนาดของดีเอ็นเอบน 1% agarose gel electrophoresis ใน 1X TBE buffer ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลท์ นาน 40 นาที จากนั้นย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำนาน 5 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตและบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel documentation (SYNGRNE; Gene Genius Bio Imagine System)

2.2 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Sequencing)

ทำการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ ribosomal protein gene ของ β-operon ของเชื้อสาเหตุ โดยนำ PCR product มาวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Sanger method โดยใช้ความเข้มข้นของ PCR product ประมาณ 200-500 นาโนกรัมต่อ 50 ไมโครลิตร และใช้ความเข้มข้นของ primer A2/J5 อย่างละ 10 พิโคโมลต่อ 20 ไมโครลิตร โดยใช้ PRISM Ready Dye Termimation Cycle Sequencing kit และใช้เครื่อง ABI Model 3100 version 3.7 automated DNA sequencer (Perkin Elmer) เป็นตัวช่วยอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์

2.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาทำ sequence aligment เพื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST เข้าไปในส่วนของ Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn) หรือใช้โปรแกรม Clustal W นอกจากนี้นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปทำการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม ORF Finder

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(Open Reading Frame Finder) (http://www.ncbi.nlm.nih/gov/gorf/gorf.html) และนำข้อมูลลำดับกรดอะมิโนที่ทำการแปลรหัสได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลของลำดับกรดอะมิโนที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank ของ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST หรือโปรแกรม Clustal W

3. การตรวจหาเชื้อไวรัสสาเหตุโรคทริสเตซ่า

3.1 การตรวจหาเชื้อไวรัสสาเหตุโรคทริสเตซ่าด้วยเทคนิค Double Antibody Sandwich ELISA (DAS-ELISA)

3.1.1 การเคลือบ antibody บนเพลท

เจือจางแอนติบอดี (Anti CTV IgG; บริษัท BIOREBA, Switzerland) 1:1000 ด้วย coating buffer (20 มิลลิลิตรต่อเพลท) จากนั้นใช้ micropipette ดูดสารละลายที่ได้ใส่ในหลุมเพลท เพลทละ 200ไมโครลิตร เก็บเพลทไว้ในกล่องความชื้น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เมื่อครบเวลาเทของเหลวทิ้งแล้วทำการล้างเพลทด้วย washing buffer

3.1.2 การล้างเพลท

ใช้ micropipette ดูด washing buffer เติมลงไปในหลุมๆ ละ 240 ไมโครลิตร เขย่าเพลทเบาๆ นาน 2- 3 นาที ระวังอย่าให้ของเหลวกระเด็นออกจากหลุม จากนั้นเทของเหลวในเพลททิ้งแล้วล้างซ้ำด้วยวิธีเดิมจนครบ 3 ครั้ง

3.1.3 การสกัดน้ำคั้นจากตัวอย่างใบส้มโอ

เช็ดตัวอย่างใบส้มโอให้สะอาด ใช้กรรไกรตัดเอาเฉพาะเส้นกลางใบ ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ชั่งให้ได้ 0.5 กรัม นำไปใส่ในโกร่งเย็นที่อบฆ่าเชื้อแล้วเติม extraction buffer 2 มิลลิลิตร บดให้ละเอียด เทน้ำคั้นที่ได้ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นแยก (centrifuge) ด้วยความเร็ว 7,000 g นาน 5 นาที ดูดน้ำใสด้านบนใส่ในหลุมเพลท ที่ผ่านการเคลือบ antibody แล้วจากข้อ 1 หลุมละ 200 ไมโครลิตร ตัวอย่างละ 2 หลุม จากนั้นเติม extraction buffer ในหลุมเปรียบเทียบ (blank) ตามด้วย positive check และ negative check ตามลำดับ เสร็จแล้วเก็บไว้ในตู้เย็น 1 คืน เมื่อครบเวลาเทของเหลวทิ้งแล้วล้างเพลทด้วย washing buffer ทำเหมือนในข้อ 2 จากนั้นเติมแอนติบอดีที่ติดเอ็นไซม์ (enzyme-labeled antibody)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.4 การเติม enzyme-labeled antibody

เจือจางแอนติบอดีที่ติดเอ็นไซม์ (Anti CTV conjugate; บริษัท BIOREBA, Switzerland) 1:1000 ด้วย conjugate buffer ดูดสารละลายที่ได้ใส่ในหลุม ๆ ละ 200 ไมโครลิตร เก็บไว้ในกล่องความชื้นที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา เทของเหลวทิ้งแล้วทำการล้างเพลทด้วย washing buffer ทำเหมือนในข้อ 2 จากนั้นเติม substrate

3.1.5 การเติม substrate

ละลาย p-nitrophenyle phosphate (PNPP) ใน substrate buffer อัตรา 1 มิลลิกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นดูดสารละลายที่ได้ใส่หลุมๆ ละ 200 ไมโครลิตร เก็บไว้ในกล่องความชื้นในที่มืดอุณหภูมิห้อง (18-25 องศาเซลเซียส) นาน 60 นาที เมื่อครบเวลานำไปอ่านค่าดูดกลืนแสง (optical density) ด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

3.2 การตรวจหาเชื้อไวรัสสาเหตุโรคทริสเตซ่าด้วยวิธี RT-PCR

การแยกสกัด dsRNA ใช้วิธีการซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีการของ Jordan and Dodds (1985) และ Valverde *et al*. (1990)

นำเส้นกลางใบพืชที่แสดงอาการโรค 1.5 กรัม บดด้วยโกร่งแช่เย็น (-20 องศาเซลเซียส) ที่มี extraction buffer (ภาคผนวก) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เมื่อบดละเอียดแล้วเทของเหลวที่ได้ใส่ในหลอดทดลอง (centrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 400 ไมโครลิตรต่อหลอด แล้วเติม phenol 400 ไมโครลิตร และ chloroform : pentanol (24:1) 200 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน ประมาณ 20-30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปใส่เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แยกของเหลวใสที่อยู่ด้านบนถ่ายลงในหลอดทดลองใหม่ เก็บส่วนของเหลวใส แล้วปรับให้ของเหลวใสมีความเข้มข้นเท่ากับ 16 เปอร์เซ็นต์ ethanol จากนั้นเติม cellulose CF-11 จำนวน 0.1 กรัม แล้วนำหลอดทดลองไปทำการผสมให้เข้ากันโดย vortex จำนวน 3 ครั้งในเวลา 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเก็บส่วนของตะกอน cellulose CF-11 แล้วทำการล้างตะกอนด้วย 1X STE ที่มี 16 เปอร์เซ็นต์ ethanol ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการ vortex แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำขั้นตอนนี้อีกครั้ง หลังจากล้างตะกอนครั้งสุดท้ายแล้ว ทำการชะ dsRNA ด้วยการเติม 1X STE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในตะกอน cellulose แล้ว vortex ให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ถ่ายส่วนของเหลวใสที่มี dsRNA ลงในหลอดใหม่ จากนั้นตกตะกอน dsRNA ด้วยการปรับให้สารละลายมีความเข้มข้นเท่ากับ 67 เปอร์เซ็นต์ ethanol (v/v) และปรับให้ของเหลวใสมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50mM sodium acetate แล้วนำไปเก็บที่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส อย่างน้อยที่สุดเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ต่อจากนั้นจึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จะได้ตะกอน dsRNA แล้วละลายตะกอนที่ได้ในน้ำกลั่นปริมาตร 30 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

การทำปฏิกิริยา RT- PCR

ทำการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกด้วยวิธี RT-PCR ด้วย forward primer AR18F (5'-ATGTCAGGCAGCTTGGGAAATT-3') และ reverse primer AR18R (5'-TTCGTGTCTAAGTCRCGCTAAACA-3'), (Roy *et al*., 2005) การเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกด้วยวิธี RT-PCR ประกอบด้วยสารละลายปริมาตรรวม 12.5 ไมโครลิตร ดังนี้

ส่วนประกอบ	**ปริมาตร (ไมโครลิตร)**
น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ	1.25
2x Reaction Mix	6.25
(a buffer containing 0.4 mM of each dNTP, 3.2 mM $MgSO_4$)	
5 mM $MgSO_4$	0.50
50 µM primer AR18F	1.00
50 µM primer AR18R	1.00
Super script™ III RT/ Platinum® *Tag* Mix	0.50
(1 ไมโครลิตร/ 1 unit)	
dsRNA ต้นแบบ	2.00
(0.01 พิโคกรัม – 1 ไมโครกรัม)	

เริ่มจากการนำไพร์เมอร์ทั้ง 2 ชนิด ชนิดละ 1 ไมโครลิตร และ dsRNA ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใส่รวมกันใน PCR tube นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส นาน 2-5 นาที จากนั้นย้ายมาวางบนน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว นาน 10 นาที หลังจากนั้นจึงใส่ master mix ปริมาตร 10 ไมโครลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผสมส่วนประกอบให้เข้ากันจากนั้นนำเข้าเครื่อง Programable Thermal Controller PTC-100^{TM} (MJ Research) ซึ่งมีเงื่อนไขในการทำปฏิกิริยา ดังนี้

1.reverse transcription	ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	นาน	30	นาที	
2.initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	นาน	2	นาที	
3.denaturation	ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	นาน	15	วินาที	จำนวน 40 รอบ
annealing	ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส	นาน	30	วินาที	
extension	ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส	นาน	1	นาที	
4.final extension	ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส	นาน	5	นาที	

การตรวจวิเคราะห์ผลผลิตจากการทำ RT-PCR (RT-PCR product)

ทำการตรวจวิเคราะห์ผลด้วยวิธี Gel electrophoresis โดยนำผลผลิตจากการทำ RT-PCR มา 10 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye 2 ไมโครลิตร แล้วแยกขนาดของดีเอ็นเอบน 1% agarose gel electrophoresis ใน 1X TBE buffer ความต่างศักย์ไฟฟ้า 50 โวลท์ นาน 90 นาที จากนั้นย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย ethidium bromide นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำนาน 5 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลตและบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel documentation (SYNGRNE; Gene Genius Bio Imagine System)

สถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยและรวบรวมข้อมูล

1. สวนเกษตรกรผู้ปลูกส้มโอ อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย
2. ห้องปฏิบัติการวิจัยและเทคโนโลยีชีวภาพ สาขาวิชาโรคพืช ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืชคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. ห้องปฏิบัติการกลาง ศูนย์ด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved