อุปกรณ์และวิธีการ

1. การพัฒนาเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (Polymerase Chain Reaction: PCR) **ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อย**

1.1 การเตรียมตัวอย่างพืชและแมลงที่ใช้ในการทดลอง

1.1.1 ตัวอย่างพืช

ทำการเก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการใบขาว ซึ่งคาดว่ามีสาเหตุเนื่องมาจากการติดเชื้อไฟโตพลาสมา และพืชปกติที่ไม่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาจากสถานที่ต่างๆ ตามตารางที่ 1 ภาพที่ 1 และภาพที่ 1.1 – 1.3 จากนั้นนำตัวอย่างพืชมาล้างน้ำทำความสะอาด , และตัดเป็นชิ้นเล็กๆ โดยจะใช้ส่วนก้านใบหรือส่วนที่เป็นท่อลำเลียงของพืช เนื่องจากเชื้อไฟโตพลาสมามีการเพิ่มปริมาณภายในเซลท่อลำเลียงอาหารของพืช จากนั้นนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อทำการสกัดดีเอ็นเอและตรวจต่อไป

1.1.2 ตัวอย่างแมลง

ทำการเก็บตัวอย่างแมลงปากดูดพวกเพลี้ยจักจั่นต่างๆ ในอันดับ Homoptera โดยใช้กับดักแสงไฟ (ภาพที่ 2) จากแปลงอ้อยของเกษตรกรหมู่บ้านคำไผ่ อำเภอกุมภวาปี จังหวัดอุดรธานี จากนั้นนำแมลงที่ดักจับได้มาแยกชนิด และคัดเลือกเอาเฉพาะแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) (ภาพที่ 3) เก็บรักษาแมลงไว้ใน 100% เอทธานอล และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อทำการสกัดดีเอ็นเอและตรวจต่อไป

1.2 การสกัดดีเอ็นเอ

1.2.1 ตัวอย่างพืช

วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากพืชนั้นได้ดัดแปลงจากวิธีการของ Kollar และคณะ (1990) โดยนำตัวอย่างพืชสดหรือพืชที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาหั่นเป็นชิ้นละเอียด จากนั้นบดตัวอย่างพืชกับไนโตรเจนเหลวในโกร่งบดยาให้ละเอียดเป็นผง ใส่ตัวอย่างพืชในหลอดทดลองขนาด 30 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์ 2% CTAB (ภาคผนวก ข) ที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วนำหลอดที่มีตัวอย่างพืชและสารละลายบัฟเฟอร์ 2% CTAB ไปบ่มไว้ที่ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำหลอดวางไว้ที่อุณหภูมิห้องให้เย็น

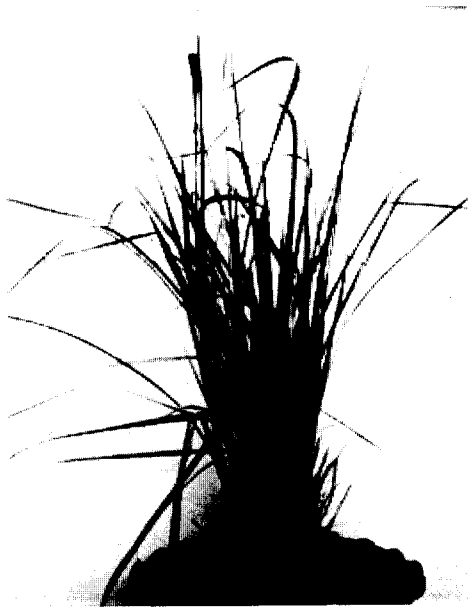
ตารางที่ 1 อาการของพืชที่แสดงอาการเป็นโรคที่คาดว่าเกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาที่เก็บจากสถานที่ต่างๆ

ชื่อพืช	ชื่อวิทยาศาสตร์	ลักษณะอาการ	สถานที่เก็บ
อ้อย	*Saccharum officinarum*	-แสดงอาการใบขาวแตกกอมากกว่าปกติ ลำต้นแคระแกรน -แตกกอมาก มีลักษณะเหมือนกอตะไคร้ ทั้งที่ใบยังมีสีเขียวปกติ -อาการด่างเหลืองเป็นทางยาวตามแนวเส้นใบ	-แปลงเกษตรกรในจังหวัดขอนแก่นและอุดรธานี
หญ้าข้อ	*Brachiaria distachya* (Linn.) Stapf	-อาการใบขาวทั้งส่วนใบและลำต้น ข้อและข้อดอกสั้นกว่าปกติ หรือไม่ออกดอก	-ศูนย์วิจัยพืชไร่จังหวัดขอนแก่นและอำเภอกุมภวาปี จังหวัดอุดรธานี
หญ้าแพรก	*Cynodon dactylon* (Linn.) Pers.	-อาการใบขาวทั้งใบและลำต้น	-ศูนย์วิจัยพืชไร่และแปลงทดลองพืชไร่ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น
หญ้าปากควาย	*Dactyloctenium aegyptium* (Linn.) Beauv.	-อาการใบขาวทั้งใบและลำต้น	-เขื่อนอุบลรัตน์อำเภอน้ำพองและศูนย์วิจัยพืชไร่ จังหวัดขอนแก่น
หญ้ามาเลเซีย	*Axonopus compressus* (Swartz)Beauv.	-อาการเหลืองถึงขาวทั้งใบและลำต้น	-บริเวณคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ตารางที่ 1 อาการของพืชที่แสดงอาการเป็นโรคที่คาดว่าเกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาที่เก็บจากสถานที่ต่างๆ (ต่อ)

ชื่อพืช	ชื่อวิทยาศาสตร์	ลักษณะอาการ	สถานที่เก็บ
หญ้าเจ้าชู้	*Chrysopogon aciculatus* (Retz.) Trin.	-อาการเหลืองซีดทั้งใบและลำต้น	-บริเวณคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น
หญ้าขน	*Brachiaria mutica* (Forsk.) Stapf.	-อาการเหลืองซีดทั้งใบและลำต้น	-บริเวณคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น
ผักปราบ	*Cyanotis axillaris* R.&S.	-อาการเหลืองทั้งใบและลำต้น	-บริเวณคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น
ตะไคร้หอม	*Cymbopogon nardus* Rendle	-อาการเหลืองถึงขาวที่ส่วนใบและก้านใบ	-บริเวณคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น
เซ่งใบมน	*Melochia corchorifolia* Linn.	-อาการด่างเหลืองที่ส่วนใบ	-บริเวณคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น

(1)

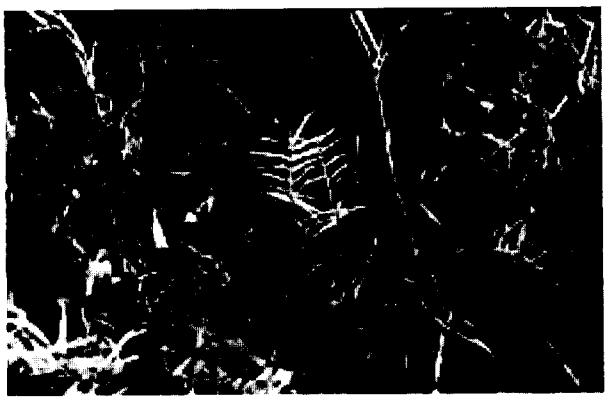


(2)

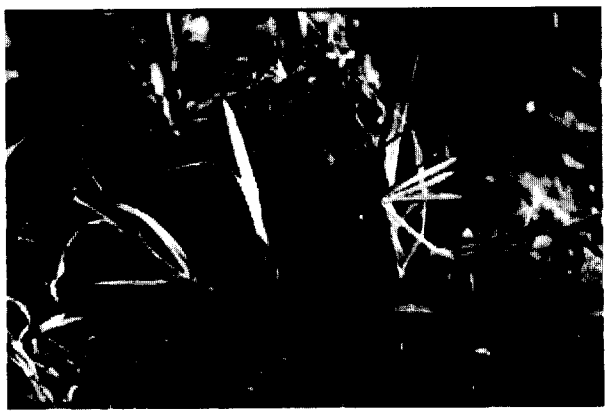
(3)

ภาพที่ 1 อาการของพืชที่แสดงอาการเป็นโรคที่คาดว่าเกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา หมายเลข (1)-(3) ได้แก่ อ้อยที่แสดงอาการใบขาว อ้อยแสดงอาการกอตะไคร้ และอ้อยแสดงอาการใบด่างเหลืองเป็นทางยาวตามแนวเส้นใบ ตามลำดับ

(1)

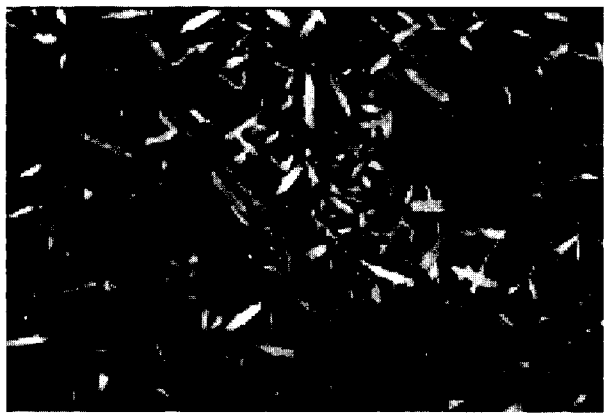


(2)



(3)

ภาพที่ 1.1 อาการของพืชที่แสดงอาการเป็นโรคที่คาดว่าเกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา หมายเลข (1)-(3) ได้แก่ หญ้าข้อที่แสดงอาการขาวทั้งส่วนใบและลำต้น หญ้าแพรกแสดงอาการขาวทั้งส่วนใบและลำต้น และหญ้าปากควายแสดงอาการขาวทั้งส่วนใบและลำต้น ตามลำดับ



(1)

(2)

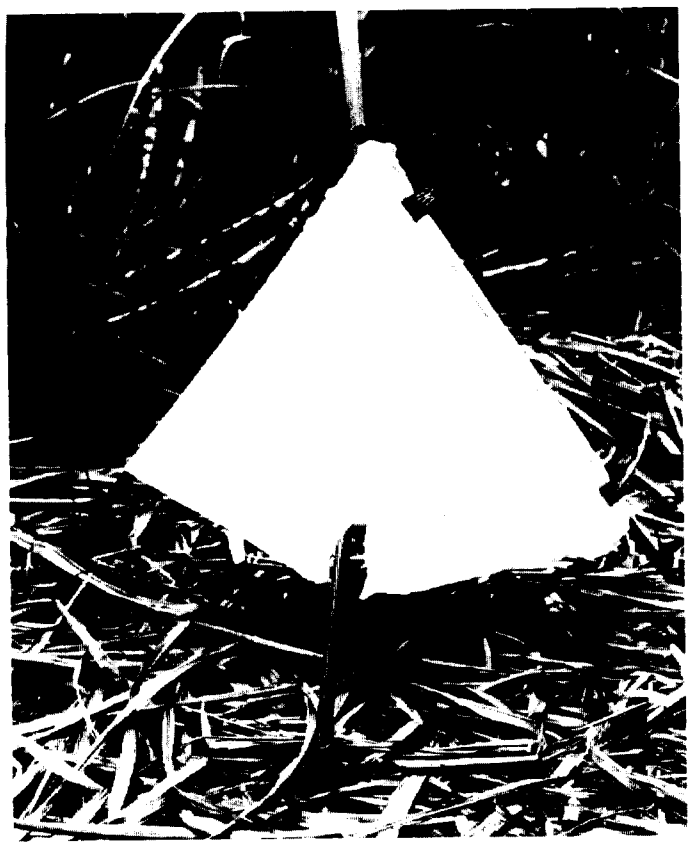
(3)

ภาพที่ 1.2 อาการของพืชที่แสดงอาการเป็นโรคที่คาดว่าเกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา หมายเลข (1)-(3) ได้แก่ หญ้ามาเลเซียที่แสดงอาการเหลืองถึงขาวทั้งส่วนใบและลำต้น หญ้าเจ้าชู้แสดงอาการเหลืองซีดทั้งส่วนใบและลำต้น และตะไคร้หอมแสดงอาการเหลืองถึงขาวที่ใบและก้านใบ ตามลำดับ

(1)

(2)

ภาพที่ 1.3 อาการของพืชที่แสดงอาการเป็นโรคที่คาดว่าเกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา หมายเลข (1)-(2) ได้แก่ ผักปราบที่แสดงอาการเหลืองทั้งส่วนใบและลำต้น และเซ่งใบมนแสดงอาการด่างเหลืองที่ส่วนใบ ตามลำดับ



ภาพที่ 2 กับดักแสงไฟที่ใช้ดักจับแมลงเพลี้ยจักจั่นในแปลงปลูกอ้อย

ภาพที่ 3 แมลงเพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura)

เติมสารละลายคลอโรฟอร์ม และ ไอโซเอมีลแอลกอฮอล์ (chloroform: isoamyl alcohol) อัตราส่วน 24:1 ให้เท่ากับปริมาตรสารละลายที่มีในหลอด เขย่าหลอดเบาๆให้สารผสมเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายชั้นบนเก็บในหลอดใหม่ แล้วเติมสาร isopropanol ลงไป 0.7 เท่าของปริมาตรสารละลายที่มีในหลอด เขย่าหลอดเบาๆ จะสังเกตเห็นตะกอนของดีเอ็นเอ นำหลอดไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นเก็บตะกอนดีเอ็นเอและเทสารละลายใสทิ้งไป ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 90% เอทธานอล ทิ้งไว้ 2 นาที แล้วนำหลอดไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทแอลกอฮอล์ทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนแห้งที่อุณหภูมิห้อง ย้ายตะกอนดีเอ็นเอใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-Ethylenediaminetetraacetic acid (TE) ที่มี RNase 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรผสมอยู่ในอัตราส่วน 200:1 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เพื่อขจัดอาร์เอ็นเอ เก็บรักษาดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.2.2 ตัวอย่างแมลง

วิธีการสกัดดีเอ็นเอของแมลง ได้ดัดแปลงตามวิธีการของ Maniatis และคณะ (1982) และ Henry และคณะ (1990) โดยนำตัวอย่างแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) ที่เก็บจากแปลงปลูกอ้อยหมู่บ้านคำไผ่ อำเภอกุมภวาปี จังหวัดอุดรธานี มาใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรต่อแมลงจำนวน 1 ตัว เติมสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับสกัดดีเอ็นเอของแมลง (ภาคผนวก ข) แล้วนำไปบดให้ละเอียดโดยใช้เครื่องบดแมลง และบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาปั่นระยะสั้น 1,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที เติมสารละลายฟีนอล, คลอโรฟอร์ม และ ไอโซเอมีลแอลกอฮอล์ (phenol: chloroform: isoamyl alcohol) อัตราส่วน 25:24:1 ในปริมาตรที่เท่ากันกับปริมาตรสารละลายที่มีในหลอด ผสมสารให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสชั้นบนในหลอดมาใส่หลอดใหม่ แล้วเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม และ ไอโซเอมีลแอลกอฮอล์ (chloroform: isoamyl alcohol) อัตราส่วน 24:1 ในปริมาตรเท่ากันกับปริมาตรสารละลายที่มีในหลอด ผสมสารให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนใสชั้นบนในหลอดมาใส่หลอดใหม่แล้วเติม 3M sodium acetate pH 5.2 จำนวน 1 ใน 10 ของปริมาตรสารละลายในหลอด ผสมสารให้เข้ากัน และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

(๗๗
SB
๕๗๖

เติม isopropanol เท่ากับปริมาตรสารละลายที่มีในหลอด ผสมสารให้เข้ากันและนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 ชั่วโมง นำไปปั่นให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที จะสังเกตเห็นตะกอนดีเอ็นเอที่ก้นหลอด ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอทธานอล แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทแอลกอฮอล์ออกให้หมด และทิ้งไว้สักครู่ให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ TE ที่มี RNase 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรผสมอยู่ในอัตราส่วน 200:1 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 1 ชั่วโมง เพื่อขจัดอาร์เอ็นเอ และเก็บรักษาดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

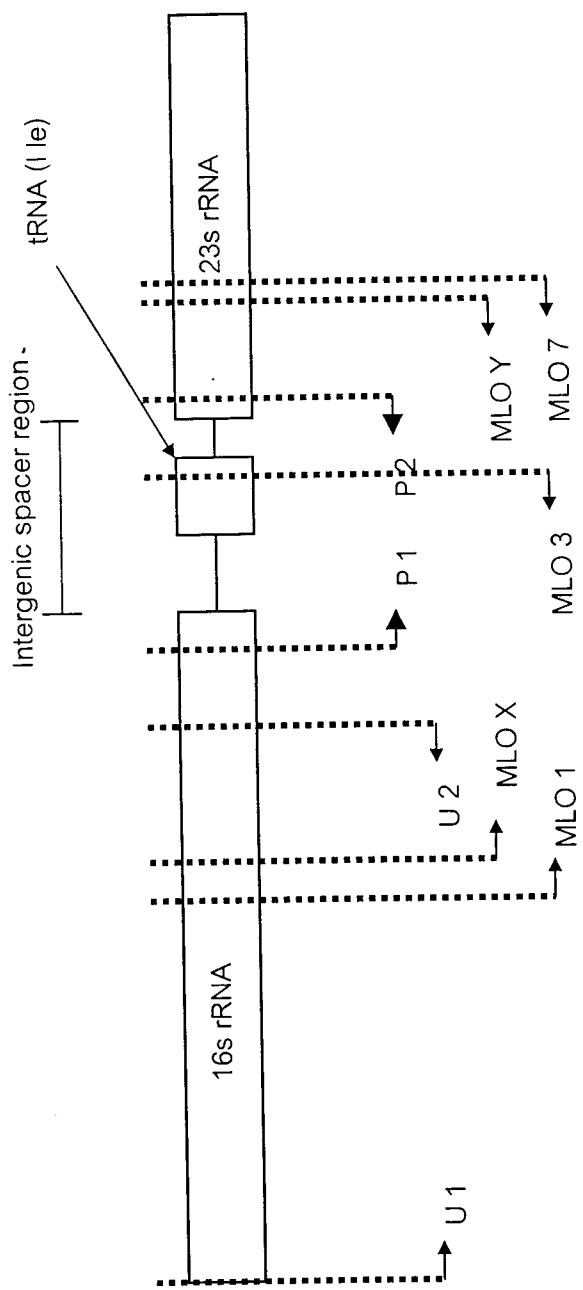
นำตัวอย่างดีเอ็นเอของพืช และแมลงที่สกัดได้ มาตรวจปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีการอิเล็กโตรโฟรีซีส (electrophoresis) บน 0.8% agarose gel ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris borate ethylenediaminetetraacetic acid (TBE) ที่มี ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรผสมอยู่ แล้วนำไปตรวจดูปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต พร้อมบันทึกภาพ

1.3 **การคัดเลือก** Primer

1.3.1 primer ที่ใช้ตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวอย่างพืช (ภาพที่ 4) มีดังนี้

1. universal primer เป็น primer ที่สังเคราะห์มาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ส่วนของยีน 16s rRNA (U1, U2) ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของ universal primer ได้อ้างจากรายงานของ Namba และคณะ (1993) โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ 5'- 3': GTT TGA TCC TGG CTC AGG ATT และ 5'- 3': AAC CCC GAG AAC GTA TTC ACC

2. specific MLO primer มี 2 ชุด ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของ specific MLO primer แต่ละชนิดได้มาจากการสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเปรียบเทียบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมาที่มีในธนาคารยีน ได้แก่ ชุดที่ 1 primer ของเชื้อไฟโตพลาสมา ซึ่งสังเคราะห์มาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ระหว่างยีน 16s rRNA และ Intergenic spacer region (MLO 1, MLO 3) โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ 5'- 3': CAG GTG GTG CAT GGT TGT CGT C และ 5'- 3': GAA CCA CCG ACC TCA CGC TTA TC 3' และชุดที่ 2 primer ของเชื้อไฟโตพลาสมา ซึ่งสังเคราะห์มาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ระหว่างยีน 16s rRNA และ 23s rRNA (MLO 1, MLO 7) โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ 5'- 3': CAG GTG GTG CAT GGT TGT CGT C และ 5'- 3': CGT CCT TCA TCG GCT CTT



ภาพที่ 4 แผนที่แสดงตำแหน่งของ primer ที่ใช้ในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบตูมของข้าวโพด

1.3.2 primer ที่ใช้ตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวอย่างแมลง โดยปฏิกิริยา nested PCR มี 2 ชุด ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของ specific MLO primer แต่ละชนิดได้มาจากการสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 4) โดยเปรียบเทียบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมาที่มีในธนาคารยีน ดังนี้

1. ชุด primer U 1, MLO 7 เป็น specific MLO primer ของเชื้อไฟโตพลาสมา ที่ใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในครั้งแรก ซึ่ง primer U 1 และ MLO 7 นั้นสังเคราะห์มาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ระหว่างยีน 16s rRNA และ 23s rRNA โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ 5'- 3': GTT TGA TCC TGG CTC AGG ATT และ 5'- 3': CGT CCT TCA TCG GCT CTT และชุด primer MLO 1, MLO 3 ซึ่งเป็น specific MLO primer ของเชื้อไฟโตพลาสมา ที่ใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในครั้งที่สอง ซึ่ง primer MLO 1 และ MLO 3 นั้นสังเคราะห์มาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ระหว่างยีน 16s rRNA และ Intergenic spacer region โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ 5'- 3': CAG GTG GTG CAT GGT TGT CGT C และ 5'- 3': GAA CCA CCG ACC TCA CGC TTA TC

2. ชุด primer MLO X, MLO Y เป็น specific MLO primer ของเชื้อไฟโตพลาสมา ที่ใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในครั้งแรก ซึ่ง primer MLO X และ MLO Y สังเคราะห์มาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ระหว่างยีน 16s rRNA และ 23s rRNA โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ 5'- 3': GTT AGG TTA AGT CCT AAA ACG AGC และ 5'- 3': GTG CCA AGG CAT CCA CTG TAT GCC และชุด primer P1, P2 ซึ่งเป็น specific MLO primer ของเชื้อไฟโตพลาสมา ที่ใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในครั้งที่สอง ซึ่ง primer P 1 และ P 2 นั้นสังเคราะห์มาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ระหว่างยีน 16s rRNA และ 23s rRNA โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ 5'- 3': GTC GTA ACA AGG TAT CCC TAC CGG และ 5'- 3': GGT GGG CCT AAA TGG ACT TGA ACC

1.4 ปรับความเหมาะสมระดับความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ (magnesium chloride) ในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (PCR)

ทำการปรับระดับความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ในปฏิกิริยา PCR ให้เหมาะสมกับ primer แต่ละชนิดที่ใช้ โดยใช้ระดับความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ ตั้งแต่ 1.5-4 mM ซึ่งทำการทดลองเป็นจำนวน 3 ซ้ำในแต่ละระดับความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์

1.5 ปรับโปรแกรมที่เหมาะสมในปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (PCR) สำหรับการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา

ทำการปรับเปลี่ยนโปรแกรมของปฏิกิริยา PCR ซึ่งได้แก่ อุณหภูมิในช่วง annealing ที่เหมาะสมกับ primer แต่ละชนิด และ จำนวนรอบของปฏิกิริยา PCR เพื่อให้เหมาะสมกับ primer แต่ละชนิด โดยทำการทดลองเป็นจำนวน 3 ซ้ำในแต่ละช่วงอุณหภูมิของ annealing และจำนวนรอบของปฏิกิริยา ของ primer แต่ละชนิด

2. การตรวจชนิดของพืชอาศัยและแมลงพาหะของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อยโดยเทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (PCR)

การตรวจชนิดของพืชอาศัยและแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่นของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อย โดยเทคนิค PCR ได้ดัดแปลงตามวิธีของ Innis และ Gelfand (1990) ดังนี้

2.1 การตรวจพืช

ตรวจพืชอาศัยของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อย ในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่แสดงอาการใบขาว โดยนำดีเอ็นเอของพืชชนิดต่างๆที่สกัดได้ มาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ชุด primer U 1, U 2, ชุด primer MLO 1, MLO 3 และชุด primer MLO 1, MLO 7 ซึ่งในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอของพืชจำนวน 25 นาโนกรัม, dATP dGTP dCTP และ dTTP อย่างละ 2 มิลลิโมลาร์, primer ชนิดละ 2.5 ไมโครโมลาร์, *Taq* DNA polymerase ของบริษัท Promega, Madison, USA จำนวน 1 ยูนิต ใน 1XPCR buffer ที่มีสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมกับ primer แต่ละชุด หลังจากผสมสารละลายทั้งหมดเข้ากันแล้ว เติม mineral oil ในอัตราส่วน 1:1 ของปริมาตรสารละลายทั้งหมดในปฏิกิริยา จากนั้นนำไปใส่ในเครื่อง PCR กำหนดอุณหภูมิเป็นรอบตามโปรแกรมที่เหมาะสมกับ primer แต่ละชุด และในการทดลองแต่ละครั้งได้ทำปฏิกิริยา PCR เพิ่มจากเดิมเป็นจำนวน 2 หลอด เพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบในการทดลอง โดยหลอดที่ 1 ในส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ไม่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมาย และหลอดที่ 2 ในส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมาย ซึ่งได้แก่ ดีเอ็นเอของอ้อยที่แสดงอาการใบขาว

2.2 การตรวจแมลงพาหะ

ตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อยในแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) ที่พบในแปลงอ้อย โดยนำดีเอ็นเอของแมลงพาหะ

M. hiroglyphicus (Matsumura) ที่สกัดได้มาทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี nested PCR โดยใช้ชุด primer จำนวน 2 ชุด ชุดแรกคือ ชุด primer U 1, MLO 7 ที่ใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในครั้งแรก และนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในครั้งแรกมาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในครั้งที่สองด้วยชุด primer MLO 1, MLO 3 ส่วนชุดที่สองคือ ชุด primer MLO X, MLO Y ที่ใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในครั้งแรก และนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในครั้งแรกมาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์สำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในครั้งที่สองด้วยชุด primer P 1, P 2 ซึ่งในปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอของแมลงจำนวน 25 นาโนกรัม, dATP dGTP dCTP และ dTTP ชนิดละ 2.5 มิลลิโมลาร์, primer ชนิดละ 2.5 ไมโครโมลาร์, *Taq* DNA polymerase ของบริษัท Promega, Madison, USA จำนวน 1 ยูนิต ใน 1XPCR buffer ที่มีสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมกับ primer แต่ละชุด หลังจากผสมสารละลายทั้งหมดเข้ากันแล้ว เติม mineral oil ในอัตราส่วน 1:1 ของปริมาตรสารละลายทั้งหมดในปฏิกิริยา จากนั้นนำไปใส่ในเครื่อง PCR กำหนดอุณหภูมิเป็นรอบตามโปรแกรมที่เหมาะสมกับ primer แต่ละชุด ซึ่งในการทดลองแต่ละครั้งได้ทำปฏิกิริยา PCR เพิ่มจากเดิมเป็นจำนวน 2 หลอด เพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบในการทดลอง โดยหลอดที่ 1 ในส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ไม่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมายอยู่ และหลอดที่ 2 ในส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป้าหมายอยู่ ซึ่งได้แก่ ดีเอ็นเอของอ้อยที่แสดงอาการใบขาว

หลังจากเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของพืชและแมลงแล้ว ตรวจผลิตภัณฑ์ PCR โดยใช้วิธีการอิเล็กโตรโฟรีซีส (electrophoresis) บน 1% หรือ 1.5% agarose gel ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ที่มี ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปตรวจดูภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต พร้อมบันทึกภาพ

3. การศึกษาชนิดและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย พืชอื่นๆ และแมลงพาหะ

3.1 ศึกษาชนิด และ ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย และพืชอื่นๆ โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme)

ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย และพืชชนิดต่างๆ โดยนำผลิตภัณฑ์ PCR ของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยและในพืชชนิดต่างๆ ที่มีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16s rRNA กับส่วนที่อยู่ระหว่างยีน 16s rRNA และ Intergenic spacer region โดยใช้ชุด primer U 1, U 2 กับชุด primer MLO 1, MLO 3 ตามลำดับ มาทำการ

ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆจำนวน 15 ชนิด ได้แก่ *Msp* I, Rsa I, *Alu* I, *Acc* I, Hpa I, *Hpa* II, *Dra* I, *Xba* I, *Bgl* I, *Eco*R I, *Kpn* I, *Sal* I, *Bam*H I, *Hind* III, และ *Taq* I ซึ่งในปฏิกิริยาประกอบด้วย ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR จำนวน 1 ไมโครกรัม, เอนไซม์แต่ละชนิด ปริมาณ 1 ใน 20 ส่วนของปริมาตรของสารผสมทั้งหมดในปฏิกิริยา, 10X buffer ของเอนไซม์แต่ละชนิด ปริมาณ 1 ใน 10 ส่วนของปริมาตรของสารผสมทั้งหมดในปฏิกิริยา และเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้ครบตามปริมาตรที่ต้องการ จากนั้นนำหลอดที่มีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังกล่าว ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 หรือ 65 องศาเซลเซียส ขึ้นกับการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์แต่ละชนิด เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยหลังจากตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ของพืชชนิดต่างๆ ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆแล้ว ตรวจชิ้นส่วนดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ถูกตัดโดยใช้วิธีการอิเล็กโตรโฟรีซีส บน 1.5% agarose gel ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ที่มี ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปตรวจดูภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต พร้อมบันทึกภาพ

3.2 ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย พืชอื่นๆ และแมลงพาหะ โดยวิธีการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing)

ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequencing) ของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย พืชชนิดต่างๆ และแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) โดยนำผลิตภัณฑ์ PCR ของพืชที่มีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ในส่วนที่อยู่ระหว่างยีน 16s rRNA และ 23s rRNA โดยใช้ชุด primer MLO 1, MLO 7 และผลิตภัณฑ์ PCR ของแมลงที่มีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ในส่วนที่อยู่ระหว่างยีน 16s rRNA และ Intergenic spacer region โดยใช้ชุด primer MLO 1, MLO 3 มาทำตามขั้นตอนดังนี้

3.2.1 การทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธีการทำอิเล็กโตรโฟรีซีสใน 1% agarose gel ที่มีจุดหลอมเหลวต่ำ

เตรียม 1% agarose gel ที่มีจุดหลอมเหลวต่ำ ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE เสร็จแล้วนำผลิตภัณฑ์ PCR มาตรวจโดยใช้วิธีการอิเล็กโตรโฟรีซีส (electrophoresis) เพื่อแยกแถบดีเอ็นเอออกจากแถบอื่นๆ จากนั้นตัดชิ้นส่วนวุ้นที่มีแถบดีเอ็นเอเป้าหมายภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต แล้วนำชิ้นส่วนวุ้นเก็บในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร และนำไปเก็บที่อุณหภูมิต่ำ -80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หรือเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 1-2 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดทดลองมาวางที่อุณหภูมิห้องสักครู่ เติมสารละลายบัฟเฟอร์ TE ลงไป และ

บดวุ้นให้เป็นชิ้นเล็กๆโดยใช้ไม้บด จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร (vortex) ประมาณ 1-2 นาที แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ประมาณ 10 นาที จากนั้นย้ายสารละลายใสชั้นบน (supernatant) เก็บในหลอดอันใหม่และเติม 3M sodium acetate ลงไป 1 ใน 10 ของปริมาตรสารละลายที่มีในหลอด และเติม 100% เอทธานอล ลงไป 2 เท่าของปริมาตรสารละลายที่มีในหลอด ผสมให้เข้ากัน และนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นเทสารละลายใสออกเก็บตะกอนดีเอ็นเอไว้ แล้วเติม 70 % เอทธานอล เขย่าหลอดเบาๆให้ตะกอนดีเอ็นเอหลุดออกจากก้นหลอด นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ประมาณ 10 นาที จากนั้นดูดสารละลายใสออก ทิ้งให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ เสร็จแล้วตรวจปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ทำให้บริสุทธิ์บน 1% agarose gel ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ที่มี ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และนำไปตรวจดูภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต

3.2.2 การเชื่อมต่อ (ligation) ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR เข้าในพลาสมิด pBluescript II vector

หลังจากทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์โดยวิธีการอิเล็กโตรโฟรีซีสใน 1% agarose gel ที่มีจุดหลอมเหลวต่ำแล้ว เติมผลิตภัณฑ์ PCR ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วจำนวน 1 ไมโครลิตร (ประมาณ 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) ลงในหลอดทดลองขนาด 0.5 ไมโครลิตร และเติมสารละลายบัฟเฟอร์ (10X buffer: Takara DNA blunting kit) จำนวน 1 ไมโครลิตร ลงไป ผสมให้เข้ากัน แล้วนำหลอดที่มีผลิตภัณฑ์ PCR และสารละลายบัฟเฟอร์ผสมอยู่ไปปั่นตกตะกอนเล็กน้อย นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และย้ายไปเก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นนำหลอดทดลองที่มีผลิตภัณฑ์ PCR และสารละลายบัฟเฟอร์ผสมอยู่ มาวางบนน้ำแข็ง เติมเอ็นไซม์ T4 DNA Polymerase จำนวน 0.5 ไมโครลิตรลงไป ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำหลอดไปเก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วนำไปวางบนน้ำแข็งอีกครั้ง แล้วเติมพลาสมิด pBluescript II vector ที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*R V และสารละลาย ligation ที่มีใน Takara DNA blunting kit ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นตกตะกอนเล็กน้อย จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เสร็จแล้วดูดสารละลายผสมที่อยู่ในหลอด มาใส่ในหลอดทดลองใหม่ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ TE และสารละลายใสของฟีนอล และคลอโรฟอร์ม (phenol: chloroform) ผสมอยู่ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากัน และนำไปปั่นตกตะกอนเล็กน้อย จากนั้นดูดสารละลายใสมาเติมลงไปในหลอดทดลองใหม่ที่มี 3M sodium

acetate และ 100% เอทธานอล ผสมอยู่ในอัตราส่วน 1:20 ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จะสังเกตเห็นตะกอนดีเอ็นเอสีขาว ดูดสารละลายทิ้งไป แล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอทธานอล เขย่าหลอดเบาๆ จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ดูดแอลกอฮอล์ทิ้งไป ผึ่งให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง และละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ผ่านการเชื่อมต่อกับพลาสมิด pBluescript II vector แล้ว ไปทำการถ่ายเข้าสู่เชื้อแบคทีเรียชนิด *Escherichia coli* เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาต่อไป

3.2.3 การถ่ายพลาสมิดของเชื้อไฟโตพลาสมา เข้าสู่เชื้อแบคทีเรียชนิด *Escherichia coli* และการแยกพลาสมิดดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์

นำหลอดที่มี competent cell ของเชื้อแบคทีเรียชนิด *E. coli* สายพันธุ์ JM 109 จากตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาทิ้งให้ละลายบนน้ำแข็ง จากนั้นดูด competent cell ของเชื้อแบคทีเรียชนิด *E. coli* สายพันธุ์ JM 109 ลงไปในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่แช่เย็นอยู่บนน้ำแข็ง เติมพลาสมิดที่ผ่านการเชื่อมต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ลงไปจำนวน 20 นาโนกรัม กวนให้เข้ากันเบาๆ และทิ้งไว้ในน้ำแข็งนาน 30 นาที เสร็จแล้วนำหลอดที่มีสารละลายผสมไปอุ่นที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที แล้วรีบนำหลอดที่มีสารละลายผสม มาแช่น้ำแข็งเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิด SOC (ภาคผนวก ก) ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำหลอดไปใส่ในเครื่องเขย่าสารที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมงเพื่อเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรีย ระหว่างทำการเลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรีย ให้ดูดสารละลาย 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-gal) และ Isopropyl-1-thio-β-D-galactoside (IPTG) ที่ผสมกันในอัตราส่วน 1:1 มาเกลี่ยลงบนอาหารวุ้นชนิด Luria-Bertani (LB) (ภาคผนวก ก) สำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งมีสารปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมอยู่ ทิ้งให้แห้ง เสร็จแล้วดูดเซลของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ SOC มาเกลี่ยลงบนอาหารวุ้นชนิด LB ดังกล่าว จากนั้นนำไปบ่มที่ตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ค้างคืน จะปรากฏโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียทั้งที่มีสีขาวและสีน้ำเงินเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ย้ายเฉพาะโคโลนีที่มีสีขาวของเชื้อแบคทีเรีย มาใส่ลงในอาหารเหลวชนิด LB (ภาคผนวก ก) สำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ที่มีสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมอยู่ในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร โดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วแตะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารวุ้น แล้วนำไปเกลี่ยที่ข้างหลอดทดลอง ให้เชื้อ

แบคทีเรียผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณในเครื่องเขย่าสารที่ความเร็ว 225 รอบต่อนาที และที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ค้างคืน เสร็จแล้วนำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิด LB ที่มีเชื้อแบคทีเรียเจริญอยู่ มาแยกเอาพลาสมิดดีเอ็นเอออก โดยนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที จากนั้นละลายตะกอนของพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลายผสมของ 10% SDS, 10M NaOH, และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาณ 200 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารละลายผสมของ 5M potassium acetate, acetic acid, และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ในอัตราส่วน 5:1:2 ปริมาณ 150 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันอีกครั้ง จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เสร็จแล้วดูดสารละลายใสไปใส่ในหลอดทดลองใหม่ แล้วเติม 100% เอทธานอล จำนวน 800 µl ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นตกตะกอน ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดสารละลายใสทิ้งไปแล้วล้างตะกอนพลาสมิดดีเอ็นเอด้วย 70% เอทธานอล จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอน ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาทีอีกครั้ง ดูดสารละลายใสทิ้งไป และละลายพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำพลาสมิดดีเอ็นเอมาตรวจโดยวิธีการอิเล็กโตรโฟรีซีส บน 1% agarose gel ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ที่มี ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และตรวจภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต เพื่อดูความเข้มข้นของพลาสมิด ถ้าพบว่ามีอาร์เอ็นเอให้ขจัดอาร์เอ็นเอออกจากพลาสมิดดีเอ็นเอ

3.2.4 การขจัดอาร์เอ็นเอของแบคทีเรียออกจากพลาสมิดดีเอ็นเอ

นำหลอดทดลองที่มีตัวอย่างพลาสมิดดีเอ็นเอที่จะขจัดอาร์เอ็นเอ มาเติมสารละลายผสมของเอนไซม์ RNase ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ในอัตราส่วน 1:10 จากนั้นนำหลอดทดลองที่มีสารละลายผสมดังกล่าว ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง และนำมาทำการขจัดอาร์เอ็นเอด้วยการกรองด้วยวุ้น (gel filtration) โดยนำวุ้น (Sepharose CL2-B) มาเขย่าเบาๆ ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเทวุ้นลงในคอลัมน์ ให้มีความสูงประมาณ 3.5 เซนติเมตร รอจนวุ้นแข็ง แล้วใส่แผ่นกรองลงบนผิวหน้าของวุ้นที่แข็งภายในคอลัมน์ ล้างวุ้นด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE และรอให้สารละลายบัฟเฟอร์ TE ไหลผ่านแผ่นกรองออกมาให้หมด เสร็จแล้วเติมตัวอย่างพลาสมิดดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ RNase แล้วลงบนแผ่นกรองที่อยู่ในคอลัมน์ รอให้ตัวอย่างพลาสมิดดีเอ็นเอไหลผ่านแผ่นกรองออกมาให้หมด จากนั้นล้างวุ้นด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE และรอให้สารละลายบัฟเฟอร์ TE ไหล

ผ่านแผ่นกรองออกมาให้หมด เสร็จแล้วเติมสารละลายบัฟเฟอร์ TE ลงบนแผ่นกรองอีกครั้ง และใช้หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร รองรับสารละลายบัฟเฟอร์ TE ที่ไหลผ่านออกมาจากคอลัมน์ให้หมด จากนั้นเติมสารละลาย 3M Sodium acetate ลงไปปริมาณ 1 ใน 10 ของปริมาตรสารละลายที่มีในหลอด และเติม 100% เอทธานอล ปริมาณ 2 เท่าของปริมาตรสารละลายที่มีในหลอด ผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายทิ้งและล้างตะกอนพลาสมิดดีเอ็นเอด้วย 70% เอทธานอล เขย่าเบาๆและนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นดูดแอลกอฮอล์ทิ้งและผึ่งตะกอนให้แห้ง แล้วละลายตะกอนพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นตรวจความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส บน 1% agarose gel ในสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ที่มี ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และตรวจดูพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต

3.2.5 **การติดฉลากดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR โดยวิธีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (PCR) และทำให้บริสุทธิ์ เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ในการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์**

เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ใช้สำหรับตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ ผสมลงในหลอดทดลองขนาด 0.5 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย 5X Sequencing buffer, สารละลาย dNTP ซึ่งได้แก่ A C G และ T dye terminator, เอนไซม์ Taq DNA polymerase ของ ABI PRISM™ Dye terminator Cycle sequencing Core Kit, น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ, ผลิตภัณฑ์ PCR ที่บริสุทธิ์ จำนวน 20-50 นาโนกรัม และ primer ชนิดละ 3.3 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ซึ่ง primer ที่ใช้ในพืช เป็น primer ที่สังเคราะห์มาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่บนตำแหน่ง multiple cloning ของพลาสมิด pBluescript โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ 5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3' และ 5' AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG 3' ส่วน primer ที่ใช้ในแมลง เป็น primer ที่สังเคราะห์มาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ระหว่างยีน 16s rRNA และ Intergenic spacer region โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์คือ 5' CAG GTG GTG CAT GGT TGT CGT C 3' และ 5' GAA CCA CCG ACC TCA CGC TTA TC 3' ผสมสารต่างๆให้เข้ากัน และนำไปปั่นตกตะกอนเล็กน้อย จากนั้นเติม mineral oil ในอัตราส่วน 1:1 ของปริมาตรสารละลายทั้งหมดในปฏิกิริยา นำหลอดทดลองที่มีสารผสมของปฏิกิริยา PCR ใส่ในเครื่อง PCR และเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอตามโปรแกรมคือ ช่วง Denaturation ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีในรอบแรก ในรอบต่อๆไปใช้เวลา 30 วินาที, ช่วง Annealing ที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

และช่วง Extension ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วินาที ทั้งหมดเป็นจำนวน 25 รอบ เสร็จแล้วนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ติดฉลากแล้วมาทำให้บริสุทธิ์ โดยเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายผสมของฟีนอล, คลอโรฟอร์ม และน้ำกลั่น (phenol: chloroform: water) ในอัตราส่วน 1:1:1 และเติม 3M sodium acetate จำนวน 1 ใน 10 ของปริมาตรสารละลายที่มีในหลอด จากนั้นจึงเติมผลิตภัณฑ์ PCR ที่จะทำให้บริสุทธิ์ลงในหลอดที่มีสารละลายผสมดังกล่าว ผสมสารในหลอดทดลองให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที จากนั้นย้ายสารละลายใสชั้นบนเก็บในหลอดทดลองใหม่ แล้วเติม 100% เอทธานอล ปริมาณ 2 เท่าของปริมาตรสารละลายที่มีในหลอด ผสมสารให้เข้ากันและนำไปปั่นตกตะกอนที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 6 นาที เสร็จแล้วดูดสารละลายใสชั้นบนทิ้งและล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% เอทธานอล นำไปปั่นให้ตะกอนดีเอ็นเอตกลงที่ก้นหลอดอีกครั้ง แล้วดูดแอลกอฮอล์ทิ้งอย่างระมัดระวัง ผึ่งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลายผสมของ formamide และ EDTA ในอัตราส่วน 5:1 จากนั้นนำหลอดที่มีตัวอย่างดีเอ็นเอไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที และนำไปวางบนน้ำแข็งทันทีก่อนที่จะนำตัวอย่างดีเอ็นเอไปหยดลงบน 4% polyacrylamide gel ในเครื่องหาลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติ ของ ABI PRISM™

3.2.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชและแมลงพาหะ

ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยคัดเลือกโคลนของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่แสดงอาการกอตะไคร้ และอ้อย หญ้าข้อ หญ้าแพรก และหญ้าปากควายที่แสดงอาการใบขาว รวมทั้งเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* (Matsumura) ที่ผ่านการถ่ายลงในเชื้อแบคทีเรียชนิด *Escherichia coli* เป็นจำนวน 7, 11, 5, 6, 6 และ 12 โคลน ตามลำดับ มาตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้เครื่องตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติของ ABI PRISM™ จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตรวจได้ในแต่ละโคลนของเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชแต่ละชนิด และในแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* (Matsumura) มาทำการตรวจและจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อใช้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวแทนของเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชแต่ละชนิดและในแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* (Matsumura) แล้วนำผลที่ได้มาทำการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และสร้างเป็น dendrogram แสดงความ

สัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย พืชอื่นๆ และแมลงพาหะ โดยใช้โปรแกรม DNAMAN ของ Lynnon Biosoft, Quebec, Canada