บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการศึกษา

วัสดุอุปกรณ์

1. พืชทดลอง

1.1 พืชทดลองที่ติดเชื้อไวรัส

Malvastrum coromandelianum (L.) Garcke. ที่แสดงอาการเส้นใบเหลือง เก็บจากพื้นที่เขตดอนเมือง กรุงเทพฯ ในปีพ.ศ. 2545 นำมาปลูกและทำการศึกษา ณ เรือนทดลองที่สามารถกันแมลงศัตรูพืชได้ของกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ โดยพืชตัวอย่างได้รับการพ่นยาฆ่าแมลงและใส่ปุ๋ยทุกสัปดาห์

1.2 พืชทดลองสำหรับถ่ายทอดเชื้อไวรัส

เมล็ดพันธุ์พืชทดลองที่ได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มงานไวรัสวิทยา:

- *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench (กระเจี๊ยบเขียว)
- *Capsicum frutescens* L. var. (พริกขี้หนูห้วยศรีทน)
- *Citrullus vulgaris* Schrad. (แตงโมลาย)
- *Cucumis melo* L. (แตงไทย)
- *Cucumis sativus* L. (แตงกวาลูกใหญ่)
- *Cucurbita moschata* Duchesne (ฟักทอง)
- *Datura metel* L. (ลำโพง)
- *Gossypium barbadense* L. (ฝ้ายพันธุ์ DPSL)
- *Gossypium hirsutum* L. (ฝ้ายพันธุ์ Pima)
- *Luffa acutangula* L. Roxb. (บวบเหลี่ยม)
- *Luffa cylindrica* (L.) M.Roem. (บวบหอม)
- *Lycopersicon esculentum* Mill. (มะเขือเทศสีดา)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- *Nicotiana benthamiana* Domin. (ยาสูบ)
- *Nicotiana glutinosa* L. (ยาสูบใบเล็ก)
- *Nicotiana rustica* L. (ยาสูบ)
- *Nicotiana tabacum* L. (ยาสูบใบใหญ่ พันธุ์ White Burley)
- *Solanum melongena* L. (มะเขือม่วง)
- *Solanum xanthocarpum* Schrad. & Wendl. (มะเขือเปราะเจ้าพระยา)

เมล็ดพันธุ์พืชทดลองที่ได้จากการเก็บตัวอย่างในภาคสนาม:

- *Abelmoschus moschatus* Medik. Subsp. *Tuberosus* (Span) Borss. Waalk. (โสมชบา)
- *Malachra capitata* L.
- *Malvastrum coromandelianum*

พืชทดลองที่ได้จากการปักชำ:

- *Hitbiscus rosa-sinensis* L. (ชบา)

(โดยนำกิ่งพันธุ์มาจากตึกไรโซเบียม และได้รับการตรวจสอบว่าปลอดโรค)

พืชทดลองทั้งหมดได้ปลูกและทำการศึกษา ณ เรือนทดลองที่สามารถกันแมลงศัตรูพืชได้ของกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ โดยพืชตัวอย่างได้รับการใส่ปุ๋ยทุกสัปดาห์

2. วัสดุอุปกรณ์

2.1 อุปกรณ์

2.1.1 อุปกรณ์สำหรับการศึกษาสมบัติทางชีวภาพของไวรัส

- โกร่งบด
- Grid box
- หลอดดูดแมลง (Aspirator)
- กล่องเก็บแมลง
- ขวดแก้ว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- เครื่องเขย่าสาร (Vortex mixer)
- ตู้เย็นอุณหภูมิ -20^{0}C
- เครื่องชั่งไฟฟ้า
- Microcentrifuge tube
- กระบอกตวง
- แท่นให้ความร้อนและคนสาร (Hot plate & stirrer)
- ไมโครปิเปตและทิป (Micropipette and tip)
- ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่าง (Deep freezer) อุณหภูมิ –70^{0}C
- เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิความเร็วสูง (Refrigerated ultra speed centrifuge)

2.2.2 อุปกรณ์สำหรับการศึกษาสมบัติระดับโมเลกุลของไวรัส

- ตู้เลี้ยงเชื้อ (Incubator)
- โกร่งบด
- เครื่อง Autoclave
- ตู้เย็นอุณหภูมิ -20^{0}C
- พลาสติกห่ออาหาร (Wrap)
- Microcentrifuge tube
- ขวดแก้ว
- กระบอกตวง
- ตู้อบ (Oven 180^{0}C)
- ตู้อบ (Oven 80^{0}C)
- อลูมิเนียม ฟอล์ย (Aluminium foil)
- X-ray film (Kodak, New York, USA)
- Polaroid film (FujiFilm FP-3000, Fuji Photo Film Co., LTD, Tokyo, Japan)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
- ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บตัวอย่าง (Deep freezer) อุณหภูมิ –70^{0}C
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิสำหรับทำ Hybridization (Hybridization oven)
- ชุดแยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้า (DNA electrophoresis)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- เครื่องชั่งไฟฟ้า เครื่องเขย่าสาร (Vortex mixer)
- แท่นให้ความร้อนและคนสาร (Hot plate & stirrer)
- แผ่นไนลอนเมมเบรน (Hybond N^+, Amersham Pharmacia Biotech UK Limited England)
- Centrifuge tube แบบฝาเกลียวขนาด 50 มิลลิลิตร
- Centrifuge tube แบบฝาเกลียวขนาด 15 มิลลิลิตร
- ไมโครปิเปตและทิป (Micropipette and tip)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge)
- กล้องโพลารอยด์ (Polaroid direct screen instant camera, ULTRA-LUM, Inc. Carson, California, USA)

2.2 สารเคมี

2.2.1 สารเคมีสำหรับการศึกษาสมบัติทางชีวภาพของไวรัส

- Acetone
- Glutaraldehyde
- Low viscosity embedding media (Spurr's Kit, Electron Microscopy Sciences, Washington, USA)
- Osmium tetroxide
- Phosphate
- Powder Celite 20 – 45 µm (Fulka Chemie AG CH, Buchs, Switzerland)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2.2 สารเคมีสำหรับการศึกษาสมบัติระดับโมเลกุลของไวรัส

- Agarose agar
- β-mercaptoethanol
- Chloroform
- Developer & fixer (Kodak PTY. LTD, Coburg, Australia)
- ECL Labelling and Detection Kit (Amersham Phamacia Biotech UK

Limited, England)

- Ethanol
- Ethidium bromide
- Liquid Nitrogen
- PCR Cloning Kit (Qiagen, Germany)
- Phenol
- Sodium acetate
- 20x Sodium Chloride Sodium Citrate (2 x SSC) buffer*
- 5x Tris – Borate – EDTA (TBE) buffer*
- UltraClean DNA Purification Kit (MO BIO laboratories, Inc. CA, USA)

วิธีดำเนินการทดลอง

1. ขั้นตอนการแยกไวรัสจากตัวอย่างพืช

ทำการถ่ายทอดเชื้อไวรัสจาก *M. coromandelianum* ที่แสดงอาการเส้นใบเหลือง โดยนำกล่องกักแมลงมาครอบใบของพืชที่เป็นโรค ใช้ aspirator ดูดแมลงหวี่ขาวยาสูบ (*Bemisia tabaci* biotype B ได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์) ที่ปลอดเชื้อไวรัสซึ่งเลี้ยงเพิ่มปริมาณบนต้นพืชที่ไม่เป็นโรค ถ่ายลงในกล่องแล้วปล่อยให้แมลงหวี่ขาวดูดน้ำเลี้ยงจากใบพืชที่เป็นโรค (acquisition feeding) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นย้ายแมลงสู่ต้น *M. coromandelianum* ที่เพาะจากเมล็ดและปราศจากโรคโดยใช้แมลงหวี่ขาวจำนวน 1 ตัวต่อต้น ปล่อยให้แมลงหวี่ขาวถ่ายเชื้อไวรัส (inoculation feeding) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วกำจัดแมลงหวี่ขาวโดยฉีดพ่นสารกำจัดแมลง ทำการเก็บรักษาพืชที่ได้รับการถ่ายเชื้อไวรัสในเรือนกันแมลงเป็นเวลา 6 สัปดาห์เพื่อรอตรวจอาการของโรค จากนั้นคัดเลือกพืชที่แสดงอาการของโรคจำนวน 1 ต้น เพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นต่อไป

---

* รายละเอียดในภาคผนวก ก

2. การศึกษาสมบัติทางชีวภาพ

2.1 การศึกษาการถ่ายทอดไวรัสโดยวิธีต่าง ๆ

2.1.1 การถ่ายทอดไวรัสโดยการเสียบยอด (grafting transmission)

ใช้ใบมีดโกนที่คมและสะอาด ตัดยอดของ *M. coromandelianum* ที่เพาะจากเมล็ดอายุประมาณ 1 เดือน ที่ไม่เป็นโรค แล้วผ่ากลางลำต้น ยาวประมาณ 0.5 - 1 เซนติเมตร เลือกกิ่ง แขนง หรือก้านใบ ของต้นที่เป็นโรค ให้มีความยาวไม่น้อยกว่า 2 เซนติเมตร จากนั้นใช้ใบมีดโกนเฉือนกิ่งตามแนวยาวทั้งสองด้านให้เป็นรูปปากฉลาม และริดใบออกเพื่อลดการคายน้ำ จับกิ่งของต้นที่เป็นโรค ค่อยๆ สอดเข้าไปในช่องที่ผ่าไว้แล้วบนต้นที่ไม่เป็นโรค พันบริเวณที่ทำการเสียบยอดด้วยพาราฟิล์มให้แน่น คลุมต้นพืชที่ได้รับการเสียบยอดด้วยถุงพลาสติก ทั้งหมดจำนวน 10 ต้น และเก็บไว้ในกรงกันแมลงประมาณ 1 สัปดาห์ จึงถอดถุงพลาสติกออก เก็บพืชทดลองเพื่อสังเกตอาการนาน 4 สัปดาห์ และนำพืชทดลองจำนวน 3 ต้นทั้งที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการมาตรวจสอบเพื่อยืนยันการติดเชื้อไวรัสด้วยวิธี Southern Blot Hybridization

2.1.2 การถ่ายทอดไวรัสโดยแมลงหวี่ขาว (whitefly transmission)

นำ *M. coromandelianum* ที่ได้จากข้อ 1 หลังจากทำการยืนยันด้วยวิธี Southern Blot Hybridization แล้วมาทำการถ่ายทอดไวรัสโดยแมลงหวี่ขาวตามวิธีในข้อ 1 ใช้แมลงหวี่ขาวจำนวน 20 ตัวต่อต้น และ 40 ตัวต่อต้น ในขั้นตอน inoculation feeding เพื่อถ่ายไวรัสเข้าสู่ *M. coromandelianum* เก็บพืชทดลองเพื่อสังเกตอาการนาน 4 สัปดาห์ และทำการสุ่มพืชทดลองจำนวน 3 ต้นมาตรวจสอบเพื่อยืนยันการติดเชื้อไวรัสด้วยวิธี Southern Blot Hybridization

2.1.3 การถ่ายทอดเชื้อโดยวิธีกล (mechanical inoculation)

นำตัวอย่างพืชที่เป็นโรคบดใน 0.1 M potassium phosphate buffer* pH 7.0 ในอัตราส่วนของใบพืช : buffer 1:2 (w/v) จนละเอียด เติมผง Celite เพื่อทำให้เกิดบาดแผลบนใบพืช กวนจนเข้ากันดีแล้วทาน้ำคั้นลงบนใบ *M. coromandelianum* ที่เพาะจากเมล็ดอายุประมาณ

---

* รายละเอียดในภาคผนวก ก

1 เดือนจำนวน 10 ต้น จากนั้นล้างน้ำคั้นออกทันที เก็บพืชในเรือนกันแมลง รอตรวจอาการนาน 6 สัปดาห์ และทำการสุ่มพืชทดลองจำนวน 6 ต้นมาตรวจสอบเพื่อยืนยันการติดเชื้อไวรัสด้วยวิธี Southern Blot Hybridization

2.1.4 **การถ่ายทอดเชื้อผ่านทางเมล็ด** (seed transmission)

เก็บเมล็ด *M. coromandelianum* จากต้นที่แสดงอาการเส้นใบเหลืองจากการเก็บตัวอย่างในกรุงเทพ ซึ่งได้มีการตรวจสอบโดยวิธี Southern Blot Hybridization แล้วว่ามีเชื้อบีโกโมไวรัส และจากการทดลองถ่ายทอดไวรัสด้วยการเสียบยอดมาเพาะ เก็บรักษาต้นกล้าที่ได้ในเรือนกันแมลง รอตรวจอาการนาน 6 สัปดาห์ และทำการสุ่มพืชทดลองจำนวน 6 ต้นมาตรวจสอบเพื่อยืนยันการติดเชื้อไวรัสด้วย Southern Blot Hybridization

2.2 การศึกษาประสิทธิภาพในการถ่ายทอดเชื้อไวรัสของแมลงหวี่ขาว

2.2.1 จำนวนแมลงหวี่ขาวต่อการถ่ายทอดไวรัส

นำ *M. coromandelianum* ที่ได้จากข้อ 1 หลังจากทำการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสด้วย Southern Blot Hybridization แล้ว มาทำการถ่ายทอดไวรัสด้วยแมลงหวี่ขาว โดยการทดลองนี้ใช้จำนวนแมลงหวี่ขาวต่างๆ กันในขั้นตอน inoculation feeding period ตั้งแต่ 1 5 10 20 และ 40 ตัวต่อต้นตามลำดับ และใช้ระยะเวลาในการรับและถ่ายเชื้อไวรัส คือ 24 ชั่วโมง โดยใช้พืชทดลองจำนวน 10 ต้นในแต่ละการทดลอง

2.2.2 ระยะเวลาที่น้อยที่สุด หลังจากแมลงหวี่ขาวได้รับเชื้อไวรัสแล้วสามารถถ่ายทอดได้ (minimum inoculation feeding period)

ใช้แมลงหวี่ขาวที่มีไวรัสจำนวน 40 ตัวต่อต้นในขั้นตอน inoculation feeding แต่ใช้เวลาในการถ่ายเชื้อไวรัสแตกต่างกันตั้งแต่ครึ่งชั่วโมง 1 3 6 และ 12 ชั่วโมง โดยใช้พืชทดลองจำนวน 10 ต้นในแต่ละการทดลอง เก็บพืชทดลองเพื่อสังเกตอาการนาน 4 สัปดาห์ และทำการสุ่มพืชทดลองจำนวน 3 ต้น ทั้งที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการมาตรวจสอบเพื่อยืนยันการติดเชื้อไวรัสด้วย Southern Blot Hybridization

2.2.3 ระยะเวลาที่ไวรัสสามารถอยู่ในตัวแมลงหวี่ขาวและคงสภาพการถ่ายทอดไวรัสได้

ใช้แมลงหวี่ขาวที่มีไวรัสจำนวน 40 ตัวต่อต้นในขั้นตอน inoculation feeding โดยทำการถ่ายทอดเชื้อไวรัสหลังจากขั้นตอนการ acquisition feeding แล้วเป็นเวลา 1 3 6 และ 12 วัน โดยใช้ระยะเวลาในการถ่ายทอดไวรัส 24 ชั่วโมง และใช้พืชทดลองจำนวน 10 ต้นในแต่ละการทดลอง เก็บพืชทดลองเพื่อสังเกตอาการนาน 4 สัปดาห์ และทำการสุ่มพืชทดลองมาตรวจสอบเพื่อยืนยันการติดเชื้อไวรัสด้วย Southern Blot Hybridization

2.3 การศึกษาชนิดพืชอาศัย (host range) ของไวรัส

นำ *M. coromandelianum* ที่ได้จากข้อ 1 หลังจากทำการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสด้วย Southern Blot Hybridization แล้ว มาทำการถ่ายทอดไวรัสด้วยแมลงหวี่ขาวตามวิธีในข้อ 1 ทำการทดลอง 2 การทดลอง โดยการทดลองที่ 1 ใช้แมลงหวี่ขาวจำนวน 20 ตัวต่อต้น และการทดลองที่ 2 ใช้ 40 ตัวต่อต้น ในขั้นตอน inoculation feeding period เพื่อถ่ายไวรัสเข้าสู่พืชทดลองจำนวน 21 ชนิด ซึ่งเป็นพืชอาศัยของบีโกโมไวรัสมากกว่า 1,000 ชนิดดังนี้

Abelmoschus esculentus	*Abelmoschus moschatus*	*Capsicum frutescens*
Citrullus vulgaris	*Cucumis melo*	*Cucumis sativus*
Cucurbita moschata	*Datura metel*	*Gossypium barbadense*
Gossypium hirsutum	*Hitbiscus rusa-sinensis*	*Luffa acutangula*
Luffa cylindrica	*Lycopersicon esculentum*	*Malachra capitata*
Nicotiana benthamiana	*Nicotiana glutinosa*	*Nicotiana rustica*
Nicotiana tabacum	*Solanum melongena*	*Solanum xanthocarpum*

โดยใช้พืชทดลองแต่ละชนิดจำนวน 10 ต้นต่อการทดลอง เก็บพืชทดลองเพื่อสังเกตอาการนาน 4 สัปดาห์ และทำการสุ่มพืชทดลองมาตรวจสอบเพื่อยืนยันการติดเชื้อไวรัสด้วยวิธี Southern Blot Hybridization จำนวน 3 ต้นต่อชนิด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4 **การศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับเซลล์ใน** *M. coromandelianum* **ที่ติดเชื้อไวรัสโดยใช้** transmission electron microscope (TEM)

2.4.1 **การเตรียมตัวอย่างพืช(ดัดแปลงจาก** Spurr,1969)

ตัดชิ้นส่วนของพืชบริเวณที่ต้องการศึกษาให้มีขนาดประมาณ 1 x 2 มิลลิเมตร หนาไม่เกิน 1 มิลลิเมตร ทำการ pre-fix ด้วย 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 ทำการดูดอากาศออกจากเนื้อเยื่อเพื่อให้เกิดการแทนที่ของบัฟเฟอร์ด้วย vacuum pump แล้ว fix เป็นเวลานาน 1-2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หรือข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นล้างด้วย 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10-30 นาที โดยเขย่าเบาๆ ทำการ post-fix ด้วย 1-2 เปอร์เซ็นต์ของ osmium tetroxide ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 นาน 1-2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ทำการล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆ ละ 10-30 นาที โดยเขย่าเบาๆ ทำการแทนที่น้ำในตัวอย่างพืชด้วยอะซิโตน (acetone series) ที่ความเข้มข้น 30 50 70 และ 90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยในแต่ละความเข้มข้นแช่นาน 15 นาทีถึง 1 ชั่วโมง จากนั้นแช่ในอะซิโตน 100 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้งๆ ละ 30 นาที นำตัวอย่างพืชไปแช่ในสารละลายอะซิโตนผสมเรซิน (Spurr' resin, Electron Microscopy Sciences) อัตราส่วน 2:1 (v/v) นาน 6 ชั่วโมง ถึงข้ามคืน แล้วจึงเปลี่ยนเป็นสารละลายอะซิโตนผสมเรซินในอัตราส่วน 1:2 (v/v) นาน 6 ชั่วโมง ถึงข้ามคืน สุดท้ายแช่ตัวอย่างพืชในเรซินนาน 6 ชั่วโมง ถึงข้ามคืน ทำซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นทำการฝังชิ้นตัวอย่างลงในบล็อกขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีเรซิน ทำการ polymerize เรซิน ที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นส่งชิ้นตัวอย่างไปทำการตัดและย้อมสีด้วย uranyl acetate แล้วจึงทำการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (JEM-200CX 100KV, JEOL, Japan) ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. **การตรวจสอบไวรัสด้วย** molecular techniques

3.1 **การสกัด DNA จากพืชตัวอย่าง (ดัดแปลงจาก** Dellaporta *et al.*, 1983)

บดตัวอย่างพืชประมาณ 1 กรัมในไนโตรเจนเหลวจนละเอียดเป็นผง เติม Extraction buffer* ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ผสมจนเข้ากันแล้วเติม 20% (w/v) SDS* ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หลังจากผสมจนเข้ากันแล้วบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เติม 5 M potassium acetate*

---

* รายละเอียดในภาคผนวก ก

ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมจนเข้ากันแล้วบ่มบนน้ำแข็งนาน 20 นาที vortex ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm (หรือมากกว่า 8,500 xg) เก็บส่วนใสนำมาเติม Isopropanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วเก็บที่ –20 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมงถึงข้ามคืน จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm นาน 20 นาทีที่ 4 องศาเซลเซียส เทของเหลวทิ้งแล้วทำตะกอนให้แห้งโดยเครื่อง speed vacuum concentrator จากนั้นละลายตะกอนด้วย TE buffer* 700 ไมโครลิตร เติม phenol ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ผสมจนเข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm นาน 3 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วน aqueous phase ที่ได้แล้วทำการสกัดซ้ำอีกครั้งด้วย phenol ดูด aqueous phase ที่ได้มาเติม chloroform ในปริมาตรเท่ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm นาน 3 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วทำซ้ำขั้นๆอนนี้อีกครั้ง แล้วดูด aqueous phase ที่ได้มาเติม 3 M sodium acetate (pH 5.5) ปริมาตร 0.1 เท่า และ isopropanol ปริมาตร 0.6 เท่า นำไปบ่มที่ –20 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm นาน10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เทของเหลวทิ้งแล้ว ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 800 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm นาน 5 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วเทของเหลวทิ้ง จากนั้นทำตะกอนให้แห้งโดยเครื่อง speed vacuum concentrator แล้วละลายตะกอนด้วย TE buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เก็บรักษา DNA ที่ได้ที่ –20 องศาเซลเซียส

3.2 การตรวจสอบบีโกโมไวรัสด้วยเทคนิค PCR

การศึกษาในครั้งนี้ใช้ universal primers ของบีโกโมไวรัส 2 คู่ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 Universal primers ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน DNA ของบีโกโมไวรัสด้วยวิธี PCR

Primer	Sequence*	Reference
C	5' CATRTTGCAGTAACTACTGCAGCTGGGSK 3'	Briddon and Markham (1994)
V	5' CGGTCAGRRARACCCGGGGRTACTTAAGRAA 3'	
PAL1v1978	5' GCATCTGCAGGCCCACATYGTCTTYCCNGT 3'	Rojas *et al.*, (1993)
PAR1c496	5' AATACTGCAGGGCTTYCTRTACATRGG 3'	

*หมายเหตุ: K= G, T; N= A, T, C and G; R= A, G; S= C, G และ Y= C, T

โดย reaction mixture ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน DNA ของไวรัส ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1x PCR buffer $MgCl_2$ 2.5 mM dNTPs 0.2 mM primers 0.2 μM DNA

polymerase 1.25 unit (*Taq* DNA polymerase, Life Technologies Inc., NY, USA หรือ DyNAzyme II DNA Polymerase, Finnzymes, Espoo, Finland) และ DNA จากตัวอย่างพืช 0.02 μg ทำการเพิ่มจำนวน DNA ของไวรัสโดยใช้ PTC –100 ™ Programmble Thermal ConTroller (MJ Research, Inc., Massachusetts, USA) โดยในแต่ละรอบปฏิกิริยาประกอบด้วย 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 50 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จำนวนรอบปฏิกิริยาที่ใช้ทั้งหมด 40 รอบ หลังจากนั้นเพิ่มขั้นตอน final extension 1 รอบ ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที (ดัดแปลงจาก Lotrakul, Valverde and Landry, 2000) ทำการตรวจสอบ PCR products ที่ได้ด้วยวิธี electrophoresis โดยใช้ agarose gel (USB, Ohio, USA) 1.2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ใน 1x TBE และใช้กระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นย้อมเจลด้วย ethidium bromide (1 μg/ml) นาน 10 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่น นาน 10 นาที ซ้ำ 2 ครั้ง แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้แสง UV บันทึกภาพด้วยกล้องโพลารอยด์ คำนวณขนาดโดยประมาณของ PCR products โดยเปรียบเทียบกับ DNA marker (1 kb Ladder ของ New England Biolabs, Inc., New England, USA หรือ λDNA (New England Biolabs, Inc., New England, USA) ที่ตัดด้วย *Eco*RI และ *Hin*dIII)

3.3 การตรวจสอบบีโกโมไวรัสด้วยวิธี Southern Blot Hybridization

3.3.1 Blotting

นำ DNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างพืชไปแยกด้วยวิธี electrophoresis โดยใช้ agarose 1.2 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเตรียมเจลเพื่อถ่าย DNA ลงสู่ nylon membrane (H – bond N+ ของ Amersham Pharmacia Bio. Tech., Buckinghamshire, England) โดยมีขั้นตอนตามวิธีการที่แนะนำโดย ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection Systems ของ Amersham Pharmacia Bio. Tech. (Buckinghamshire, England) ดังนี้ ขั้นแรกทำการแยก DNA สายคู่โดยใช้ด่าง โดยนำเจลไปแช่ใน denaturation solution* เขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่านาน 45 นาที เท denaturation solution ออก แล้วล้างเจลด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเติม neutralization buffer* ให้ท่วมเจล เขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่า นาน 30 นาที 1 รอบและ 15 นาที อีก 1 รอบ ตามลำดับ แล้วล้างเจลด้วยน้ำกลั่น ก่อนนำไปทำการถ่าย DNA สู่ nylon membrane โดยวางกระดาษกรองที่ชับ 2x SSC* จนอิ่มตัวบนกล่องพลาสติก โดยให้ปลายกระดาษกรองทั้งสองข้างจุ่มลงใน 2 x

---

* รายละเอียดในภาคผนวก ก

SSC จากนั้นคว่ำเจลลงบนกระดาษกรอง แล้ววาง membrane ทับบนเจล ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ทำเครื่องหมายกำหนดทิศทางของเจลบน membrane วางกระดาษกรองทับอีก 3 ชั้น ไล่ฟองอากาศโดยใช้แท่งแก้วกลิ้งไปในทิศทางเดียว ใช้ wrap ขึงด้านข้างของ gel ทั้ง 4 ด้าน แล้ววางกระดาษหนังสือพิมพ์บนกระดาษกรองให้มีความสูง 2-3 นิ้ว วางของที่มีน้ำหนักทับไว้ ทำการถ่าย DNA เป็นเวลา 14 ชั่วโมง จากนั้นนำ membrane ไปอบที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เพื่อตรึง DNA ทำการเก็บ membrane ที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อนจะนำไปทำ Southern Blot Hybridization ตามวิธีการที่แนะนำโดย Amersham Pharmacia Bio. Tech. (Buckinghamshire, England)

3.3.2 การเตรียม probe

สำหรับ probe ที่ใช้ในการศึกษานี้ ใช้ DNA-A และ DNA-B ของ *Dicliptera yellow mottle virus* (DYMoV) (Lotrakul, Valverde and Landry, 2000) ตามวิธีการที่แนะนำโดย ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection Systems โดยทำการเจือจาง DNA ในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ให้มีความเข้มข้น 10 ng/µl ใช้ DNA ปริมาตร 10 µl นำมา denature probe โดยต้มในน้ำเดือดนาน 7 - 8 นาที หลังจากนั้นทำให้เย็นอย่างรวดเร็วโดยแช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที แล้วเติม DNA labeling reagent 10 ไมโครลิตร และ glutaraldehyde solution 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นเก็บ labelled probe ในน้ำแข็งจนกว่าจะใช้

3.3.3 Hybridization

ทำการ prehybridize membrane ใน hybridization buffer* ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ใน hybridization oven (Hybridise HB – 1D/Techne (Cambridge) LTD, Cambridge, England) นาน 30 นาที จากนั้นเติม probe ที่เตรียมไว้ลงในหลอดที่บรรจุ membrane แล้ว hybridize ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 16 – 18 ชั่วโมง ล้าง membrane ด้วย primary washing buffer* ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ทำซ้ำอีกครั้ง แล้วทำการล้าง membrane ใน secondary washing buffer* ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที อีก 2 ครั้ง ก่อนนำ membrane ไปตรวจสอบโดยเท detection reagents (Amersham Pharmacia Bio. Tech., Buckinghamshire, England) ให้ท่วมบนผิว membrane แล้วบ่มนาน 1 นาที ก่อนเท detection

---

* รายละเอียดในภาคผนวก ก

reagents ออก ห่อ blot ด้วย wrap แล้วนำไปใส่ในตลับฟิล์มในห้องมืด และวาง X-ray film (Kodak, New York, USA) บน membrane ทิ้งไว้ 5 – 30 นาที เมื่อครบเวลาทำการล้างฟิล์มโดยแช่ใน developer solution นาน 3 นาที และแช่ใน fixer solution (Kodak PTY. LTD, Coburg, Australia) นาน 3 นาที ล้างฟิล์มด้วยน้ำอีกครั้ง แล้วผึ่งให้แห้ง

4. การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัส

4.1 การโคลน และการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR – amplified viral DNA

ทำการสกัด DNA ของไวรัสจาก *M. coromandelianum* ที่ติดเชื้อไวรัส และทำการเพิ่มจำนวน DNA ด้วย PCR ตามข้อ 3.2 นำ DNA ชิ้นที่ต้องการศึกษามาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ UltraClean DNA Purification kit (MO BIO Laboratories, Inc., USA) แล้วทำการโคลนเข้าสู่ pDrive cloning vector โดยใช้ PCR Cloning kit (Qiagen, Germany) จากนั้น transform เข้าสู่ *Escherichia coli* DH5α ตามวิธีของ Sambrook Fritsch และ Maniatis (1989) สกัดพลาสมิดที่ได้ด้วยวิธี small-scale preparations of plasmid DNA ตามวิธีของ Sambrook Fritsch และ Maniatis (1989) แล้วนำไปทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วย Automate Sequencer ที่หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

4.2 การออกแบบ overlapping primers เพื่อทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสที่สมบูรณ์ทั้งชิ้นด้วย PCR

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในข้อ 4.1 มาทำการออกแบบ overlapping primers เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวน DNA-A ของไวรัสทั้งวง ทำการเพิ่มจำนวน DNA ดังรายละเอียดในข้อ 2.2 ก่อนนำไปทำการโคลนและ transform สู่ *E. coli* DH5α และศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังรายละเอียดในข้อ 4.1

4.3 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และการทำ Phylogenetic analysis

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในข้อ 4.2 มาทำการจัดเรียงแบบ multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม CLUSTAL X version 1.6b (Thompson *et al.*, 1997) และทำ phylogenetic analysis ด้วยโปรแกรม PAUP version 4.0b10 (Swofford, 2003) โดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของบีโกโมไวรัสชนิดต่างๆ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบีโกโมไวรัสชนิดต่างๆ ที่ใช้ในการเปรียบเทียบ

ชนิดของบีโกโมไวรัส	Genbank accession number	**ชื่อย่อ**
Abutilon mosaic virus	X15983	AbMV
Ageratum yellow vein virus	X74516	AYVV
Ageratum yellow vein Sri Lanka virus	AF314144	AYVSLV
Bean calico mosaic virus	AF110189	BCaMV
Bean dwarf mosaic virus	M88179	BDMV
Bean golden mosaic virus (Brazil)	M88686	BGMV-[BZ]
Beet curly top virus	U56975	BCTV
Bhendi yellow vein mosaic virus [Madural]	AF241479	BYVMV-[Mad]
Cotton leaf curl Multan virus-[Okra]	AJ002459	CLCuMV-[Ok]
Cotton leaf curl Rajasthan virus	AF363011	CLCuRV
Dicliptera yellow mottle virus	AF170101	DiYMoV
Malvastrum yellow vein virus-[Y47]	AJ457824	MYVV-[Y47]
Mungbean yellow mosaic virus-Thailand	AB017341	MYMV-TH
Okra yellow vein mosaic virus-[201]	AJ002451	OYVMV-[201]
Sida golden mosaic Costa Rica virus	X99550	SiGMRV
Stachytarpheta leaf curl virus-[Hn5]	AJ495814	StaLCV-[Hn5]
Tomato yellow leaf curl virus-[1]	X63015	TYLCTHV-[1]
Tomato yellow leaf curl virus-[2]	AF141922	TYLCTHV-[2]
Tomato yellow leaf curl virus-[Y72]	AJ495812	TYLCTHV-[Y72]

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย