บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 การคัดเลือกและพิสูจน์ลักษณะของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่สามารถตรึงไนโตรเจนในเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลหวาย

3.1.1 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจน

3.1.1.1 การกำจัดเชื้อที่ผิวต้นกล้วยไม้ (Surface sterilization) และการแยกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนที่อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลหวาย

คัดเลือกชิ้นส่วนลำลูกกล้วยของกล้วยไม้สกุลหวายสายพันธุ์เอื้องสายสามสี (*Dendrobium crystallinum*) ขนาดประมาณ 5-10 เซนติเมตร ที่ไม่มีบาดแผลหรือเป็นโรค ทำความสะอาดโดยล้างผ่านน้ำกลั่น จากนั้นทำการฆ่าเชื้อที่ผิวโดยขั้นตอนนี้จะทำในตู้ปลอดเชื้อ เริ่มจาก แช่ในเอทานอล 70 % นาน 3 นาที ต่อจากนั้นแช่ในคลอรอกซ์ (Clorox) 3 % 5 นาที และตามด้วยแช่ในแช่ในเอทานอล 70 % อีก 3 นาที (ระยะเวลาการแช่ขึ้นอยู่กับขนาดและอายุของพืช) จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้ออีก 4-5 ครั้ง ตัดชิ้นส่วนตัวอย่างให้มีขนาด 2-3 เซนติเมตร บดชิ้นส่วนตัวอย่างด้วยโกร่งบด ค่อยๆเติม 0.85 % NaCl ลงไปผสมจนครบ 10 เท่าของน้ำหนักตัวอย่าง บดจนชิ้นส่วนละเอียด นำของเหลวที่ได้ไปเลี้ยงใน modified Rennie medium (Rennie,1981) (ดังแสดงในภาคผนวก ก)

การกำจัดเชื้อที่ผิวต้นพืช ต้องทำการทดสอบเพื่อหาวิธีการและขั้นตอนที่เหมาะสม โดยปรับระยะเวลาในการแช่ตัวอย่างพืช และปรับความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ เพื่อไม่ให้มีเชื้อติดบริเวณผิวพืช จากนั้นนำตัวอย่างพืชที่ทดสอบไปกลิ้งบนอาหาร NA เพื่อดูการเจริญของเชื้อเทียบกับวิธีที่ปรับเปลี่ยน ซึ่งวิธีการข้างต้นเหมาะสมกับการทดลองในครั้งนี้ มีข้อควรระวัง คือ ถ้าแช่นานเกินก็อาจมีผลต่อเชื้อที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อพืชที่ต้องการศึกษา

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.1.2 การประเมินประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน

เมื่อมีการเจริญของเชื้อในอาหาร นำไปทดสอบหาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนด้วยเทคนิค Acetylene Reduction Assay จากนั้นนำหลอดที่พบการตรึงไนโตรเจนสูงสุดไปทำการแยกเชื้อเพื่อหาปริมาณและแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

การทำ Acetylene Reduction Assay ทำโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารกึ่งแข็ง บ่มไว้เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนด เปลี่ยนฝาหลอดทดลองให้เป็นจุกยางเพื่อดูดอากาศภายในหลอดออก 5 % ของปริมาตรส่วนช่องว่างที่เหลือ (head space) เมื่อดูดอากาศออกแทนที่อากาศด้วยก๊าซ acetylene ในปริมาตรที่เท่ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 24 ชั่วโมง ตรวจวัดปริมาณ etylene ด้วยเครื่อง Gas Chromatograph (GC) (ยี่ห้อ Shimadzu GC-14B) แยกหลอดที่พบการตรึงไนโตรเจน เพื่อทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

3.1.1.3 การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

เซลล์แบคทีเรียที่เจริญในหลอดอาหารและพบการตรึงไนโตรเจน ในการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์นั้น สำหรับแบคทีเรียที่ต้องอาศัยออกซิเจนในการเจริญเติบโต (aerobic bacteria) นำมาเลี้ยงบน Nutriet agar medium (NA) สำหรับ anaerobic bacteria จะเลี้ยงในอาหาร VL agar medium (สูตรอาหารและวิธีการเตรียม ดังแสดงในภาคผนวก ก)

แยกเชื้อด้วยวิธี spread plate บนอาหารทั้ง 2 ชนิด จากนั้นเก็บโคโลนีที่ต่างกัน แยกโคโลนีเดี่ยวให้บริสุทธิ์บน NA และVL medium ด้วยวิธี streak plate โคโลนีเดี่ยวบริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหาร นำมาเก็บใน slant เพื่อทำการเก็บรักษาเชื้อสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

ในการแยกเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจนเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อลงบนอาหาร VL แล้ว นำไปเลี้ยงไว้ใน Anaerobic jar ซึ่งภายในขวดโหลนี้จะเป็นสภาพที่ไม่มีออกซิเจน เพื่อให้สภาพแวดล้อมเหมาะสำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก)

3.1.1.4 การทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ภายในเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลหวาย

นำโคโลนีเชื้อตัวอย่างที่แยกได้บริสุทธิ์ไปเลี้ยงในอาหาร semi-solid modified Rennie medium (RM) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 7 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อภายในหลอดอาหาร สำหรับเชื้อที่เจริญได้ในสภาพที่มีออกซิเจนทำการเปลี่ยนฝาจากฝาพลาสติกเป็นจุกยางเพื่อใช้เข็มฉีดยาเจาะผ่าน ในขณะที่เชื้อ anaerobic bacteria นั้นก่อนทำการเปลี่ยนฝาพลาสติกเป็นจุกยางต้องทำการไล่อากาศภายในหลอดทดลองออกโดยใช้ก๊าซไนโตรเจนแทนที่ออกซิเจนในหลอด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ทดลอง ดูดอากาศออกประมาณ 5 % ของบรรยากาศภายใน (Head space) แทนที่อากาศที่ดูดออกด้วยก๊าซ acetylene ในปริมาตรเดียวกันกับที่ดูดออก บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 24 ชั่วโมง ตรวจวัดปริมาณก๊าซ ethylene ที่เกิดขึ้นจะตรวจวัดโดยดูดอากาศในหลอด 1 ml ฉีดเข้าเครื่อง Gas Chromatography (Teaumroong *et al.*,2001) คำนวณปริมาณก๊าซ ethylene จากตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟที่เกิดจากฉีด ก๊าซ ethylene มาตรฐาน (รายละเอียดการคำนวณปริมาณ C_2H_2 ดูภาคผนวก ก)

การหาจำนวนเชื้อทั้งหมดที่เจริญในอาหาร

นำหลอดที่มีการตรึงไนโตรเจนมาหาปริมาณเชื้อ โดยดูดเชื้อตัวอย่างจากหลอดอาหารที่พบการตรึงไนโตรเจน ทำการเจือจาง (dilution) จนได้ความเจือจางที่ 10^{-5} ดูดสารละลายที่เจือจาง 10^{-3} – 10^{-5} ปริมาตร 100 µl ลงในจานเพาะเชื้อ (plate) ที่มีอาหารแข็ง NA (สำหรับเลี้ยงเชื้อในสภาพที่ใช้ออกซิเจน) หรือ อาหาร VL (สำหรับเลี้ยงเชื้อในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน) ทำ spread plate โดยเกลี่ยเชื้อด้วยแท่งแก้วรูปตัว L ที่ปราศจากเชื้อ (จุ่มด้วยแอลกอฮอลแล้วเผา) จนทั่วจานอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C หรือวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-7 วัน สังเกตการเจริญเติบโตและลักษณะโคโลนีที่ปรากฏ นับจำนวนเชื้อที่ได้แล้วคำนวณกลับเป็นปริมาณเชื้อทั้งหมดที่มีการตรึงไนโตรเจน

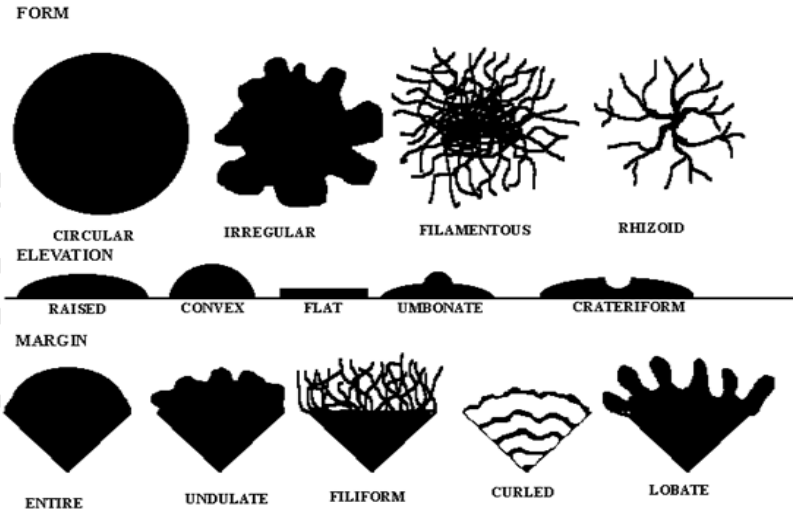
$$\text{คำนวณโดย ปริมาณเชื้อ} = \frac{\text{จำนวนเชื้อที่นับได้จากอาหารแข็ง}}{\text{ความเจือจางของสารละลาย x ปริมาตรที่ใส่ในอาหาร}}$$

3.1.2 การพิสูจน์ลักษณะของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่พบในเนื้อเยื่อกล้วยไม้พันธุ์เอื้องสายสามสี

3.1.2.1 ศึกษาลักษณะของโคโลนี

ดูลักษณะของกลุ่มเซลล์ที่เรียกว่า โคโลนี (colony) บนวุ้นเลี้ยงเชื้อ (agar) แบคทีเรียที่เจริญรวมเป็นกลุ่มจะมีลักษณะแตกต่างกันตามชนิด ตั้งแต่ขนาด รูปแบบ (form) ส่วนเว้าส่วนโค้งของผิวหน้า (elevation) ขอบ (margin) ตลอดจนรงควัตถุ (pigment) ที่ผลิต ทำให้โคโลนีของแบคทีเรียหลายชนิดมีสีแตกต่างกันตามธรรมชาติ ดังรูปที่ 3

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



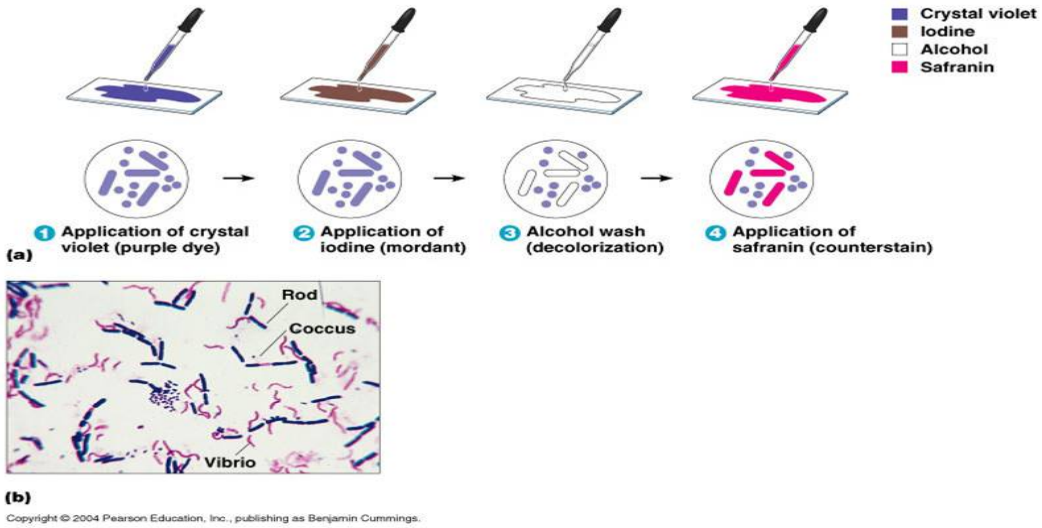
รูปที่ 3 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย
(http://chsweb.lr.k12.nj.us/psidelsky/colony%20characteristics_files/image002.gif)

3.1.2.2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

การย้อมสีแกรม(Gram's stain) (กัญจนา และคณะ, 2547)

การย้อมสีแบบแกรม เป็นวิธีการเบื้องต้นในการจำแนกแบคทีเรียออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ การย้อมนี้จัดเป็นการย้อมแบบ differential staining ซึ่งหมายถึงการใช้สีย้อมตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป สีย้อมแรกเรียกว่า primery stain ซึ่งได้แก่สี crystal violet ส่วนสีที่สองเรียกว่า counterstain หรือ secondary stain สีที่ใช้คือ safanin O แบคทีเรียที่ย้อมติดสีแรกเรียก แบคทีเรียแกรมบวก ส่วนแบคทีเรียที่ติดสีที่สองเป็นแบคทีเรียแกรมลบ ระหว่างการย้อมสีแรกกับสีที่สอง จะมีการใช้สารละลายไอโอดีน ซึ่งทำหน้าที่เป็น mordant ช่วยให้ crystal violet จับกับแบคทีเรียพวกแกรมบวกได้แน่น ไม่หลุดออกเมื่อล้างด้วยสารละลายแอลกอฮอล์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



รูปที่ 4 ขั้นตอนการย้อมสีแกรม
(http://faculty.ircc.edu/faculty/tfischer/images/gramstain.jpg)

ขั้นตอนวิธีการย้อมสีแกรม

1. ทำความสะอาดสไลด์ และเช็ดให้แห้ง
2. เตรียมรอยสเมียร์และตรึงเซลล์ด้วยความร้อน
3. หยดสี crystal violet ให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้นาน 1 นาที
4. เทสีที่เหลือค้างบนสไลด์ลงในอ่างน้ำ แล้วชะด้วยสารละลายไอโอดีน หลังจากนั้นหยดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมรอยสเมียร์ และทิ้งไว้นาน 1 นาที
5. เทสารละลายไอโอดีนทิ้ง แล้วชะด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ 95 % จนกระทั่งไม่มีสีม่วงละลายออกมา แต่อย่าให้เกิน 20 วินาที แล้วล้างน้ำทันที โดยให้น้ำผ่านเบาๆ
6. ซับด้วยกระดาษซับ แล้วย้อมทับด้วยการหยดสี safranin O ให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้นาน 1 นาที
7. เทสีทิ้ง ล้างด้วยน้ำ แล้วซับด้วยกระดาษซับ วางทิ้งให้แห้ง
8. นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ตรวจสอบลักษณะการติดสีแกรมและรูปร่างเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.2.3 ตรวจสอบลักษณะเฉพาะทางชีวเคมี (Biochemical characteristics)

3.1.2.3.1 การทดสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่าง

เลี้ยงเชื้อทั้ง 7 isolate ลงใน NB medium ประมาณ 1-2 วัน จากนั้นทำ dilution ความเข้มข้นตั้งแต่ 10^{-1} – 10^{-6} สังเกตการเจริญของเชื้อ โดยการทำ drop plate ที่ความเข้มข้นตั้งแต่

$10^{-3} – 10^{-6}$ บนอาหาร ammonium mineral salt agar medium คอยสังเกตการเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหารและบันทึกผล (สูตรอาหารดังแสดงในภาคผนวก ก)

3.1.2.3.2 การวิเคราะห์หา Indole-3-acetic acid (IAA) (Gordon และคณะ, 1951)

การทดสอบความสามารถในการสร้าง indole สิ่งมีชีวิตจะสร้างสาร indole จากกรดอะมิโน tryptophane โดย tryptophanse ในอาหารทดสอบจะต้องมี tryptophane ซึ่งกรดอะมิโนชนิดนี้อาจจะไม่มีในอาหาร peptone ทั่วๆไป ดังนั้นจึงนิยมใช้ casein digest หรือ tryptone ก็ได้ อาหารที่ใช้ควรมีส่วนผสมของ casein digest หรือ tryptone 1 % และไม่จำเป็นต้องใส่อาหารอื่นอีกหากแบคทีเรียนั้นเจริญได้ แต่หากไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ควรใส่อาหารที่ช่วยให้แบคทีเรียนั้นเจริญได้ แต่ข้อควรระวังคือในอาหารทดสอบจะต้องไม่มีน้ำตาล glucose เพราะจะไปยับยั้งการสร้าง indole ออกซิเจนก็มีอิทธิพลต่อการสร้าง indole

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว RM medium ซึ่งเพิ่ม tryptophan 0.102 g / L เพิ่มลงไป เลี้ยงไว้ประมาณ 2-5 วัน นำมาตรวจหาปริมาณของเชื้อโดยวิธีการ drop plate แล้ว centrifuge โดยใช้ส่วนที่เป็นสารละลายใสเพื่อนำไปวิเคราะห์หา IAA โดยใช้เครื่อง spectrophotometer

สารเคมี salkovskii reagent (ใช้สำหรับพัฒนาสี)

0.5 M $FeCl_3$ 1 มิลลิลิตร

35 % $HClO_4$ 50 มิลลิลิตร

Standard Indole – 3 – acetic acid (IAA)

เตรียม standard IAA (MW = 175.19) 10 mM เตรียมโดยละลาย IAA ใน 50 % methanol ทำ standard IAA 10 mM ให้เจือจางเป็น 1mM ด้วย 50 % methanol เตรียม standard ความเข้มข้น 0, 10, 20, 50, 100 และ150 μM โดยใช้ IAA 1 mM ที่เตรียมไว้ เติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ tryptophan เพื่อปรับปริมาตรให้มีปริมาตรรวมเป็น 1ml

<u>วิธีการ</u>

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ endophytic bacteria (RMR medium) เติม tryptophan 0.102 g/L ดูดใส flask ขนาด 50 ml ปริมาณ 25 ml จากนั้นเขี่ยเชื้อที่แยกได้บริสุทธิ์แล้วใส่ลงในอาหารที่เตรียมไว้ เลี้ยงไว้ประมาณ 3-5 วัน ขึ้นอยู่กับอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ เมื่อครบกำหนด นำมาทำ drop plate แล้วนำส่วนที่เหลือไปเหวี่ยง (centrifuge) โดยใช้ส่วนที่เป็นสารละลายใส ในการวิเคราะห์หา IAA

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2. ดูดสารละลายใสจากตัวอย่างมา 1 ml. ใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก เติม salkovskii reagent 2 ml. เขย่าให้เข้ากัน บ่มไว้ในที่มืด 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร

3. วิธีเตรียม Standard IAA

No.	1mM IAA (µl)	medium (µl)	ความเข้มข้น (µM/l)
1.	0	1000	0
2.	10	990	10
3.	20	980	20
4.	50	950	50
5.	100	900	100
6.	150	850	150

ใช้ Standard แต่ละความเข้มข้น 1 มล. ใส่ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก เติม salkovskii reagent 2 มล. แล้วเขย่าให้เข้ากัน บ่มไว้ในที่มืดเช่นเดียวกับตัวอย่าง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร

การคำนวณ

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เข้าสมการ Linear regression จะได้ปริมาณ IAA ในหน่วย µmol/L

3.1.2.3.3 การตรวจหาและแยกจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส

เลี้ยงเชื้อในอาหาร mineral salt – cellulose medium ด้วยวิธีการ streak plate mineral salt – cellulose medium เป็นอาหารสำหรับใช้ในการตรวจหาและแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเซลลูโลส ตรวจสอบการเจริญเติบโตของเชื้อ และเมื่อเชื้อเจริญบนอาหารนำไปตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลส ดูการสร้าง clear zone ของเชื้อ

วิธีการ

1. ทำการเกลี่ยเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อแยกเชื้อที่มีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส
2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 45 องศาเซลเซียส โดยระยะเวลาในการบ่มนาน 3-5 วัน
3. ก่อนวัดขนาดเติม congo red เข้มข้น 0.1 % ให้ท่วมอาหารวุ้นทิ้งไว้ 15 นาที เททิ้ง แล้วราดทับด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1โมลาร์ ทิ้งไว้ 5-10 นาที
4. เทสารละลายทิ้งแล้ววัดขนาดดวงใสและโคโลนี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.2.4 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟท์ด้วยเทคนิคทาง Molecular biology

3.1.2.4.1 การเตรียมเซลล์สำหรับการทำ 16S rDNA Sequence Analysis

การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

1. คัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบ โดยคัดให้เหลือ single colony ก่อน เพื่อให้ แบคทีเรียที่นำมาใช้มีความบริสุทธิ์ นับเป็นขั้นตอนที่สำคัญ ถ้าแบคทีเรียที่ใช้ไม่บริสุทธิ์ เมื่อนำไปทำปฏิกิริยา PCR อาจได้แถบดีเอ็นเอที่มี 16S rRNAgenes หลายแบบปะปนกันอยู่ เมื่อนำไปหาลำดับเบสจะปรากฏค่า N (ค่าที่อ่านไม่ได้) มาก ทำให้การวิเคราะห์ลำดับเบสขาดความแม่นยำ

2. นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการตรวจสอบย้ายลงอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับเชื้อนั้นๆ หรืออาจใช้ Nutrient broth (NB) เขย่าเชื้อเบาๆ 24-48 ชั่วโมง สังเกตอาหารเหลวจะขุ่นขึ้น บางวิธีอาจใช้บนอาหารแข็ง เช่น Nutrient agar (NA) ก็ได้ใช้ห่วงถ่ายเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วถ่ายเชื้อแบคทีเรีย 1 โคโลนีลงในอาหาร NB เลี้ยงไว้ 24 ชั่วโมง - 2 วัน แล้วแต่อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อแต่ละชนิด

3.1.2.4.2 การสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย (DNA extraction)

เซลแบคทีเรียที่ใช้จะต้องมีอายุไม่มากนัก ควรอยู่ในระยะ Log phase จะสกัดดีเอ็นเอได้ง่าย ถ้าอายุเซลของแบคทีเรียมากไปจะย่อยผนังเซลได้ยาก และอาจมีสารประกอบหลายๆ อย่างที่แบคทีเรียสร้างขึ้นมารบกวนความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่ได้ เช่น pigment ต่างๆ เป็นต้น สำหรับการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียมีหลายวิธี ในที่นี้จะใช้ชุดสำเร็จรูป (DNA Preparation Kits) เพื่อการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียโดยตรง

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย

1. เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA Plate นาน 48 ชั่วโมง

2. ล้างเซลแบคทีเรียด้วย TEN buffer (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA pH 8.0 ที่มี 0.1 N NaOH, 0.5 % Sodium dodecyl sulfate) โดยปั่นเหวี่ยงที่ 5000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม 500 µl TEN buffer หมุนเหวี่ยงที่ 5000 rpm 5 นาที 2 รอบ

3. เทส่วนใสทิ้ง เติม 20 % sucrose (ใน TEN buffer) 200 µl , 10 % SDS 100 µl , 2 Mg / 1 ml Lysozyme 20 µl และ10 Mg/1ml RNase 32 µl ผสมให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จนได้สารละลายใส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

4. เติม5 M NaCl 75 µl ผสมกับ Phenol : Chloroform : Isoamylalcohol (25 : 24 : 1) 500 µl ผสมให้เข้ากัน หมุนเหวี่ยงที่ 14000 เป็นเวลา 10 นาที 2 รอบ ดูดสารละลายส่วนใส

5. เติม ethanol 500 µl และ 3 M sodium acetate 500 µl แช่ที่ 4 °C เพื่อให้ตกตะกอน

6. ทำให้แห้ง โดยล้างด้วย ethanol 70 % เติม TE buffer (10 mM Tris pH 7.9, 1 mM EDTA pH 8) 50 µl เก็บที่ 20 °C เพื่อใช้ในการหาลำดับเบสและตรวจสอบ nif gene ต่อไป

3.1.2.4.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน 16S rDNA โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (amplifying DNA : polymerase chain reaction)

พอลิเมอเรสเชนรีแอกชั่นหรือพีซีอาร์ (PCR) เป็นเทคนิคการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในหลอดทดลองที่ได้พัฒนาขึ้นเพื่อเพิ่มจำนวนโมเลกุลของดีเอ็นเอในปริมาณมาก พีซีอาร์สามารถเพิ่มโมเลกุลของดีเอ็นเอได้เป็นล้านๆเท่าในหลอดทดลอง ผลทำให้มีได้ยีนจำนวนมากสำหรับการทำสำเนาในการหาลำดับเบส (อุไรวรรณ, 2545) ใช้primer 9F, 339F, 785F และ1099F โดยใช้ดีเอ็นเอจากเชื้อที่สกัดได้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ มีวิธีการดังนี้

1. เติมองค์ประกอบของส่วนผสมต่างๆ ดังตารางที่ 1 เพื่อทำให้เกิด มาสเตอร์มิกซ์(master mix) ดังตารางที่ 4

2. ผสมมาสเตอร์มิกซ์และไพรเมอร์ที่มีหรือไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมายในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 0.5 มล. ใส่ตัวอย่างลงใน พีซีอาร์เทอร์โมไซเคอร์(PCR thermocycle) และเริ่มต้นโปรแกรม ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 Denaturation ที่ 94 °C , 4 นาที
ขั้นตอนที่ 2 Denaturation ที่ 94 °C , 1 นาที
Annealing ที่ 50 °C , 1 นาที } 35 รอบ
Extension ที่ 72 °C , 1 นาที
ขั้นตอนที่ 3 Extension ที่ 72 °C , 4 นาที

เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยา เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C จนกว่าจะนำผลิตภัณฑ์ PCR ออก

วิเคราะห์ผลผลิตของพีซีอาร์โดยใช้ Agarose gel electrophoresis 1% ซึ่ง electrophoresis เป็นวิธีการที่ใช้ในการแยก ระบุชนิด และทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยการทำให้โมเลกุลที่มีประจุแยกออกจากกันในสนามไฟฟ้า ซึ่งจะช่วยให้เห็นว่า PCR product ที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์หรือไม่ (อุไรวรรณ, 2545)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เอกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟโรสิสของดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนโดยพีซีอาร์

1. ผสมสารผสมของปฏิกิริยาที่ได้จากการเพิ่มจำนวนโดยพีซีอาร์ 15 µl เข้ากับเจลโลดดิงบัฟเฟอร์ (gel loadind buffer)
2. ใส่สารผสมในข้อ 1 ลงใน 1.7 % เอการ์โรสเจลที่เตรียมไว้แล้ว
3. อิเล็กโตรโฟรีสิสที่ 90 โวลต์ เป็นเวลา 60-90 นาที หรือจนกระทั่งสีย้อมบรอมฟีนอลบลู (bromphenol blue dye) เคลื่อนที่อยู่ห่างจากปลายเจลประมาณ 2 ซม.
4. ถ่ายภาพเจลที่ได้ และวิเคราะห์จำนวนและขนาดของแถบหรือแบนด์ดีเอ็นเอที่ได้

ตารางที่ 4 มาสเตอร์มิกซ์สำหรับปฏิกิริยา PCR

องค์ประกอบของส่วนผสมต่างๆ	มาสเตอร์มิกซ์สำหรับปฏิกิริยา(µl)
10X buffer	2.50
25 mM dNTP	2.00
25 mM $MgCl_2$	1.50
primer 1	0.625
primer 2	0.625
taq polymerase	0.20
DNA	1.00
Sterile water	16.55
Total volume	25.00

3.1.2.4.4 การจำแนกชนิดของจุลินทรีย์

ในการทดลองนี้นำตัวอย่างไอโซเลทเชื้อแบคทีเรียตรึงไนโตรเจน ส่งไปทำการวิเคราะห์ทางชีววิทยาโมเลกุล โดยเทคนิค 16S rDNA ณ ห้องปฏิบัติการ DNA TECHNOLOGY มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ด้วยเครื่อง Automatic DNA Sequencer (ABI377) ซึ่งใช้หลักการติดฉลากบนเบสของดีเอ็นเอทั้ง 4 ชนิด คือ อะดีนีน (A) กัวนีน (G) ไซโตซีน (C) และไทนีน (T) ด้วยสารเรืองแสงที่แตกต่างกัน เบสทั้ง 4 นิวคลีโอไทด์เหล่านี้จะถูกนำเข้าไป (incorporate)ในสายดีเอ็นเอที่สร้างใหม่โดยใช้เอ็นไซม์ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส(DNA polymerase) จากนั้นจึงนำไปเคลื่อนผ่านเจลด้วยความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้า ด้วยหลักการของอิเล็กโตรโฟลีซีส (electrophoresis) ทำให้เกิดแถบสีของสารเรืองแสงเรียงกันตามลำดับเบสของสายดีเอ็นเอ ซึ่งจะถูกตรวจจับด้วยเครื่องรับสัญญาณแสงแล้วแปลงเป็นสัญญาณดิจิตอลส่งไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

วิเคราะห์ด้วยคอมพิวเตอร์ โดยขบวนการทั้งหมดจะเกิดขึ้นอย่างอัตโนมัติภายใต้การทำงานของเครื่องดีเอ็นเอซีเคว็นเซอร์ (DNA Sequencer)

เมื่อได้ข้อมูลที่เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อจุลินทรีย์แล้ว นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์หาชนิดจุลินทรีย์โดยอาศัยฐานข้อมูลจากอินเทอร์เนตของ National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) โดยใช้โปรแกรม BLAST ในการค้นหาและวิเคราะห์ชนิดของจุลินทรีย์ เชื้อที่นำไปจำแนกด้วยเทคนิค 16S rDNA ได้แก่ ไอโซเลท ESS 1, ESS 2, ESS 3, ESS 4, ESS 5, ESS 6 และESS 7 โดยใช้ primer 9F, 339F, 785F และ 1099F ในการวิเคราะห์ลำดับเบส โดย primer เหล่านี้จะใช้ตั้งแต่ในกระบวนการ PCR amplification โดยทำในเครื่อง Thermocycle (Astec PC800)

3.1.2.4.5. การทำแผนภูมิการวิเคราะห์แสดงความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิต (Phylogenetic tree)

การทำ Phylogenetic tree เป็นการเปรียบเทียบลำดับเบสที่วิเคราะห์จากเทคนิค 16S rDNA sequence โดยจะนำลำดับเบสที่ได้จากการตรวจสอบ เทียบกับตัวอ้างอิงที่หาจาก Gene Bank วิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยใช้โปรแกรม Bioedit ร่วมกับ MEGA 3

3.2 ทดสอบประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนในกล้วยไม้และตรวจหาหารเข้าอาศัยภายในเนื้อเยื่อพืช

3.2.1 ปลูกถ่ายเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ให้กบกล้วยไม้สกุลหวายที่มาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

คัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการตรึงไนโตรเจนที่แยกได้จากกล้วยไม้พันธุ์เอื้องสายสามสี เพื่อนำไปปลูกถ่ายให้กลับกล้วยไม้ที่มาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยเลี้ยงเชื้อที่ต้องการในอาหารเหลว (NB) เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ ทำการปลูกถ่ายเชื้อให้กับกล้วยไม้โดยให้มีปริมาณเชื้อที่ต้องการปลูกถ่ายประมาณ 10^8 cells/ml แบ่งเป็น 2 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 ทดลองในกล้วยไม้เอื้องสายสามสี วางแผนการทดลองแบบ factorial คือ มี 2 ปัจจัย ปัจจัยที่ 1 เชื้อที่ ESS 2 และ ESS 3 และปัจจัยที่ 2 คือ ส่วนที่ปลูกเชื้อ มี 4 ซ้ำ ดังนั้นจะมี 4 ตำรับ รวมชุดควบคุมเป็น 5 ตำรับ ดังนี้

ตำรับที่ 1 ชุดควบคุม กล้วยไม้สายพันธุ์เอื้องสายสามสีส่วนเหนือราก

ตำรับที่ 2 ปลูกถ่ายเชื้อ ESS 2 ในกล้วยไม้สายพันธุ์เอื้องสายสามสี บริเวณส่วนเหนือราก(ต้นและใบ)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตำรับที่ 3 ปลูกถ่ายเชื้อ ESS 3ในกล้วยไม้สายพันธุ์เอื้องสายสามสี บริเวณส่วนเหนือราก(ต้นและใบ)

ตำรับที่ 4 ชุดควบคุม กล้วยไม้สายพันธุ์เอื้องสายสามสีบริเวณราก

ตำรับที่ 5 ปลูกถ่ายเชื้อ ESS 2 ในกล้วยไม้สายพันธุ์เอื้องสายสามสี บริเวณราก

ตำรับที่ 6 ปลูกถ่ายเชื้อ ESS 3 ในกล้วยไม้สายพันธุ์เอื้องสายสามสี บริเวณราก

การทดลองที่ 2 กล้วยไม้ลูกผสม (White Fairy; W.F) วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Ramdomized Design) เป็นการทดลองแบบซุ่ม มีปัจจัยเดียว คือ เชื้อที่ใช้ในการปลูกถ่าย เชื้อ ESS 2 และ เชื้อ ESS 3 ทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ มีทั้งหมด 3 ตำรับ ดังนี้

ตำรับที่ 1 ชุดควบคุมกล้วยไม้ลูกผสม

ตำรับที่ 2 ปลูกถ่ายเชื้อ ESS 2 ในกล้วยไม้ลูกผสม(ทั้งต้น)

ตำรับที่ 3 ปลูกถ่ายเชื้อ ESS 3 ในกล้วยไม้ลูกผสม(ทั้งต้น)

ในแต่ละตำรับ ทำ 3 ซ้ำ โดยการจุ่มส่วนที่ต้องการปลูกถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเลี้ยงกล้วยไม้บน อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เก็บในตู้ที่ควบคุมแสงที่ 180 μE ความชื้น 60 % และอุณหภูมิ 25 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน จึงนำมาตรวจหาอัตราการตรึงไนโตรเจน (ดังแสดงในข้อที่ 2) และทำ ตัดเนื้อเยื่อพืช (section) เพื่อตรวจสอบตำแหน่งการเข้าอาศัยของเชื้อ

3.2.2 ประเมินประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจนในกล้วยไม้ที่ได้รับการปลูกเชื้อ

เมื่อครบ 1 เดือน นำไปตรวจหาประสิทธิภาพการตรึงไนโตรเจน ด้วยเทคนิค Acetylene Reduction Assay โดยนำกล้วยไม้ที่ต้องการทดสอบ ใส่ในขวดที่ทราบปริมาตร ปิดฝาขวดให้สนิท ดูดอากาศออก 5 % ของปริมาตรขวด จากนั้นฉีดก๊าซ acetylene เข้าไปแทนที่ในปริมาตรที่เท่ากัน บ่มไว้ 24 ชั่วโมง ตรวจวัดปริมาณ ethylene ด้วยเครื่อง GC

3.2.3 ตรวจสอบการเข้าอาศัยภายในเนื้อเยื่อพืช โดยวิธีไมโครเทคนิคทางพืช (Plant michotechnique)

การตัดเนื้อเยื่อพืช (section tissue)

คัดเลือกกล้วยไม้ที่พบการตรึงไนโตรเจน เพื่อนำมาตรวจสอบการเข้าอาศัยภายในเนื้อเยื่อพืช นำกล้วยไม้มาตัดแบ่งเป็นส่วนต่างๆ คือ ส่วนลำต้น, ส่วนใบ และส่วนราก หลังจากนำชิ้นส่วนของพืช ใส่ในน้ำยารักษาสภาพของเซลล์ (Fixative) ซึ่งเป็นน้ำยาที่ใช้ฆ่าเซลล์ และรักษาสภาพเซลล์เพื่อให้ protoplasm ภายในเซลล์หยุดขบวนการต่างๆ และมีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด สามารถเก็บรักษาเนื้อเยื่อไว้ใกล้เคียงปกติ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

แบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การรักษาสภาพเซลล์

การรักษาสภาพของเซลล์ โดยใช้สูตรน้ำยา FAA (Formalin-acetic acid-alcohol) การแช่เนื้อเยื่อ หากเนื้อเยื่อมีความอ่อน ควรแช่ไว้ 18-24 ชั่วโมง ถ้าเนื้อเยื่อมีความแข็ง ควรแช่ไว้ 1-2 สัปดาห์ หรืออาจเก็บเนื้อเยื่อไว้ประมาณ 1 ปี

สูตรน้ำยา FAA (Formalin-acetic acid-alcohol)

Ethyl alcohol 95 %	50 ml.
Acetic acid glacial	5 ml.
Formalin	10 ml.
น้ำกลั่น	35 ml.

ขั้นตอนที่ 2 การดึงน้ำออกจากเซลล์

ตารางที่ 5 การเตรียม dehydrating reagents

ขั้นตอน	50 % (ml.)	70 % (ml.)	85 % (ml.)	95 % (ml.)	100 % + erythosin (ml.)
น้ำกลั่น	50	30	15	-	-
95 % ethyl alcohol	40	50	50	45	-
TBA	10	20	35	55	75
Alcohol 100 %	-	-	-	-	25

ขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเซลล์

ขั้นที่ 1 ดึงน้ำออกด้วย dehydrating reagent 50 % ทิ้งไว้ 1 คืน

ขั้นที่ 2 ดึงน้ำออกด้วย dehydrating reagent 70 % ทิ้งไว้ 1 คืน

ขั้นที่ 3 ดึงน้ำออกด้วย dehydrating reagent 85 % ทิ้งไว้ 1 คืน

ขั้นที่ 4 ดึงน้ำออกด้วย dehydrating reagent 95 % ทิ้งไว้ 1 คืน

ขั้นที่ 5 ดึงน้ำออกด้วย dehydrating reagent 100 % + erythosin ทิ้งไว้ 1 คืน

ขั้นที่ 6 แช่ใน TBA (pure) ทิ้งไว้ 1 คืน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ขั้นที่ 7 แช่ใน TBA + liquid paraplast ทิ้งไว้ 1 คืน

ขั้นที่ 8 อบเนื้อเยื่อด้วย paraffin อุณหภูมิของตู้อบ 58-60 องศาเซลเซียส โดยเริ่มอบจาก paraffin เกรดต่ำก่อน แล้วค่อยเปลี่ยนเป็น paraffin เกรดดี โดยเปลี่ยน 3-4 ครั้ง สำหรับครั้งสุดท้ายใช้ parafin บริสุทธิ์ (paraplast) โดยอบไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ และพร้อมที่จะทำในขั้นตอนต่อไป

ขั้นตอนที่ 3 การฝังชิ้นส่วนพืชใน parafin (embedding) และการตัดเนื้อเยื่อพืช

ชิ้นส่วนที่แช่อยู่ใน parafin บริสุทธิ์ ทุกส่วนภายในเนื้อเยื่อเต็มไปด้วย paraffin ขั้นตอนนี้ คือ การนำเอาเนื้อเยื่อมาฝังใน parafin โดยหล่อเหมือนวัตถุในแม่พิมพ์ paraffin ก็จะแข็งตัว และทำหน้าที่ยึดห่อหุ้มให้ชิ้นส่วนพืชสามารถรับคมมีดได้เต็มที่ และไม่ให้เนื้อเยื่อบางส่วนหลุดออกไปขณะที่ตัด

วิธีการ

พับกระดาษเป็นพิมพ์ หรือที่เรียกว่า boat (กระทง) โดยนำกระทงวางบนโต๊ะที่มีความราบเรียบก่อนวางกระทงควรใช้กระดาษรองโต๊ะก่อน จากนั้นวางกระทง แล้วเท paraffin บริสุทธิ์ที่หลอมไว้ลงในกระทง ให้ระดับ parafin ต่ำกว่าขอบกระทงเล็กน้อย ถ้ามีฟองอากาศเกิดขึ้นใช้เข็มเขี่ยลนไฟให้ร้อน ไล่ฟองอากาศให้หมดโดยเร็ว พอ parafin แข็งตัวสูงขึ้นประมาณ 1 ใน 4 ของทั้งหมด หรือประมาณ 2 มม. รีบนำชิ้นส่วนพืชใส่ลงในกระทง แล้วใช้เข็มเขี่ยที่ลนไฟไล่ฟองอากาศอกให้หมดอีกครั้ง พร้อมกับจัดตำแหน่งของเนื้อเยื่อในระนาบที่สามารถนำไปตัดได้ตามจุดประสงค์ แล้วปล่อยให้ parafin แข็งตัว หลังจาก parafin แข็งตัวให้แกะกระดาษออก จะได้ parafin รูปเหลี่ยมข้างในมีเนื้อเยื่อพืช ก่อนนำไปตัดต้องนำแท่ง parafin ที่ embedding ไปตกแต่งโดยให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ให้ตรงกลางเป็นชิ้นส่วนพืช โดยมี parafin ล้อมรอบหนาเท่าๆกันทุกด้าน หลังจากนั้นนำแท่ง parafin ไปติดกับแท่งไม้ที่มีลักษณะขนาด 1.5 x 1.5 x 1.5 ล.บ.ซ.ม. สำหรับแท่งไม้นี้มีคุณสมบัติในการตัดแท่ง parafin ด้านหนึ่งและอีกด้านหนึ่งไว้สำหรับยึดติดกับตัวเครื่อง

อุปกรณ์การตัด

1.มีดปลายแหลม 1 อัน

2.พู่กันขนอ่อน 2 อัน

3.ที่รองรับ Ribbon section

ขณะที่ตัดใช้พู่กันเขี่ยขอบบน และล่างของ block เพื่อกำจัดเศษ parafin และควรใช้กระดาษชุบ xylene เช็ดคมมีดบ่อยครั้ง เพื่อทำความสะอาด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การตัดที่ดี ขึ้นอยู่กับ

1.ความเร็วของการหมุน หรือจังหวะในการหมุน

2.มุมของใบมีด

3.อุณหภูมิในขณะทำการตัดไม่ควรสูง หรือต่ำเกินไป

การตัดจะต้องตัดให้เป็นแผ่น ribbon ออกมาตรง และมีความยาวไม่ฉีกขาด การตัดเนื้อเยื่อกล้วยไม้ในครั้งนี้ ตัดให้มีความหนาประมาณ 13 μm. นำมาวางที่รับรองจากนั้นเลือกตรงที่ต้องการตามวัตถุประสงค์ ใช้กรรไกรตัด หรือมีดคมๆมาตัด ribbon เพื่อนำไปวางบนแผ่น slide ต่อไป ในการเตรียมแผ่น slide จะต้องสะอาด ไม่มีคราบมัน

หลังจากเตรียมน้ำยา ให้นำแผ่น slide ที่สะอาดวางลงที่ราบเรียบ แล้วหยดน้ำยายึดแผ่น ribbon ลงไปบนแผ่น slide ประมาณ 2-3 หยด จากนั้นนำไปวางบนเครื่องอุ่นแผ่น slide (Hot plate) ที่อุณหภูมิ 40 °C พอแห้งหมาดๆนำพู่กันขนาดเล็กที่เปียกน้ำแตะแผ่น ribbon ที่แบ่งเป็นชิ้นสั้นๆ นำมาวางบนแผ่น slide เรียงลำดับ ribbon จะคลี่ออกสามารถมองเห็นได้ชัดเจน จากนั้นทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 2-3 วัน หรือ 24 ชั่วโมง แล้วทำขั้นตอนต่อไป

การเตรียมน้ำยายึดแผ่น ribbon กับแผ่น slide มีขั้นตอน ดังนี้

1. ตีไข่ขาวจนข้น
2. ตักเอาฟองอากาศออก
3. ผสมไข่ขาวและน้ำกลั่น (อัตราส่วน 1 : 50)
4. นำไข่ขาวที่ผสมกับน้ำกลั่น ผสมรวมกับ Sodium bensoule 0.5-1 g จากนั้นกรองด้วยสำลี แล้วเก็บ stock ที่อุณหภูมิ ≤ 15 °C
5.เมื่อจะใช้ให้เจือจาง stock : น้ำกลั่น (อัตราส่วน 1 : 50)

ขั้นตอนที่ 4 การย้อมสีพืช ขั้นตอนการย้อมสี มีดังนี้

1. แช่ 95 % alcohol 5 นาที
2. แช่ 70 % alcohol 5 นาที
3. แช่ 50 % alcohol 5 นาที
4. แช่ Safranin O 1-12 ชั่วโมง
5. แช่น้ำกลั่น ครั้งที่1 5 นาที
6. แช่น้ำกลั่น ครั้งที่2 5 นาที
7. แช่ 50 % alcohol 5 นาที
8. แช่ 70 % alcohol 5 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

9. แช่ 95 % alcohol 5 นาที

10. จุ่ม Absolute alcohol

11. แช่สีย้อม Fast green 5-30 วินาที

12. แช่ Cover oil + Absolute alcohol + Xylene (2: 1: 1) ครั้งที่ 1 15 นาที

13. แช่ Cover oil + Absolute alcohol + Xylene (2: 1: 1) ครั้งที่ 2 15 นาที

14. แช่ Xylene ครั้งที่ 1 15-30 นาที

15. แช่ Xylene ครั้งที่ 2 15-30 นาที

16. mounted ใน canada balsam

การ mounted ใน canada balsam เป็นการทำสไลด์ถาวร และทำให้เห็นเนื้อเยื่อที่ย้อมชัดเจนยิ่งขึ้น canada balsam ก่อนใช้จะผสมกับ xylene แต่มีข้อควรระวังคือ ต้องปิดฝาขวดทุกครั้งหลังใช้ เพื่อไม่ให้แข็งตัว ถ้า canada balsam แข็งจะไม่สามารถนำมาใช้ได้อีก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved