บทที่ 3
อุปกรณ์ และวิธีการ

<u>การทดลองที่ 1</u> : การทดสอบความต้านทานของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วงต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

1.1 การแยกเชื้อราบริสุทธิ์ และเก็บรวบรวมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง

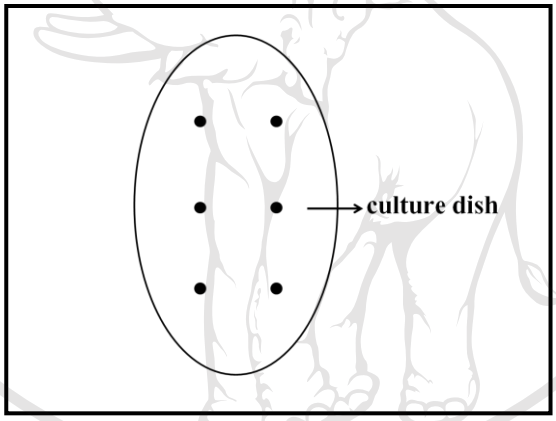
ศึกษาลักษณะอาการโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง โดยเก็บตัวอย่างมะม่วงที่เป็นโรคจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ สวน และตลาด ในจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน นครนายก และพิษณุโลก มาศึกษาอาการภายใต้กล้อง stereo microscope เพื่อตรวจดูลักษณะอาการของโรคบนผล จากนั้นนำตัวอย่างพืชมาศึกษาลักษณะอาการภายใต้กล้อง compound microscope ด้วยวิธี free hand section technique เพื่อศึกษาทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราสาเหตุของโรค

จากนั้นแยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี tissue transplanting method โดยล้างชิ้นพืชในน้ำสะอาด ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 70% ethanol ผึ่งให้แห้ง ตัดเนื้อเยื่อบริเวณรอยต่อส่วนที่เป็นโรคและส่วนปกติขนาดประมาณ 0.5 × 0.5 เซนติเมตร แช่ใน 1% sodium hypochlorite (10% Clorox) เป็นเวลา 3 - 5 นาที ใช้เข็มเขี่ยที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ย้ายชิ้นพืชไปล้างในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็นเวลา 3 – 5 นาที ซับด้วยกระดาษทิชชูที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นวางชิ้นพืชบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) โดยวางจานละ 4 ตำแหน่ง บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน เมื่อมีการเจริญของเส้นใย ใช้ cork borer ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเจาะบริเวณขอบเส้นใย นำมาเลี้ยงบนอาหาร PDA จากนั้นเก็บเชื้อในหลอดทดลอง เพื่อใช้เป็น stock culture สำหรับศึกษาขั้นต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* บนผลมะม่วง (Pathogenisity test)

พิสูจน์เชื้อสาเหตุของโรคด้วยการปลูกเชื้อราบนผลมะม่วง โดยใช้มะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สุกที่ปราศจากโรคและแมลง นำมาล้างทำความสะอาด แล้วฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 70% ethanol ผึ่งให้แห้ง จากนั้นปลูกเชื้อบนผลมะม่วงโดยทำแผลที่ผิวมะม่วงแล้ววางชิ้นเชื้อ (culture disc) ผลละ 6 ชิ้น เปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือ อาหาร PDA (ภาพ 11) แล้วนำไปเก็บไว้ใน moist chamber บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อสังเกตอาการของโรคต่อไป



ภาพ 11 การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* บนผลมะม่วง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.3 การจัดจำแนกเชื้อราสาเหตุโรคด้วยเทคนิค polymerace chain reaction (PCR)

เตรียมเส้นใยเชื้อรา และสกัดดีเอ็นเอ

เลี้ยงเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่ได้ทำการทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคทั้ง 58 ไอโซเลท บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน หรือจนเชื้อเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นใช้ spatula ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ขูดเส้นใยเชื้อราลงในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาณ 0.1 - 0.2 กรัม จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุด NucleoSpin® Plant Kit โดยนำเส้นใยเชื้อราที่เตรียมไว้ใส่ในโกร่งที่อบฆ่าเชื้อแล้ว เติมไนโตรเจนเหลวลงไปเพื่อให้เส้นใยแข็งตัว จากนั้นบดเส้นใยให้เป็นผงตักใส่หลอด Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม PL1 buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงผสม (Vortex) เติม RNaseA ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และ PL1 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นประกอบชุดทดลองสำเร็จรูป (ชุด kit) และนำของเหลวใสที่ได้ใส่ใน column สีม่วง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที นำส่วนใสด้านบนใส่หลอด Eppendorf ใหม่ จากนั้นเติม PC buffer ปริมาตร 450 ไมโครลิตร ใช้ไมโครปิเปตต์ต์ดูดขึ้นลง 5 ครั้ง จากนั้นประกอบชุด kit และนำของเหลวใสที่ได้ใส่ใน column สีเขียว นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวในหลอดทิ้ง จากนั้นล้างซิลิกาเมมเบรน (silica membrane) ใน column สีเขียว ด้วย PW buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงใน column สีเขียว นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้ง แล้วเติม PW2 buffer ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ใน column สีเขียว นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้ง แล้วเติม PW2 buffer อีก 200 ไมโครลิตร ลงใน column สีเขียว นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที แล้วเติม PE elution buffer (สำหรับ buffer PE ก่อนนำไปใช้ต้องอุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสก่อน) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงใน column สีเขียว บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อละลายเอาส่วนของดีเอ็นเอจากซิลิกาเมมเบรนของ column สีเขียว นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเติม PE elution buffer อีก 25 ไมโครลิตร ลงใน column สีเขียวอีกครั้ง บ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเก็บดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

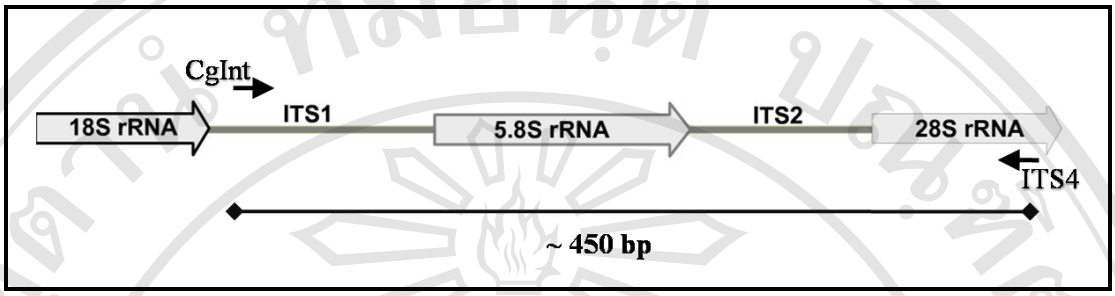
การเพิ่มปริมาณยีนบางส่วนที่ตำแหน่ง ITS ด้วยเทคนิค PCR (polymerace chain reaction)

นำดีเอ็นเอที่ได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนตรงตำแหน่ง ITS ด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ CgInt forward (5'-GGC CTC CCG CCC CCG GGCGC-3') และ ITS4 reverse (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAGGA-3') (White *et al*., 1990; Mills *et al*., 1992; Freeman *et al*., 2000) ซึ่งไพรเมอร์คู่นี้จะเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตั้งแต่บริเวณ ITS1 ของเชื้อรา *C. gloeosporioides* (ภาพ 12) ใช้ดีเอ็นเอของเชื้อรา *C. capsici* เป็นชุดควบคุม เตรียมส่วนผสมการทำ PCR ในหลอด Eppendorf ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ตามตาราง 5

ตาราง 5 ส่วนผสมของปฏิกิริยา Polymerace Chain Reaction ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนที่ตำแหน่ง ITS

สารประกอบ	ปริมาตร (µl)
10X PCR buffer	5.0
*d*NTP mix	5.0
ไพรเมอร์ CgInt	1.0
ไพรเมอร์ ITS4	1.0
DNA template	1.0
น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว	36
Taq DNA polymerace	1
ปริมาตรรวม	50

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 12 แผนภาพแสดง ribosomal DNA ของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. และตำแหน่งจับของไพรเมอร์ CgInt และ ITS4 บนตำแหน่ง ITS ที่อยู่ระหว่าง 18S และ 28S ribosomal gene ซึ่งเป็นตำแหน่งอนุรักษ์ (conserved 18S and 28S ribosomal gene sequences flanking the spacer regions) โดยให้ผลผลิต PCR (amplicons) ขนาด 450 คู่เบส

เมื่อเติมส่วนผสมทุกอย่างครบแล้ว นำหลอด PCR tube ที่เตรียมพร้อมแล้วไปเข้าเครื่อง Thermal Cycler Programmable Thermal Controller PTC-200™ Thermocycler (MJ Research, Inc., Watertown, MA) โดยกำหนดอุณหภูมิ และเวลาแต่ละขั้นตอนดังนี้

1. initial denaturation	ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที	
2. template denaturation	ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที	30 รอบ
primer annealing	ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที	
extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที	
3. primer extension	ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที	

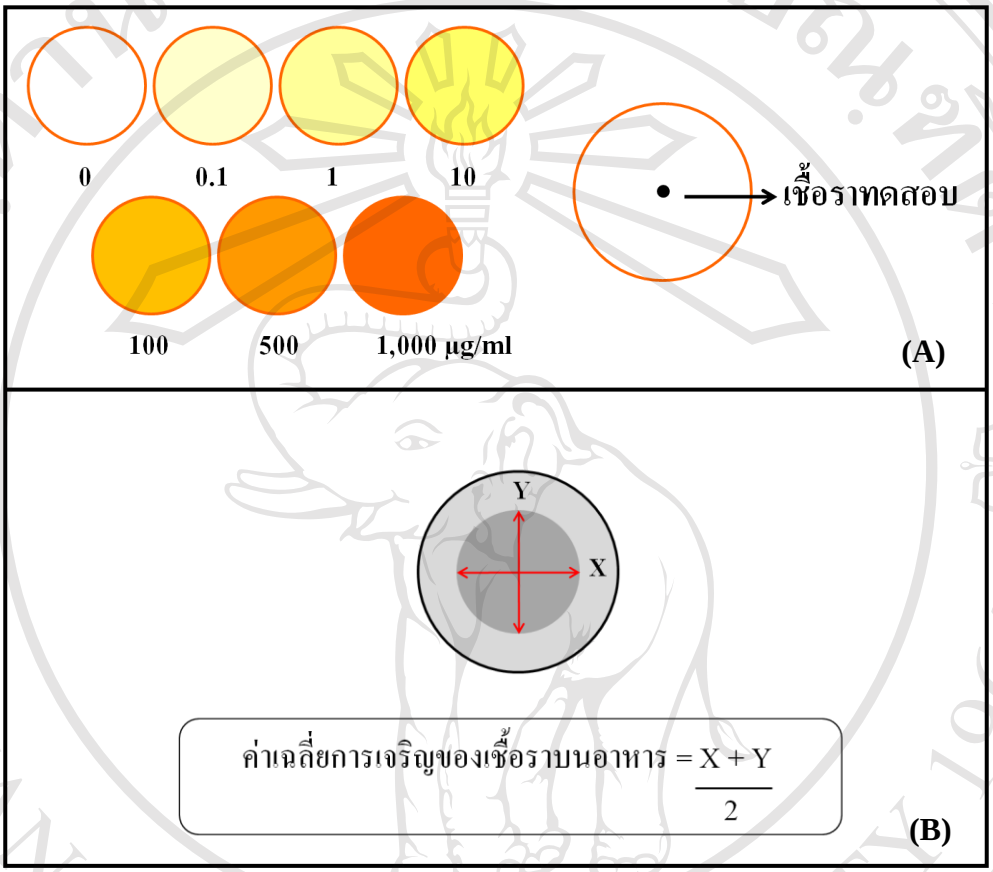
จากนั้นตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซีสโดยผสมผลผลิต PCR กับ 6X loading dye ในอัตราส่วน 5:1 ไมโครลิตร เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งใช้ 100-bp sharp DNA marker ต่อ 6X loading dye ในอัตราส่วน 8:2 ไมโครลิตร จากนั้นต่อเครื่องอิเลคโตรโฟริซิสเข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้าใช้กระแสไฟ 80 โวลต์ 400 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 40 นาที แล้วนำเจลตรวจดูภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต และบันทึกภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.4 การประเมินระดับความต้านทานของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ต่อสารป้องกันกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0, 0.1, 1, 10, 100, 500 (อัตราแนะนำ) และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ก) โดยเทอาหารใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร จานละประมาณ 10 มิลลิลิตร (ทิ้งไว้จนผิวหน้าอาหารแห้ง) ทดสอบความต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมด้วยวิธี culture disc technique โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ตัดปลายเส้นใยของเชื้อราแต่ละไอโซเลท ที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร PDA ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมความเข้มข้นต่างๆ โดยทำการทดลองความเข้มข้นละ 3 ซ้ำต่อไอโซเลท (ภาพ 13) บันทึกลักษณะโคโลนีของเชื้อรา และการเจริญของเชื้อรา โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อราเมื่อเชื้อราชุดควบคุมเจริญเต็มที่ โดยบันทึกทั้งในแกน X และแกน Y แล้วหาค่าเฉลี่ยการเจริญเส้นใยของเชื้อรา จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาประเมินตามหลักเกณฑ์ในข้อ A และ B

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 13 การทดสอบความต้านทานเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ต่อสารคาร์เบนดาซิมที่ความเข้มข้นต่างๆ;

A: ลักษณะการวางเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม

B: การประเมินหาค่าการเจริญเติบโตของเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารคาร์เบนดาซิม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หลักเกณฑ์ในการประเมินระดับความต้านทานของเชื้อราต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม พิจารณาจาก [ดัดแปลงจาก Farungsang and Farungsang (1992); Koenraadt *et al*. (1992) และ Peres *et al*. (2004)]

A. ความสามารถเจริญได้บนอาหาร PDA ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

เมื่อเลี้ยงเชื้อรา *Colletotrichum* spp. เป็นเวลา 7 วัน หรือจนกว่าเชื้อราในชุดควบคุมเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำเชื้อราจากทุกไอโซเลทมาจัดระดับความต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม 4 ระดับ ดังนี้

- เชื้อราที่อ่อนแอต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิม (sensitive: S) คือเชื้อราที่ไม่สามารถเจริญได้หรือเจริญได้เพียงเล็กน้อยบนอาหาร PDA ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับความเข้มข้น < 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- เชื้อราที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับต่ำ (weakly resistant: WR) คือ เชื้อราที่เจริญได้บนอาหาร PDA ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับความเข้มข้น $\leq$ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- เชื้อราที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับปานกลาง (moderately resistant : MR) คือเชื้อราที่เจริญได้บนอาหาร PDA ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับความเข้มข้น $\leq$ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- เชื้อราที่ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับสูง (highly resistant : HR) คือเชื้อราที่สามารถเจริญได้บนอาหาร PDA ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมระดับความเข้มข้น $\geq$ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 6 หลักเกณฑ์ในการจัดระดับความต้านทานสารคาร์เบนดาซิม (ดัดแปลงมาจาก Farungsang and Farungsang 1992; Peres *et al*. 2004)

Phenotype resistant level	Carbendazim concentration (µg/ml)					
	1	**10**	**50**	**100**	**500**[1/]	**1,000**
sensitive (S)	X[2/]	X	X	X	X	X
	✓	X	X	X	X	X
weakly resistant (WR)	✓	✓	X	X	X	X
moderately resistant (MR)	✓	✓	✓	X	X	X
	✓	✓	✓	✓	X	X
highly resistant (HR)	✓	✓	✓	✓	✓	X
	✓	✓	✓	✓	✓	✓

[1/] อัตราแนะนำ

[2/] X = เชื้อราที่เจริญไม่ได้ หรือเจริญ <10 เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม,
✓ = เชื้อราที่เจริญได้ >10 เปอร์เซนต์ ขึ้นไปเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

B. เปอร์เซนต์การเจริญของเชื้อราบนอาหาร PDA ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

นำค่าเฉลี่ยการเจริญของเชื้อราที่ได้จากการทดสอบมาประเมินหาอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราบนอาหาร PDA ที่ผสมสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมในแต่ละความเข้มข้น โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คำนวณจากสมการ ดังนี้

$$\text{เปอร์เซนต์การเจริญของเชื้อรา (เทียบกับชุดควบคุม)} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีชุดทดสอบ}}{\text{ค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี ชุดควบคุม}} \times 100$$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จากนั้นนำเปอร์เซนต์การเจริญเติบโตของเชื้อราที่ได้มาเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อราในแต่ละความเข้มข้น 5 ระดับการเจริญ ดังนี้คือ

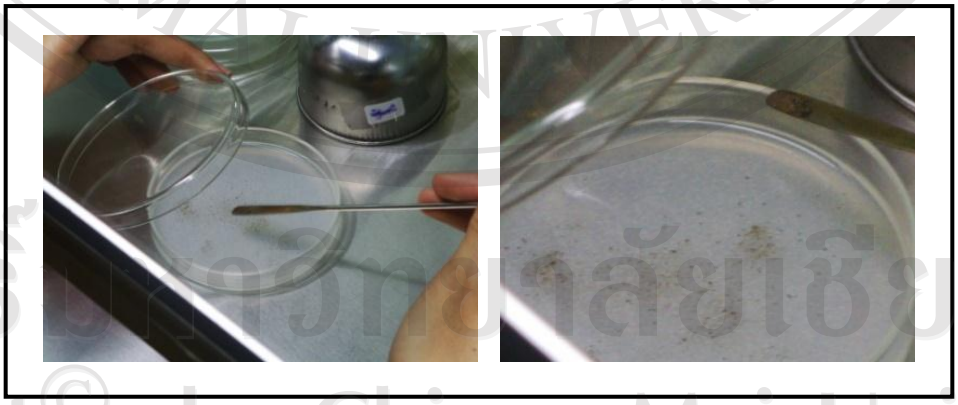
-	=	เชื้อราที่เจริญได้ ≤ 10 เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม
+	=	เชื้อราที่เจริญได้ $35 \leq 10$ เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม
++	=	เชื้อราที่เจริญได้ $65 \leq 35$ เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม
+++	=	เชื้อราที่เจริญได้ $90 \leq 65$ เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม
++++	=	เชื้อราที่เจริญได้ ≥ 90 เปอร์เซนต์ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

<u>การทดลองที่ 2</u> : การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง และการจัดจำแนกเชื้อแอกติโนไมซีส

2.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อแอกติโนไมซีสจากดิน

เก็บตัวอย่างดินจากเขตป่าในบริเวณต่างๆ ของจังหวัดเชียงใหม่ และแม่ฮ่องสอน โดยเก็บดินใส่ถุงพลาสติกใสตัวอย่างละ 1 กิโลกรัม ผึ่งตัวอย่างดินให้แห้งเป็นเวลา 7-10 วัน จากนั้นบดให้ละเอียด กรองด้วยตะแกรงขนาด 3 มิลลิเมตร นำไปอบโดยใช้ดินตัวอย่างละ 1 กรัม อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Xu *et al*., 1996; นลิน, 2541) นำตัวอย่างดินที่อบแล้วมาโรยลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ soil extract agar (SEA) (ภาคผนวก ก) (ภาพ 14) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยสังเกตลักษณะโคโลนีที่เจริญบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อค่อนข้างแห้งยึดกับอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือมีลักษณะเหมือนผงชอล์กหรือแป้งสีขาวเป็นจุดเล็กๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเกิดโคโลนีของเชื้อแอกติโนไมซีส ใช้ไม้จิ้มฟันที่อบฆ่าเชื้อแตะแล้วนำมาขีดลงบนผิวหน้าอาหาร 2 ชนิด คือ caseine starch agar (CSA) และ yeast starch agar (YSA) (ภาคผนวก ก) ที่แบ่งออกเป็น 2 ชุด ชุดแรกผสมสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมในอาหาร 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (อัตราแนะนำ) และชุดที่สองไม่ผสมสารใดๆ แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ได้ เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นเก็บรักษาในอาหารวุ้นผิวหน้าเอียง Emerson's agar (ภาคผนวก ก) เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป



ภาพ 14 การโรยตัวอย่างดินลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสชนิดต่างๆ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง

ทดสอบความสามารถในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ (antagonistic) ของเชื้อแอกติโนไมซีสที่มีผลในการยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ด้วยวิธี dual culture โดยเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสไอโซเลทต่างๆ ที่แยกได้บนอาหาร glucose yeast extract-malt extract agar (GYM) (ภาคผนวก ก) โดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วแตะผงสปอร์ของเชื้อแอกติโนไมซีสที่เลี้ยงบนอาหาร GYM เป็นระยะเวลา 7 วัน โดยขีดลงบนผิวหน้าอาหารให้ห่างจากจุดศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร โดยทดลองไอโซเลทละ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใช้ cork borer ที่ฆ่าเชื้อแล้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะบริเวณขอบเส้นใยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นระยะเวลา 7 วัน วางชิ้นเชื้อ (culture disc) ของเชื้อราสาเหตุกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้เป็นชุดทดสอบ ส่วนชุดควบคุมไม่ทำการขีดเชื้อแอกติโนไมซีส (ภาพ 15) บ่มที่อุณหภูมิห้องจนกว่าเชื้อราในชุดควบคุมเจริญถึงตำแหน่งที่ขีดเชื้อแอกติโนไมซีส แล้วบันทึกผลโดยวัดเส้นรัศมีโคโลนีของเชื้อรา จากนั้นคำนวณเปอร์เซนต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุ (percent inhibition of radial growth; PIRG) (เกษม, 2532)

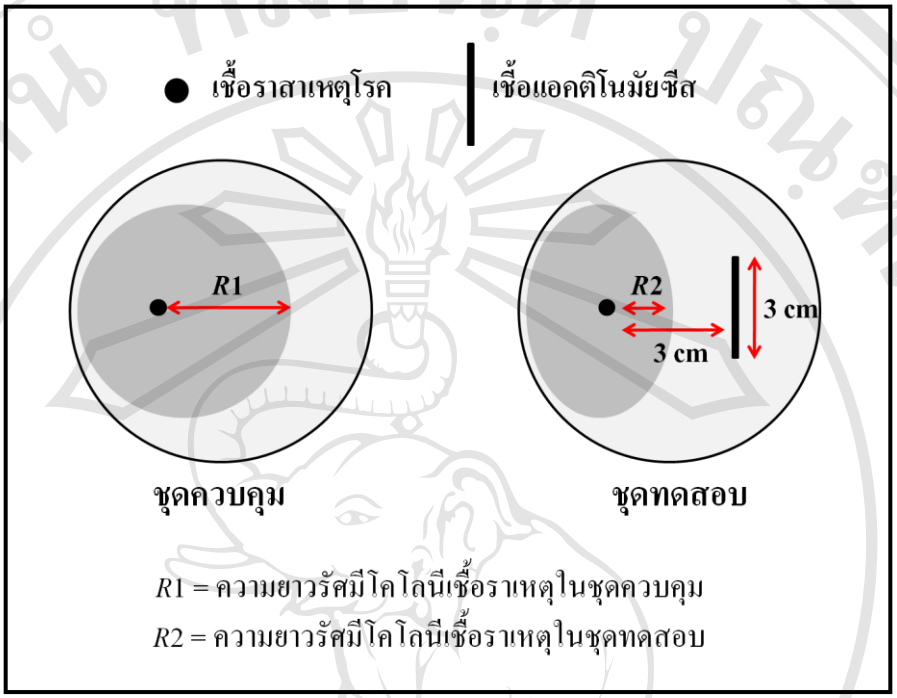
สูตรคำนวณเปอร์เซนต์การยับยั้ง (percent inhibition of radial growth, PIRG)

$$\text{PIRG} = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

โดยประมาณค่าการยับยั้งดังนี้ (เกษม, 2532)

> 75 เปอร์เซนต์	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก
> 60 – 75 เปอร์เซนต์	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง
> 50 – 60 เปอร์เซนต์	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง
≤ 50 เปอร์เซนต์	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



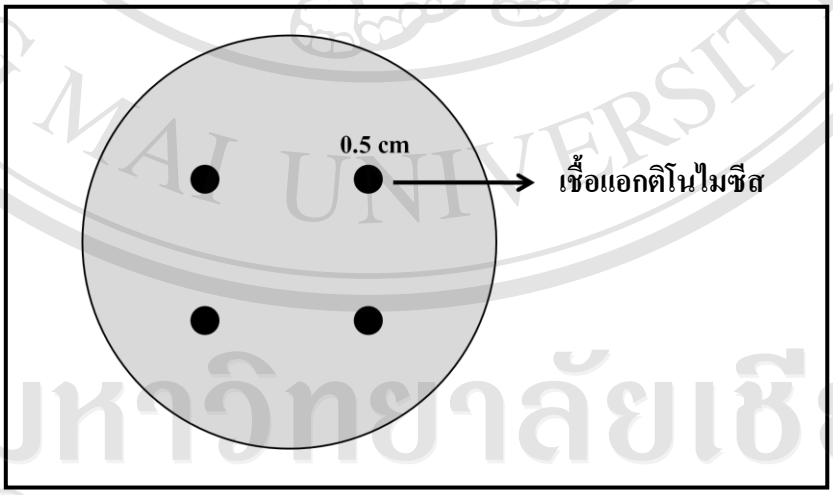
ภาพ 15 วิธีการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* โดยวิธี dual culture บนอาหาร glucose yeast extract-malt extract agar (GYM)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3 การคัดเลือกเชื้อแอกติโนไมซีสที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนส

เตรียม colloidal chitin (Hsu and Lockwood, 1975) โดยละลายผงไคตินที่ได้จากเปลือกกุ้ง (Sigma) 10 กรัม ด้วยกรดเข้มข้น H_3PO_4 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำปริมาตร 500 มิลลิลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน กรองด้วยผ้าขาวบางและล้างด้วยน้ำสะอาดจนกว่าจะได้ pH 6.2-7.2 นำ colloidal chitin ที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที เก็บรักษา colloidal chitin ที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการเตรียม colloidal chitin agar ต่อไป (ภาคผนวก ก)

เตรียม 15% colloidal chitin agar (CCA) (Hsu and Lockwood, 1975) (ภาคผนวก ก) โดยเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันที่อบฆ่าเชื้อแล้วแตะผงสปอร์ของเชื้อแอกติโนไมซีสที่แยกได้จากดินอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *C. gloeosporioides* โดยคัดเลือกเฉพาะไอโซเลทที่มีเปอร์เซนต์การยับยั้งได้มากกว่า 50 เปอร์เซนต์แตะลงบนอาหาร 4 จุดต่อ 1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพ 16) ทำการทดลองไอโซเลทละ 3 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง และสังเกตวงใส (inhibition zone) ที่เกิดขึ้นบนอาหาร CCA บันทึกผลการทดลอง โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้น



ภาพ 16 การคัดเลือกเชื้อแอกติโนไมซีสที่ผลิตเอนไซม์ไคติเนส โดยใช้วิธีแท่งวุ้น (agar plug method) บนอาหาร colloidal chitin agar

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4 การทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีส

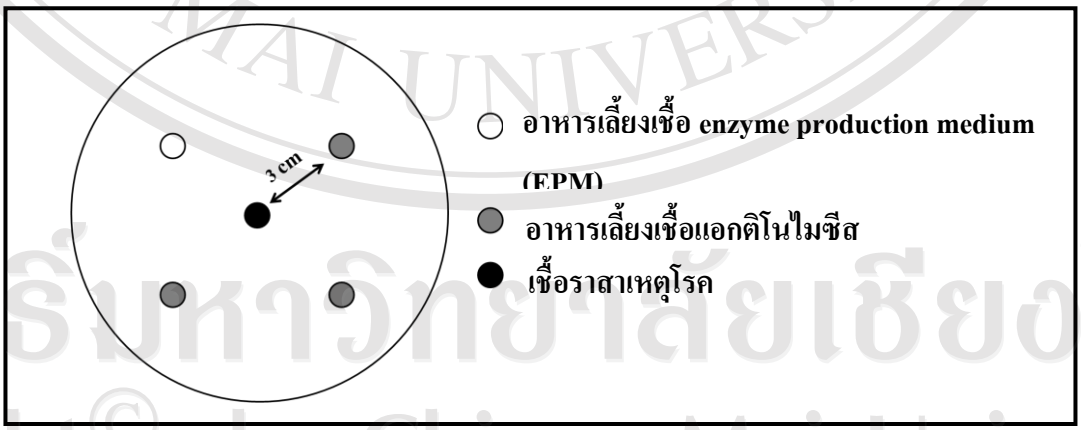
เพิ่มปริมาณเชื้อแอกติโนไมซีสบริสุทธิ์ จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง ซึ่งมีเปอร์เซนต์การยับยั้งเชื้อราสาเหตุได้มากกว่า 70 เปอร์เซนต์ ในห้องปฏิบัติการ และสามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสบนอาหารแข็ง 15 เปอร์เซนต์ colloidal chitin agar โดยเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสทั้ง 6 ไอโซเลท บนอาหาร oatmeal agar (OMA) (ภาคผนวก ก) ด้วยวิธี streak plate บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งเชื้อแอกติโนไมซีสที่คัดเลือกนี้ มีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ไคติเนสที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum* spp. สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของพริก และเชื้อรา *Cercospora* sp. สาเหตุโรคใบจุดผักกาดหอมได้ 100 เปอร์เซนต์ (วรรษมน, 2553; ณัฐพงษ์, 2553)

ในการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีสจำนวน 6 ไอโซเลท เพื่อยับยั้งการเจริญเส้นใยของเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง จำนวน 1 ไอโซเลท ได้แก่ NDM_F012 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมได้ระดับสูง ทำโดยนำเชื้อแอกติโนไมซีสที่เลี้ยงบนอาหาร oatmeal agar (OMA) เป็นเวลา 7 วัน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะเอาโคโลนีเชื้อแอกติโนไมซีส จำนวน 10 ชิ้น ใส่ในอาหารเหลว enzyme production medium (EPM) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 13 วัน จากนั้นนำอาหาร EPM ที่เลี้ยงเชื้อไว้ตามระยะเวลาที่ต้องการทดสอบไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกย้ายใส่ในหลอด Eppendorf ใหม่ จะได้อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่ไม่กรองเอาเชื้อออก (NF; non-filtrate culture) อีกส่วนกรองด้วยชุดกรองแบคทีเรีย (Minisart®) ซึ่งขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร จะได้อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่กรองเอาเชื้อออก (F; filtrate culture) จากนั้นใช้ไมโครปิเปตต์ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสทั้ง 2 ชนิด ไปใช้ในการทดสอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.1 การทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสในการยับยั้งการเจริญของเส้นใย

ทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีส ในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง จำนวน 1 ไอโซเลท ได้แก่ NDM_F012 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมได้ระดับสูง ด้วยวิธี agar well diffusion method โดยเทอาหารวุ้น PDA 2 ชั้น (double layer) ชั้นล่างเป็น base layer (ความหนาประมาณ 0.1 เซนติเมตร) ชั้นบนเป็น seeded layer (ความหนาประมาณ 0.5 เซนติเมตร) เจาะวุ้นชั้นบนให้เป็นหลุมด้วย cock borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร (Koneman *et al.*, 1983) หยดอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่ไม่กรองเอา เชื้อออก (NF), อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่กรองเอาเชื้อออก (F) และอาหารเหลว EPM ปริมาตร 50 ไมโครเมตร ลงในหลุม ห่างจากเชื้อรา *C. gloeosporioides* 3 เซนติเมตร (ภาพ 17) ซึ่งอาหารเลี้ยงแอกติโนไมซีสนี้จะใช้ทดสอบตั้งแต่น้ำเลี้ยงที่บ่มบนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 3 - 15 วัน ทำการทดสอบทุกวัน โดยหยดอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีส และวางเชื้อรา *C. gloeosporioides* พร้อมกัน จากนั้นบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องจนเชื้อราในชุดควบคุมเจริญถึงตำแหน่งหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีส ทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสจำนวน 3 ซ้ำ บันทึกผลการทดลอง โดยวัดความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในชุดทดสอบเปรียบเทียบกับความยาวรัศมีของโคโลนีเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในชุดควบคุม จากนั้นคำนวณหาเปอร์เซนต์การยับยั้งเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช

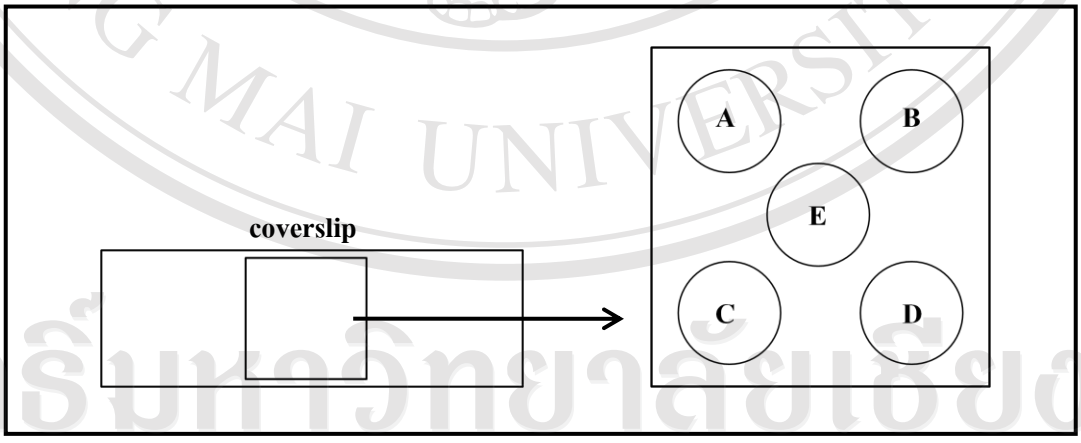


ภาพ 17 การทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสโดยวิธีแพร่ (agar well diffusion method)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสในการยับยั้งการงอกของสปอร์

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีส จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 ในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง จำนวน 1 ไอโซเลท ได้แก่ NDM_F012 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมได้ระดับสูงด้วยเทคนิค slide culture โดยเตรียมเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในรูป spore suspension ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลตร ใช้ไมโครปิเปตต์ดูด spore suspension และอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่ไม่กรองเอาเชื้อออก (NF) หรืออาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่กรองเอาเชื้อออก (F) อย่างละ 100 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร PDA ในจานอาหาร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือเฉพาะ spore suspension แล้วใช้แท่งแก้วเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าจานอาหาร จากนั้นตัดชิ้นวุ้นขนาด 1 × 1 เซนติเมตร จำนวน 3 ชิ้น นำไปวางในชุด slide culture บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วตรวจนับจำนวนโคนิเดียที่งอกที่เวลา 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยโคนิเดียที่ถือว่างอกนั้น ต้องงอก germ tube ออกมามากกว่าความกว้างของโคนิเดีย ซึ่งการตรวจดูลักษณะของโคนิเดียและการตรวจนับการงอกของโคนิเดียนั้น จะสุ่มตรวจ 5 ตำแหน่ง คือ บริเวณรอบชิ้นวุ้นที่ตำแหน่ง A, B, C และ D จำนวน 4 ตำแหน่ง และตรงกลางชิ้นวุ้นที่ตำแหน่ง E อีก 1 ตำแหน่ง (ภาพ 18)



ภาพ 18 ตำแหน่งที่สุ่มตรวจนับสปอร์ของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ที่งอกบน cover slip

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสในการยับยั้งการงอกของเกิดโรคแอนแทรคโนสจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* บนผลมะม่วง

ทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแอกติโนไมซีส จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 ในการยับยั้งการงอกของสปอร์เชื้อรา *C. gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสมะม่วง จำนวน 1 ไอโซเลท ได้แก่ NDM_F012 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ต้านทานต่อสารกำจัดเชื้อราคาร์เบนดาซิมได้ระดับสูง โดยการปลูกเชื้อบนผลมะม่วงพันธุ์น้ำดอกไม้สุกที่ปราศจากโรคและแมลง นำมาล้างทำความสะอาด แล้วฆ่าเชื้อที่ผิวด้วย 70% ethanol ผึ่งให้แห้ง จากนั้นปลูกเชื้อบนผลมะม่วงโดยเตรียมเชื้อรา *C. gloeosporioides* ในรูป spore suspension ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลตร ใช้ไมโครปิเปตต์ดูด spore suspension และ อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่ไม่กรองเอาเชื้อออก (NF) หรืออาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่กรองเอาเชื้อออก (F) อย่างละ 150 ไมโครลิตร ผสมกันในหลอด Eppendorf แล้วนำไปหยดบนผลมะม่วงที่ทำแผล แผลละ 20 ไมโครลิตร ผลละ 8 แผล ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม 6 ชุด คือ อาหาร EPM, น้ำกลั่น, อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด NF, อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด F, spore suspension และทำแผลบนผล (ภาพ 19) นำไปเก็บไว้ใน moist chamber บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อสังเกตอาการของโรค บันทึกผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของแผลที่เกิดขึ้นในแนวแกน x และ y แล้วคำนวณหาค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลาง จากนั้นคำนวณเปอร์เซนต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราสาเหตุ (percent inhibition of radial growth; PIRG) (เกษม, 2532)

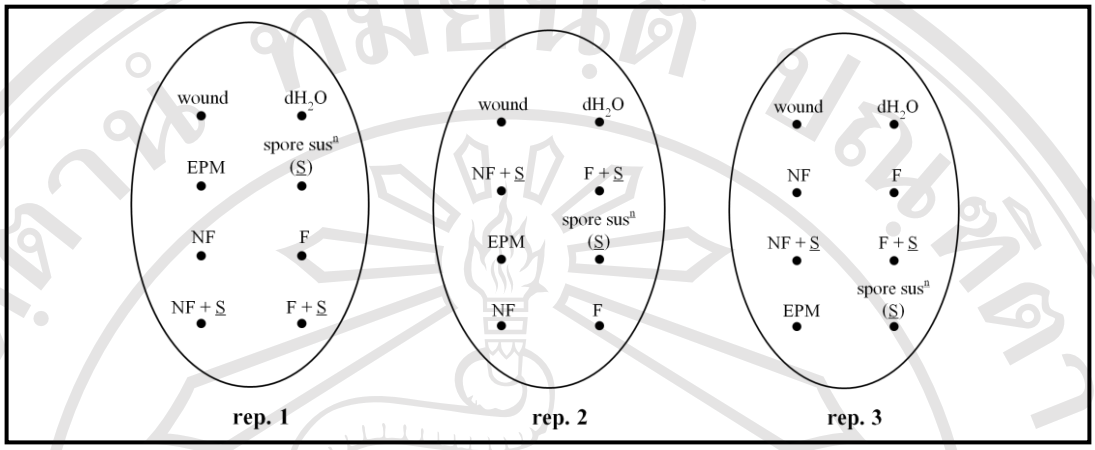
สูตรคำนวณเปอร์เซนต์การยับยั้ง (percent inhibition of radial growth, PIRG)

$$\text{PIRG} = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

โดยประมาณค่าการยับยั้งดังนี้ (เกษม, 2532)

> 75 เปอร์เซนต์	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงมาก
> 60 – 75 เปอร์เซนต์	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง
> 50 – 60 เปอร์เซนต์	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งปานกลาง
≤ 50 เปอร์เซนต์	มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 19 อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสบนผลมะม่วง เพื่อการทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุโรคแอนแทรคโนสของมะม่วง; wound = ทำแผล, dH_2O = น้ำกลั่น, EPM = อาหาร enzyme production medium, spore sus^{n} (S) = spore suspension ของเชื้อราสาเหตุโรคไอโซเลท NDM_F01, NF = อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่ไม่กรองเอาเชื้อออก และ F = อาหารเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสที่กรองเอาเชื้อออก

2.5 การจัดจำแนกชนิดของเชื้อแอกติโนไมซีส

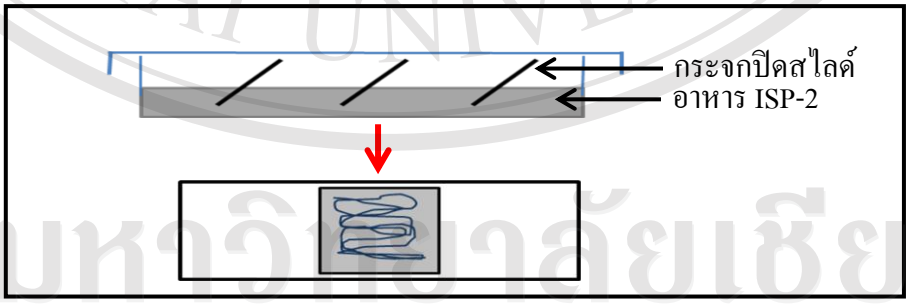
2.5.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีและสปอร์ โดยวิธี inclined coverslip

นำเชื้อแอกติโนไมซีส 15 ไอโซเลท (ตาราง 7) เลี้ยงบนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP-2) (ภาคผนวก ก) ด้วยวิธี streak plate แล้วใช้ปากคีบ (forceps) จุ่มแอลกอฮอล์ผ่านไฟฆ่าเชื้อคีบกระจกปิดสไลด์ (cover slip) ที่ปลอดเชื้อปักลงในอาหารเป็นมุม 45 องศา ให้ลึกลงไปในเนื้ออาหาร ISP-2 ประมาณครึ่งแผ่น (ภาพ 20) บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 7 วัน หรือจนกว่าเชื้อแอกติโนไมซีสจะเจริญขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นย้อมสีกระจกปิดสไลด์ที่มีเชื้อเชื้อแอกติโนไมซีสเจริญอยู่แบบ simple stain โดยหยดด้วยสารละลาย 0.1% crystal violet ทิ้งไว้ประมาณ 3 นาที ซับน้ำออกให้แห้ง จากนั้นตรวจดูลักษณะ เส้นใย และสปอร์ ของเชื้อแอกติโนไมซีสภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า โดยเปรียบเทียบลักษณะต่างๆ ตามเอกสารของ Williams *et al*. (1989) และ Miyadoh *et al*. (1997) เพื่อจำแนกจีนัส (genus) ของเชื้อแอกติโนไมซีส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 7 เชื้อแอกติโนไมซีสจากดินที่นำมาจัดจำแนกชนิด

ลำดับที่	ไอโซเลท	แหล่งที่มา
1	NSP1	อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย อ.เมือง จ.เชียงใหม่
2	NSP2	อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย อ.เมือง จ.เชียงใหม่
3	NSP3	อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย อ.เมือง จ.เชียงใหม่
4	NSP4	อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย อ.เมือง จ.เชียงใหม่
5	NSP5	อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย อ.เมือง จ.เชียงใหม่
6	NSP6	อุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย อ.เมือง จ.เชียงใหม่
7	NOK7	อ.อมก๋อย จ.เชียงใหม่
8	NOK8	อ.อมก๋อย จ.เชียงใหม่
9	NOK9	อ.อมก๋อย จ.เชียงใหม่
10	NOK10	อ.อมก๋อย จ.เชียงใหม่
11	NHK11	น้ำตกห้วยแก้ว อ.เมือง จ.เชียงใหม่
12	NHK12	น้ำตกห้วยแก้ว อ.เมือง จ.เชียงใหม่
13	NOK13	อ.อมก๋อย จ.เชียงใหม่
14	CHK14	น้ำตกห้วยแก้ว อ.เมือง จ.เชียงใหม่
15	NHK15	น้ำตกห้วยแก้ว อ.เมือง จ.เชียงใหม่



ภาพ 20 การเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสด้วยเทคนิค inclined coverslip เพื่อศึกษาลักษณะสปอร์ของเชื้อแอกติโนไมซีส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.5.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบผนังเซลล์ diaminopimelic acid (DAP) ของเชื้อแอกติโนไมซีส

วิเคราะห์หา diaminopimelic acid (DAP) ซึ่งเป็นองค์ประกอบภายในผนังเซลล์ของเชื้อแอกติโนไมซีส ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Lechevalier and Lechevalier (1970) โดยใช้วิธีการแยกสีของสารละลายมาตรฐานจากเทคนิค thin layer chromatography (TLC) เทียบกับสารละลายมาตรฐาน 0.01 M *LL* and *meso* – A_2pm โดยเลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสจำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 และ NSP6 ในอาหาร non-sporulating medium (ภาคผนวก ก) เมื่อเชื้อเจริญเติบโตเต็มที่ใช้ระยะเวลาประมาณ 1 - 2 สัปดาห์ ใช้ปลาย loop ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วขูดโคโลนีของเชื้อแอกติโนไมซีสที่เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ประมาณ 100 mg ใส่ในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 ไมโครลิตร ที่บรรจุ 6 N HCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Vortex เป็นเวลา 6 นาที นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลาประมาณ 20 นาที แล้วแยกส่วนที่เป็นของเหลว (supernatant) โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จะได้สารละลายที่ใช้เป็นตัวอย่างในการวิเคราะห์ DAP หยดสารละลายตัวอย่าง 3 ไมโครลิตร และสารละลายมาตรฐาน (0.01 M *LL*-A_2pm and *meso*-A_2pm) 1 ไมโครลิตร ลงบนฐานของแผ่นทดสอบ TLC plate นำไปแช่ใน TLC tank ที่บรรจุตัวทำละลาย ดังนี้ methanol-distilled : water : 6 N HCl : pyridine ในอัตราส่วน 80 : 26 : 4 : 10 v/v โดยใช้เวลาให้สารละลายซึมผ่านแผ่น TLC ประมาณ 3 - 6 ชั่วโมง และผึ่งแผ่น TLC ให้แห้งใน fume hood ประมาณ 3 - 5 นาที จากนั้นฉีดพ่นสารละลาย 0.2% ninhydrin ให้ทั่วแผ่น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที สังเกตการแยกสีและบันทึกผลการทดลอง

2.5.3 การจัดจำแนกเชื้อแอกติโนไมซีสด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา โดยใช้แทคนิค 16S rDNA sequencing

การเตรียมเชื้อแอกติโนไมซีสและการสกัดดีเอ็นเอ

เลี้ยงเชื้อแอกติโนไมซีสจำนวน 15 ไอโซเลท (ตาราง 7) ในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุอาหารเหลว yeast-malt extract broth (YM broth) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ใช้ไมโครปิเปตต์ดูดเชื้อแอกติโนไมซีสที่เลี้ยงในอาหารเหลว YM ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสทิ้ง จากนั้นนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุด NucleoSpin Plant Kit® แล้ว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เติม buffer T1 ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ในส่วนที่เป็นตะกอน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นใช้ไม้ที่ผ่านการฆ่าเชื้อช่วยในการบด เพื่อให้เซลล์แตก (ดัดแปลงวิธีการมาจาก Cook and Meyers, 2003) และเติม Proteinase K ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เขย่าให้สารละลายเข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสด้านบนใส่ในหลอดใหม่ เติม buffer B3 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าให้สารละลายเข้ากันอีกครั้ง แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติม 96 – 100% ethanol ปริมาตร 210 ไมโครลิตร เขย่าให้สารละลายเข้ากัน จากนั้นประกอบชุดทดลองสำเร็จรูป (ชุด kit) แล้วเทแต่ละตัวอย่างลงใน Nucleospin Tissue Column (Collection tube) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เติม buffer BW ลงไป 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เติม buffer B5 600 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาทีและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที อีกครั้ง จากนั้นจึงใส่ buffer BE (สำหรับ buffer BE ก่อนนำไปใช้ต้องอุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ก่อน) 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที และนำไปนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดเสร็จเรียบร้อยใส่ในหลอดใหม่ เก็บดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

การเพิ่มปริมาณยีนบางส่วนที่ตำแหน่ง 16S rDNA ด้วยเทคนิค PCR (polymerace chain reaction)

นำดีเอ็นเอของเชื้อแอกติโนไมซีส จำนวน 15 ไอโซเลท มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนตรงตำแหน่งยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 16Sf forward (5'-TCA CGG AGA GTT TGA TCCTG-3') และ 16Sr reverse (5'-GCG GCT GCT GGC ACG TAGTT-3') (Kim *et al*., 2003) โดยผสมสารตามตาราง 8

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 8 ส่วนผสมของปฏิกิริยา Polymerace Chain Reaction ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนของยีน 16S rDNA

สารประกอบ	ปริมาตร (µl)
10X PCR buffer	5.0
*d*NTP mix	5.0
ไพรเมอร์ 16Sf	1.0
ไพรเมอร์ 16Sr	1.0
DNA template	1.0
น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว	36
Taq DNA polymerace	1
ปริมาตรรวม	50

เมื่อเติมส่วนผสมทุกอย่างครบแล้ว นำหลอด PCR ที่เตรียมพร้อมแล้วไปเข้าเครื่อง Thermal Cycler Programmable Thermal Controller PTC-200™ Thermocycler (MJ Research, Inc., Watertown, MA) โดยกำหนดอุณหภูมิ และเวลาแต่ละขั้นตอนดังนี้

1. initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที
2. template denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 0.5 นาที
   primer annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเวลา 0.5 นาที
   extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 1.5 นาที
   } 30 รอบ
3. primer extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเวลา 5 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 21 ตำแหน่งจับของไพร์เมอร์ 16Sf และ 16Sr บนยีน 16S ribosomal DNA ของเชื้อแอกติโนไมซีส *Streptomyces coelicolor* (accession no. Y00411.1)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี 1% agarose gel electrophoresis

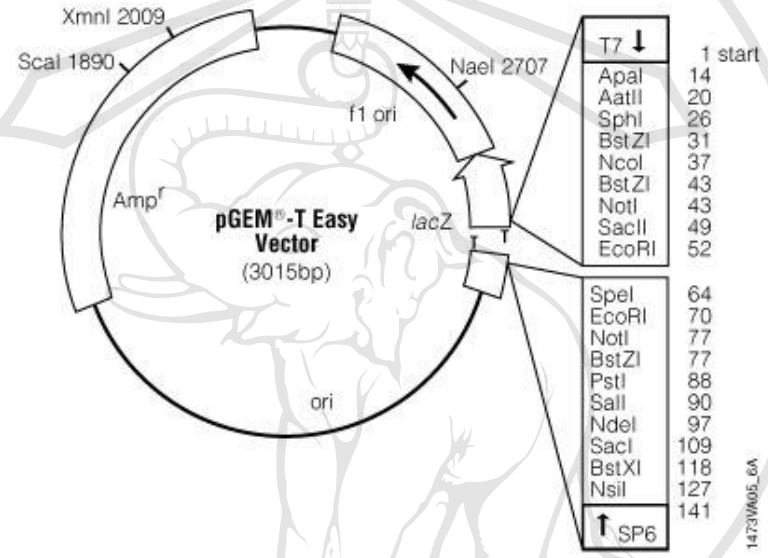
ตรวจสอบผลผลิต PCR ด้วยวิธี 1% agarose gel electrophoresis โดยผสมผลผลิต PCR ที่ได้กับ 6X loading dye ในปริมาตร 5:1 ไมโครลิตร เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งใช้ λ DNA digested by *Hind III* ต่อ 6X loading dye ในปริมาตร 8:2 ไมโครลิตร ต่อเครื่องอิเลคโทรโฟริซีสเข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า ใช้กระแสไฟ 90 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำเจลไปตรวจดูภายใต้แสง อุลตร้าไวโอเลต และบันทึกภาพ จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้มาทำ purification ด้วยชุด NucleoSpin® Extract II แล้วจึนำดีเอ็นที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค 16S rDNA sequencing

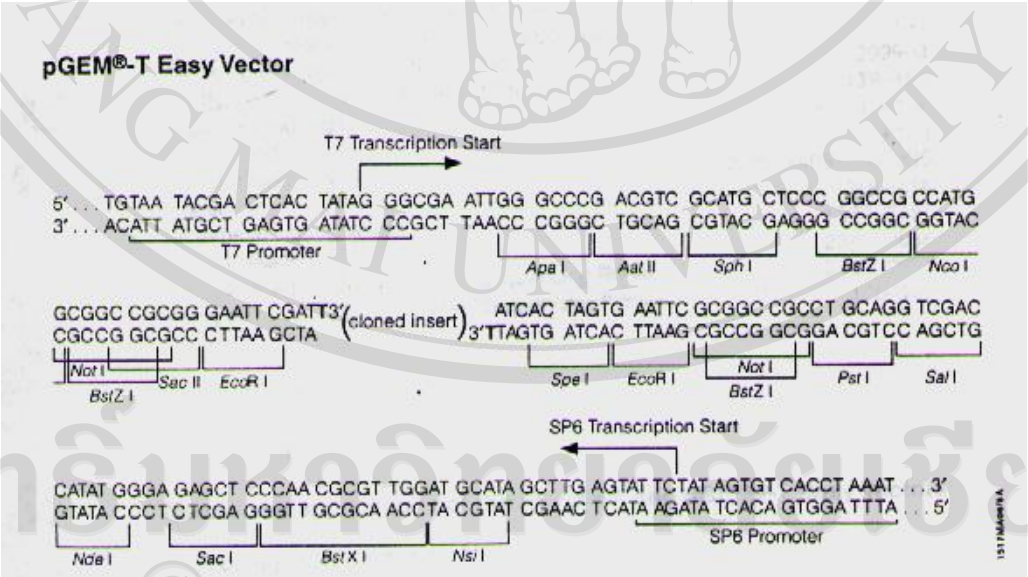
การทำ Transformation และ colony direct PCR

นำผลผลิตจาก PCR ที่ได้มาตรวจสอบบน 1% low melting point gel (Invitrogen®) โดยผสมผลผลิต PCR กับ 6X loading dye ในปริมาตร 20:3 ไมโครลิตร เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานต่อ 6X loading dye ในปริมาตร 8:2 ไมโครลิตร จากนั้นต่อเครื่องอิเล็กโทรโฟริซีสเข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า เติม 50X TAE ให้ท่วมเจล ใช้กระแสไฟ 60 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำเจลตรวจดูภายใต้แสงอุลตร้าไวโอเลต ใช้ใบมีดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ตัดเจลบริเวณแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ (ขนาด 500 คู่เบส) ลงในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำเจลมาหลอมให้ละลาย ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หรือจนกว่าเจลจะหลอมหมด จากนั้นนำเจลที่หลอมมา ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ใส่ลงใน T-vector pGEM® Easy 0.5 ไมโครลิตร (ภาพ 22) ที่เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร, 2X ligation buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และ T4 DNA ligase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (โดยทำบนน้ำแข็ง) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เตรียม competent cell (*Escherichia coli*) ที่แช่แข็งที่ -80 องศาเซลเซียส มาทำให้ละลายโดยแช่ในน้ำแข็ง จากนั้นหลอมเจลที่บ่มไว้เป็นเวลา 12 ชั่วโมงอีกครั้ง ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 - 2 นาที นำลงใน competent cell แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที จากนั้นนำมาแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที เตรียม SOC medium (Super Optimal broth with Catabolite repression) (Invitrogen®) 800 ไมโครลิตร ในหลอดอาหาร (tube) จากนั้นนำ competent cell ใส่ลงใน SOC medium บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เทอาหารแข็ง Luria-Bertani (LB) ที่ผสม ampicillin ความเข้มข้น 130 มิลลิโมล ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นหยด 5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-*β-D* galacto pyranoside (X-gal) และ Isopropyl-*β-D*-thiogalactopy ranoside (IPTG) อย่างละ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

30 ไมโครลิตร ใช้แท่งแก้วรูปตัวเอล (L-shape) เกลี่ยให้แห้ง นำ SOC medium ที่มีส่วนผสมของ competent cell มา 200 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร LB ที่เตรียมไว้ ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลเกลี่ยให้ผิวหน้าอาหารแห้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

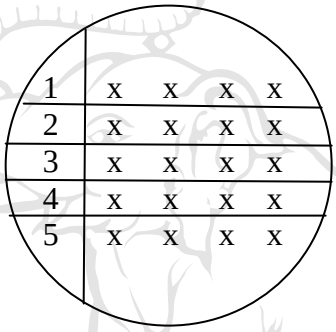




ภาพ 22 แผนที่พลาสมิดเวกเตอร์ (T-vector *p*GEM® Easy)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เลือกโคโลนีสีขาวที่ขึ้นบนอาหาร LB ที่ได้โดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วแตะโคโลนีสีขาว แล้วนำมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB ที่ผสมสาร ampicillin ความเข้มข้น 130 มิลลิโมล ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (ภาพ 23) หลังจากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันที่แตะโคโลนีจุ่มลงในหลอด PCR ที่ผสมสารดังตาราง 6 (colony direct PCR) นำไปเข้าเครื่อง PCR (สุ่มเลือก 4 โคโลนีต่อ 1 ตัวอย่าง) เพื่อเป็นการตรวจสอบเบื้องต้นว่าโคโลนีที่เลือกมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง LB มีส่วนของ insert gene 16S rDNA หรือไม่



ภาพ 23 การเลี้ยง *Escherichia coli* บนอาหารแข็ง Luria-Bertani (LB) ที่ผสมสาร 130 mM ampicillin

จากนั้นนำ ผลผลิต PCRที่ได้มาโหลด (load) บน 1% agarose gel โดยมีส่วนผสมของ ผลผลิต PCR ต่อ 6X loding dye ในอัตราส่วน 5:2 ไมโครลิตร หากปรากฏแถบดีเอ็นเอตรงตำแหน่ง 500 คู่เบส แสดงว่าโคโลนีที่เลือกมามีส่วนของ insert gene 16S rDNA อยู่ จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันที่ฆ่าเชื้อแล้วแตะโคโลนีที่เลี้ยงไว้บนอาหาร LB โดยเลือกโคโลนีที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในขั้นตอนการทำ colony direct PCR มาเลี้ยงในหลอดอาหารเหลว LB ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ที่ผสม ampicillin ความเข้มข้น 130 มิลลิโมล แล้ว โดยใส่ไม้จิ้มฟันลงไปด้วย บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 - 12 ชั่วโมง จากนั้นนำใส่หลอด Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำส่วนใสทิ้งเก็บตะกอนไว้ จากนั้นสกัด plasmid *E. coli* ด้วย NucleoSpin® plasmid Kit โดยเติม P1 buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ลงในหลอด Eppendorf ที่มีตะกอนอยู่ ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมให้เข้ากัน เพื่อให้เซลล์ membrane แตก เติม P2 buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาประมาณ 5 ครั้ง เติม N3 buffer ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ใสลงใน column สีขาว ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายส่วนใส เติม PE buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งสารละลายส่วนใส นำ column ไปปั่นเหวี่ยงให้แห้ง ด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำ column ที่ได้ใส่ในหลอด Eppendorf เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 50 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้ง column สีขาวเก็บหลอด Eppendorf ที่มีส่วน plasmid ของแบคทีเรียไว้เพื่อนำไปทำ PCR ในขั้นตอนต่อไป เตรียม master mix (ตาราง 10, 11) โดยแยกหลอดออกเป็น 2 หลอด คือหลอดที่ผสมไพรเมอร์ T7 และไพรเมอร์ Sp6 นำตัวอย่างที่ได้ 1 ไมโครลิตร ลงในหลอด PCR ที่ผสม master mix ไว้แต่ละหลอดแล้ว นำไปเข้าเครื่อง PCR

ตาราง 9 ส่วนผสมของปฏิกิริยา Polymerace Chain Reaction ในขั้นตอนการทำ colony direct PCR

สารประกอบ	ปริมาตร (µl)
10X PCR buffer	0.5
*d*NTP mix	0.5
ไพรเมอร์ T7	0.1
ไพรเมอร์ Sp6	0.1
น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว	3.72
Taq (Blend *Taq* (TOYOBO))	0.08
ปริมาตรรวม	5

เมื่อเติมส่วนผสมทุกอย่างครบแล้ว นำหลอด PCR เตรียมพร้อมแล้วไปเข้าเครื่อง Thermal Cycler Programmable Thermal Controller PTC-200™ Thermocycler (MJ Research, Inc., Watertown, MA) โดยกำหนดอุณหภูมิ และเวลาแต่ละขั้นตอนดังนี้

1. initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที
2. template denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 0.5 นาที
   primer annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 15 วินาที
   extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที
   } 40 รอบ
3. primer extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเวลา 5 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 10 ส่วนผสมของปฏิกิริยา Polymerace Chain Reaction ในขั้นตอนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ T7

สารประกอบ	ปริมาตร (µl)
buffer	3
ไพรเมอร์ T7	1
Big Dye	2
น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว	13
template	1
ปริมาตรรวม	20

ตาราง 11 ส่วนผสมของปฏิกิริยา Polymerace Chain Reaction ในขั้นตอนการหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้ไพรเมอร์ Sp6

สารประกอบ	ปริมาตร (µl)
buffer	3
ไพรเมอร์ Sp6	1
Big Dye	2
น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว	13
template	1
ปริมาตรรวม	20

เมื่อเติมส่วนผสมทุกอย่างครบแล้ว นำหลอด PCR tube ที่เตรียมพร้อมแล้วไปเข้าเครื่อง Thermal Cycler Programmable Thermal Controller PTC-200™ Thermocycler (MJ Research, Inc., Watertown, MA) โดยกำหนดอุณหภูมิ และเวลาแต่ละขั้นตอนดังนี้

1. initial denaturation ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที
2. template denaturation ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เวลา 0.5 นาที
   primer annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 15 วินาที
   extension ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เวลา 4 นาที
   } 30 รอบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นำผลผลิต PCR ที่ได้หลังจากการตรวจสอบบน 1% agarose gel ใส่ลงในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม sodium ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ 100% ethanol ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปผสมให้เข้ากันโดยเครื่อง Vortex เก็บที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายใสทิ้ง เติม 70% ethanol ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนใสทิ้ง ผึ่งตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง จากนั้นนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และเปรียบเทียบลักษณะทางพันธุกรรม

เติม buffer Hi-Di ^{TM} formamide ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในตะกอนดีเอ็นเอ ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมให้เข้ากัน (Vortex) เพื่อให้ดีเอ็นเอแยกเป็นสายเดี่ยว จากนั้นเปลี่ยนหลอด Eppendorf เป็นหลอดสำหรับใช้ทำ sequence นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำสารละลายดีเอ็นเอไปตรวจสอบลำดับเบสด้วยเครื่อง ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer โดยตั้งค่าต่างๆ ตามคู่มือการใช้ที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ โดยเครื่องจะทำงานประมาณ 3 ชั่วโมง ต่อการอ่านค่า 1 ตัวอย่าง การทำงานของเครื่องจะเป็นไปแบบอัตโนมัติ และบันทึกผลโดยเครื่องคอมพิวเตอร์ที่ต่อกับเครื่องหาลำดับเบส ซึ่งเมื่อเสร็จสิ้นการทำงานของเครื่องแล้วสามารถนำข้อมูลออกจากเครื่องคอมพิวเตอร์ เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ผลต่อไป โดยเปรียบเทียบข้อมูลนิวคลีโอไทด์ที่ได้ทั้งหมดกับข้อมูลจาก National Center for Biotechnology Information (NCBI) ที่เวปไซต์ http://www.ncbi.nlm.gov/Genbank เข้าไปในส่วนของ BLAST นำข้อมูลนิวคลีโอไทด์วางลงในโปรแกรม เลือก nucleotide blast เลือก nucleotide collection (nr/nt) จากนั้นทำการ sequence alignment โดยเลือกที่ BLAST จะได้ข้อมูลสำหรับการเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์ออกมา แล้วเลือกให้แสดงตำแหน่งของกรดอะมิโนเทียบกับข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเลือก Reformat these results เลือก CDS feature เลือก view report จะได้ข้อมูลของการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบความเหมือนกันระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rDNA ของทุกตัวอย่าง โดยใช้คอมพิวเตอร์โปรแกรม BioEdit และเปรียบเทียบความเหมือนกันระหว่างกรดอะมิโนของทุกตัวอย่างโดยใช้โปรแกรม MEGA5 แล้ววิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม PUAP (Bootstrap = 1000)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved