บทที่ 3

วิธีดำเนินกา.วิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

3.1.1 เครื่องแก้ว

: บีกเกอร์ (beaker) ขวดรูปชมพู่ (flask) กระบอกตวง (cylinder) แท่งแก้วคน (glass stirrer) แท่งแก้วงอ จานเพาะเชื้อ (petri dish) หลอดหยดสาร (dropper) หลอดแก้วฝาเกลียว (vial) กรวยแยกสาร (separatory funnel) ขวดแก้วก้นกลม (round bottom flask) ขวดแก้วสีชา (brown glass bottle) โหลแก้วมีฝาปิด (TLC chamber) โหลแก้วดูดความชื้น (desiccator) กระจกสไลด์ (slide glass) แผ่นปิดสไลด์ (cover glass)

3.1.2 เครื่องมือ

1. เครื่องชั่งอย่างละเอียด (analytical balance) รุ่น AR2140 บริษัท Ohaus Corp. Pine Brook, USA
2. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น PH2001 บริษัท Bio-Active Co., Ltd.
3. เครื่องเขย่าแบบธรรมดา (shaker) ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
4. เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุน (vacuum rotary evaporator) รุ่น SB1000 บริษัท Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan
5. เครื่องดูดสุญญากาศ (vacuum pump) บริษัท Cole-Parmer Instrument, USA
6. เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer) รุ่น VX-100 บริษัท Labnet International Inc., USA
7. เครื่องก๊าซโครมาโทรกราฟี (Gas Chromatography) รุ่น GC2010 บริษัท Shimadzu Corporation, Japan
   - คอลัมน์ (column): Fused silica capillary column ชนิด Rtx-5MS (30 m x 0.25 mm ID, 0.25 µm film) บริษัท Restek Corporation, USA
   - เครื่องตรวจวัด (detector): Electron Capture Detector (ECD) บริษัท Shimadzu Corporation, Japan

8. เครื่องปั่นเหวี่ยงสารปริมาตรน้อย (microcentrifuge) รุ่น CM-610T บริษัท HSLANGTAI, Taiwan
9. เครื่องปั่นเหวี่ยงสารปริมาตรน้อยชนิดควบคุมอุณหภูมิ (micro refrigerated centrifuge) รุ่น 3700 บริษัท KUBOTA Corporation, Japan
10. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ (authorized DNA thermal cycler) รุ่น TP 600 บริษัท TaKaRa Bio Inc., Japan
11. ชุดตรวจสอบดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้า (electrophoresis chamber set) รุ่น Mupid-ex บริษัท Advance, Japan
12. เครื่องยูวีทรานซิลลูมิเนเทอร์ (UV - transilluminator) รุ่น TM-10E บริษัท UVP Inc., USA
13. เครื่องจ่ายไฟฟ้ากระแสตรง (power supply) รุ่น AE-8130 my power 300 บริษัท ATTO Corporation, Japan
14. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น WB-710M บริษัท Optima Inc., Japan
15. อ่างควบคุมอุณหภูมิแบบแห้ง (digital dry bath) บริษัท Labnet International Inc., USA
16. หลอดไมโครเซนติฟิวส์ (microcentrifuge tubes) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บริษัท Axygen Scientific, Inc., USA
17. หลอดพีซีอาร์ (PCR tubes) ขนาด 200 ไมโครลิตร บริษัท Axygen Scientific, Inc., USA
18. PCR Purification Kit บริษัท Stratagene, USA
19. PCR-Script™ Amp Cloning Kit บริษัท Stratagene, USA
20. FastPlasmid™ Mini Kit บริษัท Eppendorf Inc., USA
21. ไปเปตต์อัตโนมัติ (automatic adjustable micropipette) บริษัท Gilson, Inc., USA
22. ไปเปตต์ทิป (pipette tip) บริษัท Axygen Scientific, Inc., USA
23. ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) รุ่น Clean Model บริษัท Lab Service Ltd., part
24. ตู้อบความร้อน (hot air oven) บริษัท Memmert, western Germany
25. ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (refrigerator) บริษัท Sharp Corporation, Japan
26. ตู้เยือกแข็งอุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส (freezer) บริษัท Sharp Corporation, Japan

27. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) รุ่น TC459 บริษัท Gemmy Industrial Corp., Taiwan
28. เตาไฟฟ้า 1,500 วัตต์ (hot plate) บริษัท หริกุล กรุ๊ป จำกัด
29. ไมโครเวฟ (microwave) รุ่น MA8905D บริษัท Goldstar, the Republic of Korea
30. กล้องจุลทรรศน์ (microscope) รุ่น CX31 บริษัท Olympus Optical Co., Ltd., Japan
31. กล้องถ่ายภาพดิจิตอล (digital camera) รุ่น C4040ZOOM บริษัท Olympus Optical Co., Ltd., Japan
32. แผ่นทดสอบ Thin Layer Chromatography (TLC plate) ชนิด Aluminium Oxide60 F_{254} neutral บริษัท Merck, Germany
33. หลอดไฟแสงอัลตราไวโอเลต (UV light) ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร

3.1.3 วัสดุอุปกรณ์อื่นๆ

: กระดาษกรอง (filter paper) กระดาษฟอยล์ (foil) กระดาษทิชชู กระบอกอบจานเพาะเชื้อ ปากคีบ (forceps) ลวดและเข็มเขี่ยเชื้อ (loop&needle) มีดผ่าตัด (scapel) เครื่องเจาะรูไม้คอร์ก (cork borer) ตะเกียงแอลกอฮอล์ ไฟแช็ค พาราฟิล์ม (parafilm) หลอดฉีดยาขนาด 1 ซีซี (1 cc syringe) ขวดแก้วมีหัวสเปรย์ โกร่ง (mortar) ถุงมือยาง ช้อนตักสาร (spatula) ดินสอ ปากกาเคมี ไม้บรรทัด ถุงพลาสติก คัตเตอร์ กรรไกร ขวดน้ำกลั่น (plastic water bottle) จุกอุดสำลี

3.2 สารเคมีสำหรับการวิจัย

3.2.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. วุ้นผง (agar) บริษัท วุ้นบริสุทธิ์ จำกัด
2. น้ำตาลกลูโคส (glucose) บริษัท พงษ์จิตต์ จำกัด
3. มอลต์สกัด (malt extract) บริษัท Difco Laboratories, USA
4. ยีสต์สกัด (yeast extract) บริษัท Himedia Laboratories Limited, India
5. เพพโตน (peptone) บริษัท Difco Laboratories, USA
6. โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) บริษัท Asia Pacific Specialty Chemicals Limited, Australia

7. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท Merck KGaA, Germany
8. แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) บริษัท Merck KGaA, Germany
9. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) บริษัท Merck KGaA, Germany
10. ไอรอน (II) ซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท Merck KGaA, Germany
11. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท Merck KGaA, Germany
12. แอมโมเนียมทาร์เทรต ($(NH_4)_2C_4H_4O_6$) บริษัท Fluka, Germany
13. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) บริษัท Merck KGaA, Germany
14. คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) บริษัท Merck KGaA, Germany
15. ไอรอน (III) ซัลเฟต ($Fe_2(SO_4)_3$) บริษัท Merck KGaA, Germany
16. แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$) บริษัท Merck KGaA, Germany
17. สีย้อมชนิดโพลี-อาร์ 478 (Polymeric dye R-478) บริษัท Fluka, Germany
18. กรดแทนนิก (Tannic acid) บริษัท Fluka, Germany

3.2.2 เอ็นโดซัลแฟน และสารเมทาโบไลท์มาตรฐาน

1. เอ็นโดซัลแฟน (อัลฟา + เบตา) (Endosulfan $\alpha + \beta$) 99.5% (Labor Dr. Ehrenstorfer-Schaefers, Germany)
2. เอ็นโดซัลแฟนซัลเฟต (Endosulfan sulfate) 97.5% (Labor Dr.Ehrenstorfer-Schaefers, Germany)
3. เอ็นโดซัลแฟนไดออล (Endosulfan diol) 99.0% (Labor Dr.Ehrenstorfer-Schaefers, Germany)

3.2.3 สารเคมีสำหรับการศึกษาด้านพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล

1. เอธานอล (C_2H_5OH) บริษัท Scharlau Chemie S.A., Spain
2. ทริส-เบส (Tris-base) บริษัท Biocompare Inc., USA
3. โพลีไวนิลไพโรลิโดน (Polyvinylpyrolidone; PVP) บริษัท Serva, Germany
4. แอสคอร์บิก ($C_6H_8O_6$) บริษัท Serva, Germany
5. บอริก (H_3BO_3) บริษัท Serva, Germany
6. ไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท Fluka, Germany
7. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck KGaA, Germany
8. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck KGaA, Germany

9. 2-เมอร์แคพโตเอธานอล (C_2H_6OS) บริษัท Sigma-Aldrich Co., USA
10. CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide; $C_{16}H_{32}N(CH_3)_3Br$) บริษัท Serva, Germany
11. EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid; $C_{10}H_{16}N_2O_8$) บริษัท Scharlau Chemie S.A., Spain
12. คลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$) บริษัท Merck KGaA, Germany
13. ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ($(CH_3)_2CHCH_2CH_2OH$) บริษัท Carlo Erba, Italy
14. ไอโซโพรพานอล ($CH_3CHOHCH_3$) บริษัท Carlo Erba, Italy
15. RNase บริษัท Mylab Corporation, China
16. โพลีเอธิลีนไกลคอล (Polyethylene glycol; PEG) บริษัท Serva, Germany
17. dNTP mixed บริษัท Bio Basic Inc., Canada
18. ไพรเมอร์ (Primer) ITS1-F และ ITS4 บริษัท Bio Basic Inc., Canada
19. *Taq* DNA polymerase (recombinant) บริษัท Fermentas, USA
20. พีซีอาร์บัฟเฟอร์ (PCR buffer) บริษัท Fermentas, USA
21. แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) บริษัท Merck KGaA, Germany
22. อะกาโรส (agarose) บริษัท ISC Bio Express, USA
23. เอธิเดียมโบรไมด์ ($C_{21}H_{20}BrN_3$) บริษัท บริษัท Sigma-Aldrich Co., USA
24. 100 bp + 1.5 kb DNA ladder บริษัท SibEnzyme, Russia

3.2.4 สารเคมีอื่น ๆ

1. เมธานอล (CH_3OH) บริษัท Merck KGaA, Germany
2. เอธิลอะซิเตต ($CH_3COOC_2H_5$) บริษัท Fisher Scientific Ltd., UK
3. เฮกเซน ($CH_3(CH_2)_4CH_3$) บริษัท Merck KGaA, Germany
4. โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (NaClO) บริษัท Merck KGaA, Germany
5. ซิลเวอร์ไนเตรต ($AgNO_3$) บริษัท Merck KGaA, Germany
6. สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin) บริษัท M&H Manufacturing Co. Ltd
7. ทวีน 80 (Tween 80) บริษัท Fluka, Germany
8. ซิลิกาเจล (Silica gel) บริษัท Merck KGaA, Germany
9. สีย้อมสไลด์ชนิด Lacto-phenol cotton blue บริษัท The British Drug Houses Ltd., England

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 การเก็บตัวอย่างราจากแหล่งต่างๆ

3.3.1.1 ราในดิน

เก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ป่าธรรมชาติในอุทยานแห่งชาติตากสินมหาราช จังหวัดตาก และจากพื้นที่เกษตรกรรมมีประวัติการใช้สารกำจัดแมลงเอ็นโดซัลแฟนในจังหวัดปทุมธานี และนนทบุรี โดยใส่ในถุงพลาสติกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำคัดมาแยกราให้บริสุทธิ์

3.3.1.2 ราที่ขึ้นบนซากพืช

เก็บตัวอย่างกิ่งไม้ผุที่มีลักษณะยุ่ย น้ำหนักเบา มีเนื้อไม้สีขาว และเห็ดที่ขึ้นบนเนื้อไม้ ในถุงพลาสติกที่บรรจุซิลิกาเจล แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำเนื้อเยื่อด้านในส่วนที่ไม่ได้สัมผัสกับอากาศออกมาเพาะเลี้ยง และคัดแยกราให้บริสุทธิ์ โดยกิ่งไม้ผุและเห็ดดังกล่าว เก็บมาจากพื้นที่ป่าธรรมชาติในอุทยานแห่งชาติดอยสุเทพ-ปุย จังหวัดเชียงใหม่ และอุทยานแห่งชาติตากสินมหาราช จังหวัดตาก

3.3.1.3 ราเอนโดไฟต์

เก็บตัวอย่างใบพืชจากป่าธรรมชาติ ในอุทยานแห่งชาติตากสินมหาราช จังหวัดตาก และจากพืชที่มีประวัติการใช้สารกำจัดแมลงเอ็นโดซัลแฟนในพื้นที่เกษตรกรรมจังหวัดปทุมธานี และนนทบุรี โดยใส่ในถุงพลาสติก แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาคัดแยกราเอนโดไฟต์บริสุทธิ์ออกมาใช้ในการวิจัยขั้นต่อไป

3.3.2 การแยกเส้นใยราจากตัวอย่าง

3.3.2.1 การแยกราในดิน

การคัดแยกราที่อาศัยอยู่ในดินจากแหล่งต่างๆ เริ่มจากการนำตัวอย่างดินน้ำหนัก 1 กรัม ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium (pH 7) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อความดันไอน้ำ

เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว จากนั้นใส่เอ็นโดซัลแฟนความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบธรรมดาที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 วัน เมื่อครบกำหนด ใช้ไปเปตต์อัตโนมัติดูดสารละลายดิน 5 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิมที่เตรียมใหม่โดยใส่เอ็นโดซัลแฟนความเข้มข้นเท่าเดิม แล้วใช้เครื่องเขย่าที่สภาวะเดิมต่ออีก 5 วัน ทั้งนี้จะทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เตรียมใหม่ และเขย่าที่สภาวะเดิมรวมทั้งสิ้น 3 ครั้ง จากนั้นเตรียม Czapek's Dox Agar (ภาคผนวก ก) ที่มีส่วนผสมของเอ็นโดซัลแฟนความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วดูดสารละลายดินจากการเขย่าครั้งที่ 3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เทอาหารที่เตรียมไว้ลงในจานเพาะเชื้อที่มีสารละลายดิน 1 มิลลิลิตร อยู่ตามลงไป หมุนวนให้อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเนื้อเดียวกันกับสารละลายดิน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 – 3 วัน สังเกตชนิดของราที่ขึ้น แล้วทำการแยกโคโลนีเดี่ยวออกมาจนกว่าจะได้ราที่บริสุทธิ์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก) จากนั้นจึงศึกษาลักษณะภายนอกของราที่แยกได้ ได้แก่ ลักษณะของเส้นใย และสีของโคโลนี แล้วเก็บรักษาในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผิวหน้าเอียง ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.3.2.2 **การแยกราที่ขึ้นบนซากพืช**

นำตัวอย่างเห็ด และกิ่งไม้ผุมาคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ โดยใช้เนื้อเยื่อด้านในส่วนที่ไม่ได้สัมผัสกับอากาศมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องประมาณ 7 วัน สังเกตการเจริญเติบโต ลักษณะภายนอกของรา ได้แก่ ลักษณะของเส้นใย และสีของโคโลนี แล้วนำราที่คัดแยกได้มาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสารที่มีโครงสร้างเป็นวงแหวน หรือทดสอบความเป็นราไวต์รอต โดยเพาะเลี้ยงราดังกล่าวบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสี หรือสารเพื่อทดสอบความสามารถในการย่อยสลาย ซึ่งได้ทำการทดสอบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด ได้แก่

1) การทดสอบกับอาหาร Poly-R agar clearance

นำราที่แยกได้จากข้อ 3.3.2.2 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้น จากนั้นใช้เครื่องเจาะรูไม้คอร์ก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร เจาะลงบนเส้นใยบริเวณขอบนอกของโคโลนี วางลงบนอาหาร Poly-R agar clearance (ภาคผนวก ก) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน และสังเกตสีของอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณรอบๆ โคโลนี ถ้าเชื้อมีแนวโน้มในการย่อยสลายได้ดี สีของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนจากสีชมพูม่วงเป็นสีเหลือง

I 25209875

2) การทดสอบกับอาหาร Tannic acid agar

นำราที่แยกได้จากข้อ 3.3.2.2 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน เพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้น จากนั้นใช้เครื่องเจาะรูไม้คอร์ก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร เจาะลงบนเส้นใยบริเวณขอบนอกของโคโลนี วางลงบนอาหาร Tannic acid agar (ภาคผนวก ก) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน และสังเกตสีของอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณรอบๆ โคโลนี ถ้าเชื้อมีแนวโน้มในการย่อยสลายได้ดี สีของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีน้ำตาลเข้ม

ทำการคัดเลือกรา โดยสังเกตจากบริเวณที่เกิดการย่อยสี Poly R-478 บนอาหาร Poly-R agar clearance หรือบริเวณที่มีการสร้างโซนสีน้ำตาลบนอาหาร Tannic acid agar แล้วเก็บรักษาในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผิวหน้าเอียง ณ อุณหภูมิห้อง เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.3.2.3 การแยกราเอนโดไฟต์จากพืช

การคัดแยกราเอนโดไฟต์จากพืช โดยวิธี Surface sterilization (Schulz และคณะ, 1993) เริ่มจากการล้างส่วนของพืชที่จะนำมาแยกราออกให้สะอาดด้วยน้ำ เช็ดด้วยเอธานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาตัดให้มีขนาดเล็กลงเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส มีความกว้างด้านละ 5 มิลลิเมตร จากนั้นนำชิ้นส่วนพืชที่ตัดแล้วมาจุ่มในสารละลายต่างๆ ตามลำดับ โดยเริ่มจากเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที เอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง ทำชิ้นส่วนของพืชให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูปราศจากเชื้อ จากนั้นใช้ปากคีบ คีบชิ้นส่วนของพืชวางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Malt Extract Agar (MEA) (ภาคผนวก ก) ที่ใส่สเตรปโตมัยซินเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตรลงไป เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย สังเกตการเจริญเติบโตของเส้นใยราที่เจริญออกมาจากชิ้นส่วนพืชบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA ทุกวัน แล้วทำการแยกโคโลนีเดี่ยวออกมาจนกว่าจะได้เส้นใยราที่บริสุทธิ์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA ที่เตรียมใหม่ เมื่อได้ราเอนโดไฟต์ที่บริสุทธิ์แล้ว ศึกษาลักษณะภายนอก ได้แก่ ลักษณะของเส้นใย และสีของโคโลนี แล้วเก็บรักษาในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผิวหน้าเอียง ณ อุณหภูมิห้อง เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.3.3 การศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของราที่คัดแยกได้

3.3.3.1 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายขั้นปฐมภูมิ (Primary degradation test)

1) เตรียมเชื้อตั้งต้นสำหรับใช้ทดสอบ โดยเพาะเลี้ยงราแต่ละไอโซเลตตามที่คัดแยกได้ในข้อ 3.3.2 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน เมื่อนำมาใช้ในการทดสอบจะใช้เครื่องเจาะรูไม้คอร์ก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร เจาะลงบนชิ้นวุ้นบริเวณปลายเส้นใย

2) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium (pH 7) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 4 ชุด ชุดละ 3 ซ้ำ ดังนี้

- ชุดที่ 1 (ชุดควบคุม): อาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ที่ใส่ชิ้นวุ้นของเส้นใยราที่คัดแยกได้ จำนวน 5 ชิ้น
- ชุดที่ 2 (ชุดควบคุม): อาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ที่ใส่เอ็นโดซัลแฟน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ชุดที่ 3 (ชุดควบคุม): อาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ที่ใส่เอ็นโดซัลแฟน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และเส้นใยของราที่ตายแล้วจากการเตรียมโดยใส่ชิ้นวุ้นเส้นใยรา จำนวน 5 ชิ้น ลงในอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนดนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ระยะเวลา 20 นาที เป็นเวลา 3 วัน ติดต่อกัน (Juhasz และคณะ, 2002) แล้วนำมากรองเอาเส้นใยที่ตายแล้วมาใช้ในการทดลองชุดดังกล่าวนี้
- ชุดที่ 4 (ชุดทดลอง): อาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ที่ใส่เอ็นโดซัลแฟน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และชิ้นวุ้นเส้นใยของราไอโซเลตที่แยกได้จำนวน 5 ชิ้น

3) นำมาเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบธรรมดาที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 20 วัน เมื่อครบกำหนด ตรวจสอบค่าความเป็นกรด-ด่าง และดูดสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากทุกชุดเก็บไว้ในหลอดแก้วมีฝาเกลียวปิดที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส พร้อมกับกรองเส้นใยของราที่ตายแล้วในชุดที่ 3 นำไปสกัด และวิเคราะห์หาเอ็นโดซัลแฟนที่เหลือ รวมทั้งสารเมทาโบไลท์ที่เกิดจากการย่อยสลายโดยใช้เทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) ซึ่งมีวิธีการดังต่อไปนี้

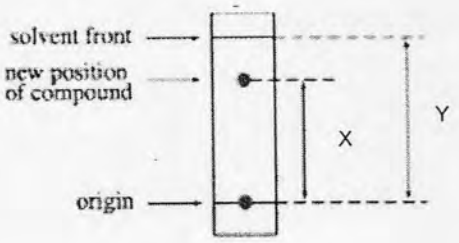
การสกัดเอ็นโดซัลแฟนและเมทาโบไลท์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อและเส้นใยรา (ดัดแปลงจาก Sutherland และคณะ, 2000)

นำสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อและเส้นใยราที่เก็บไว้ มาใส่ในกรวยแก้วแยกสาร ขนาด 100 มิลลิตร แล้วใส่เอธิลอะซิเตตลงไปในอัตราส่วน 1:1 เพื่อใช้เป็นตัวทำละลายในการสกัด เขย่าให้เข้ากันประมาณ 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น นำของเหลวส่วนล่างที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อมาสกัดอีกครั้งโดยใช้เอธิลอะซิเตตในอัตราส่วนเดิม โดยทำการสกัดทั้งหมด 5 ครั้ง จากนั้น นำสารละลายเอธิลอะซีเตตที่ได้จากขั้นตอนการสกัดทั้งหมด มาระเหยเอาส่วนที่เป็นของเหลวออกโดยใช้เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุน แล้วล้าง (rinse) ส่วนที่เป็นผงสีขาวก้นขวดออกด้วยเฮกเซนเก็บไว้เพื่อนำสารที่สกัดได้นั้นไปทดสอบหาเอ็นโดซัลแฟน และเมทาโบไลท์ที่เกิดขึ้น โดยเทคนิค TLC

การวิเคราะห์เอ็นโดซัลแฟน และเมทาโบไลท์ที่สกัดได้โดยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) (ดัดแปลงจาก Awasthi, Ahuja และ Kumar, 2000; Sutherland และคณะ, 2000)

ตัดแผ่น TLC ชนิด Aluminium Oxide60 F_{254} neutral ที่มีขนาด 20 x 20 ตารางเซนติเมตร ให้มีขนาดเล็กลง โดยแผ่นแรก ซึ่งใช้เป็นแผ่นอ้างอิง ตัดให้มีขนาด 2 x 5 ตารางเซนติเมตร แบ่งเลน (lane) ตามแนวกว้างให้แต่ละเลนมีระยะห่างจากกัน 0.5 เซนติเมตร จากนั้นหยดสารละลายมาตรฐานเอ็นโดซัลแฟน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ในเฮกเซน) ณ จุดเริ่มต้นของเลนแรก และสารละลายมาตรฐานเอ็นโดซัลแฟนซัลเฟต 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ในเฮกเซน) ณ จุดเริ่มต้นของเลนที่สอง เตรียมแผ่น TLC แผ่นต่อๆ มา โดยตัดให้มีขนาด 3 x 5 ตารางเซนติเมตร แบ่งเลนให้มีระยะห่างกัน 0.5 เซนติเมตรเช่นเดียวกัน เพื่อหยดสารที่ผ่านการสกัดแล้ว ลงบนจุดเริ่มต้นของแต่ละเลนถัดมา โดยเริ่มจากสารสกัดของชุดการทดลองที่ 1 2 3 และ 4 ของราแต่ละไอโซเลต ตามลำดับ เมื่อหยดสารสกัดครบทุกชุดการทดลองแล้ว นำแผ่น TLC ใส่ลงในโหลแก้วมีฝาปิดที่บรรจุสารละลายอิ่มตัวเฮกเซน-คลอโรฟอร์มในอัตราส่วน 1:1 เมื่อแผ่น TLC ดูดซับสารละลายเฮกเซน-คลอโรฟอร์มขึ้นมาถึงขอบบนแล้ว นำแผ่น TLC ออก ผึ่งให้แห้ง แล้วนำมาพ่นด้วยสารละลายอิ่มตัวของซิลเวอร์ไนเตรตในเมธานอล ทิ้งไว้ให้แห้งภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร จนสามารถมองเห็นจุด (spot) ที่เกิดขึ้นบนแต่ละเลน บันทึกผล และคัดเลือกราที่มีความสามารถในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนในขั้นปฐมภูมิ เพื่อนำไปวิเคราะห์ในขั้นทุติยภูมิต่อไป โดยพิจารณาจากตำแหน่ง spot ของสารสกัดที่ปรากฏบนแผ่น TLC เปรียบเทียบกับตำแหน่ง spot อ้างอิงของสารเอ็นโดซัลแฟนมาตรฐาน หรือพิจารณาจากค่า R_f (Retention factor) ซึ่งเป็นค่าอัตราส่วนระหว่างระยะทางจากจุดเริ่มต้นที่หยดสารถึงจุดกึ่งกลางของ spot ที่ปรากฏขึ้น ต่อระยะทางจากจุดเริ่มต้นที่หยดสารถึงขอบบนของแผ่น TLC (University of Colorado at Boulder, Department of Chemistry and Biochemistry, 2006) ซึ่งแสดงเป็นสมการได้ดังนี้

$$R_f = \frac{\text{Distance traveled by the compound (X)}}{\text{Distance traveled by the solvent front (Y)}}$$



ภาพที่ 3.1 การวัดระยะทางเพื่อคำนวณค่า R_f (Retention factor)

3.3.3.2 การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายขั้นทุติยภูมิ (Secondary degradation test)

1) เตรียมเชื้อตั้งต้นสำหรับใช้ทดสอบ โดยนำราที่ได้จากการคัดเลือกในขั้นปฐมภูมิไปเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน เมื่อนำมาใช้ในการทดสอบ จะใช้เครื่องเจาะรูไม้คอร์ก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร เจาะลงบนชิ้นวุ้นบริเวณปลายเส้นใย

2) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium (pH 7) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 3 ชุด ชุดละ 3 ซ้ำ ดังนี้

- ชุดที่ 1 (ชุดควบคุม): อาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ที่ใส่เอ็นโดซัลแฟน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ชุดที่ 2 (ชุดควบคุม): อาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ที่ใส่เอ็นโดซัลแฟน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และเส้นใยของราที่ตายแล้วจากการเตรียมโดยใส่ชิ้นวุ้นเส้นใยราจำนวน 13 ชิ้น ลงในอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบกำหนด นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ระยะเวลา 20 นาที เป็นเวลา 3 วัน ติดต่อกัน (Juhasz และคณะ, 2002) แล้วนำมากรองเอาเส้นใยที่ตายแล้วมาใช้ในการทดลองชุดดังกล่าวนี้

- ชุดที่ 3 (ชุดทดลอง): อาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ที่ใส่เอ็นโดซัลแฟน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร และชิ้นวุ้นเส้นใยของรา จำนวน 13 ชิ้น

3) นำมาเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบธรรมดาที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 วัน ทั้งนี้ จะมีการเก็บตัวอย่างสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทุก 3 วัน ในระหว่างการบ่มเชื้อจนครบกำหนด โดยเก็บไว้ในหลอดแก้วมีฝาเกลียวปิดที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปสกัด (วิธีการเดียวกันกับสกัดเพื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC) และวิเคราะห์ความเข้มข้นที่เปลี่ยนไปของเอ็นโดซัลแฟน และสารเมทาโบไลท์ โดยใช้เทคนิค Gas Chromatography (GC) นอกจากนี้ มีการตรวจสอบค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชุด และตรวจวัดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อในชุดที่ 3 จากน้ำหนักแห้ง ทุก 3 วันเช่นกัน

การวิเคราะห์เอ็นโดซัลแฟน และเมทาโบไลท์ที่สกัดได้โดยเทคนิค Gas Chromatography (GC)

เตรียมสารละลายมาตรฐานเอ็นโดซัลแฟนในเฮกเซนที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 10 20 30 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งสารที่ผ่านการสกัดแล้วทุกชุด ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำมาฉีดวิเคราะห์ลงในเครื่อง Gas Chromatography รุ่น GC2010 ของบริษัท Shimadzu Corporation ที่มี autosampler ชนิด AOC-5000 และเครื่องตรวจวัดชนิด Electron Capture Detector (ECD) โดยคอลัมน์ที่ใช้เป็นแบบ fused silica capillary column ชนิด Rtx-5MS (stationary phase: 5% diphenyl / 95% dimethyl polysiloxane) มีความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 มิลลิเมตร และความหนาของฟิล์มหุ้ม 0.25 µm film การฉีดวิเคราะห์เป็นแบบ splitless โดยมีการตั้งค่าโปรแกรมอุณหภูมิดังนี้ อุณหภูมิของ injector เท่ากับ 250 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของ detector เท่ากับ 320 องศาเซลเซียส ทั้งนี้อุณหภูมิเริ่มต้นของคอลัมน์อยู่ที่ 120 องศาเซลเซียส รักษาอุณหภูมิให้คงที่เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 300 องศาเซลเซียส โดยมีอัตราเพิ่มอุณหภูมิเป็น 10 องศาเซลเซียสต่อนาที และรักษาอุณหภูมิให้คงที่เป็นเวลา 1 นาที ใช้ฮีเลียม เป็น carrier gas(mobile phase) โดยมีอัตราไหลเท่ากับ 1.36 มิลลิลิตรต่อนาที มีโปรแกรมเวลาทั้งหมด 21 นาที เมื่อได้โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานเอ็นโดซัลแฟนและสารเมทาโบไลท์ที่ความเข้มข้นต่างๆ นำมาสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) แล้วเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของโครมาโทแกรมที่วิเคราะห์จากสารสกัดจากอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อที่จะสามารถหาความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟนที่ยังคงเหลือ และสารเมทาโบไลท์ที่เกิดขึ้นใหม่จากการย่อยสลายของราที่คัดเลือกได้

3.3.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนของราคัดเลือกได้

3.3.4.1 การกำหนดสภาวะต่าง ๆ ในการทดสอบการย่อยสลาย

3.3.4.1.1 ความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟน

ความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟนในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Czapek's Dox Medium ที่นำมาทดสอบได้แก่ ความเข้มข้นที่ 50 100 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร

3.3.4.1.2 ปริมาณแหล่งอาหารคาร์บอน

ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Czapek's Dox Medium โดยแปรผันปริมาณของกลูโคสไว้ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์

3.3.4.1.3 ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่นำมาทดสอบคือ 4 5 6 และ 7 ซึ่งได้ใช้ไฮโดรคลอริก (HCl) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เป็นสารปรับค่า pH

3.3.4.2 การทดสอบในสภาวะต่าง ๆ ที่กำหนด

1) เตรียมเชื้อตั้งต้นสำหรับใช้ทดสอบ โดยนำราที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนที่ผ่านการทดสอบในข้อ 3.3.3 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน เมื่อนำมาใช้ในการทดสอบ จะใช้เครื่องเจาะรูไม้คอร์ก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร เจาะลงบนชิ้นวุ้นบริเวณปลายเส้นใย

2) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีการผันแปรสภาวะต่างๆ ตามที่กำหนดในข้อ 3.3.4.1 ซึ่งสรุปได้ดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 3.1 สภาวะต่างๆ ของอาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ที่นำมาทดสอบ

EN 50 mg/l, 0.5%GL, pH 4	EN 100 mg/l, 0.5%GL, pH 4	EN 200 mg/l, 0.5%GL, pH 4
EN 50 mg/l, 0.5%GL, pH 5	EN 100 mg/l, 0.5%GL, pH 5	EN 200 mg/l, 0.5%GL, pH 5
EN 50 mg/l, 0.5%GL, pH 6	EN 100 mg/l, 0.5%GL, pH 6	EN 200 mg/l, 0.5%GL, pH 6
EN 50 mg/l, 0.5%GL, pH 7	EN 100 mg/l, 0.5%GL, pH 7	EN 200 mg/l, 0.5%GL, pH 7
EN 50 mg/l, 2%GL, pH 4	EN 100 mg/l, 2%GL, pH 4	EN 200 mg/l, 2%GL, pH 4
EN 50 mg/l, 2%GL, pH 5	EN 100 mg/l, 2%GL, pH 5	EN 200 mg/l, 2%GL, pH 5
EN 50 mg/l, 2%GL, pH6	EN 100 mg/l, 2%GL, pH 6	EN 200 mg/l, 2%GL, pH 6
EN 50 mg/l, 2%GL, pH 7	EN 100 mg/l, 2%GL, pH 7	EN 200 mg/l, 2%GL, pH 7

หมายเหตุ

EN หมายถึง ความเข้มข้นของเอ็นโดซัลแฟน

GL หมายถึง ความเข้มข้นของกลูโคส

3) แบ่งการทดลองเป็น 2 ชุด ชุดละ 3 ซ้ำ ดังนี้

- ชุดที่ 1 (ชุดควบคุม): อาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ตามตารางที่ 3.1 ที่ไม่ได้ใส่เชื้อทดสอบ

- ชุดที่ 2 (ชุดทดลอง): อาหารเลี้ยงเชื้อ Czapek's Dox Medium ตามตารางที่ 3.1 ที่ใส่ชิ้นวุ้นบริเวณปลายเส้นใยของราจำนวน 13 ชิ้น

4) นำมาเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบธรรมดาที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ณ อุณหภูมิห้อง (30-35 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 วัน ทั้งนี้ จะมีการเก็บตัวอย่างสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทุก 6 วัน ในระหว่างการบ่มเชื้อจนครบกำหนด โดยเก็บไว้ในหลอดแก้วมีฝาเกลียวปิดที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นที่เปลี่ยนไปของเอ็นโดซัลแฟน โดยใช้เทคนิค Gas Chromatography (GC) ตามข้อที่ 3.3.3.2 นอกจากนี้ มีการตรวจสอบค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชุด และตรวจวัดอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อในชุดที่ 2 จากน้ำหนักแห้ง ทุก 6 วันเช่นกัน

5) เปรียบเทียบอัตราการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนในแต่ละชุดการทดลอง เพื่อประเมินสภาวะที่ราสามารถย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟนได้ดีที่สุด

3.3.5 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราที่คัดเลือกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยเทคนิค slide culture

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราที่มีความสามารถในการย่อยสลายเอ็นโดซัลแฟน ทำโดยใช้เทคนิค slide culture เริ่มจากการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เทลงในจานเพาะเชื้อให้ระดับอาหารสูงประมาณ 2 มิลลิเมตร ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าอาหารแห้ง จากนั้นใช้มีดผ่าตัดจุ่มเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ เผาไฟ เพื่อฆ่าเชื้อ แล้วกรีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส มีความกว้างด้านละ 5 มิลลิเมตร ยกชิ้นวุ้นที่ตัด มาวางลงตรงกลางกระจกสไลด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วบนแท่งแก้วงอในจานเพาะเชื้อ จากนั้น ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยเส้นใยราที่คัดเลือกไว้มาแตะบนชิ้นวุ้นของอาหารเลี้ยงเชื้อบนกระจกสไลด์ แล้วใช้ปากคีบ คีบแผ่นปิดสไลด์จุ่มเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ นำไปเผาไฟ แล้วค่อยๆ วางปิดบนชิ้นวุ้น เทน้ำกลั่นปราศจากเชื้อลงไปในจานเพาะเชื้อ ให้มีระดับสูงประมาณครึ่งหนึ่งของแท่งแก้วงอ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งเส้นใยของราเจริญจนถึงขอบแผ่นปิดสไลด์ ให้ยกแผ่นปิดสไลด์ขึ้น แล้ววางลงบนสีย้อมสไลด์ Lacto-phenol cotton blue ซึ่งหยดอยู่ตรงกลางกระจกสไลด์แผ่นใหม่ เขี่ยชิ้นวุ้นที่วางอยู่บนกระจกสไลด์แผ่นเก่าออกไป แล้วหยดสีย้อมสไลด์ Lacto-phenol cotton blue ลงไปตรงกลางกระจกสไลด์แทน ปิดทับด้วยแผ่นปิดสไลด์แผ่นใหม่ นำสไลด์ทั้งสองแผ่นไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.3.6 การบ่งชี้ชนิดของราที่คัดเลือกได้โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ประมวลรหัสของตำแหน่ง ITS (Internal Transcribed Spacer)

3.3.6.1 การสกัดจีโนมิก DNA ของรา

นำเส้นใยของราที่คัดเลือกได้มาสกัด DNA โดยวิธี Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) ของ Zhou, Miwa และ Hogetsu (1999) เริ่มจากการนำเส้นใยไปบดให้ละเอียดโดยใช้โกร่ง เติมสารละลาย washing buffer (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ถ่ายลงในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทของเหลวส่วนบนทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน เติมสารละลาย washing buffer ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงซ้ำ เพื่อล้างตัวอย่างจนของเหลวส่วนบนใส เติมสารละลาย 2X CTAB (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์แตก เติมสารละลายคลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 24 : 1 (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าผสมสาร เพื่อกำจัดโปรตีน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที ถ่ายส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใส่ลงในหลอด

ไมโครเซนติฟิวจ์หลอดใหม่ เติมสารละลายคลอโรฟอร์ม-ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 24 : 1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร อีกครั้ง ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 นาที ถ่ายส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติมสารละลายไอโซโพรพานอล ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แช่ในน้ำเข็งเป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนกรดนิวคลีอิก เทส่วนใสทิ้งให้เหลือแต่ตะกอน เติมเอธานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อล้างตะกอนของกรดนิวคลีอิก เทส่วนใสทิ้ง ทิ้งตะกอนให้แห้งในอุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ RNase ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัด RNA เติมสารละลาย PEG ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งให้เหลือตะกอนของ DNA เติมเอธานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อล้างตะกอน DNA ดูดสารละลายออก ทิ้งตะกอนให้แห้งในอุณหภูมิห้อง เติมสารละลาย TE buffer (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอน DNA เก็บตัวอย่าง DNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ศึกษาในขั้นต่อไป

3.3.6.2 **การเพิ่มจำนวน DNA ของราที่ตำแหน่ง ITS ด้วยวิธี** Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำ DNA ที่สกัดได้ตามวิธีในข้อ 3.3.6.1 ไปทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA ที่ตำแหน่ง ITS โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ (specific primer) ที่มีลำดับเบสเป็น ITS1-F (forward) และ ITS4 (reverse) ได้แก่ 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3' และ 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (White และคณะ, 1990; Gardes และ Bruns, 1993) ตามลำดับ ทำสารละลาย PCR ให้มีปริมาตรรวมเป็น 10 ไมโครลิตร โดยมีส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังแสดงใน ตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)

สาร	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
10X PCR buffer without $MgCl_2$	1X	1.0
2 mM dNTP mixed	0.2 mM	1.0
5u/µl *Taq* DNA polymerase	0.5 units/10µl	0.1
25 mM $MgCl_2$	2.5 mM	1.0
20 µM Primer I (ITS1-F)	1 µM	0.5
20 µM Primer II (ITS4)	1 µM	0.5
DNA template	-	1.0
Sterilized distilled water	-	4.9
ปริมาตรรวม		**10**

เมื่อได้ส่วนผสมทั้งหมดที่มีปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร นำไปดำเนินปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA ที่ตำแหน่ง ITS ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณ DNA อัตโนมัติ (Authorized DNA thermal cycler) โดยได้กำหนดสภาวะไว้ดังต่อไปนี้

Initial denaturation	94	องศาเซลเซียส	5 นาที	
Amplification				
Denaturation	94	องศาเซลเซียส	1 นาที	38 รอบ
Annealing	51	องศาเซลเซียส	1 นาที	
Extension	72	องศาเซลเซียส	1 นาที	
Final Extension	72	องศาเซลเซียส	5 นาที	
Hold	4	องศาเซลเซียส		

ตรวจสอบผลการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยวิธีอิเลคโทรโฟเรซิส (Electrophoreses) โดยการแยกขนาดชิ้นส่วน DNA บนอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) ใน 0.5X TBE buffer (ภาคผนวก ข) เติมเอธิเดียมโบรไมด์ 1 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข) ต่ออะกาโรสเจล 30 มิลลิลิตร ใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที และใช้ชิ้นส่วน DNA มาตรฐานขนาด 100 bp + 1.5 kb DNA ladder ตรวจสอบขนาดชิ้นส่วน DNA ที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร

ทำการโคลนชิ้นส่วน ITS โดยใช้ PCR-Script™ Amp Cloning Kit และสกัดพลาสมิดโดยใช้ FastPlasmid™ Mini Kit แล้วหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน ITS ในพลาสมิด โดยส่งไปวิเคราะห์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ ด้วยเครื่อง ABI 3730 xl automatic sequencer (Applied Biosystems, USA) ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะถูกนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับ ITS ของราชนิดอื่นๆ ที่ได้มีรายงานไว้ใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST version 2.1 ที่จัดทำโดย The National Center for Biotechnology Information (NCBI)