บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow) Clean model (Lab service LTD.)

เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อ (Shaker)

เครื่องชั่งแบบละเอียด (Sartorius)

กล้องจุลทรรศน์ (Olympus)

เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) Model 250 (Denver Instrument)

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectophotometer) (Hewlette-Packard)

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air oven) (Mammert)

เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อความดันสูง (Autoclave)

เครื่องดูดสารแบบสุญญากาศ (Suction)

เวอร์เนีย คาลิบเปอร์

Erlenmeyer flask ขนาด 250 ml

กระดาษกรองเบอร์93 (whatmann)

UV Cross linker (UVtec Crosslinker) รุ่น CL–508 (Bio-Active Co., Ltd)

เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ (Biometra)

เครื่องจ่ายไฟฟ้ากระแสตรง(Biorad)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2 สารเคมี

2.1 สารเคมีสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อและการวิเคราะห์การลดสีของน้ำกากส่า

Agar	
Bacto Peptone	(Difco)
Citric acid	(Serva)
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	(Carlo Erba Reagent)
Dextrose	(Hi media)
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	(Merck)
Glucose	(Hi media)
Gracial CH_3COOH	(Scharlau)
K_2HPO_4	(Merck)
KCl	(Carlo Erba Reagent)
Ketoconazole	(Scharlau)
Lactophenol - blue	(Sigma)
Malachite-Green	(Lab Chem)
Malt extract powder	(Hi media)
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	(Merck)
$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	(Merck)
NaCl	(Merck)
NaOH	(Ajax Finechem)
Potato Dextrose Agar (PDA)	(Hi media)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Potato Dextrose Broth (PDB)	(Hi media)
Yeast extract	(Scharlau)
$ZnSO_4 \cdot 5H_2O$	(Merck)

2.2 สารเคมีสำหรับศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมที่ตำแหน่ง ITS

100 bp DNA ladder	(Fermentus)
20 bp DNA ladder	(Fermentus)
2-Mercaptoethanol	(Bio Basic)
3-Methyl-1-butanol	(Carlo Erba)
Agarose	(Sigma)
Ascorbic acid	(Amersham Life Science)
Chloroform	(Analar)
CTAB	(Merck)
Deoxy ribonucleside triphosphate (dNTP)	(Fermentus)
EDTA	(Merck)
Ethidium bromide	(Fermentus)
MgCl2	(Fermentus)
Poly vinyl pyrrolidone	(Serva)
Polyethylene glycol	(Fluka)
Primer ITS1-F	(Fermentus)
Primer ITS4	(Fermentus)
Resriction enzyme *AluI* *HinfI* และ *MboI*	(Fermentus)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

RNase	(Fermentus)
Taq Buffer	(Fermentus)
Taq Polymerase	(Fermentus)
TOPO TA cloning kit (K4500-01)	(Introvagen)
Tris-HCl	(Scharlau)

3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างดิน เห็ด กิ่งไม้ ใบไม้ ที่มีราเจริญจากธรรมชาติ จาก 1.โรงงานสุรา จังหวัดนครปฐม 2.โรงงานเบียร์ จังหวัดปทุมธานี 3. ป่าขุนแม่กวง จังหวัดเชียงใหม่ 4. บ่อน้ำพุร้อน จังหวัดเชียงใหม่ 5. อุทยานแห่งชาติตากสินมหาราช จังหวัดตาก

3.2 การคัดแยกราและทำให้บริสุทธิ์

สำหรับตัวอย่างดิน คัดแยกราจากดินโดยวิธี serial dilution **โดยนำดิน** 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 95 มิลลิลิตร ทำให้เป็นสารละลายเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องเขย่าสาร ความเร็ว 150 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จะได้ สารละลายที่มีความเข้มข้น 10^{-2} กรัม ต่อมิลลิลิตร ดูดสารละลายจากข้อ 3.1.2.1 มา 0.1 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 9.9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (Vortex) จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 10^{-4} กรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายนี้ 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง Rose bengal Agar (ภาคผนวก ก) ดูดสารละลาย มา 1 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร (Vortex) จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 10^{-5} กรัมต่อมิลลิลิตรนำสารละลายนี้ 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง Rose bengal Agar ดูดสารละลายมา 1 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 10^{-6} กรัมต่อมิลลิลิตรนำสารละลายนี้ 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง Bengal rose Agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3- 7 วัน สังเกตเส้นใยราที่เกิดขึ้นทุกวัน และทำการย้ายราที่เกิดขึ้นลงในอาหารสูตร Potato Dextrose Agar (PDA, ภาคผนวก ก) เพื่อทำราให้บริสุทธิ์ และนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

สำหรับราที่เป็นกิ่งไม้ หรือใบไม้ ที่มีราเจริญอยู่ ใช้เข็มเขี่ย เขี่ยเส้นใยราที่ติดอยู่บนกิ่งไม้และใบไม้ วางบนอาหารแข็งสูตร PDA ที่เติมสารปฏิชีวนะยับยั้งแบคทีเรีย streptomycin 50 ppm เพื่อป้องกันเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อน จากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3- 7 วัน สังเกตเส้นใยราที่เกิดขึ้นทุกวัน และทำการย้ายราที่เกิดขึ้นลงในอาหารสูตร PDA เพื่อทำราให้บริสุทธิ์ และนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

สำหรับดอกเห็ด กรีดดอกเห็ดด้วยใบมีดผ่าตัดที่เผาฆ่าเชื้อโรคแล้ว แยกเนื้อดอกเห็ดเป็นสองส่วน จากนั้นใช้มีดผ่าตัดตัดเนื้อเยื่อด้านในของดอกเห็ดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาดเล็ก แล้วย้ายไปวางบนอาหารแข็งสูตร PDA ที่เติมสารปฏิชีวนะยับยั้งแบคทีเรีย streptomycin 50 ppm จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3- 7 วัน สังเกตเส้นใยราที่เกิดขึ้นทุกวัน และทำการย้ายราที่เกิดขึ้นลงในอาหารสูตร PDA เพื่อทำราให้บริสุทธิ์ และนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.3 คัดเลือกราที่มีความสามารถในการลดสีของน้ำกากส่า

นำราบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากข้อ 3.1.2 – 4 อายุ 7 วัน มาตัดด้วยเครื่องตัดจุกคอร์ก เบอร์ 6 ย้ายชิ้นวุ้นที่มีรามาวางลงบนอาหารแข็งที่มีน้ำกากส่าเป็นองค์ประกอบที่ระดับความเข้มข้น 10% (MoA, ภาคผนวก ก) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 7-14 วัน สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงของสีของอาหารแข็งสูตร MoA ราที่สามารถลดสีของน้ำกากส่าได้จะสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของสีของอาหารใต้จานเพาะเชื้อจากเดิมสีน้ำตาลเข้ม เปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อนถึงขาวขึ้นอยู่กับความสามารถในการลดสีของราชนิดนั้น ๆ จากนั้นคัดเลือกราที่สามารถลดสีของน้ำกากส่าได้เพื่อทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.4 วิเคราะห์ความสามารถในการลดสี

นำราที่มีความสามารถในการลดสีของน้ำกากส่าที่คัดแยกไว้ เลี้ยบนอาหารสูตร PDA เป็นเวลา 7 วัน ตัดราด้วยเครื่องตัดจุกคอร์ก เบอร์ 6 สำหรับชุดทดลอง ย้ายชิ้นวุ้นที่มีราเจริญจำนวน 3 ชิ้น ลงในอาหารเหลวที่มีน้ำกากส่าเป็นองค์ประกอบที่ระดับความเข้มข้น 10% (MoB, ภาคผนวก ก) 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ส่วนชุดควบคุม ไม่ใส่ชิ้นวุ้นที่มีราลงในอาหารเหลวสูตร MoB แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเช่นเดียวกับชุดทดลอง ทำการทดลองแบบ completely randomize design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ เก็บผลการทดลองทุก ๆ 5 วัน เป็นเวลา 40 วัน

วัดความสามารถในการลดสีของน้ำกากส่าของราชนิดต่าง ๆ ตามวิธีของ Sirianuntapiboon และคณะ (2003) โดยทั้งชุดควบคุมและชุดทดลองนำสารละลายมากรองผ่านกระดาษกรองด้วยเครื่องดูดสารแบบสุญญากาศ นำของเหลวส่วนที่กรองได้มาเจือจาง 10 เท่าด้วย acetic buffer pH 5.0 วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารเมลานอยดินในน้ำกากส่าที่ 475 นาโนเมตรด้วย

เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ บันทึกค่าการดูดกลืนแสง (A_{475}) คำนวณค่าการลดสีของน้ำกากส่าโดยราชนิดต่าง ๆ จากค่าการดูดกลืนแสงจากสูตร

ความสามารถในการลดสี (เปอร์เซ็นต์)

$$= \left[\frac{A_{475} \text{ของชุดทดลอง} - A_{475} \text{ของรา}}{A_{475} \text{ของชุดทดลอง}} \right] \times 100$$

ราที่มีความสามารถในการลดสีของน้ำกากส่าได้สูงที่สุดจะนำไปเป็นเชื้อไวด์ไทป์เริ่มต้นในการชักนำให้เกิดมิวเทชันในขั้นตอนต่อไป

3.5 ชักนำให้เกิดมิวเทชันด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตและสาร MNNG

<u>การชักนำให้เกิดมิวเทชันด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต</u> โดยนำเส้นใยของราที่ได้จากข้อ 3.2.5 ที่เจริญในอาหารแข็งสูตร PDA อายุ 7 วัน ตัดด้วยเครื่องตัดจุกคอร์ก เบอร์ 6 จำนวน 10 ชิ้น ขูดเฉพาะเส้นใยราไปบดด้วย Hand Homoginizer เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 20 มิลลิลิตร เพื่อทำให้เป็น mycelial suspension จากนั้นนำไปกรองด้วยสำลี แบ่ง mycelial suspension ที่ผ่านการกรองแล้วใส่จานเพาะเชื้อ จานละ 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปฉายรังสีอัลตราไวโอเลตที่ 254 นาโนเมตร ความเข้มแสง 120 J/cm^2 เป็นเวลา 1, 3, 5, 10, 15, 20 และ 25 วินาที และส่วนที่เหลือไม่นำไปฉายรังสีอัลตราไวโอเลต จากนั้นนำ mycelial suspension ที่ได้รับรังสีอัลตราไวโอเลตไปไว้ในที่มืดนาน 30 นาที แล้วนำ mycelial suspensionปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหารผิวหน้าอาหารแข็งสูตร PDA อย่างละ 5 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นทุกวันเป็นเวลา 7 วัน แล้วนำไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาที่ได้รับรังสีอัลตราไวโอเลตและอัตราการอยู่รอด และย้ายเส้นใยรามิวแทนต์ ที่มีอัตราการอยู่รอดที่ต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ลงบนอาหารแข็งสูตร PDA เพื่อใช้ในการทดลองในขั้นตอนต่อไป

<u>การวิเคราะห์ความสามารถในการลดสี ของน้ำกากส่าของรา UV มิวแทนต์</u> เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ไวด์ไทป์ โดยใช้อาหารเหลวตามสูตร Miyata และคณะ (2000) เพื่อให้ราสายพันธุ์เดิมและยูวี-มิวแทนต์สามารถลดสีของน้ำกากส่าได้มีประสิทธิภาพที่สูงที่สุด โดยนำรา UV มิวแทนต์ และไวด์ไทป์ ที่เจริญในอาหารแข็งสูตร PDA อายุ 7 วัน ตัดด้วยเครื่องตัดจุกคอร์กเบอร์ 6 จำนวน 3 ชิ้น ย้ายไปเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร PDB เป็นเวลา 10 วัน (ราไวด์ไทป์ ที่อยู่ในช่วง log phase) ย้าย inoculum ปริมาณ 1.5 กรัม ลงในอาหารเหลว ที่มีน้ำกากส่าเป็นองค์ประกอบตามสูตรของ Miyata และคณะ (2000) (ภาคผนวก ก) ทำการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ วัดความสามารถในการลดสีของน้ำกากส่าของราไวด์ไทป์ และยูวี-มิวแทนต์ รายูวี-มิวแทนต์ที่มี

ความสามารถในการลดสีของน้ำกากส่าได้สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับราไวด์ไทป์ จะนำไปเป็นเชื้อตั้งต้นในการชักนำให้เกิดมิวเทชันด้วยสาร MNNG ต่อไป

การชักนำให้เกิดมิวเทชันด้วยสาร MNNG โดยนำเส้นใยของรา UV มิวแทนต์ที่มีความสามารถในการลดสีสูงสุดเจริญในอาหารแข็งสูตร PDA อายุ 7 วัน ตัดด้วยเครื่องตัดจุกคอร์ก เบอร์ 6 จำนวน 5 ชิ้น ขูดเฉพาะเส้นใยราไปบดด้วย Hand Homoginizer เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 10 มิลลิลิตร เพื่อทำให้เป็น mycelial suspension จากนั้นนำไปกรองด้วยสำลี แบ่ง mycelial suspension ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร จำนวน 5 หลอด เติม MNNG solution ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 3, 0.3, 0.03, 0.003, 0.003 และ 0.0003 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้นาน 20 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 7000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง แล้วเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 1 มิลลิลิตร เพื่อล้างสารเคมีทิ้ง เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 7000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทำซ้ำอีก1 รอบ เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ดูดสารละลาย 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงแข็งสูตร PDA อย่างละ 5 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นทุกวันเป็นเวลา 7 วัน แล้วนำไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารเคมีและอัตราการอยู่รอด และย้ายเส้นใยรา UV-NG มิวแทนต์ที่มีอัตราการอยู่รอดที่ต่ำกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ ลงบนอาหารแข็งสูตร PDA เพื่อใช้ในการทดลองในขั้นตอนต่อไป

การวัดความสามารถในการลดสีของน้ำกากส่าของราไวด์ไทป์ ยูวี-มิวแทนต์ที่ใช้เป็นเชื้อตั้งต้น และ UV-NG มิวแทนต์ เช่นเดียวรา UV มิวแทนต์ ทำการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ รา UV-NG มิวแทนต์ที่มีความสามารถในการลดสีของน้ำกากส่าได้สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับราไวด์ไทป์นำไปเป็นศึกษาต่อไป

ทดสอบความเสถียรของมิวแทนต์ โดยเลี้ยงราไวด์ไทป์และมิวแทนต์ที่มีความสามารถในกากรลดสีสูงที่สุดในอาหาร PDA โดยต่อเชื้อ 5 รุ่น ในเวลา 3 เดือน จากนั้นวัดความสามารถในการลดสีของน้ำกากส่าของราไวด์ไทป์มิวแทนต์ โดยใช้อาหารเหลว Miyata และคณะ (2000) ทำการทดลองแบบ CRD จำนวน 3 ซ้ำ เปรียบเทียบความสามารถในการลดสีของราไวด์ไทป์และมิวแทนต์ก่อนและหลังการต่อเชื้อ 5 รุ่น

3.6 ศึกษาลักษณะของราไวด์ไทป์และมิวแทนต์

ศึกษาความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของราไวด์ไทป์และมิวแทนต์ บนอาหารสูตร PDA โดยเลี้ยงเส้นใยราไวด์ไทป์บนอาหาร PDA สังเกตลักษณะโคโลนี สีของโคโลนี ขอบของโคโลนี ความฟูของเส้นใย

ศึกษาอัตราการเติบโตของราไวด์ไทป์และมิวแทนต์บนอาหาร PDA โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน

ศึกษาหา MIC ของราไวด์ไทป์และมิวแทนต์ เพื่อใช้เป็น resistance marker นำราไวด์ไทป์และมิวแทนต์ที่มีความสามารถในการลดสีของน้ำกากส่าได้สูง เจริญในอาหารสูตร PDA แล้วเป็นเวลา 7 วัน ตัดด้วยเครื่องตัดจุกคอร์ก เบอร์ 6 ย้ายชิ้นวุ้นมาวางบนอาหารแข็งสูตร PDA ที่เติมสารยับยั้งการเจริญของรา มาลาไชต์กรีน เข้มข้น 0-0.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรหรือคีโตโคนาโซลเข้มข้น 0-0.21 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี ในวันที่ 7 ความเข้มข้นที่น้อยที่สุด คือ MIC ของรานั้น

ศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมที่ตำแหน่ง ITS โดยเทคนิค RFLP

การสกัดดีเอ็นเอของรา (Zhou และคณะ, 1999)โดยใช้เส้นใยของราประมาณ 100 มิลลิกรัม บดให้ละเอียดด้วยโกร่ง เติม Washing buffer 1000 ไมโครลิตร แล้วดูดสารละลายลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลงทิ้ง ทำซ้ำ 2-3 รอบ เติม 2 X CTAB 700 ไมโครลิตร เขย่าให้ตะกอนละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม chloroform/isoamyl alcohol (24:1, v/v) 700 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 8 นาที 2 ครั้ง ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol 700 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง แล้วเติม 70% ethanol 700 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง ตั้งทิ้งไว้ให้ตะกอนแห้ง จากนั้นเติม TE buffer 100 ไมโครลิตร นำดีเอ็นเอไปทำให้บริสุทธิ์ โดยเติม RNase เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 1 ไมโครลิตรแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที จากนั้นเติม PEG 60 ไมโครลิตร แล้วนำปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วเติม 70% ethanol 700 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูด สารละลายส่วนบนทิ้ง ตั้งทิ้งไว้ให้ตะกอนแห้ง จากนั้นเติม TE buffer 100 ไมโครลิตร

การเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอของตำแหน่ง ITS ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ทำการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอของตำแหน่ง ITS ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้โครโมโซมอลดีเอ็นเอของราสายพันธุ์ไวด์ไทป์และสายพันธุ์มิวแทนต์ที่คัดเลือกด้วยไพร์เมอร์ ITS1-F และ ITS4 ซึ่งมีลำดับเบสดังต่อไปนี้

ITS1-F: 5' – CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA -3'

ITS4: 5' – TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'

โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย 10X Taq buffer ความเข้มข้นสุดท้าย 1X 2 mM dNTP แต่ละชนิด มีความเข้มข้นสุดท้าย 0.2 mM $MgCl_2$ 2.5 mM ไพร์เมอร์ ITS1-F และ ITS4 ความเข้มข้นสุดท้าย 2.5 μM *Taq* polymerase 1.25 U/50 0.5 μl ดีเอ็นเอความเข้มข้นสุดท้าย 10pg-1μg/50μl จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณอัตโนมัติ (PCR) โดย

ประกอบด้วย denaturation step ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้น denaturation step ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที annealing step ที่อุณหภูมิ 51 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที extention step ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 38 รอบ และ Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

Denaturation step	95° C 5 นาที	
Denaturation	95° C 1 นาที	38 รอบ
Annealing	51° C 1 นาที	
Extention	72° C 1 นาที	
Final Extention	72° C 5 นาที	

<u>การตัด ITS ด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ</u> โดยนำผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน ITS ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AluI HinfI* และ *MboI* (ภาคผนวก ค) โดย *AluI* ใช้ร่วมกับ Tango buffer ส่วน *HinfI* และ *MboI* ใช้ร่วมกับ R buffer โดยในปฏิกิริยา 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X buffer 1 ไมโครลิตร เอนไซม์ตัดจำเพาะ 0.5 ไมโครลิตร ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ITS 5 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 3.5 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลการตัด ITS ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยวิธี electrophoresis บน 3% agarose gel ใน 0.5 TBE buffer โดยใช้กระแสไฟฟ้า 60 โวลต์ นาน 120 นาที ตรวจดูการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลตเปรียบเทียบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 20 bp พร้อมบันทึกภาพ

<u>การประมวลผลลำดับเบสของ ITS</u> จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน ITS ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น นำไปโคลนยีนเข้าสู่เวคเตอร์ โดยใช้ TOPO TA cloning Kit (pCR2.1-TOPO)

Cloning Reaction ในปฏิกิริยานี้ ประกอบด้วย PCR product 2 ไมโครลิตร Salt solution 1 ไมโครลิตร TOPO vector 1 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 2 ไมโครลิตร รวม 6 ไมโครลิตร ใส่สารลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก จากนั้นเขย่าเบา ๆ บ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส นาน 5-30 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Transformation ดูดสารละลายจาก Cloning reaction มา 2 ไมโครลิตรใส่ลงในหลอด One Shot Chemical Competent *E.coli* เขย่าเบา ๆ ห้ามดูดขึ้นลง จากนั้นนำไปบ่มบนน้ำแข็ง 5-30 นาที ทำการ Heat-shock เซลล์โดยการแช่ลงในน้ำอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส 30วินาที จากนั้นนำไปแช่ลงในน้ำแข็งทันที เติม S.O.C. Medium 250ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วนำไปเขย่าในแนวราบด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ดูดสารละลาย transformant 10-50 ไมโครลิตร เกลี่ยลงบน selective media plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 17 ชั่วโมง

ตรวจสอบ Transformant โดยเลือกโคโลนีที่มีสีขาวหรือฟ้าอ่อน 10 โคโลนี ย้ายลงใน selective media plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 17 ชั่วโมง จากนั้นเลือกโคโลนีที่มีสีขาวหรือฟ้าอ่อน 5 โคโลนี เขี่ยเชื้อแต่ละโคโลนีด้วยไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ละลายลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 30 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปแช่ในน้ำเดือด 15 นาที จากนั้นดูดสารละลายที่ได้เป็นดีเอ็นเอที่ใช้ในตรวจสอบด้วยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR) เลือกโคโลนีที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ITS เช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น

จากนั้นส่งพลาสมิดไปประมวลหาลำดับเบสที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี เปรียบเทียบลำดับเบสของ ITS ระหว่างราสายพันธุ์ไวด์ไทป์และสายพันธุ์มิวแทนต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย