บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 วัสดุอุปกรณ์และสายพันธุ์เห็ดหอม

2.1.1 ครุภัณฑ์

ชนิดเครื่องมือ	แบบ-รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์	Shimadzu UV-visible UV-240 Spectronic 2000	Shimadzu, Japan Bausch & Lomb, U.S.A.
เครื่องเซนตริฟิวจ์	Sigma 2-MK	Sigma, Western-Germany
ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ	Memmert	Memmert, Western-Germany
เครื่องวัดพีเอช	Zeromatic IV pH meter Radiometer	Beckman, U.S.A.
เครื่องทำลายเซลล์ด้วยความถี่สูง	Sonicater model W 375	Heat system Ultrasonic,Inc., U.S.A.
อิเลคโตรฟอริซิส	1.LKB(Broma) 2219 MultitempII Thermostatic Circulator 2.LKB(Broma) 2002 Power supply	LKB, Sweden

เครื่องบดเซล	Thomas homogenizer	Arthur H. Thomas, U.S.A.
ตู้ถ่ายเชื้อ	"ISSCO" Laminar flow model H-124	International Scientific Supply co., Thailand
เครื่องอบฆ่าเชื้อจุลินทรีย์	Autoclave	TA Chang Med. Inst. Taiwan

2.1.2 เคมีภัณฑ์

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
1. α-Naphthyl Acetate	Sigma Chemicals Co.,U.S.A.
2. Fast Blue RR Salt	Sigma Chemicals Co.,U.S.A.
3. *o*-Tolidine;3,3′-dimethylbenzidine	Sigma Chemicals Co.,U.S.A.
4. p-Nitrophenol	Sigma Chemicals Co.,U.S.A.
5. Phosphatase substrate; p-Nitrophenyl Phosphate Disodium	Sigma Chemicals Co.,U.S.A.
6. Acrylamide	Merck-Schuchardt, Germany
7. N′N′-Methylene Bis Acrylamide	Sigma Chemicals Co.,U.S.A.
8. TEMED;NNN′N′Tetramethylenediamine	BDH Chemical Ltd., England
9. Tris (hydroxymethyl aminomethane)	Fluka, Switzerland
10. Glycine (aminoacetic acid)	Sigma Chemicals Co.,U.S.A.
11. Coomassie Brilliant Blue G-250	Fluka, Switzerland

สารเคมีอื่นๆ ที่ใช้นอกจากที่กล่าวนี้ สั่งซื้อจากบริษัท Sigma Chemicals Co., ประเทศสหรัฐอเมริกา, บริษัท BDH Chemicals Ltd.,ประเทศอังกฤษ, บริษัท Fluka

ประเทศสวิสเซอร์แลนด์ เป็นต้น

2.1.3 สายพันธุ์เห็ดหอม (*L. edodes*)

สายพันธุ์ *L. edodes* ที่ใช้ในการทดลอง เป็นของหน่วยปฏิบัติการวิจัยเห็ด จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เก็บรักษาบนอาหารวุ้น PDY ที่ 10 ° ซ.

ตารางที่ 1 Some characteristics of dikaryotic *L. edodes* strains of the parents (MU12, MU2, MU4, MU5, MU9 and MU11)

Strains			Mycelial growth** on MEA at 30 ° C	Fruiting*** on sawdust bag at 24 ° C	Color of caps
Codes	Sources	Substrates		B.E. (%)	
MU12 (N) (Native)	Northern Thailand	wood log	slow	< 1	creamy white
MU2 (E)	Taiwan	sawdust	fast	25.6	brown
MU4 (F)	Japan	sawdust	fast	48.8	greyish brown
MU5 (J)	Japan	sawdust	slow	30.1	brown
MU9 (D)	Japan	wood log	slow	< 1	brown
MU11 (S)	Taiwan	sawdust	fast	1.19	brown

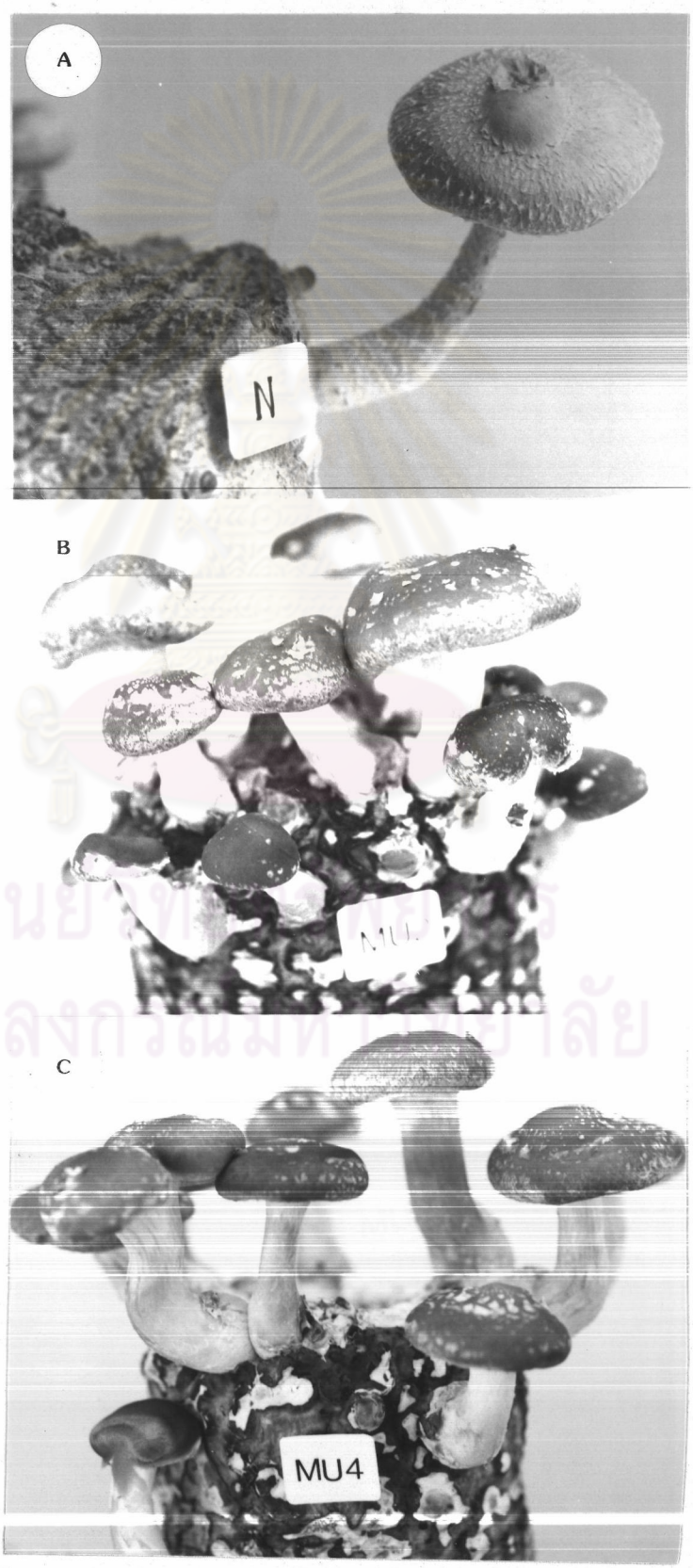
* N-, E-, FF- monospore isolates from MU12, MU2 and MU4 respectively

** fast : Fully colonized within 14-16 days ; slow : > 26 days

*** Cultivation in the controlled house. Substrate :pararubber sawdust mixture of 300 g/bag (Triratana and Tantikanjana, 1989)

รูปที่ 3.1 Fruiting of *L. edodes* parental strains on sawdust blocks

A. MU12 (N) B. MU2 C. MU4



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

018219

ตารางที่ 2 Some characteristics of dikaryotic *L. edodes* strains of the hybrids (derived from MU2 MU12) : C364, C366, C359, C373, C369 and C377

Strains		Mycelial growth** on MEA at 30 ° C	Fruiting*** on sawdust bag at 24 ° C	Color of caps
Codes	Mating isolates*		B.E. (%)	
C364	N9 x E6	fast	30.7	brown
C366	N9 x E8	fast	27.0	brown
C359	N9 x E1	fast	11.9	brown
C373	N10x E5	fast	15.2	brown
C369	N10x E1	fast	-	-
C377	N10x E9	fast	-	-

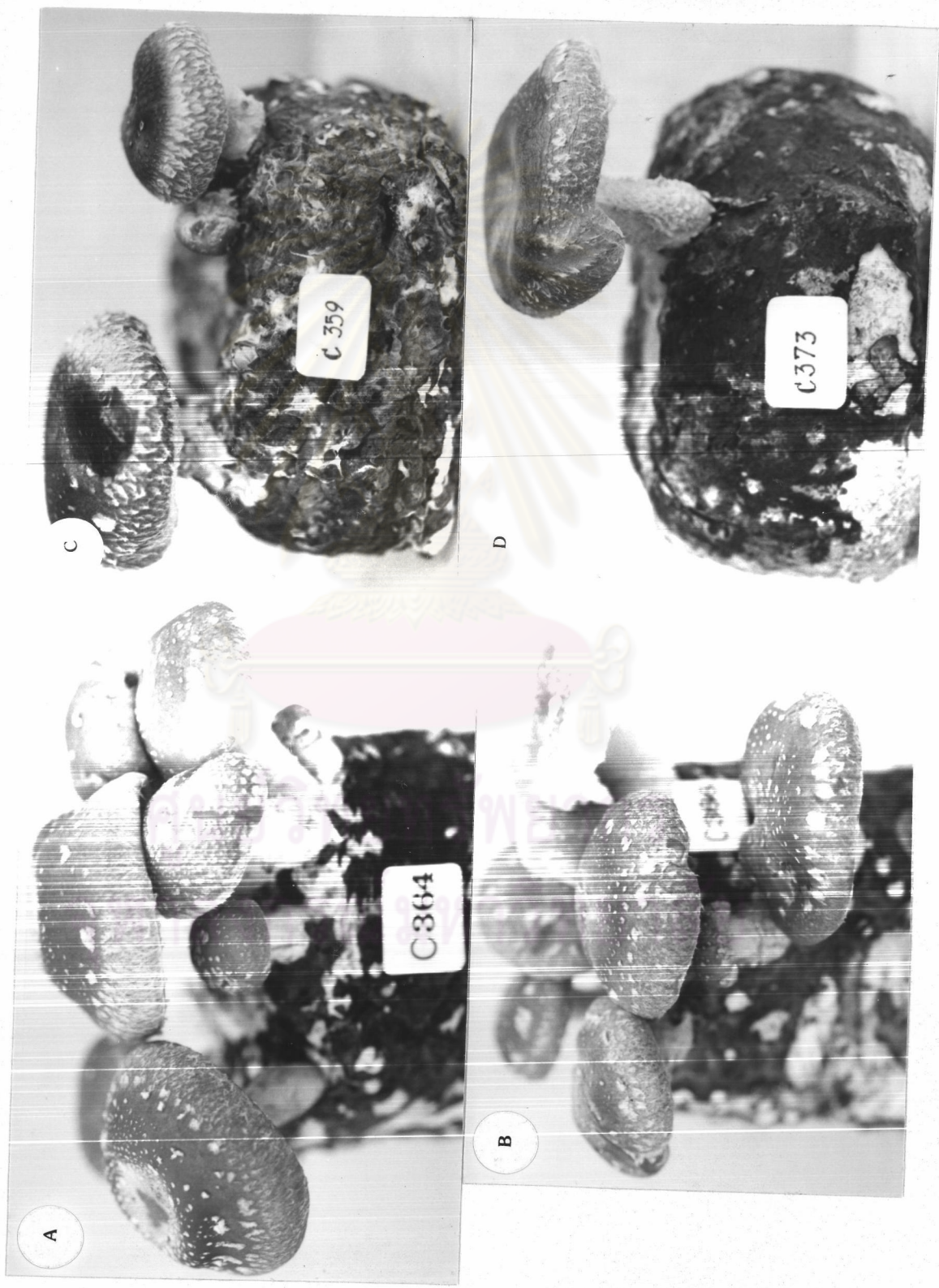
* N-, E-, FF- monospore isolates from MU12, MU2 and MU4 respectively

** fast : Fully colonized within 14-16 days ; slow : > 26 days

*** Cultivation in the controlled house. Substrate :pararubber sawdust mixture of 300 g/bag (Triratana and Tantikanjana,1989)

รูปที่ 3.2 Fruiting of *L. edodes* hybrids on sawdust blocks

A. C364 B. C366 C. C359 D. C373



ตารางที่ 3 Some characteristics of dikaryotic *L. edodes* strains of the hybrids (derived from MU4 MU12) : C508, C507, C513, C502, C516 and C504

Strains		Mycelial growth** on MEA at 30 ° C	Fruiting*** on sawdust bag at 24 ° C	Color of caps
Codes	Mating isolates*		B.E. (%)	
C508	N9 x FF10	fast	52.2	brown
C507	N9 x FF9	fast	39.7	brown
C513	N10x FF7	rather fast	27.5	light brown
C502	N9 x FF2	slow	13.1	light brown
C516	N10x FF10	slow	-	-
C504	N9 x FF5	slow	-	-

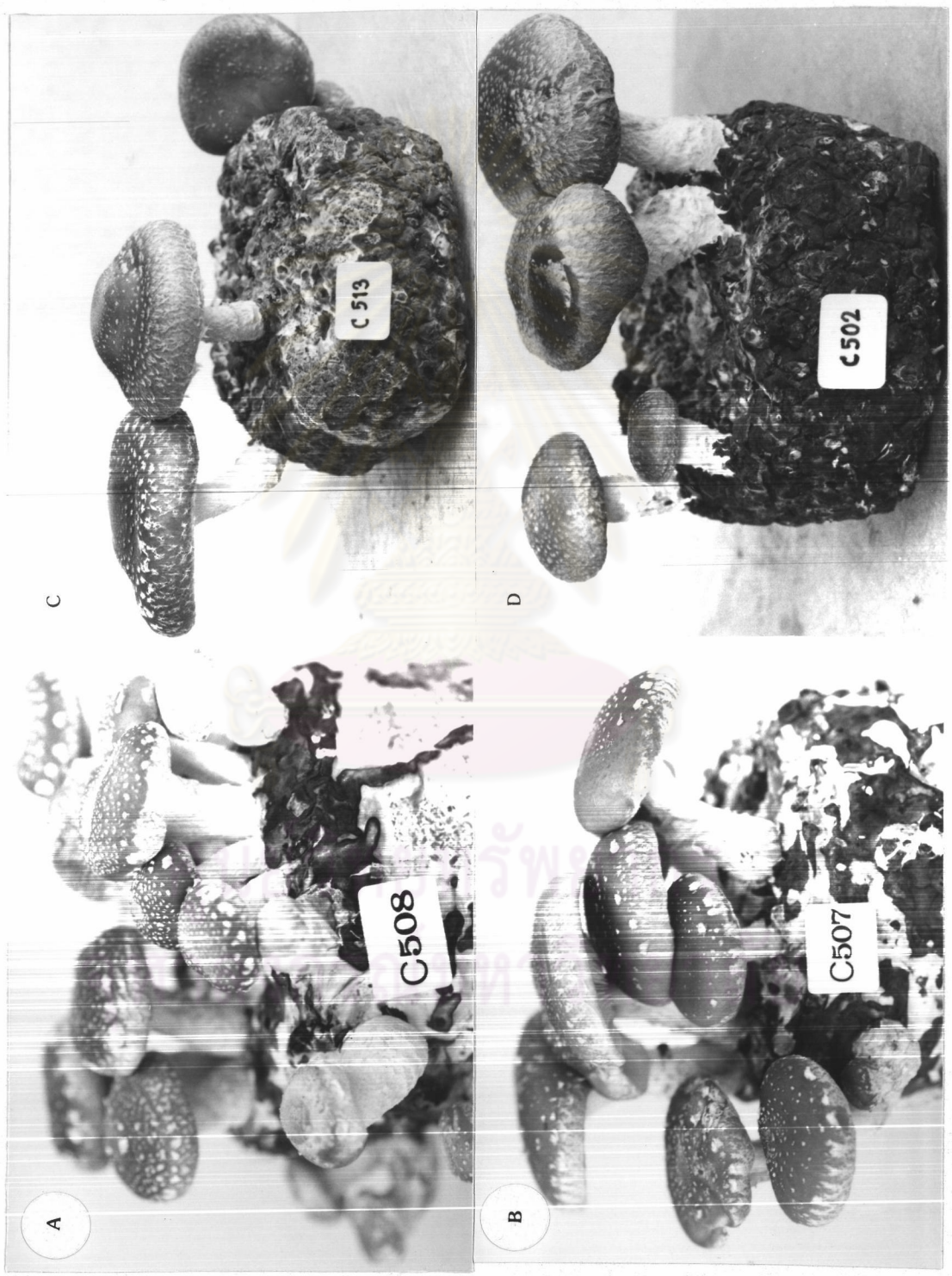
* N-, E-, FF- monospore isolates from MU12, MU2 and MU4 respectively

** fast : Fully colonized within 14-16 days ; slow : > 26 days

*** Cultivation in the controlled house. Substrate :pararubber sawdust mixture of 300 g/bag (Triratana and Tantikanjana,1989)

รูปที่ 3.3 Fruiting of *L. edodes* hybrids on sawdust blocks

A. C508 B. C507 C. C513 D. C502



2.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อและเก็บเชื้อและสูตรวัสดุเพาะ

2.1.4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและเก็บเชื้อ

PDYB (Potato Dextrose Yeast extract Broth)

ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย	มันฝรั่ง	200	กรัม
	Dextrose	20	กรัม
	Yeast extract	5	กรัม

ถ้าเป็นอาหารวุ้น เติม agar 15 กรัม ต่อลิตร , pH 6.0

ME (Malt extract agar)

ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย	Malt extract	20	กรัม
	Peptone	5	กรัม
	Agar	15	กรัม

2.1.4.2 สูตรวัสดุเพาะ (Triratana and Tantikanjana, 1989)

ในวัสดุเพาะน้ำหนัก 100 กรัม ประกอบด้วย

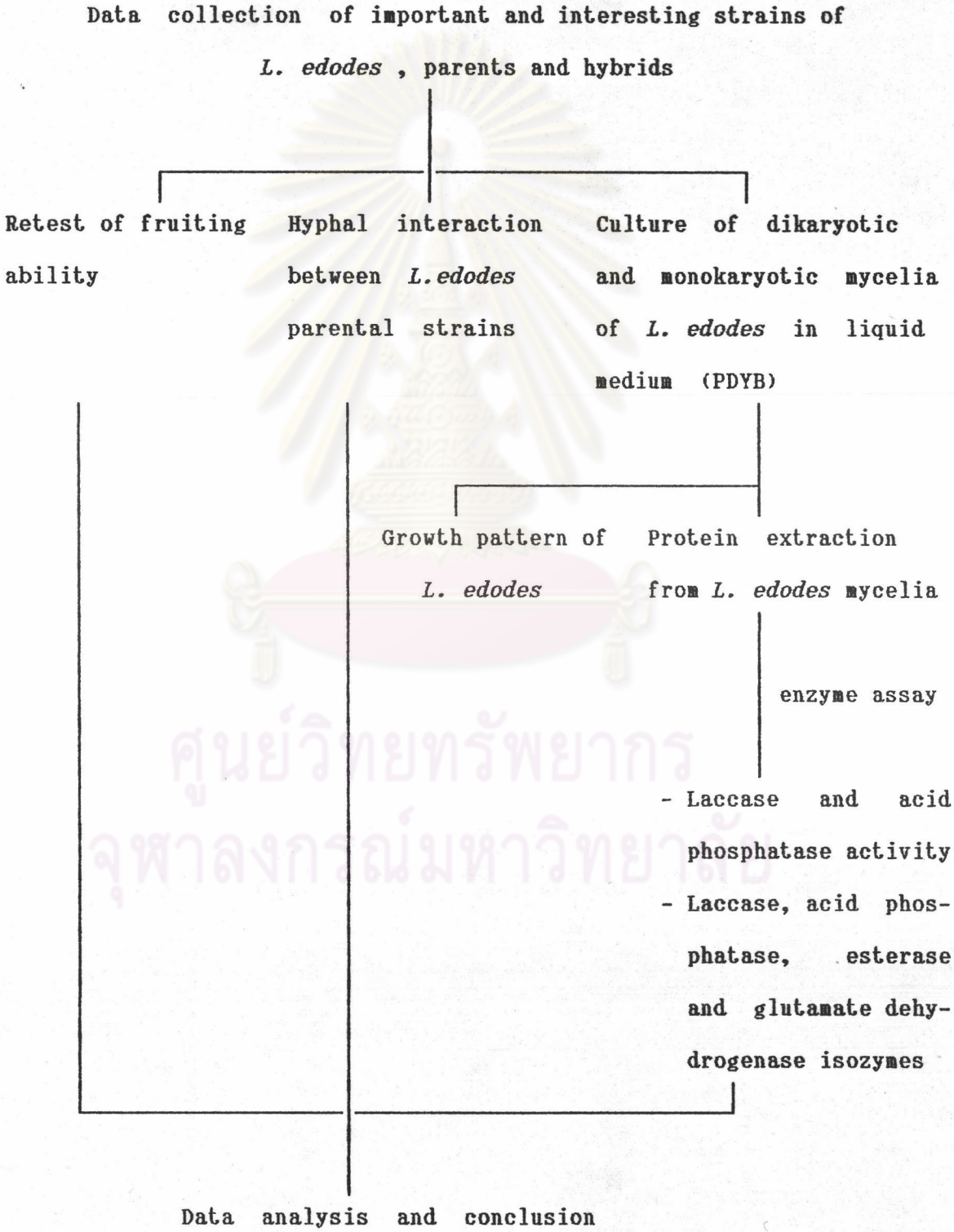
ซีเลอย	94	%
รำข้าว	5	%
แป้งข้าวโพด	0.4	%
Calcium sulphate	1	%
Magnesium sulphate	0.1	%
ความชื้น	55	%

pH 5.5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 <u>วิธีการทดลอง</u> มีขั้นตอนดังรูปที่ 4

รูปที่ 4 Outlines of the procedure used in the experiment



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการทดลองมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.2.1 การทดสอบความสามารถในการเกิดดอกในลูกผสม C369,C377,C516, และ C504

ทำการทดลองเพาะในถุงขี้เลื่อยไม้ยางพาราผสม ตามวิธีของ Triratana และ Tantikanjana (1989) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

2.2.1.1 การเตรียม inoculum โดยการนำเส้นใย *L. edodes* จากเชื้อตั้งต้น (stock culture) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น (PDY) ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่ 25 ° ซ. ประมาณ 2 สัปดาห์

2.2.1.2 การเตรียมหัวเชื้อ ทำด้วยเมล็ดข้าวฟ่างผสม ใส่ inoculum ในขวดข้าวฟ่างผสม บ่มที่ 25 ° ซ. ประมาณ 2 - 3 สัปดาห์

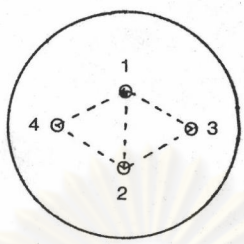
2.2.1.3 วัสดุเพาะและการบ่ม นำหัวเชื้อเมล็ดข้าวฟ่างที่มีเส้นใยปกคลุมใส่ลงในถุงขี้เลื่อยวัสดุเพาะขนาด 300 กรัม บ่มที่ 25 ° ซ. เมื่อเส้นใยเดินเต็มถุงแล้ว โดยปกติจะเกิด maturation ภายในเวลา 3 - 4 เดือน หลังการใส่เชื้อ คือถุงก้อนเชื้อจะมีลักษณะรัดตัว เส้นใยสีขาวจะเปลี่ยนเป็นลักษณะคล้ายแผ่นหนังสีน้ำตาล (Triratana and Tantikanjana, 1989)

2.2.1.4 การเกิดดอก (fruiting) นำถุงก้อนเชื้อที่สมบูรณ์แล้วไปเปิดดอกในโรงเพาะควบคุมสภาวะแวดล้อม

2.2.2 การศึกษาปฏิกิริยาระหว่างเส้นใย (hyphal interaction) ของ dikaryotic mycelium

การเตรียม inoculum ทำตามวิธีข้อ 2.2.1.1 จากนั้นนำเส้นใย dikaryotic mycelium ของ *L. edodes* สายพันธุ์ MU2, MU4, MU5, MU9, MU11 และ MU12 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น (PDY) โดยใช้ที่เจาะจุก (cork borer) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 ซม. เจาะวุ้นบริเวณที่มีเส้นใยปกคลุมห่างจากขอบนอกของโคโลนี 0.5 ซม. นำมาวางบนอาหารวุ้น ในจานเลี้ยงเชื้อ 4 จุด ให้ระยะห่างระหว่างจุดที่ 1 ถึงจุดที่ 2, 3 และ 4 เท่ากับ 2.5 ซม. ซึ่งเป็นการออกแบบการวาง inoculum เพื่อให้มี selfing control โดยที่

จุดที่ 1 และ 2 วาง inoculum สายพันธุ์เดียวกัน ส่วนจุดที่ 3 และ 4 วาง inoculum สายพันธุ์ที่ต่างออกไป ดังรูป บ่มที่ 25 ° ซ.



⊢---⊣ = 2.5 ซม.

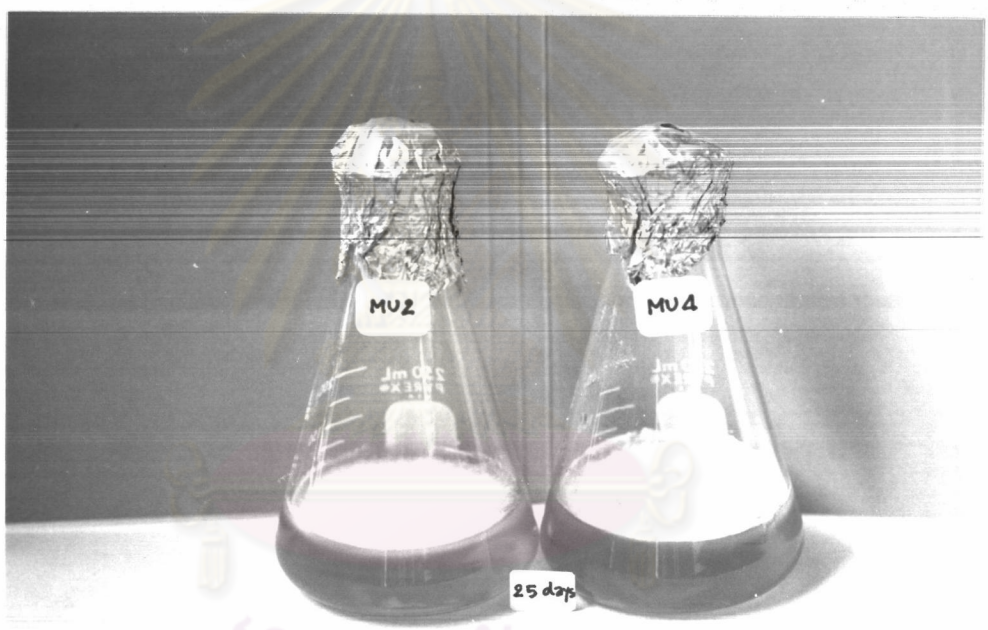
เปรียบเทียบปฏิกิริยาระหว่างเส้นใยเมื่อเจริญมาพบกัน โดยที่เห็ดหอมสายพันธุ์เดียวกันหรือใกล้เคียงกัน เส้นใยจะเจริญเข้าหากันและสอดแทรกประสานกันได้ แต่สายพันธุ์ที่ต่างกันจะเกิดแนว (barrage) ระหว่างเส้นใย

2.2.3 วิธีการเลี้ยงและการศึกษารูปแบบการเจริญของเส้นใย *L. edodes* ในอาหารเหลว

2.2.3.1 การเลี้ยงเส้นใย *L. edodes* ในอาหารเหลว (PDYB) ทำการเตรียม inoculum ตามวิธีข้อ 2.2.1.1 ใช้ที่เจาะจุก (cork borer) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7 ซม. เจาะวุ้นบริเวณที่มีเส้นใยปกคลุม ลอยบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (PDYB)ปริมาตร 100 มล. ในขวดขนาด 250 มล. (รูปที่ 5) เพาะเลี้ยงในสภาพนิ่ง(static culture) บ่มที่ 25 ° ซ.

2.2.3.2 การวัดการเจริญของเส้นใย *L. edodes* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว โดยการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดหอมในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ในสภาพนิ่ง เก็บเส้นใยเพื่อหาน้ำหนักแห้ง ทุก ๆ 10 วัน โดยการกรองด้วย Buchner funnel ผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 ล้างเส้นใยให้สะอาดปราศจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำไปอบแห้งในตู้อบควบคุมอุณหภูมิที่ 60 ° ซ. 48 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำหนักแห้งคงที่แล้ว ชั่งหาน้ำหนักแห้งของเส้นใย เขียนกราฟแสดงรูปแบบการเจริญของเส้นใย *L.edodes* เป็นน้ำหนักแห้งของเส้นใยต่ออายุ

หมายเหตุ การเพาะเลี้ยงเส้นใยต้องทำในสภาพปลอดเชื้อ (aseptic technique)



รูปที่ 5 Cultures of *L. edodes* in static liquid media (PDYB)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2.4 วิธีการเตรียมและสกัดสารละลายเอนไซม์จากตัวอย่างเพื่อใช้ในการวัดแอคติวิตีและวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์

เก็บเส้นใยเห็ดหอมที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว โดยการกรองด้วย Buchner funnel ผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 ล้างเส้นใยให้สะอาดปราศจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ชั่งหาน้ำหนักสดของเส้นใย เติมน้ำกลั่นในอัตราส่วนน้ำหนักสดเส้นใยต่อน้ำกลั่น เท่ากับ 1 : 2 บดด้วยเครื่องโฮโมจิไนเซอร์ (Thomas homoginizer) ให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน ถ่ายบรรจุในหลอดไมโครฟิวจ์ นำไปปั่นที่ 12000 rpm (Sigma 2MK), 4 ° ซ. , 25 นาที สารละลายส่วนใสที่ได้คือสารละลายเอนไซม์ส่วนแรก เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 ° ซ.

หลังจากเก็บสารละลายเอนไซม์แล้ว นำตะกอนที่ได้มาเติมน้ำกลั่นปริมาตรเท่ากับครั้งแรก นำไปทำให้เซลแตกด้วยเครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง (sonicater) ที่ตั้งรอบการทำงานที่ 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที บรรจุในหลอดไมโครฟิวจ์ นำไปปั่นที่ 12000 rpm (Sigma 2MK), 4 ° ซ., 25 นาที สารละลายส่วนใสที่ได้คือสารละลายเอนไซม์ส่วนที่สอง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 ° ซ.

2.2.5 การวิเคราะห์โปรตีน โดยวิธีของ Bradford (1976)

วัดปริมาณโปรตีนในสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้จาก ข้อ 2.2.4 โดยเจือจางสารละลายให้มีความเข้มข้นโปรตีนที่เหมาะสม ใช้สารตัวอย่าง 0.1 มล. และน้ำกลั่น 0.9 มล. เติมลงในสารละลายวัดโปรตีน 5 มล. ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนซึ่งได้จากอัลบูมินของซีรั่มวัว (Bovine serum albumin)

2.2.6 วิธีการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ในสภาพสารละลาย

2.2.6.1 Laccase

การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ laccase ดัดแปลงจากวิธีของ Ross (1982) ซึ่งใช้ *o*-tolidine เป็นสับเสตรท โดยในสารละลายปฏิกิริยาประกอบด้วย 2.0 mM *o*-tolidine

ใน 0.2 M Sodium acetate buffer, pH 4.7 ปริมาตร 1 มล. และสารละลายเอนไซม์ปริมาตรครบ 2 มล. ทำการทดลองที่อุณหภูมิ 25 ° ซ. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปต่อเวลาด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ Shimadzu UV-visible UV240 ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

กำหนดให้ แอคติวิตีของเอนไซม์ 1 หน่วย เท่ากับ ค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไป 0.001 หน่วย ต่อนาที ที่สภาวะของการทดลอง

2.2.6.2 Acid phosphatase (Leatham, 1985a)

นำสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้จากข้อ 2.2.4 ทำปฏิกิริยากับสารละลายสับสเตรทที่ประกอบด้วย 6.66 mM PNP-P (*p*-Nitrophenyl phosphate) ใน 0.1 M Sodium acetate buffer, pH 4.0 ปริมาตร 1 มล. ในปริมาตรของสารละลายปฏิกิริยาทั้งหมด 2 มล. ที่อุณหภูมิ 25 ° ซ. หลังจากปฏิกิริยาดำเนินไป 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติม 1.0 M Sodium carbonate 3 มล. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร โดยใช้ PNP (*p*-Nitrophenol) เป็นสารมาตรฐาน (standard)

กำหนดให้ แอคติวิตีของเอนไซม์ 1 หน่วย เท่ากับ ปริมาณไมโครโมลของ PNP ที่เกิดขึ้น ต่อนาที ที่สภาวะของการทดลอง

2.2.7 การแยกไอโซไซม์ที่สกัดได้จากเส้นใยเห็ดหอมด้วยเทคนิคโพลีอคริลาไมด์เจลอิเลคโตร-ฟอริซิสและการติดตามรูปแบบไอโซไซม์

2.2.7.1 การแยกไอโซไซม์ที่สกัดได้จากเส้นใยเห็ดหอมด้วยเทคนิคโพลีอคริลาไมด์เจลอิเลคโตรฟอริซิส (Laemmli, 1970)

ผสมสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้จากข้อ 2.2.4 กับสารละลายผสมที่ประกอบด้วย 10 % glycerol ใน 2 % Tris chloride buffer, pH 6.7 ความเข้มข้น 10 % และ Bromphenol blue 5 % หยอดในช่องของโพลีอคริลาไมด์เจล โดยให้มีปริมาณแอคติวิตีของ

เอนไซม์ อยู่ในช่วงระหว่าง 500-1000 หน่วย (units) สำหรับ laccase และให้มีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วงระหว่าง 50-100 ไมโครกรัม สำหรับ acid phosphatase, esterase และ glutamate dehydrogenase นำไปแยกโดยใช้กระแสไฟฟ้า 30 มิลลิแอมป์ ต่อเจล 1 แผ่น นาน 3 ชั่วโมง ใน Tris-glycine buffer , pH 8.3

2.2.7.2 การติดตามรูปแบบไอโซไซม์โดยการย้อมสี

2.2.7.2.1 Laccase (Leatham and Stahmann, 1981)

นำแผ่นโพลีอคริลาไมด์เจลที่ทำการแยกเอนไซม์ด้วยกระแสไฟฟ้าแล้ว ลงแช่ในสารละลายซึ่งประกอบด้วย 1.0 mM *o*-tolidine ใน 0.1 M Sodium acetate buffer, pH 4.5 บ่มที่อุณหภูมิห้อง 3-4 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.1 M Sodium acetate buffer, pH 4.5 1 ครั้ง ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นคือ *o*-tolidine ถูกออกซิไดซ์ โดยมี laccase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เกิดเป็นสารประเภท quinone ซึ่งจะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็นสารประเภทที่คล้าย melanin (melanin-like pigment)

สังเกตแถบสีน้ำตาลของ melanin-like pigment ที่เกิดขึ้น

2.2.7.2.2 Esterase (Toyomasu and Zennyozi, 1981)

นำแผ่นโพลีอคริลาไมด์เจลที่ทำการแยกเอนไซม์ด้วยกระแสไฟฟ้าแล้ว ลงแช่ในสารละลายซึ่งประกอบด้วย 0.2 % Fast Blue RR Salt ใน 0.06 M Phosphate buffer, pH 5.4 , 0.5 % α-Naphthyl acetate ใน 50 % acetone บ่มที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที ในที่มืด เปลี่ยนสีอีกครั้ง แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่น เติม 70 % แอลกอฮอล์ ทิ้งไว้ข้ามคืน เท แอลกอฮอล์ออก เติมน้ำกลั่นลงไป สังเกตแถบสีม่วงดำที่เกิดขึ้น

2.2.7.2.3 Acid phosphatase

นำแผ่นโพลีอคริลาไมด์เจลที่ทำการแยกเอนไซม์ด้วยกระแสไฟฟ้าแล้ว ลงแช่ในสารละลายซึ่งประกอบด้วย 3.33 mM PNP-P(*p*-Nitrophenyl phosphate)ใน 50 mM Sodium acetate buffer, pH 4.0 บ่มที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที แถบสีเหลืองที่สังเกตได้ด้วยตาเปล่า แสดงถึงแอคติวิตีของ acid phosphatase

2.2.7.2.4 Glutamate dehydrogenase (Darnall and Klotz, 1972)

นำแผ่นโพลีอคริลาไมด์เจลที่ทำการแยกเอนไซม์ด้วยกระแสไฟฟ้าแล้ว ลงแช่ในสารละลายซึ่งมี L-glutamic acid เป็นสับเสตรท บ่มที่อุณหภูมิ 37 ° ซ. ในที่มืดจนกระทั่งสังเกตเห็นแถบสีน้ำเงินเกิดขึ้น

2.2.7.3 <u>การวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์</u>

2.2.7.3.1 เปรียบเทียบรูปแบบไอโซไซม์โดยการส่องดูด้วยไฟฟลูออเรส-เซนต์

2.2.7.3.2 วิเคราะห์เปรียบเทียบรูปแบบไอโซไซม์โดยการถ่ายรูป และวัดระยะทางที่แถบสีของเอนไซม์เคลื่อนที่ เทียบกับระยะทางที่สีมาตรฐาน (bromphenol blue) เคลื่อนที่ แล้วนำมาคำนวนค่า Rf

$$Rf = \frac{\text{ระยะทางที่แถบสีของเอนไซม์เคลื่อนที่ (ซม.)}}{\text{ระยะทางที่สีมาตรฐานเคลื่อนที่ (ซม.)}}$$

เปรียบค่า Rf ที่ได้เพื่อจำแนกลักษณะความแตกต่างของเอนไซม์แต่ละรูป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย