บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างและเลี้ยงเนื้อเยื่อเห็ดโคน ได้แก่ ขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 200 มิลลิลิตร จานเพาะเชื้อ(petri dish) มีดผ่าตัด ปากคีบ(forcep) กระบอกตวง ปิเปต บีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร ถุงพลาสติก กระดาษกรอง Whatman No. 1 กล้องถ่ายรูป ฟิล์มสีโกดัก ฯลฯ

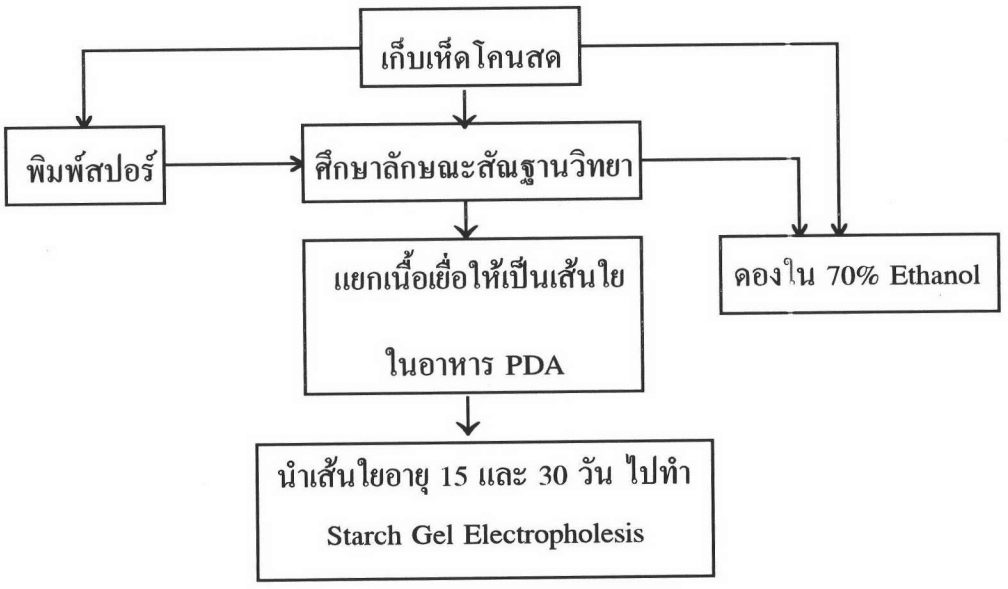
2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์แบบ camera lucida ไมโครมิเตอร์ ไม้บันทัด เป็นต้น

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำอิเลคโตรโฟริซิส ได้แก่ electrophoresis cell power supply ชนิดกระแสตรง(direct current) โกร่งสำหรับบดตัวอย่างเห็ด microtube น้ำแข็ง refrigerated centrifuge ของ HITRACHI type 20-PR-52 กล่องพลาสติกขนาดใหญ่สำหรับย้อมสี suction flask ขวดสีชา เครื่องตัดเจล ลวดสแตนเลสขนาดเล็ก ฯลฯ

4. อาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อเห็ดโคน potato dextrose agar(PDA)และpotato dextros broth(PDB)

5. สารเคมี(ภาคผนวก ข.)

แผนการดำเนินการวิจัย สรุปได้ดังนี้ คือ



การรวบรวมสายพันธุ์เห็ดโคน

ทำการเก็บรวบรวมสายพันธุ์เห็ดโคนจากจังหวัดต่าง ๆ ดังนี้

1. จังหวัดราชบุรี
2. จังหวัดกาญจนบุรี
3. เพชรบุรี

ถ่ายรูปและดองแต่ละตัวอย่างใน 70 % เอทธานอล

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดโคน

1. ทำพิมพ์สปอร์(spore print)

นำหมวกเห็ดจากแต่ละตัวอย่าง ซึ่งบานเต็มที่ ทำความสะอาดด้านบนของหมวกดอก นำมาวางใน petri dish ที่มีกระดาษกรอง Whatman No. 1 รองอยู่ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนกระทั่งสปอร์ถูกดีดออกมา ถ่ายรูปและเก็บไว้เพื่อศึกษาลักษณะของสปอร์โดยกล้องจุลทรรศน์

2. เตรียมสไลด์เพื่อตรวจหาเซลล์หมัน(cystidia) และ basidium

นำส่วนของครีบดอกมาทำสไลด์เพื่อตรวจหาเซลล์หมัน วัดขนาดด้วยไมโครมิเตอร์ ศึกษาลักษณะและวาดรูป ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ camera lucida

3. จำแนกชนิดเห็ดโคน

โดยพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น รูปร่างและขนาดของหมวกดอก ความยาว ขนาดและลักษณะของก้านดอก เซลล์หมัน ขนาดและสีของสปอร์ เป็นต้น (Heim, 1962 ; เกษม 2537 ; อนงค์ 2520)

การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดโคน

1. เตรียมอาหาร สูตร PDA และสูตร PDB (ภาคผนวก ก)

2. เลือกเห็ดโคนจากตัวอย่างที่เก็บได้ ตัดหมวกดอกและรากออก ทำความสะอาด ตัดเนื้อเยื่อขนาด 0.5x0.5x0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร วางบนอาหาร PDA โดยวิธีปลอดเชื้อ(aseptic echnique) ในตู้ปลอดเชื้อ(aseptic chamber) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเจริญของเส้นใยจากเนื้อเยื่อเห็ดประมาณ 4 สัปดาห์

3. การเตรียมเส้นใยเห็ดโคนเพื่อการทำอิเลคโตรโฟริซิส ตัดเส้นใยเห็ดโคนขนาด 0.5x0.5 ตารางเซนติเมตร จากอาหาร PDA เลี้ยงในอาหาร PDB โดยให้ชิ้นเนื้อเยื่อลอยอยู่บนผิวของอาหาร บ่มเชื้อ(incubate)ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 วัน และ 30 วัน ตามลำดับ

การทำอิเลคโตรโฟริซิสชนิดเจลแป้ง

1. เตรียมเครื่องมือในการทำอิเลคโตรโฟริซิสดังรูปที่ 2 ซึ่งประกอบด้วย

รูปที่ 2 เครื่องมือในการทำอิเลคโตรโฟริซิส

2. การเตรียม extraction buffer ซึ่งประกอบด้วย ส่วนต่าง ๆดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบของ extraction buffer

สารประกอบ	ปริมาณ
Tris	1.60 กรัม
Triplex II	0.12 กรัม
PVP-40	4.00 กรัม
DTT	50 มิลลิกรัม
mercaptoethanol	1 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร
ปรับ pH ให้ได้ 7.3 ด้วย	1 N HCl

3. การเตรียมสารสกัดจากเส้นใยเห็ดโคน

หยดบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดเอ็นไซม์(extraction buffer)ลงในโกร่งที่เย็นจัด ประมาณ 5 - 10 หยด ใส่เส้นใยเห็ดโคนที่ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง บดให้ละเอียด จากนั้นเก็บไว้ใน microtube ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส สามารถนำมาใช้ได้ทันที หรือใส่หลอดเหวี่ยง(centrifuge tube) เข้าเครื่อง refrigerated centrifuge ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำน้ำใสที่อยู่ตอนบน (supernatant) เก็บไว้ใช้ run electrophoresis (รูปที่ 5)

ก. ข

รูปที่ 3 การเตรียมสารสกัดจากเส้นใยเห็ดโคน

ก. บดตัวอย่างในโกร่งที่เย็นจัด

ข. นำตัวอย่างใส่หลอด microtube และเข้าเครื่อง refrigerated centrifuge

4. การเตรียม electrod buffer (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 อิเลคโทรดบัปเฟอร์ เจลบัปเฟอร์ ค่าทางไฟฟ้าและระยะเวลาที่เหมาะสมกับเอ็นไซม์

ระบบของเอ็นไซม์ (enzyme system)	อิเลคโทรดบัปเฟอร์ electrode buffer	เจลบัปเฟอร์ gel buffer	ค่าทางไฟฟ้าและระยะเวลา running conditions
GOT	0.06 M NaOH 0.3 M boric acid pH 8.2	0.075 M Tris 0.01 M citric acid pH 8.7	approx.30 V cm^{-1} for 4.30 h. max.80 mA
LAP GDH	0.025 M LiOH 0.2 M boric acid pH 8.1	0.05 M Tris 0.01 M citric acid 5%(v/v) electr.buffer pH 8.1	approx.30 V cm^{-1} for 4.30 h. max.80 mA
SKDH IDH 6-PGDH	0.135 M Tris 0.043 M citric acid pH 7.3	0.042 M Tris 0.013 M citric acid pH 7.3	approx. 20 V cm^{-1} for 5.30 h max.130 mA
PGM MDH	0.135 M Tris 0.043 M citric acid pH 7.0	0.042 M Tris 0.013 M citric acid pH 7.0	approx.20 Vcm^{-1} for 5.30 h max. 130 mA
G-6-PDH DIA(+NAD) FDH	0.135 M Tris 0.043 M citric acid pH 6.7	0.06 M Tris 0.036 M histidine-HCl 0.04%(w/v)EDTA pH 6.7	approx.20 V cm^{-1} for 5.30 h max. 130 mA

ที่มา : Changtragoon, 1995

5. การเตรียมเอ็นไซม์ที่ใช้ในการศึกษา

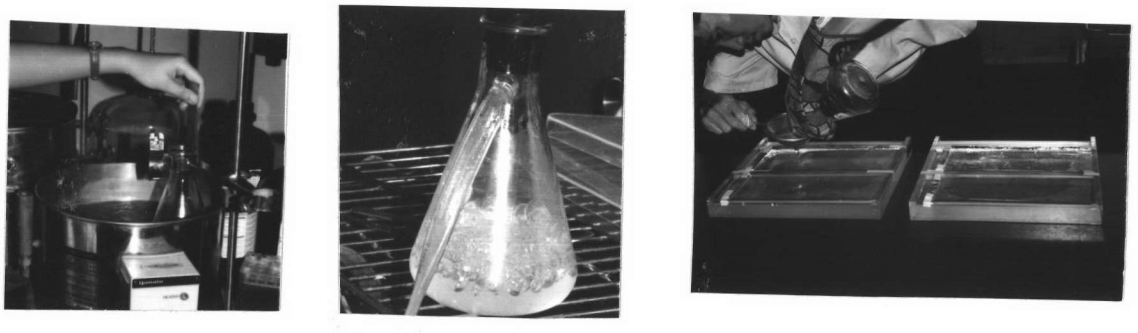
นำสารสกัดของเส้นใยเห็ดโคนทั้ง 11ตัวอย่าง มาทดสอบในอิเลคโตรโฟริซิสแป้ง แล้วตรวจสอบแถบสีที่เกิดขึ้นจากเอ็นไซม์ 11 ชนิด

6. การเตรียมเจลแป้ง

ชั่งน้ำหนักแป้งชนิด hydrolyzed potato starch for electrophoresis และน้ำตาล ใส่ลงใน suction flask เติมเจลบัฟเฟอร์และน้ำ ตามลำดับ ซึ่งมีส่วนผสม ดังแสดงใน ตารางที่ 5 คนให้ผสมกันดีแล้ว นำไปต้มในน้ำเดือด แล้วกวนจนเจลเริ่มหนืด กวนต่อไปอีก 2 นาที ปิดฝาทิ้งไว้ให้เดือดอีก 15 นาที ยกลงนำไปดูดอากาศออกโดยใช้ suction pump แล้วจึงเทลงบนถาดขนาด 10x25x1 เซนติเมตร โดยกรองด้วยกระชอน ระวังอย่าให้มีฟองอากาศเกิดขึ้นในแผ่นเจล ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาที แล้วนำไปวางบนแท่นวางในกล่องอุปกรณ์อิเลคโตรโฟรีซิสที่มีอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้เจลเย็น

ตารางที่ 5 ส่วนผสมของเจลแป้งในบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ

ชนิดของบัฟเฟอร์	ปริมาณสาร(กรัม)			ปริมาณสาร(มิลลิลิตร)	
	แป้ง	น้ำตาล	เจลบัฟเฟอร์	อิเลคโทรดบัฟเฟอร์	น้ำ
สูตรของ Ashton และ Braden	27	5	215	10	-
สูตรของ Poulik	27	5	225	-	-
Tris-citrate pH 6.0-8.0	25.2	5	-	50	160
Tris-histidine pH 6.7	25.2	5	150	-	60



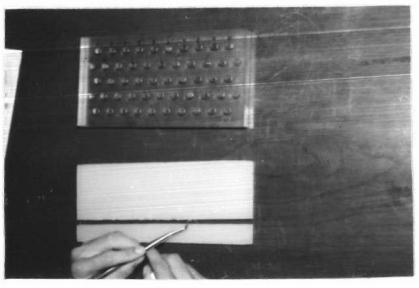
ก. ข. ค.

รูปที่ 4 การเตรียมเจลแป้ง

ก. กวนในน้ำเดือด ข. suction pump ค. เทใส่ถาด

7. การใส่ตัวอย่าง

ตัดกระดาษกรอง Whatman No.3 ให้มีขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร นำ microtube ที่ใส่สารสกัดเอ็นไซม์เห็ดโคนแต่ละตัวอย่าง เทลงบนถาดหลุมที่แช่ให้เย็นจัด ตามลำดับ ใช้ปากคีบ(forcep) คีบกระดาษกรองนำไปซับสารสกัดเอ็นไซม์พอมาด นำเจลแป้งที่เย็นจัด มาตัดตามแนวยาวออกเป็น 2 ส่วน โดยให้ส่วนล่างกว้างประมาณ 2.5 เซนติเมตร ใช้นิ้วกรีดให้เจลแป้งแยกออกจากกันพอประมาณ วางกระดาษกรองที่ซับสารสกัดเอ็นไซม์แต่ละตัวอย่างติดกับเจลแป้งบริเวณรอยตัดของเจลแผ่นใหญ่ โดยให้วางกระดาษกรองแต่ละชิ้นห่างกันประมาณ 1 มิลลิเมตร ตามลำดับ จากนั้นเลื่อนเจลแป้งขนาดเล็กด้านล่างเข้ามาประกบให้แนบติดกับเจลแป้งแผ่นใหญ่เช่นเดิม



รูปที่ 5 การใส่ตัวอย่าง

8. การทำอิเลคโตรโฟรีซิส

รินสารละลายอิเลคโทรดบัฟเฟอร์ลงใน electrode tray ปรับอุณหภูมิภายในกล่องอุปกรณ์ของอิเลคโตรโฟรีซิสให้มีอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส นำเจลแป้งที่ใส่ตัวอย่างแล้ววางลงใน electrode tray โดยให้ด้านที่ใส่ตัวอย่างอยู่ทางขั้วลบ แล้วใช้ผ้าที่มีความยาวเท่ากับแผ่นเจลแป้ง 2 ผืน วางพาดทับขอบเจลทั้ง 2 ด้าน โดยให้ชายผ้าจุ่มอยู่ในบัฟเฟอร์เพื่อใช้เป็นสะพานเชื่อมระหว่างเจลแป้งกับบัฟเฟอร์ จากนั้นเปิดเครื่องป้อนกระแสไฟฟ้ากระแสตรง(power supply) โดยปรับค่ากระแสไฟฟ้าและความต่างศักย์ไฟฟ้าให้สอดคล้องกับชนิดของบัฟเฟอร์จนครบเวลา(ตารางที่ 4)

9. การตัดแผ่นเจลเพื่อย้อมสี

นำเจลแป้งที่ทำอิเลคโตรโฟรีซิสแล้วออกมา แล้วตัดในแนวนอนให้เป็นแผ่นบาง ๆ ประมาณ 2 มิลลิเมตร ด้วยลวดสแตนเลสขนาดเล็ก นำเจลที่ตัดได้ใส่ในกล่องที่มีบัฟเฟอร์อยู่เพื่อไม่ให้แผ่นเจลติดกล้อง เทบัฟเฟอร์ทิ้งก่อนย้อมสีเอ็นไซม์แต่ละชนิด

ภาควิชาพยาธิวิทยา สถาบันวิจัยการแพทย์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 ส่วนประกอบต่าง ๆ ของสารเคมีที่ใช้ศึกษาไอโซไซม์

ชนิดของเอนไซม์	สารละลายสีย้อมเอนไซม์	ปริมาณ
1.Diaphorase (DIA)	Tris-HCI 0.0825 M. pH 8.0	50.0 ml
	Tetrazolium thiazolyl blue (MTT) 0.096 M	2.5 ml
	β-nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)0.003	50.0 mg
	2,6-dichlorophenol-indophenol (DICIP)	1.0 mg
2.Formate dehydrogenase (FDH)	Tris-HCI 0.0825 M ph 8.0	40.0 ml
	Phenazine methosulfate (PMS) 0.0032 M	1.3 ml
	NAD 0.003 M	6.0 ml
	MTT 0.0096 M	2.5 ml
	Formic acid	3.0 g
3.Glucose-6-phosphate dehydrogenase (6-PGDH)	Tris-HCI 0.0825 M ph 8.0	40.0 ml
	PMS 0.0032 M	1.0 ml
	NADP .0026 M	5.3 ml
	$MgCl_2$-$6H_2O$ 0.4918 M	1.3 ml
	MTT 0.0096 M	2.5 ml
	Bovine serum albumin	400.0 mg
	D-glucose-6-phosphate	50.0 mg
4.Glutamate dehydrogenase (GDH)	Tris-HCI 0.0825 M. pH 8.0	40.0 ml
	PMS 0.0032 M	1.3 ml
	NAD 0.003 M	6.0 ml
	MTT 0.0096 M	2.5 ml
	Sodium glutamate	1.0 g

ตารางที่ 6 (ต่อ) ส่วนประกอบต่าง ๆของสารเคมีที่ใช้ศึกษาไอโซไซม์

ชนิดของเอ็นไซม์	สารละลายสีย้อมเอ็นไซม์	ปริมาณ
5.Glutamate oxaloacetate transaminase (GOT)	Tris-HCI 0.0825 M ph 7.0	50.0 ml
	2-oxoglutaric acid	70.0 mg
	1- aspatic acid	120.0 mg
	Fast blue RR salt	80.0 mg
6.Isocitrate dehydrogenase (IDH)	Tris-HCI 0.0825 M ph 8.0	40.0 ml
	PMS 0.0032 M	1.3 ml
	$MgCl_2$-$6H_2O$ 0.4918	1.3 ml
	MTT 0.0096 M	2.5 ml
	NADP 0.0026 M	5.3 ml
	DL-isocitrate acid (trisodium salt)	50.0 mg
7.Leucine aminopeptidase (LAP)	Tris-malate 0.05 m PH 5.4	50.0 ml
	1- leucine (β-naphthylamide-HCI)	10.0 mg
	Fast-back K salt	10.0 mg
8.Malate dehydrogenase (MDH)	Tris-HCI 0.0825 m pH 8.0	40.0 ml
	PMS 0.0032 M	1.3 ml
	$MgCl_2$-$6H_2O$ 0.4918 M	1.3 ml
	MTT 0.0096 M	2.5 ml
	NAD 0.003 M	5.3 ml
	DL-malic acid (sodium salt)	60.0 mg

ตารางที่ 6 (ต่อ) ส่วนประกอบต่าง ๆ ของสารเคมีที่ใช้ศึกษาไอโซไซม์

ชนิดของเอนไซม์	สารละลายสีย้อมเอนไซม์	ปริมาณ
9.6-Phosphogluconate dehydrogenase (6-PGDH)	Tris-HCI 0.0825 M,pH 8.0	40.0 ml
	PMS 0.0032 M	1.3 ml
	$MgCl_2$-$6H_2O$ 0.4918 M	1.3 ml
	MTT 0.0096 M	2.5 ml
	NADP 0.0026 M	5.3 ml
	6-Phosphogluconic acid trisodium(หรือ barium)salt	40.0 mg
10.Phosphoglucomutase (PGM)	Tris-HcI 0.0825 M,pH 8.0	40.0 ml
	PMS 0.0032 M	1.3 ml
	$MgCl_2$-$6H_2O$ 0.4918 M	1.3 ml
	MTT 0.0096 M	2.5 ml
	NADP 0.0026 M	5.3 ml
	D-glucose-1-phosphate	50.0 mg
	Glucose-6-phosphate dehydrogenase 10%	25.0 ml
11.Shikimate dehydrogenase (SKDH)	Tris-HcI 0.0825 M,pH 8.0	40.0 ml
	PMS 0.0032 M	1.3 ml
	MTT 0.0096 M	2.5 ml
	NADP 0.0026 M	5.3 ml
	shikimic acid	50.0 mg

10. การเตรียมสีและย้อมสีเจลแป้ง

เตรียมส่วนผสมของสีย้อมดังตารางที่ 6 ในขวดสีชา ปิดด้วยกล่องดำ คนส่วนผสมด้วย magnetic stirer เป็นเวลา 15 นาที รินส่วนผสมลงในกล่องย้อมสีที่บรรจุเจลแป้งไว้แล้ว จากนั้นนำไปวางในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ถึง 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาให้เทสารละลายสีย้อมออก แล้วล้างออกด้วยน้ำ บันทึกไซโมแกรมที่ได้ โดยการถ่ายรูปพร้อมทั้งบันทึกลงในกระดาษโดยวาดแถบสีที่ปรากฏ

รูปที่ 6 การเตรียมสีย้อม

11. การทำเจลแห้ง

นำกระดาษเซลโลเฟนที่มีขนาดใหญ่กว่าเจลแป้ง จุ่มน้ำให้เปียก วางทับลงบนกระจกปาดให้เรียบ ใช้แผ่นพลาสติกช้อนแผ่นเจลจากกล่องย้อมสี วางทับลงไปแล้วปิดแผ่นเจลแป้งด้วยกระดาษเซลโลเฟนจุ่มน้ำอีกแผ่น ปาดให้เรียบ พับมุมกระดาษเซลโลเฟนแต่ละด้านให้แนบกับกระจกเพื่อให้เจลแห้งเรียบและตรง วางบนตะแกรงที่อุณหภูมิห้อง 1-2 วัน

12. การวิเคราะห์ไซโมแกรม

นำไซโมแกรมที่ได้มาประเมินผลเปรียบเทียบแถบสีที่ปรากฏ โดยคำนวณหาค่า R_f (Relative fraction) ซึ่งเป็นค่าคงที่เฉพาะตัวของแถบไอโซไซม์แต่ละชนิด มีสูตรดังนี้

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางเคลื่อนที่ของไอโซไซม์จากจุดเริ่มต้น}}{\text{ความกว้างของแผ่นเจลแป้ง}}$$

นำค่า R_f ที่ได้บันทึกลงในแถบไซโมแกรมซึ่งได้วาดไว้ของเอ็นไซม์แต่ละชนิด เพื่อนำมาจัดลำดับเปรียบเทียบแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมเส้นใยเห็ดแต่ละสายพันธุ์