บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

1. เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น G-10 ของบริษัท New Brunwick Scientific CO ., U.S.A.

2.ตู้เขย่าและตู้ควบคุมอุณหภูมิ(Controlled environment incubator shaker) รุ่น G-27 ของบริษัท New Brunswick Scientfic CO., U.S.A.

3.เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) รุ่น H-103 N ของบริษัท Kokusan , Japan.

4. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb, U.S.A.

5. เครื่องวัดพีเอช (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning, U.S.A.

6. เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HA-36 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Tokyo, Japan.

7. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH-CO1-764604 ของบริษัท Olympus, Japan.

8. กล้องสเตอริโอสองตา รุ่น VM-205157 ของบริษัท Olympus, Japan.

9. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ รุ่น RO-8 ของบริษัท Memmert, Germany.

10. ตู้ลามินาร์โฟล์ว (Laminar flow) รุ่น W-760 ของบริษัท Olympus,Japan.

11. อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น J2-21 ของบริษัท Kottermann , Germany.

12. กล้องจุลทรรศน์สำหรับถ่ายภาพ รุ่น BH-2 ของบริษัท Olympus, Japan.

13. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดใหญ่ (Ultra centrifuge) รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman, U.S.A.

14. อุปกรณ์นับเม็ดเลือด(Haemacytometer) ของบริษัท Bocco, Germany.

15. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น K-550-GE ของบริษัท Scientific Industries, U.S.A.

16. เครื่องแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า (Disc gel electrophoresis) รุ่น DE102 ของบริษัท Hoefer Scientific Instruments, U.S.A.

17. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (Power supply) รุ่น 2761 ของบริษัท Shandow Southern Instruments, U.S.A.

<u>เคมีภัณฑ์</u>

1. <u>เคมีภัณฑ์สำหรับเตรียมโปรโตพลาสต์</u> (Protoplast preparation)

เอนไซม์ไซโมไลเอส (Zymolyase-20T) จาก *Arthrobacter luteus* ของ Seikagaku Kogyo Co., Japan. 20,000 U/g

เอนไซม์โนโวไซม์ (Novozyme 188) จาก *Trichoderma hazianum* ของ Novo Industries, Denmark. 250U/g

เอนไซม์เบตา-กลูคูโรนิเดส (β-Glucuronidase) จาก *Helix pomatia* ของ Sigma Chemical, U.S.A.

เอนไซม์ไลซิ่งเอนไซม์ (Lysing enzyme) จาก *Trichoderma hazianum* ของ Sigma Chemical, U.S.A.

เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) จาก *Trichoderma viride* ของ Sigma Chemical, U.S.A. 7,800U/g

2-เมอแคปโตเอธานอล (2-Mercapto ethanol) ของ J.T. Baker Chemical CO.,U.S.A.

2. <u>เคมีภัณฑ์ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและอาหารสำหรับคืนสู่สภาพเซลล์</u> (Protoplast Regeneration)

เดกโตส (Dextose) ของบริษัท Difco Laboraturies, U.S.A.

ซอร์บิทอล (Sorbitol) ของบริษัท Difco Laboraturies, U.S.A.

ยีสต์ไนโตรเจนเบสที่ไม่มีกรดอะมิโน (Yeast nitrogen base without amino acid) ของบริษัท Difco Laboraturies, U.S.A.

วุ้นผง (Bacto agar) ของบริษัท Difco Laboraturies, U.S.A.

กลูโคส (Glucose) ของ E.Merck, Darmstadt, Germany.

ซอยโตน (Soytone) ของบริษัท Difco Laboraturies, U.S.A.

ผงสกัดยีสต์ (Yeast extract) ของบริษัท Difco Laboraturies, U.S.A.

โปแตสเซี่ยมคลอไรด์ (KCl) ของ E. Merck, Darmstadt, Germany.

แมกนีเซี่ยมซัลเฟต ($MgSO_4$)ของ Farmitalia Carlo Erba, Milano, U.S.A.

โปแตสเซี่ยมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของ BDH Laboratory Chemical Divison Poole, England.

ไดโปแตสเซี่ยมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ของE.Merck, Darmstadt, Germany.

เปปโตน (Bacto peptone) ของบริษัท Difco Laboratories, U.S.A.

3. <u>เคมีภัณฑ์สำหรับรวมโปรโตพลาสต์</u> (Protoplast fusion)

โพลีเอธิลีนไกลคอล (Polyetylene glycol-8000) ของ Sigma Chemical, U.S.A.

แคลเซี่ยมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ของ E.Merck, Darmstadt, Germany.

4. <u>เคมีภัณฑ์สำหรับหาปริมาณดีเอนเอ</u>

ดีเอนเอมาตราฐาน (Deoxyribonucleic acid from Calf Thymus Type1) ของ Sigma, Chemical CO., U.S.A.

ไดเฟนนิลลามีน (Diphenylamine) ของSigma Chemical, U.S.A.

กรดน้ำส้ม (Glacial acetic acid) ของ Riedel-de Hasen A.G. Seelze-Hannover, U.S.A.

อะเซตาดีไฮด์ (Acetaldehyde) ของ BDH laboratory Chemical Division Poole, England.

กรดไตรคลอโรอะซีติก (Tricholoacetic acid)ของ E.Merck, Darmstadt, Germany.

ไดเอธิลอีเทอร์ (Diethylether) ของ Mary and Baker Laboratory Ltd. Dagenham, England.

5. เคมีภัณฑ์สำหรับการการทำเจลอิเลคโตรโฟรีสิส (Gel electrophoresis)

กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของ E.Merck, Darmstadt, Germany.

ทริส (TRIS) ของ Sigma Chemical, U.S.A.

TEMED ของ Sigma Chemical, U.S.A.

อะคริลาไมด์ (Acrylamide) ของ Sigma Chemical, U.S.A.

BIS ของ Sigma Chemical, U.S.A.

ไรโบฟลาวิน (Riboflavin) ของ Sigma Chemical, U.S.A.

ซูโครส (Sucrose) ของ Difco Laboratories, U.S.A.

โคแมสซี บริลเลียนส์ บูล จี-250 (Coomascy billan blue G-250)ของFluka, Switzerland.

อะซีโตน (Acetone) ของ Mary and Baker Laboratory Ltd, Dayenham, England.

วิธีการทดลอง

1. สายพันธุ์เห็ดที่ใช้ในการทดลอง และการทำกล้าเชื้อ

สายพันธุ์เห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*, V)ได้จากกรมวิชาการเกษตร และสายพันธุ์เห็ดโคน (*Termitomyces sp.*, T3) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่แยกจากดอกเห็ดสดในห้องปฏิบัติการของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

นำเชื้อบริสุทธิ์ของเห็ดโคนและเห็ดฟางที่แยกได้ เลี้ยงบนอาหารวุ้นเอียง พีดีเอ(PDA) สูตร1 (ภาคผนวก1.2) บ่มสายใยที่อุณหภูมิห้อง (30±2° ซ.)นาน 5-7 วัน เมื่อสายใยเจริญเต็มที่แล้ว เตรียมไว้ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อไป

2. การเตรียมสายใยในอาหารเหลว

เตรียมสายใยให้ได้ปริมาณมากพอ และหาอัตราการเจริญเติบโต อายุที่เหมาะสมของสายใย เพื่อนำมาเตรียมโปรโตพลาสต์

2.1 อัตราการเจริญของเห็ดโคนในอาหารเหลว

นำน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 5 มล. เติมลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสายใยที่เจริญเต็มผิวหน้าอาหารประมาณ 5-7 วัน ใช้เข็มเขี่ยลากไปบนผิวหน้าอาหาร เพื่อให้สายใยหลุดออกมาใส่ในอาหารเหลว เตรียมอาหารเหลว พีดีบี สูตร2 (ภาคผนวก1.2) ปริมาณ 50 มล.ในขวดทรงกรวยขนาด 250 มล. นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 200 รอบ/นาที เก็บสายใยโดยการกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์1 กรองและเก็บสายใยทุกวัน เป็นเวลา 10วัน ชั่งน้ำหนัก นำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 80° ซ. นำมาชั่งหาน้ำหนักแห้งของสายใย

2.2 การเตรียมสายใยเห็ดฟางในอาหารเหลวเพื่อเตรียมโปรโตนลาสต์

ภาวะการเตรียมสายใยเห็ดฟางในอาหารเหลวและการเตรียมโปรโตพลาสต์ตามวิธีของวีรวัฒน์ และสุมาลี (2534)โดยนำน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 10 มล.ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ พีดีเอที่มีสายใยเจริญเต็มผิวหน้า ใช้เข็มเขี่ยลากไปบนผิวหน้าของอาหาร เพื่อให้สายใยของเชื้อเห็ดหลุดออกมา นำไปใส่ในขวดรูปกรวยที่มีอาหารเหลวพีดีบี 50 มล.และเติมลูกแก้วเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.3 ซม.จำนวน 20 ลูกที่ฆ่าเชื้อแล้ว บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 °ซ.)เป็นเวลา 4 วัน กรองแล้วล้างและเก็บสายใยเห็ดด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อเพื่อใช้เตรียมโปรโตพลาสต์ต่อไป

3. การเตรียมโปรโตพลาสต์จากสายใยเห็ดโคน

การเตรียมโปรโตพลาสต์นั้นเพื่อหาภาวะที่เหมาะสม สำหรับการเตรียมโปรโตพลาสต์จากสายใย ให้ได้จำนวนมาก โดยแปรผันชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ อุณหภูมิ พีเอช ชนิดของออสโมติกสเตบิไลท์เซอร์ และระยะเวลาในการย่อยสลายผนังเซลล์ได้ดังนี้

3.1 ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์

3.1.1 เอนไซม์ชนิดเดี่ยว

เตรียมสายใยเห็ดโคนตามข้อ 2.1 บ่มกับสารละลายเอนไซม์มาตราฐานตามวิธีของ Tseuboi (1985) สูตร1 (ภาคผนวก 1.3) โดยใช้เอนไซม์ 4ชนิดคือ โนโวไซม์ เบตา-กลูคูโรนิเดส ไซโมไลเอส ไลซิ่งเอนไซม์

โนโวไซม์ (Novozyme)

เตรียมเอนไซม์ให้ได้ความเข้มข้น 2.5% 5% 10% 15% และ 20% ผสมในสารละลายเอนไซม์มาตราฐานให้ได้ความเข้มข้นละ 5 มล. นำมาบ่มกับสายใยเห็ดโคนน้ำหนัก 500 มก. ซึ่งเตรียมได้จากข้อ 2.1 ตั้งบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 ° ซ. นับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ทุกชั่วโมง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

เบตา-กลูคูโรนิเดส (β-Glucuronidase)

ละลายเอนไซม์ในสารละลายเอนไซม์มาตราฐานให้ได้ความเข้มข้น 0.2 0.5 1 2 และ 4 มก./มล. อย่างละ 5 มล. นำมาบ่มกับสายใย 500 มก. ที่ได้จาก 2.1 บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบ/นาที 30 ° ซ. ตรวจดูจำนวนโปรโตพลาสต์ทุกชั่วโมง นาน 6 ชม. ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์

ไซโมไลเอส(Zymolyase)

บ่มสายใยเห็ดโคนจาก2.1 ด้วยสารละลายเอนไซม์ที่แปรความเข้มข้นของไซโมไลเอส 0.2 0.5 1 2 และ 4 มก./มล. ตามลำดับ ตั้งบนเครื่องเขย่า 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30° ซ. เป็นเวลา6 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์ทุกชั่วโมง

ไลซิงเอนไซม์ (Lysing enzyme)

นำเอนไซม์ไลซิ่งเอนไซม์ความเข้มข้น 0.2 0.5 1 2 และ 4 มก./มล. ละลายในสารละลายเอนไซม์มาตราฐาน เตรียมแต่ละความเข้มข้นจำนวน5 มล.เมื่อบ่มกับสายใยเห็ดโคน ซึ่งเตรียมจาก 2.1 น้ำหนัก 500 มก. อุณหภูมิ 30 ° ซ. ความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นในแต่ละชั่วโมง

3.1.2 เอนไซม์ผสม

หาชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ผสม 2 ชนิด ที่สามารถใช้สลายผนังเซลล์ให้เกิดโปรโตพลาสต์จากสายใยเห็ดโคนให้ได้จำนวนมากขึ้น โดยนำผลการทดลองจากข้อ 3.1.1 มาใช้ในข้อนี้ โดยคัดเลือกมา 4 ชนิด คือโนโวไซม์ความเข้มข้น20% เบตา-กลูคูโรนิเดส 4มก./มล. ไซโมไลเอส 4 มก./มล. ไลซิ่งเอนไซม์ 4 มก./มล. นำแต่ละชนิดมาผสมกับเซลลูเลส แล้วแปรผันความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลสดังนี้

เอนไซม์ผสมระหว่างโนโวไซม์กับเซลลูเลส

เตรียมโนโวไซม์ความเข้มข้น 20% ในสารละลายมาตราฐานเอนไซม์ แล้วแปรความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลส 1 และ2 มก./มล. ผสมในสารละลายเอนไซม์อย่างละ 5 มล. เติมลงในสายใยเห็ดโคนที่เตรียมได้จากวิธีในข้อ 2.1 มีน้ำหนักสายใยสด 500 มก. บ่มที่อุณหภูมิ 30 ° ซ. บนเครื่องเขย่า 150 รอบ/นาที ดูดสารละลายที่บ่มมาตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสที่เกิดขึ้นด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทุกชั่วโมงเป็นเวลา 6 ชม.

เอนไซม์ผสมระหว่างเบตา-กลูคูโรนิเดสกับเซลลูเลส

ทำเช่นเดียวกับข้างต้นแต่เปลี่ยนเป็นสารละลายของเอนไซม์ผสมระหว่างเบตา-กลูคูโรนิเดส และเซลลูเลส โดยเตรียมเบตา-กลูคูโรนิเดส ความเข้มข้น 4 มก./มล. แล้วแปรความเข้มข้นของเซลลูเลส 1และ 2 มก./มล. ผสมในสารละลายเอนไซม์อย่างละ5 มล.

เอนไซม์ผสมระหว่างไซโมไลเอสกับเซลลูเลส

เตรียมไซโมไลเอสความเข้มข้น 4 มก./มล. ในสารละลายเอนไซม์มาตราฐาน แล้วแปรความเข้มข้นของเซลลูเลส 1 และ 2 มก./มล. ผสมในสารละลายเอนไซม์อย่างละ 5 มล. แล้วทำการทดลองเช่นเดียวกับข้างต้น

เอนไซม์ผสมระหว่างไลซิ่งเอนไซม์กับเซลลูเลส

เตรียมเซลลูเลสความเข้มข้น 1 และ 2 มก./มล. เพื่อผสมในสารละลายมาตราฐานเอนไซม์ของไลซิ่งเอนไซม์ ความเข้มข้น 4 มก./มล. แล้วนำมาบ่มกับสายใยเห็ดโคนที่เตรียมจาก 2.1 ทำเช่นเดียวกับวิธีข้างต้น

3.2 อุณหภูมิ

การทดลองข้างต้นได้คงภาวะการบ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ. จึงทำการเปรียบเทียบอุณหภูมิระหว่าง 22 30 และ 40 °ซ. อุณหภูมิใดที่เหมาะสมสำหรับ การนำสายใยมาบ่มด้วยเอนไซม์เพื่อให้ได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุด โดยนำผลการทดลองจากข้อ 3.1.2 มาใช้ในข้อนี้โดยใช้เอนไซม์ผสมของโนโวไซม์ความเข้มข้น 20 %และเซลลูเลส 2 มก./มล. แล้วแปรผันอุณหภูมิ

เตรียมสายใยในอาหารเหลวตามวิธีในข้อ 2.1 นำมาเติมสารละลายเอนไซม์มาตราฐานของโนโวไซม์ 20%และเซลลูเลส 2มก./มล.ปริมาณ 5 มล. ตั้งบนเครื่องเขย่า 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิต่างๆคือ 22 30 และ 40 °ซ. เปรียบเทียบจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นทุกชั่วโมงเป็นเวลา 6 ชม.

3.3 <u>ความเป็นกรดด่าง</u>

เนื่องจากความเป็นกรดด่างมีผลต่อการเกิดโปรโตพลาสต์ และการแตกสลายของเซลล์ จึงทำการทดลองในช่วงพีเอช 7-8 เพื่อหาพีเอชที่เหมาะสมต่อโปรโตพลาสต์

เตรียมสายใยตามวิธีในข้อ 2.1 เพื่อนำมาบ่มกับสารละลายเอนไซม์มาตราฐานผสมของโนโวไซม์ 20% และเซลลูเลส 2 มก./มล. ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงพีเอชของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ คือ 7 7.25 7.5 7.75 และ 8 ตามลำดับ อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มคือ 30 °ซ. และตั้งบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบ/นาที บันทึกจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นทุก 1 ชั่วโมง นาน6 ชั่วโมง ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์

3.4 <u>ออสโมติก สเตบิไลท์เซอร์</u>

เปรียบเทียบออสโมติก สเตบิไลท์เซอร์ 2 ชนิด เกลืออนินทรีย์กับน้ำตาลแอลกอฮอล์ชนิดใดที่ทำให้ได้โปรโตพลาสต์มากสุด โดยใช้โปแตสเซี่ยมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ (Tseuboi,1985) และซอร์บิทอลความเข้มข้น 0.8 โมลาร์ (Peberdy,1980)

เตรียมสายใยในอาหารเหลวตามวิธีในข้อ 2.1 และเตรียมสารละลายเอนไซม์มาตราฐานของเอนไซม์ผสมของโนโวไซม์ 20% และเซลลูเลส 2 มก./มล. โดยใช้0.6 โมลาร์โปแตสเซี่ยมคลอไรด์และ 0.8 โมลาร์ซอร์บิทอล นำมาบ่มและตั้งทิ้งไว้ที่เครื่องเขย่า ความเร็ว 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 °ซ. นับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นทุกชั่วโมง นาน 6 ชั่วโมง

3.5 ระยะเวลาที่บ่มเอนไซม์

หาระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่มเอนไซม์ผสมของโนโวไซม์20% และเซลลูเลส ความเข้มข้น 2 มก./มล. โดยใช้ภาวะและเอนไซม์ดังกล่าวเป็นหลัก

เตรียมสายใยตามวิธีในข้อ 2.1 บ่มสายใยที่เตรียมไว้ในสารละลายมาตราฐานที่มีเอนไซม์ผสม ของโนโวไซม์และเซลลูเลส นำไปตั้งบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ. นับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่เกิดขึ้นในชั่วโมงที่ 1 2 3 4 5 6 8 และ 10 ตามลำดับโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์

4. การคืนสภาพผนังเซลล์ของโปรโตพลาสต์ (Regeneration protoplast)

4.1 การคืนสภาพผนังเซลล์ของโปรโตพลาสต์เห็ดโคน และการคำนวณเปอร์เซ็นต์การคืนกลับของเซลล์

จากข้อ 3.5 พบว่าโปรโตพลาสต์จะเกิดมากสุด เมื่อบ่มสายใยเห็ดโคนในสารละลายมาตราฐานของโนโวไซม์ 20%และเซลลูเลส 2มก./มล. นาน 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30°ซ. บนเครื่องเขย่า 150 รอบ/นาที นำโปรโตพลาสต์ที่เตรียมได้ไปเลี้ยงให้เจริญและคืนกลับสภาพโคโลนี เพื่อศึกษาลักษณะโคโลนีที่เกิดขึ้น และเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของการคืนสภาพผนังเซลล์ของโปรโตพลาสต์บนอาหารแข็ง 3 ชนิด

นำโปรโตพลาสต์ของเห็ดโคนที่แขวนลอยอยู่ในสารละลายเอนไซม์ กรองผ่านกรวยแยกซินเทอร์กราส เบอร์2 (Sinterglass filter No2.)ปั่นของเหลวเพื่อให้ตกตะกอนที่ 3,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที ล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยสารละลายออสโมติกสเตบิไลท์เซอร์ สูตร 2(ภาคผนวก1.3) ละลายตะกอนใน 1โมลาร์ของสารละลายซอร์บิทอล (Tseuboi,1985) ใช้ปิเปตดูดสารละลายโปรโตพลาสต์ที่ได้ 0.1 มล.ลงบนอาหารแข็ง 3 ชนิดคือ อาหารแข็งชนิดที่ 1 (Tseuboi,1985) สูตร3 (ภาคผนวก1.2) อาหารแข็งชนิดที่ 2 (Mukherjee and Sengupta,1988)สูตร4 (ภาคผนวก1.2)อาหารแข็งชนิดที่3 (วีรวัฒน์ และสุมาลี,2534)สูตร 5 (ภาคผนวก1.1) ใช้แท่งแก้วปลายงอที่ฆ่าเชื้อแล้วกระจายเซลล์ให้ทั่วจานแก้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30° ซ.เป็นเวลา 5-10 วัน นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นบนผิวหน้าอาหาร และคำนวณเปอร์เซ็นต์การคืนสู่สภาพเซลล์ของโปรโตพลาสต์บนอาหารชนิดต่างๆ

เปอร์เซ็นต์การคืนกลับเซลล์= $\frac{\text{จำนวนโคโลนีที่เกิดบนผิวหน้าอาหาร}}{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์}} \times 100$

4.2 การคืนสภาพผนังเซลล์ของโปรโตพลาสต์เห็ดฟางและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การคืนกลับเป็นเซลล์

การคืนสภาพผนังเซลล์ของโปรโตพลาสต์เห็ดฟางทำตามวีรวัฒน์และสุมาลี(2534) โดยนำสายใยที่เจริญในอาหารเหลวตามวิธีในข้อ 2.2 ที่มีน้ำหนัก 0.12 กรัม/มล. บ่มในสารละลายเอนไซม์ สูตร 3 (ภาคผนวก 1.3) ซึ่งมีเอนไซม์ผสมระหว่าง ไซโมไลเอสความเข้มข้น 0.2 มก.และเซลลูเลส 2 มก/มล. ปริมาณ 50 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30 ° ซ. นาน 4ชม. นำโปรโตพลาสต์ที่ได้กรองผ่านกรวยแยกชินเทอร์กราส เบอร์2 ปั่นให้ตกตะกอนที่ 3,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที ล้างตะกอน 2 ครั้ง ด้วยสารละลายผสมระหว่างซอร์บิทอลและฟอสเฟตบัฟเฟอร์ สูตร 4 (ภาคผนวก1.3) และอีกครั้งด้วยสารละลายซอร์บิทอล 1 โมลาร์ กระจายเซลล์ใน 1 โมลาร์สารละลายซอร์บิทอล เจือจางให้ได้ความเข้มข้นเป็น 10^3 10^2 และ 10 เซลล์/มล. ใช้ปิเปตดูดสารละลายที่ได้ 1 มล. ใส่ลงบนอาหารแข็งชนิดที่ 3 ใช้แท่งแก้วปลายงอที่ฆ่าเชื้อแล้วกระจายเซลล์ให้ทั่วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30° ซ.เป็นเวลา 2 สัปดาห์ นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นบนอาหารวุ้นแข็ง แล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การคืนกลับเป็นเซลล์ของเห็ดฟาง

5. การรวมโปรโตพลาสต์

การรวมโปรโตพลาสต์ของเห็ดโคนและเห็ดฟาง ทำโดยเตรียมโปรโตพลาสต์ของเห็ดโคนในข้อ 4.1 และโปรโตพลาสต์ของเห็ดฟางตามข้อ 4.2

นำสารละลายโปรโตพลาสต์ของเห็ดโคนและเห็ดฟาง ซึ่งมีจำนวนประมาณสายพันธุ์ละ 10^6 เซลล์/มล.มารวมกัน ปั่นเพื่อเก็บโปรโตพลาสต์ที่ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที นาน5 นาที เติมสารละลายโพลีเอธิลีนไกลคอล (Polyethylene glycol,PEG) สูตร 5 (ภาคผนวก1.3) 5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37° ซ.นาน 15นาที ปั่นแยกสารละลาย PEG ออกด้วยความเร็ว 3,000 รอบ/นาที นาน 10นาที ล้างโปรโตพลาสต์ด้วยสารละลายซอร์บิทอล 1โมลาร์ ทำการเจือจางโปรโตพลาสต์ จนได้ความเข้มข้นประมาณ10^4เซลล์/มล.ใช้ปิเปตดูดโปรโตพลาสต์ผสม 0.1 มล. ลงบนอาหารแข็งบนจานเลี้ยงเชื้อ ใช้แท่งแก้วปลายงอที่ฆ่าเชื้อแล้วกระจายเซลล์ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30° ซ.นาน10-15 วัน เก็บโคโลนีที่เกิดขึ้นบนอาหารวุ้นเอียง พีดีเอ

โคโลนีละ 1หลอด

5.1 การคำนวณเปอร์เซ็นต์การคืนกลับเป็นเซลล์

นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์การคืนกลับเป็นเซลล์ของฟิวแสนท์ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การคืนกลับเป็นเซลล์ของฟิวแสนท์} = \frac{\text{จำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นบนอาหารแข็ง}}{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์}} \times 100$$

6.การตรวจสอบลักษณะของฟิวแสนท์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต้นแบบ

ตรวจสอบแต่ละโคโลนีที่เกิดขึ้นบนอาหารแข็งตามลักษณะที่กำหนดเป็น 3 กลุ่ม หลังจากการบ่มเป็นเวลา 10 วัน ดังนี้

1.ลักษณะสายใยที่เกาะกันแน่น นูน ขนาดเล็กประมาณ 0.5-1.0 ซม.

2.ลักษณะสายใยที่เกาะกันปานกลาง ขนาดประมาณ 1.0-1.5 ซม.

3.ลักษณะสายใยที่เกาะกันหลวม กระจาย

6.1 การสกัดและหาปริมาณดีเอนเอทั้งหมด

6.1.1 การสกัดดีเอนเอ

นำแต่ละกลุ่มของโคโลนี ซึ่งประกอบด้วยหลายสายพันธุ์ที่แยกได้เจริญเติบโตได้ตามปกติ ภายในหลอดของอาหารแข็งพีดีเอ แล้วนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว Mozer สูตร 6 (ภาคผนวก1.2) 50 มล.ในขวดรูปกรวยขนาด250 มล. ที่อุณหภูมิห้องโดยไม่มีการเขย่าเพื่อมิให้สายใยจับตัวเป็นก้อน เมื่อสายใยเจริญเต็มผิวหน้าอาหารแล้ว กรองเก็บสายใย นำไปเก็บที่-20 ° ซ. นำมาสกัดหาปริมาณดีเอนเอ ทำตามวิธีของ Schneider (1945,1946) โดยบดสายใยน้ำหนักสด 1 กรัม ในครกที่เย็นจัด เติมสารละลายบัฟเฟอร์ สูตร1(ภาคผนวก1.4) 5มล.และกรดไตรคลอโรอะซิติก 10% 12.5มล. สูตร2 (ภาคผนวก1.4) ปั่นเก็บตะกอนมาเติม 80% แอลกอฮอล์ 25 มล. ปั่นทิ้งส่วนใสเติมสารละลายอีเทอร์-แอลกอฮอล์ สูตร3 (ภาคผนวก 1.4) 5 มล. บนอ่างน้ำเดือด ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง ปั่นแยกตะกอนครั้งสุดท้าย เพื่อทำปฏิกิริยากับ

5 %กรดไตรคลอโรอะซิติก ปริมาณ 5 มล. บนอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ90 ° ซ. นาน15 นาที ปั่นเก็บส่วนใสมาวิเคราะห์หาปริมาณดีเอนเอ

6.1.2 การวิเคราะห์หาปริมาณดีเอนเอ

การวิเคราะห์หาปริมาณดีเอนเอทั้งหมด ทำตามวิธีของ Burton(1956) โดยใช้สารละลายไดเฟนนิลอะลามีน (Diphenylamine) สูตร4 (ภาคผนวก1.4) วัดสีที่เกิดขึ้นโดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และใช้คาร์ฟไทมัส ดีเอนเอ (Calf Thymus DNA) สูตร 5 (ภาคผนวก1.4) เพื่อเปรียบเทียบดีเอนเอทั้งหมด

นำ 1มล.ของส่วนใสที่สกัดได้จากข้อ 6.1.1 เติม2 มล.ของสารละลายไดเฟนนิลลามีนและ 0.1มล. สารละลายอะเซตาดีไฮด์ สูตร6 (ภาคผนวก1.4) เขย่าให้เข้ากัน ตั้งบนอ่างน้ำเดือดนาน 10 นาที ทำให้เย็นลงทันทีในอ่างน้ำแข็ง

วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยสเปกโตโฟโต-มิเตอร์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตราฐาน เพื่อหาปริมาณของดีเอนเอ

6.2 การหาแถบโปรตีนด้วยดีสท์เจลอีเลคโตรโฟรีสิส

6.2.1 การเตรียมโปรตีน

นำสายพันธุ์จากโคโลนีทั้ง 3 กลุ่ม จำนวน 13 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ต้นแบบ T3 และ V มาเลี้ยงในอาหารเหลว พีดีบี โดยตั้งที่อุณหภูมิห้องจนสายใยเจริญเต็มผิวหน้า กรองและล้างเก็บสายใย นำไปเก็บที่อุณหภูมิ - 70 ° ซ. บดสายใยในครกที่เย็นจัด เติมทรายละเอียดเซอร์คอน(zircon) ลงไปบดพร้อมกับสายใย ใส่ไนโตรเจนเหลวลงไปในระหว่างการบด ละลายโปรตีนด้วยอะซิโตน กรองและเก็บโปรตีนที่ได้บนกระดาษกรอง

นำโปรตีนละลายในบัฟเฟอร์ สูตร4 (ภาคผนวก1.5) ผสมกับสารละลายบรอมฟีนอลบลู-กรีเซอรอล สูตร 5 (ภาคผนวก1.5)

6.2.2 การเตรียมเจล

เตรียมเจลที่ใช้ในการแยก(Separating gel)สูตร1 (ภาคผนวก1.5)

และเจลที่ใช้ทำให้โปรตีนเข้มข้นขึ้น (Stracting gel) สูตร2 (ภาคผนวก1.5)

นำเจลที่ใช้ในการแยก ใส่ในหลอดที่ปิดปลายด้านหนึ่งด้วยพาราฟิน ให้สูงประมาณ 7 ซม. เติมน้ำทับผิวหน้าเจล ตั้งทิ้งไว้ใต้แสงประมาณ 30 นาที เทน้ำออกแล้วเติมเจลที่ทำให้โปรตีนเข้มข้นขึ้นสูงประมาณ 1ซม. เติมน้ำปิดผิวหน้า ตั้งทิ้งให้เจลแข็งภายใต้แสงนาน 20 นาที

ใส่แท่งเจลในเครื่อง ซึ่งใช้ทริสไกลซิน บัฟเฟอร์ สูตร3(ภาคผนวก1.4) เติมในแชมเบอร์ หยอดสารละลายโปรตีนลงในแท่งเจล ปรับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าที่60แอมแปร์ ใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง นำแท่งเจลออกจากแท่งแก้วโดยใช้แรงดันน้ำจากหลอดฉีดยา แช่เจลในสารละลายย้อมสี (Staining solution) สูตร 6 (ภาคผนวก1.5) 30 นาที กำจัดสีส่วนเกินออกโดยแช่ในสารละลายกำจัดสี (Destain solution) สูตร7(ภาคผนวก1.5)เปลี่ยนสารละลายใหม่จนเห็นแถบสีชัดเจน เก็บแท่งเจลใน 2% กรดอะซิติก

6.2.3 <u>การวิเคราะห์ผล</u>

เปรียบเทียบแถบโปรตีนที่เกิดขึ้นในแต่ละกลุ่มกับสายพันธุ์ต้นแบบ หาความสัมพันธ์ระหว่าง3กลุ่มและต้นแบบ เห็ดโคนและเห็ดฟางที่นำมาทดลอง