บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง

    ถุงพลาสติก

    กระดาษหนังสือพิมพ์

    ปากกา

    กล้องถ่ายรูป

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

    กล้องจุลทรรศน์แบบ camera lucida

    ไมโครมิเตอร์

    ไม้บรรทัด

    จานเพาะเชื้อ

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำอิเลคโตรโฟริซิส

    ชุดอุปกรณ์การทำอิเลคโตโฟริซิส

    โกร่งสำหรับบดตัวอย่างเห็ด

    microtube

    เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

4. อุปกรณ์ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อเห็ดโคน

    จานเพาะเชื้อ

    ขวดรูปชมพู่ขนาดปริมาตร 250 มิลลิลิตร

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

Methylene blue

KOH 10%

เอทธานอล 95%

น้ำกลั่น

2. สารเคมีที่ใช้ในการทำอิเลคโตรโฟริซิส

ดูตามตารางที่ 2 ในภาคผนวก ข

3. อุปกรณ์ในการเลี้ยงเนื้อเยื่อเห็ดโคน

อาหารวุ้นเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA (Potato Dextrose Agar)

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB (Potato Dextrose Broth)

วิธีการทดลอง

1. การรวบรวมสายพันธุ์เห็ดโคน

ทำการเก็บรวบรวมสายพันธุ์เห็ดโคนจากจังหวัดต่าง ๆ ในเขตภาคกลาง

ถ่ายรูปและดองแต่ละตัวอย่างใน 95% เอทธานอล

2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดโคน

2.1. ทำการพิมพ์สปอร์ (spore print)

นำหมวกเห็ดจากแต่ละตัวอย่าง ซึ่งบานเต็มที่ ทำความสะอาดด้านบนของหมวดดอกนำมาวางบนจานเพาะเชื้อ เก็บไว้ในกล่องโดยมีน้ำรองอยู่ด้านล่าง ใช้ผ้าขาวที่เปียกน้ำคลุมฝากล่องและปิดฝากล่อง ทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง จนกระทั่งสปอร์ถูกดีดออกมา ถ่ายรูปและเก็บไว้เพื่อศึกษาลักษณะของสปอร์โดยกล้องจุลทรรศน์

2.2. เตรียมสไลด์เพื่อตรวจหาเซลล์หมัน (cystidia)

นำส่วนของครีบดอกมาทำสไลด์เพื่อตรวจหาเซลล์หมัน วัดขนาดด้วยไมโครมิเตอร์ ศึกษาลักษณะและวาดรูป ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ camera lucida

2.3.จำแนกชนิดเห็ดโคน

โดยพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น รูปร่าง และขนาดของหมวกดอก ความยาว ขนาดและลักษณะของก้านดอก เซลล์หมัน ขนาดและสีของสปอร์ เป็นต้น

3. การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดโคน

3.1 การเพาะเลี้ยงเส้นใยในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA

เลือกเห็ดโคนจากตัวอย่างที่เก็บได้ ตัดหมวกดอกและ pseudorhiza ออก ทำความสะอาด ตัดเนื้อเยื่อที่อยู่ภายในแกนกลางส่วนที่ไม่สัมผัสกับอากาศขนาดประมาณ 0.5 X 0.5 X 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร วางชิ้นเนื้อเยื่อเห็ดบนอาหาร PDA โดยวิธีปลอดเชื้อ (aseptic technique) ในตู้ปลอดเชื้อ (aseptic chamber) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเจริญของเส้นใยจากเนื้อเยื่อเห็ดประมาณ 4 สัปดาห์

3.2 ศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดโคนในอาหารเหลว PDB

ย้ายชิ้นเส้นใยเห็ดโคนจากอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB โดยใช้ cork borer เจาะบริเวณโคโลนี นำเส้นใยที่เจริญบนชิ้นวุ้นจำนวน 2 ชิ้น นำไปเลี้ยงในอาหารเหลว PDB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มในสภาวะนิ่งที่อุณหภูมิห้อง ทำการจดบันทึกน้ำหนักแห้งที่คงที่ของเส้นใยเฉลี่ย ทุก ๆ 2 วันเป็นเวลา 28 วัน โดยนำเส้นใยของเชื้อเห็ดมากรอง จากนั้นนำเส้นใยไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ในตู้อบ นำข้อมูลที่ได้มาเขียนกราฟเพื่อหาระยะของการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดโคนในแต่ละจังหวัด

4 การทำอิเลคโตรโฟริซิสชนิดโพลิอะคริลาไมด์เจล

4.1 การเตรียมสารสกัดจากเส้นใยเห็ดโคน

นำเส้นใยเห็ดโคนที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเหลว PDB ซึ่งมีอายุเริ่มเข้าสู่ช่วง stationary phase (ผลจากการทดลองในข้อ 3.2) มาบดร่วมกับบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดเอนไซม์ (extraction buffer) ในสัดส่วน 1:2 (w/v) ในโกร่งที่เย็นจัด จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 5 นาที ดูดเอาเฉพาะส่วนใส (supernant) ใส่ไว้ใน microtube แล้วเติมสารละลาย bromophenol blue ประมาณ 1-2 หยด เก็บไว้ในที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทำการศึกษาในขั้นต่อไป

4.2 การเตรียมโพลิอะคริลาไมด์เจล

เตรียมโพลิอะคริลาไมด์เจลโดยใช้ความเข้มของเจล 8.5% ซึ่งแสดงอัตราส่วนของสารเคมีที่ใช้เตรียม (ตารางที่ 1 ในภาคผนวก ข) จากนั้นนำโพลิอะคริลาไมด์เจลชนิด running gel ที่เตรียมนี้ใส่ในแผ่นกระจกที่ประกบกันอยู่ ทิ้งไว้จนเจลแข็งจึงใส่ stacking gel ก่อนที่จะแข็งให้ใส่หวีลงไปเพื่อให้เจลเกิดเป็นช่อง

4.3 ขั้นตอนการทำอิเลคโตรโฟริซิส

นำโพลิอะคริลาไมด์เจลที่เตรียมไว้ในแผ่นกระจกประกอบกับชุดอุปกรณ์ขั้วไฟฟ้าแล้วใส่ลงไปในอ่างบัฟเฟอร์ จากนั้นจึงรินสารละลายอิเลคโทรดบัฟเฟอร์ชนิด Tris-glycine pH 8.3 (ภาคผนวก ข) ที่เย็นประมาณ 4 องศาเซลเซียส ลงในอ่างบัฟเฟอร์ทั้งบนและล่าง นำสารสกัดเอนไซม์จำนวน 10 ตัวอย่าง ใส่ในช่องเจลโดยใส่สายพันธุ์ละ 1 ช่องเรียงตามลำดับ

ต่อขั้วกระแสไฟฟ้าให้ครบวงจร แล้วเปิดเครื่องป้อนกระแสไฟฟ้า 220 โวลต์ ทิ้งไว้จนสีแถบ bromphenol blue เคลื่อนที่มาถึงปลายล่างของแผ่นเจลโดยห่างจากปลายล่างประมาณ 1 เซนติเมตร (ใช้เวลาประมาณ 30 – 40 นาที)

4.4 ขั้นตอนการย้อมสีโพลิอะคริลาไมด์เจล

ย้อมสีโพลิอะคริลาไมด์เจลด้วยสีย้อมเอนไซม์จำนวน 11 ระบบ (วิธีการเตรียมสีย้อมตามตารางที่ 2 ในภาคผนวก ข)

4.5 การล้างสีย้อมเอนไซม์ส่วนเกิน

ล้างสีย้อมส่วนเกินด้วย acetic acid ความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ (ขั้นตอนนี้ใช้สำหรับกรณีที่เจลติดสีเข้มเกินไป)

4.6 การทำให้เจลแห้ง

นำเจลที่ได้มาห่อด้วยกระดาษแก้ว นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องทำเจลแห้ง