บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างเห็ดโคน

สำรวจและเก็บตัวอย่างดอกเห็ดโคนชนิด *Termitomyces sp.* จากจังหวัดต่างๆ 10 จังหวัด ได้แก่ กาญจนบุรี นครปฐม อุทัยธานี เพชรบุรี นครสวรรค์ ตากนครราชสีมา บุรีรัมย์ มหาสารคาม และขอนแก่น

2. เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

2.1 วัสดุอุปกรณ์

2.1.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บรวบรวมตัวอย่างและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดโคน *T. striatus* (Beeli) Heim

กล้องจุลทรรศน์

กล้องถ่ายภาพสี canon รุ่น EOS 500

ฟิล์มสี kodak ISO100

ไม้บรรทัด

ขวดแก้วสำหรับดอง

2.1.2 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการแยกเส้นใยจากดอกเห็ดเพื่อให้ได้เส้นใยเห็ดบริสุทธิ์

จานเพาะเชื้อ

ขวดรูปชมภู่

กระบอกตวง

เครื่องชั่งแบบตัวเลขทศนิยมสองตำแหน่ง

เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ(autoclave)

เครื่อง freeze dryer

ตู้เขี่ยเชื้อแบบ laminar flow

2.1.3 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการการสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยวิธี PCRและการโคลน

โกร่งบดครบชุด

ขวดที่ฆ่าเชื้อแล้วสำหรับใส่สารเคมี ขนาด 100-500 มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เครื่องดูดความชื้นสุญญากาศ

เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifuge)

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

เครื่องให้กำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV - transilluminator)

เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (digital pH meter)

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

ตู้แช่เข็งจุดเยือกแข็งต่ำ อุณหภูมิ -20 และ-70 องศาเซลเซียส

เครื่อง thermocycler สำหรับทำ PCR

เครื่องเขย่าวอเท็ค (vortex)

เครื่องเขย่า (shaker for staining gel)

ไมโครทิวบ์ ขนาด 0.5 และ1.5 มิลลิลิตร

ไมโครปิเปต ขนาด P-10 P-20 P-200 P-1000

ปิเปตทิป ขนาด 10 20 200 และ1000 ไมโครลิตร

กล้องถ่ายภาพโพลารอยด์

ฟิล์มโพรารอยด์ขาวดำ

ชุดแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า

2.2 สารเคมีและอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อรา

2.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการเก็บรวบรวมตัวอย่างและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดโคน *T. striatus* (Beeli) Heim

เอทานอล 95 เปอร์เซนต์

2.2.2 สารอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อเห็ด

อาหาร Potato dextrose agar (PDA)(ภาคผนวก)

อาหาร Potato dextrose broth (PDB)(ภาคผนวก)

2.2.3 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยวิธี PCR และการโคลน

2.2.3.1 สารเคมีที่ใช้ในการการสกัดดีเอ็นเอ (ดูวิธีเตรียมภาคผนวก)

ไนโตรเจนเหลวสำหรับบดตัวอย่าง

DNA extraction buffer (CTAB)

1 M Tris-HCl buffer

0.5 M EDTA

TE saturated phenol

Chloroform/ Isoamylalcohol

Phenol/Chloroform

Isopropanol

TE buffer

50xTAE buffer

Loading buffer

Ethidium bromide solution

Rnase solution

7.5 M Ammonium Acetate ($CHCl_3$)

Agarose powder

2.2.3.2 สารเคมีที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR

10x Tag DNA Polymerase buffer

Tag DNA Polymerase

Magnesium chloride

dNTP

primer(ITS)

2.2.3.3 สารเคมีที่ใช้ในการโคลน

$CaCl_2$ Solution

Glycerol Ca Mix

Lysozyme buffer

Alkaline solution

40% Glycerol

KOAC

Isopropanol

Phenol/ Chloroform

เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2.3.3.1 **สารอาหารสำหรับเลี้ยงแบคทีเรีย** (ดูวิธีเตรียมภาคผนวก)

อาหาร LB

อาหาร SOB

อาหาร SOC

3. วิธีการทดลอง

3.1 การเก็บรวบรวมตัวอย่างและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดโคน

3.1.1 สำรวจ เก็บรวบรวมตัวอย่างและจัดจำแนกเห็ดโคน

นำเห็ดโคนที่ได้จากจังหวัดต่างๆ 10 จังหวัด มาจำแนกชนิดตามวิธีของ Pegler (1971) Heim (1977) อนงค์ จันทร์ศรีกุล (2530) และ อนิวรรต เฉลิมพงษ์ (2544) โดยศึกษาลักษณะต่างๆของดอกเห็ด ได้แก่ หมวกดอก ก้านดอก pseudorhiza cystidia และพิมพ์สปอร์ เพื่อคัดเลือกเอาเฉพาะเห็ดโคนชนิด *T. striatus* (Beeli) Heim

3.1.2 ถ่ายรูปตัวอย่างและดองตัวอย่างด้วย เอทานอล 90%

3.2 การแยกเชื้อจากดอกเห็ดเพื่อให้ได้เส้นใยเห็ดบริสุทธิ์

3.2.1 การแยกเชื้อจากดอกเห็ด

นำเห็ดมาทำความสะอาดโดยขูดดินที่ติดมากับก้านและส่วนคล้ายรากออกจนหมด แล้วเช็ดทำความสะอาดภายนอกอีกครั้งด้วยเอทานอล 70% ตัดเนื้อเยื่อดอกเห็ดมาวางบนอาหารแข็งสูตร Potato Dextrose Agar (PDA) ด้วยวิธีปลอดเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้อง ตรวจดูเส้นใยที่เจริญจากเนื้อเยื่อ แยกเชื้อจนได้เส้นใยบริสุทธิ์แล้วเก็บในหลอดอาหารแข็ง

3.2.2 การเลี้ยงเชื้อเห็ดในอาหารเหลวสูตร Potato Dextrose Broth (PDB)

แยกเชื้อเห็ดใส่ลงในอาหารเหลวปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเส้นใยเจริญได้ประมาณ 2 สัปดาห์ กรองเส้นใยด้วยผ้าขาวบาง ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Freeze dryer

3.3 การสกัดดีเอ็นเอ การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยวิธี PCRและการโคลน

3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอโดยวิธีของ Stewart และVia (1993) และนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาวิเคราะห์ดังนี้

วิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยเจือจางสารละลายดีเอ็นเอด้วย ทีอี บัฟเฟอร์ แล้ววัดการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 260 280 และ 320 นาโนเมตร ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอจะมีค่า OD_{260}: OD_{280} เท่ากับ 1.7-1.9

หาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอ ในช่วงแสงอุลตร้าไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{260} เท่ากับ 1 เทียบเท่ากับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยเจือจางดีเอ็นเอ 100 เท่า

ดีเอ็นเออีกส่วนหนึ่งเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมเท่ากับ 100 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ ITS โดยเทคนิค PCR

นำดีเอ็นเอที่เก็บรักษาไว้ของแต่ละตัวอย่าง (ข้อที่ 3.3.1) มาเพิ่มปริมาณบริเวณ ITS ด้วยเทคนิค PCR ตามวิธีการของ Williams และคณะ (1990) โดยใช้ไพรเมอร์ ITS ซึ่งมีลำดับเบสดังต่อไปนี้

Primer name	Sequence (5' → 3')
iTS4	TCCTCCGCTTATTGATATGCTTAA
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG

ปฏิกิริยาที่ได้นำไปเพิ่มปริมาณในภาวะอุณหภูมิ

อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

อุณหภูมิ 73 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที

จำนวน 35 รอบ และตรวจสอบผลผิตที่ได้ของแต่ละตัวอย่างโดย นำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบน 1% อะกาโรสเจล ใน TAE buffer โดยใช้ปริมาตรตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร ตรวจสอบดีเอ็นเอผลผลิตที่แยกได้โดยการย้อมเจลด้วย เอทิเดียมโบรไมด์ และส่องเจลด้วยเครื่องกำเนิดแสงอัตราไวโอเลต แล้วบันทึกภาพ

สำหรับการเตรียมดีเอ็นเอเพื่อการโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้าสู่พลาสมิดที่เหมาะสม โดยทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้ได้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยอยู่บนพื้นฐานที่ระบุในตอนต้นทั้งหมด

3.3.3 **การโคลน**

นำดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาสกัดด้วยสารละลาย phenol phenol-chloroform และ chloroform-isoamylalcohol และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย Sodium Acetate กับ 100%ethanol ตามวิธีการของ Sambrook และคณะ (1989) โคลนชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตกตะกอนเข้าสู่พลาสมิด pCR II โดยใช้ TOPO TA Cloning kit (Invitrogen) ตามวิธีการที่ได้อธิบายในคู่มือปฏิบัติการ (TOPO TA Cloning kit instruction) จากนั้นนำพลาสมิดที่ได้ถ่ายเข้าสู่แบคทีเรีย *Escherichia Coli* สายพันธุ์ TOP 10 โดยใช้วิธี Transformation (Sambrook และคณะ, 1989)

คัดเลือกโคลนที่โคลนได้บนอาหารที่มียาปฏิชีวนะ kanamycin 50 mg/l ทำการเลือกโคโลนีของแบคทีเรีย *E.coli* ที่ต้านทานยาปฏิชีวนะมาตรวจสอบต่อ โดยการเตรียมดีเอ็นเอระดับ small scale plasmid (Sambrook และคณะ, 1989) ตรวจสอบเบื้องต้นโดยดูจากขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น โดยการแยกพลาสมิดดีเอ็นเอใน 1% อะกาโรสเจล ใช้ TAE buffer พร้อมบันทึกผล

คัดเลือกเฉพาะดีเอ็นเอจากโคลนที่ให้พลาสมิดมีขนาดใหญ่ขึ้นมากกว่าพลาสมิดดีเอ็นเอมาตรฐาน ซึ่งมีขนาด 3,950 นิวคลีโอไทด์ ทำการตรวจสอบเพิ่มเติมโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ ITS ด้วยเทคนิค PCR คัดเลือกโคลนที่ได้รับชิ้นส่วน ITS ตัวอย่างละ 5 โคลน เพื่อนำไปหาลำดับเบสดีเอ็นเอโดยเทคนิค DNA sequence ต่อไป นำโคลนตัวอย่างที่เก็บได้มาเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวน พร้อมเก็บเชื้อใน glycerol stock ตามวิธีการของ Sambrook และคณะ, (1989)

3.4.การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำโคลนตัวอย่างที่คัดเลือกได้ทั้งหมดมาเพิ่มปริมาณโดยการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร LB ด้วยปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Sambrook และคณะ(1989)

4. **ศึกษาลักษณะเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของเห็ดโคนตัวอย่างโดยวิธี DNA sequencing**

นำดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.4 มาหาลำดับเบสบนพื้นฐานของ Dideoxy termination method (Sanger และคณะ, 1977) โดยใช้ Thermo Sequenase II Dye Terminator Cycle Sequencing Kits ด้วยไพรเมอร์ -40M13 forward และ M13 reverse ตามวิธีที่ระบุไว้ในคู่มือปฏิบัติการ (Thermo Sequenase II Dye Terminator Cycle Sequencing Kits instruction)

Primer name	Sequence(5' → 3')
-40M13	GTTTTCCCAGTCACGTTGTA
M13	GGAATTGTGAGCGGATAACA

ปฏิกิริยาทั้งหมดดำเนินการที่ห้องปฏิบัติการ โรคพืช THE PESTICIDE RESEARCH INSTITUTE คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกียวโต ประเทศญี่ปุ่น ทำการตรวจสอบหาลำดับพันธุกรรมด้วยเครื่อง ALFexpress II DNA Analysis system (Amersham Pharmacia Biotech) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ของแต่ละตัวอย่างมาเปรียบเทียบหา consensus และสรุปจาก 5 sequence ให้เหลือ 1 sequence ต่อ 1 ตัวอย่าง โดยดูจากจำนวนเบสที่พบมากที่สุด

4.1 เปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างภายในกลุ่มตัวอย่างเดียวกันและต่างกลุ่มตัวอย่าง

ข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ได้ นำมาหาความเหมือนและความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการเปรียบเทียบ Homology และ arligment ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในแต่ละตัวอย่างในการทดลอง เปรียบเทียบกับนิวคลีโอไทด์บริเวณเดียวกันจากตัวอย่างที่มีผู้รายงานไว้ก่อนหน้านี้ (Taprab และคณะ, 2002) (Rouland และคณะ, 2002) โดยใช้โปรแกรมคำนวน CLASTAL W (1.82)

วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมโดยการคำนวนบนพื้นฐานของระยะห่าง (distance) โดยใช้ KIMURA II parameter วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบในแต่ละตัวอย่างภายในกลุ่มการทดลองนี้และระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่มีผู้รายงานไว้ก่อนหน้านี้ ได้แก่ กลุ่มเห็ดโคน *Termitomyces sp.*(Taprab และคณะ, 2002) และ *T. striatus* (Rouland และคณะ ,2002)โดยการวิเคราะห์ phylogenetic tree ภายใต้ทฤษฎี neighbour joining distance method และ phylip เก็บรวบรวมค่าความแตกต่าง เปรียบเทียบและวิเคราะห์ร่วมกัน