บทที่ 3

อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีดำเนินการทดลอง

สำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1 อุปกรณ์

- Rotary evaporator
- Stainless steel beads
- TLC aluminium sheet รุ่น silica gel 60 F_{254} บริษัท Merck, Germany
- กล้องจุลทรรศน์คอมพาวด์ไมโครสโคป (compound microscope) Olympus รุ่น BX51 บริษัท Olympus optical Co.,Ltd. Japan
- กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคป (stereo microscope) Olympus รุ่น SZ60 บริษัท Olympus optical Co., Ltd. Japan
- กล้องถ่ายรูป Nikon Coolpix P5100 และ Nikon Coolpix 4500
- กล้องถ่ายรูปเจล (Gel-Doc)
- เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV-Transilluminator)
- เครื่องชั่งละเอียด รุ่น AG204 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
- เครื่องชั่งหยาบ รุ่น AG204 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
- เครื่องตรวจวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ (Microchip Electrophoresis System) รุ่น MEC-202 MultiNA บริษัท Shimudzu, Japan
- เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น VX-100 บริษัท Labnet International, Inc.
- เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (micro centrifuge) รุ่น CM-6010 บริษัท Hslangtai
- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น stratagene บริษัท Profuge
- เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (micro refrigerated centrifuge) Kubota รุ่น 3700 บริษัท Kubota Corporation, Tokyo Japan
- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Authorized thermal cycler) รุ่น TP 600 บริษัท TaKaRa
- เครื่องระเหยแห้งสุญญากาศแบบหมุน (rotary vacuum evaporator) Eyela รุ่น N-100 บริษัท Tokyo Rikakikai Co., Ltd. Japan
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง รุ่น 2000 บริษัท Cyberscan
- จานเลี้ยงเชื้อพลาสติก บริษัท Greiner bio-one Gmbh, Austria
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) รุ่น BE600 บริษัท Memmert

- ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) Sharp อุณหภูมิ -20°C
- ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) CLEAN รุ่น H1 บริษัท Lab Service Ltd, Part
- ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส
- ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส รุ่น Adventurer
- ตู้อบความร้อนแห้ง (hot air oven) รุ่น UE600 บริษัท Memmert
- ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น D06063 บริษัท Memmert
- ปิเปตต์ทิป (pipette tip) ขนาด 1-200 µl และ 1 ml บริษัท Axygen Scientific, Inc. USA
- พาราฟิล์ม บริษัท Whatman, England
- ไมโครปิเปตต์(Automatic adjustable micropipette) P2 (0.1-2 ไมโครลิตร) P10 (0.5-10 ไมโครลิตร) P20 (5-20 ไมโครลิตร) P200 (20-200ไมโครลิตร) P1000 (0.1-1 มิลลิลิตร)
- ไมโครเวฟ (Microwave)
- หม้อนึ่งความดัน (autoclave) TOMY รุ่น SS-325 บริษัท Tomy Seiko Co., Ltd. Tokyo, Japan
- หลอดเซนตริฟิวจ์ ขนาด 15 มิลลิลิตร บริษัท Corning Incorporated, USA
- หลอดพีซีอาร์ (PCR tube) ขนาด 0.2 ml บริษัท Axygen Scientific, Inc. USA
- หลอดพีซีอาร์ (PCR tube) ขนาด 200 ไมโครลิตร บริษัท Axygen Scientific, Inc. USA
- หลอดไมโครเซนติฟิวส์ (Micro centrifuge tube) ขนาด 2 มิลลิลิตร และขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- หลอดไมโครทิวป์ (microtubes) ขนาด 1.5 ml บริษัท Axygen Scientific, Inc. USA

3.2 สารเคมี

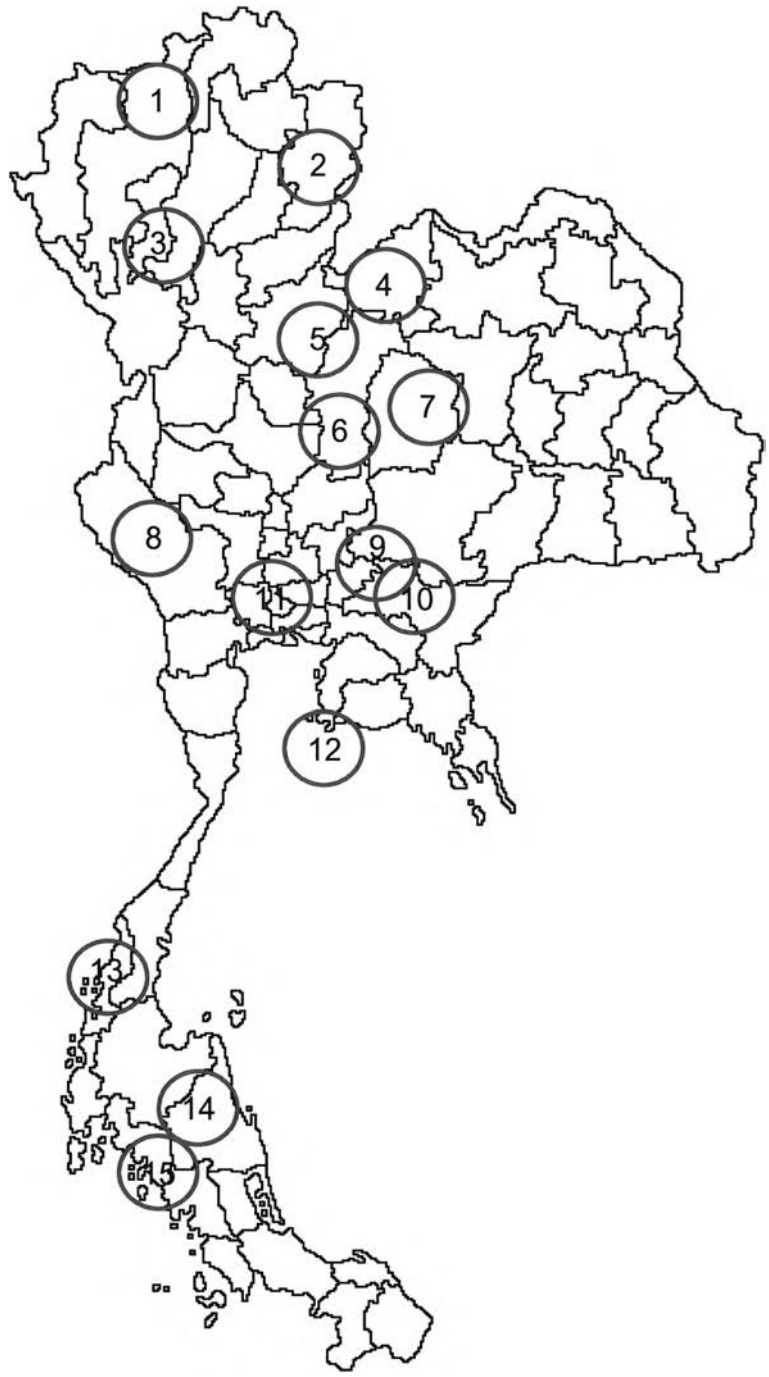
- 10x Tris boric acid disodium ethylenediamine tetracetic acid (10xTBE buffer)
- Agar
- Agarose molecular biology grade บริษัท ISC Bio Express
- Boric acid (H_3BO_3)
- Cetyltrimethylammonum bromide (CTAB) บริษัท Serva
- Dichloromethane

- Ethanol
- Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) บริษัท Scharlau
- GelStar® Nucleic Acid Gel Stain บริษัท Lonza
- Hydrochloric acid (HCl) บริษัท Merck. Germany
- Isoamyl alcohol บริษัท Carbo Erba
- Isopropanol alcohol บริษัท Merck. Germany
- Malt extract
- Methanol
- Polyvinylpyrrolidone
- Restriction enzyme บริษัท Fermentas
- RNAase Aบริษัท Fermentas
- Taq DNA polymerase บริษัท Fermentas
- Trypsin-EDTA บริษัท Hyclone
- Yeast extract

3.3 วิธีดำเนินการทดลอง

3.3.1 สำรวจและเก็บตัวอย่าง

สำรวจและเก็บตัวอย่างไลเคนบนเปลือกไม้ โดยเลือกเก็บเฉพาะไลเคนที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาตรงกับไลเคนสกุลทริพิทิเลียม (*Trypethelium* spp.) จากแหล่งต่างๆ ในประเทศไทย ได้แก่ กระบี่ กาญจนบุรี ชลบุรี เชียงใหม่ น่าน นนทบุรี นครนายก นครราชสีมา นครศรีธรรมราช ปราจีนบุรี พิษณุโลก เพชรบูรณ์ ระนอง ลำพูน เลย ดังแสดงในภาพที่ 3.1 โดยใช้มีดคัตเตอร์ลอกเปลือกไม้ที่มีแทลลัสไลเคนเกาะอยู่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-5 เซ็นติเมตร ห่อด้วยกระดาษทิชชู ใส่ในถุงกระดาษ บันทึกระดับความสูงจากระดับน้ำทะเล และสถานที่เก็บ หลังจากนั้นนำตัวอย่างแทลลัสไลเคนมาตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจัดเก็บใส่ซองกระดาษ และใส่รหัสในแต่ละตัวอย่าง แล้วจึงเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 3.1 แสดงบริเวณแหล่งที่ใช้ในการสำรวจและเก็บตัวอย่างกับไลเคนสกุลทริพิทิเลียมใน จังหวัดต่างๆ ได้แก่ 1.เชียงใหม่ 2.น่าน 3.ลำพูน 4.เลย 5.พิษณุโลก 6.เพชรบูรณ์ 7.ชัยภูมิ 8.กาญจนบุรี 9.อุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ จ.นครนายก และ นครราชสีมา 10. ปราจีนบุรี 11.นนทบุรี 12.ชลบุรี 13.ระนอง 14.นครศรีธรรมราช และ 15. กระบี่

3.3.2 การแยกเชื้อบริสุทธิ์และเพาะเลี้ยงราที่ก่อให้เกิดไลเคน

แยกราที่ก่อให้เกิดไลเคนจากตัวอย่างที่เก็บได้ โดยวิธี Ascospore discharge technique ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Yoshimura และคณะ (2002) โดยเริ่มจากเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Water Agar (WA) (ภาคผนวก ก) ลงบนจานเลี้ยงเชื้อพลาสติก จากนั้นทาปิโตรเลียมเจลลี่ (petroleum jelly) ที่ฝาด้านบนชิดไปทางขอบด้านใดด้านหนึ่งของจานเลี้ยงเชื้อพลาสติก หลังจากนั้นนำตัวอย่างแทลลัสไลเคนตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 0.5 x 0.5 เซนติเมตร 1-2 ชิ้น โดยเลือกตัดให้ครอบคลุมบริเวณที่มีโครงสร้างสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ได้แก่ ส่วนของ perithecia จากนั้นนำชิ้นส่วนมาติดบนปิโตรเลียมเจลลี่ โดยคว่ำจานเลี้ยงเชื้อพลาสติกให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งอยู่ด้านบน ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง สปอร์จะถูกยิงขึ้นไปติดอยู่บนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง คัดเลือกสปอร์ที่ติดอยู่บนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ โดยใช้มีดผ่าตัด ตัดเฉพาะบริเวณที่มีสปอร์ ย้ายไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด Malt-Yeast Extract Agar (MYA) (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาประมาณ 9-12 สัปดาห์ เพื่อให้สปอร์มีการงอกเป็นเส้นใยและพัฒนาเป็นโคโลนี (Colony)

3.3.3 การจัดจำแนกไลเคนด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จำแนกไลเคนในระดับสกุล (Genus) ซึ่งอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอก โดยศึกษาสีของแทลลัส (thallus) และลักษณะของโครงสร้างสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (perithecia) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ และถ่ายรูปลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ปรากฏด้วยกล้องถ่ายรูป จากนั้นศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใน โดยการตัดแทลลัสและโครงสร้างสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศตามขวาง (cross-section) ด้วยใบมีดโกนภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอร์ริโอ นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อศึกษาลักษณะของสปอร์ โดยทำการศึกษาลักษณะ สีของสปอร์ จำนวนผนังกั้นภายในของสปอร์ ขนาดและรูปร่างของสปอร์ และการทำปฏิกิริยาเคมี เพื่อทดสอบลักษณะการเปลี่ยนแปลงสีของสารเคมีบนแทลลัสหรือโครงสร้างสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (perithecia) ด้วยวิธี Spot test (Hale, 1979) โดยใช้สารละลาย 10% Potassium hydroxide (KOH) โดยสารละลายจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสีจากไม่มีสีเป็นม่วงสีแดงถึงสีน้ำตาล การทดสอบเป็นบวก และสารละลายไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงใดๆ เมื่อผลการทดสอบเป็นลบ จากนั้นถ่ายรูปลักษณะที่ปรากฏด้วยกล้องถ่ายรูป เพื่อใช้ในการจักจำแนก โดยจัดจำแนกตามรูปวิธานไลเคน

3.3.4 การศึกษาความสัมพันธ์ระดับโมเลกุลของราที่ก่อให้เกิดไลเคนสกุลทริพิทิเลียมด้วยเทคนิคทางด้านอณูวิทยา

3.3.4.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากราที่ก่อให้เกิดไลเคน

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างราที่ก่อให้เกิดไลเคนตามวิธีของ Cubero และคณะ (2000) โดยนำชิ้นส่วนตัวอย่างที่เตรียมจากข้อ 3.3.2 ประมาณ 20-50 มิลลิกรัม และ stainless steel beads ขนาด 1 มิลลิเมตร จำนวน 10 เม็ด ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ขนาด 2.0 มิลลิลิตร แช่ในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปบดด้วยเครื่อง Mixer MM 400 โดยความถี่ 30 เฮิรตซ์ เป็นเวลา 2 นาทีหรือจนกว่าตัวอย่างจะละเอียด เติม CTAB extraction buffer (ภาคผนวก ข) หลอดละ 400 ไมโครลิตร และ เติม 5%(w/v) PVPP (Polyvinyl polypyrrolidone) 100 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ (Choloroform / isoamyl alcohol) ในอัตราส่วน 24 : 1 (ภาคผนวก ข) ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์หลอดใหม่เจือจางส่วนใส 3 เท่า ด้วย CTAB precipitation buffer (ภาคผนวก ข) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งให้เหลือเพียงตะกอน เติมสารละลาย 1.2 M NaCl ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอน เติม RNAase buffer ความเข้มข้น 10 เท่า ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และเติม RNAase A ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมละลาย 1.2 M NaCl ปริมาตร 370 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม/ไอโซเอมิล แอลกอฮอล์ (Choloroform / isoamyl alcohol) ในอัตราส่วน 24 : 1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร อีกครั้งผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าผสมสาร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ถ่ายส่วนใสที่อยู่ชั้นบนใส่ในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์หลอดใหม่ เติมสารละลาย 2-โพรพานอล (isopropanol) ปริมาณ 0.6 เท่า ของปริมาตรส่วนใสในแต่ละหลอด (ถ้ามีส่วนใส 100 ไมโครลิตร จะเติม 2-โพรพานอล 60 ไมโครลิตร) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้งให้เหลือเพียงตะกอน เติมเอทานอลความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทิ้งตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ และเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.3.4.2 **การเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง** Internal transcribed spacer (ITS)

นำดีเอ็นเอของราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่สกัดได้ตามวิธีในข้อ 3.3.4.1 ไปทำการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะสำหรับตำแหน่ง ITS ได้แก่ ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') (Gardes และ Bruns, 1993) และ ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White และคณะ, 1990) โดยเตรียมสารละลาย PCR ให้มีปริมาตรรวมเป็น 10 ไมโครลิตร ซึ่งมีส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส

สาร	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
10X PCR buffer without $MgCl_2$	1X	1.0
2 mM dNTP mixed	0.2 mM	1.0
5U/µl *Tag* DNA polymerase	0.5 units/ µl	0.1
25 mM $MgCl_2$	2.5 mM	1.0
20µM Primer I (ITS1F)	1	0.5
20µM primer II(ITS4)	1	0.5
DNA template	-	1.0
Sterilized distilled water	-	5.3
ปริมาตรรวม		10

นำส่วนผสมทั้งหมดที่มีปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์-เรส เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ (Authorized DNA thermal cycler) โดยกำหนดสภาวะของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสดังต่อไปนี้

สภาวะของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสที่ตำแหน่ง ITS

Initial denaturation	94	องศาเซลเซียส	5	นาที	
Amplification					
Denaturation	94	องศาเซลเซียส	1	นาที	38 รอบ
Annealing	51	องศาเซลเซียส	1	นาที	
Extension	72	องศาเซลเซียส	1	นาที	
Final Extension	72	องศาเซลเซียส	5	นาที	
Hold	4	องศาเซลเซียส			

ตรวจสอบผลการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเลคโทรโฟเรซีส (Electrophoreses) โดยการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) ใน 1X TBE buffer (ภาคผนวก ข) ที่เติม Gel Star ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตรต่ออะกาโรสเจล 10 มิลลิลิตร โดยใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที และใช้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp + 1.5 kb DNA ladder ตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 312 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV-Transilluminator) และบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายรูปเจล

นำตัวอย่างที่ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำเร็จแล้วไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.3.5 การศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของราที่ก่อให้เกิดไลเคนในสกุลทริพิทีเลียม ด้วยเทคนิค ITS-RFLP (ITS-Restriction Fragment Length Polymorphism)

3.3.5.1 การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำผลิตผลพีซีอาร์ของตัวอย่างที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS จากข้อที่ 3.3.4.1 มาทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) โดยใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด ได้แก่ *Alu*I *Hin*fI และ *Mbo*I ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดมีตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่มีการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะดังแสดงในตารางที่ 3.2 และเตรียมสารละลายสำหรับการทำ RFLP ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ดังแสดงในตารางที่ 3.3 บ่นสารละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยเครื่อง Microchip Electrophoresis System (MCE-202 MultiNA) และหาขนาดของแถบดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม MultiNa view

ตารางที่ 3.2 แสดงชนิดของเอ็นไซม์และตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่มีการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

เอนไซม์	บัฟเฟอร์	ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์
*Alu*I	Tango	5'... AG↓CT ...3'
		3'... TC↑GA ...5'
*Hin*fI	R	5'... G↓ANTC ...3'
		3'... CTNA↑G ...5'
*Mbo*I	R	5'... ↓GATC ...3'
		3'... CTAG↑ ...5'

ตารางที่ 3.3 แสดงสาร ความเข้มข้น และปริมาตรที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา RFLP

สาร	ความเข้มข้น	ปริมาตร (µl)
Sterilized distilled water	-	3.5
Restriction enzyme	10 units/µl	0.5
10XBuffer	1X	1
PCR product		5
Total		10

3.3.5.2 **วิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรม**

นำขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ มาวิเคราะห์รูปแบบของแถบดีเอ็นเอ โดยตัวอย่างราที่มีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 3 ชนิด เหมือนกันจะจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน จากนั้นเลือกตัวแทนกลุ่มไปศึกษาความสัมพันธ์ระดับโมเลกุลด้วยเทคนิคอณูวิทยา

3.3.5.3 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของราที่ก่อให้เกิดไลเคนสกุลทริพิทีเลียม ด้วยเทคนิคอณูวิทยาที่ตำแหน่ง ITS และ mtSSU

นำตัวแทนของราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่ได้จากการจัดกลุ่มในข้อที่ 3.3.5.2 มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง ITS อีกครั้ง โดยมีวิธีการเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอดังกล่าวมาแล้วในข้อ 3.3.4.2 และตำแหน่ง mtSSU โดยใช้ไพรเมอร์ mrSSU1 (5'-AGCAGTGAGGAATATTGGTC-3') (Zoller และคณะ, 1999) และ MSU7 (5'-GTCGAGTTACAGACTACAATCC-3') (Zhon และ Stanosz, 2001) โดยมีวิธีการเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเช่นเดียวกับตำแหน่ง ITS ยกเว้นลภาวะการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสในขั้นตอน Annealing และ Extension มีการเปลี่ยนแปลงเป็น 53 องศาเซลเซียส 0.45 นาที และ 72 องศาเซลเซียส 1.30 นาที ตามลำดับ จากนั้นนำผลิตผลพีซีอาร์ที่เพิ่มปริมาณ ส่งตรวจเพื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ณ บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ ด้วยเครื่อง ABI 3730 xl automatic sequencer (Applied Biosystems, USA) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้เปรียบเทียบความเหมือนของ ITS และ mtSSU ที่ได้มีรายงานไว้ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม Blast version 2.2.18 ที่จัดทำโดย DDBJ (www.ddbj.nig.ac.jp)

3.3.5.4 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของราที่ก่อให้เกิดไลเคนสกุลทริพิทีเลียมโดยสร้างวงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างทั้งหมดที่ได้มาทำการ alignment รวมกันกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GeneBank (www.ddbj.nig.ac.jp) ดังแสดงในตารางที่ 3.4 ด้วยโปรแกรม Clustal X (Thompson และคณะ, 1997) และ ปรับการจัดเรียงอีกครั้งด้วยโปรแกรม MacClade 4.05 (Maddison และ Maddison, 2002). จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์วงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ที่ตำแหน่ง ITS mtSSU และวงศ์วานวิวัฒนาการเฉพาะราที่ก่อให้เกิดไลเคนสกุลทริพิทิเลียมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง ITS ร่วมกับ mtSSU ด้วยโปรแกรม PAUP* 4.0 b10 (Swofford, 2000) โดยใช้ Neighbor-joining (NJ) modes (Saitou และ Nei, 1987) ร่วมกับ Kimura 2-parameter model (Kimura, 1980) ทำการวิเคราะห์ค่า bootstrap 1000 ครั้ง เพื่อยืนยันความแม่นยำของแต่ละกิ่งของวงศ์วานวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

I76827520

ตารางที่ 3.4 แสดงตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลของ GeneBank ที่มีความใกล้ชิดกับตัวอย่างราที่ก่อให้เกิดไลเคนในสกุลทริพิทิเลียมที่ใช้ศึกษา

Species	Order	GeneBank accession	
		ITS	mtSSU
Bathelium degenerans	Trypetheliales	-	DQ328988
Pyrenula cruenta	Pyrenulales	-	AY584719
Pyrenula laevigata	Pyrenulales	-	AY568029
Pyrenula subpraelucida	Pyrenulales	-	DQ328986
Pyrgillus javanicus	Pyrenulales	DQ826741	-
Trypethelium sp.	Trypetheliales	DQ782839	-
Trypethelium eluteriae	Trypetheliales	-	DQ328990
Trypethelium nitidiusculum	Trypetheliales	-	GU327706
Trypethelium papulosum	Trypetheliales	-	GU327707
Trypethelium subeluteriae	Trypetheliales	-	DQ329009
Trypethelium tropicum	Trypetheliales	-	GU327708
Xylaria hypoxylon	Xylariales	DQ491487	AY544760

3.3.6 การศึกษาการสร้างสารทุติยภูมิของราที่ก่อให้เกิดไลเคนสกุลทริพิทิเลียม

3.3.6.1 การเตรียมราที่ก่อให้เกิดไลเคน

นำราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่เป็นตัวแทนจากข้อ 3.3.5.2 ที่แยกได้จากแทลลัสด้วยวิธี Ascospore discharge technique ในข้อ 3.3.2 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิด Malt-Yeast Extract Agar (MYA) (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 สัปดาห์

3.3.6.2 การสกัดสารทุติยภูมิ ในอาหารเลี้ยงเชื้อและเส้นใยด้วยตัวทำละลาย

นำเส้นใยของราที่ได้จากการเลี้ยงในข้อ 3.3.6.1 มาสกัดด้วยตัวทำละลาย คือ เมทานอล (methanol) โดยใช้ปริมาตรเมทานอลต่อปริมาณตัวอย่างที่นำมาสกัดในอัตราส่วน 1:1 (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำส่วนของเส้นใยบดให้ละเอียดด้วยโกร่งบดยาเพื่อให้เซลล์แตก ใส่หลอดทดลองจากนั้นสกัดด้วยตัวทำละลายทิ้งไว้ประมาณ 24 ชั่วโมง จึงนำมาแยกส่วนของเส้นใยออกจากตัวทำละลายด้วยใช้กระดาษกรอง ระเหยเมทานอลออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศแบบหมุน (rotary evaporator) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนสารสกัดแห้ง จากนั้นละลายคราบสารสกัดด้วยสารละลายเมทานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บสารสกัดไว้ในหลอดไมโครทิวบ์ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อนำไปทดสอบการออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบต่อไป

3.3.6.3 **การศึกษารูปแบบ การแยก และทำให้สารทุติยภูมิบริสุทธิ์เบื้องต้นโดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี** (Thin layer Chromatography : TLC)

นำสารสกัดหยาบจากส่วนของเส้นใยที่สกัดด้วยเมทานอล ที่ระเหยตัวทำละลายออกและละลายสารสกัดด้วยตัวทำละลายเดิมในปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในข้อ 3.3.6.2 มาแยกสารสกัดให้บริสุทธิ์เบื้องต้นโดยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยหยดสารสกัดปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงบนแผ่น TLC แล้วนำไปแยกองค์ประกอบด้วยระบบตัวทำละลายผสมระหว่างไดคลอโรมีเทนและเมทานอลในอัตราส่วน 10 : 0.2 เป็นตัวทำละลายสารทุติยภูมิ ตรวจสอบตำแหน่งของสารบนแผ่น TLC โดยการส่องภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร จากนั้นทำการวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของสาร คำนวณหาค่า retention factor (Rf) และจัดทำข้อมูลของรูปแบบของสารทุติยภูมิที่แยกได้จากตัวแทนราที่ก่อให้เกิดไลเคนแต่ละกลุ่ม จากนั้นเก็บรักษาแผ่น TLC ในถุงพลาสติก เพื่อใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.3.7 **การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดที่แยกได้บนแผ่น TLC โดยวิธีไบโอออโตกราฟี** (Bioautography)

ทำการศึกษาความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบของสารสกัดที่แยกได้จากวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี โดยวิธีไบโอออโตกราฟี (Bioautography) ตามวิธีของ Zitouni และคณะ (2005) โดยมีจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบดังนี้แบคทีเรียแกรมบวก *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), แบคทีเรียแกรมลบ *Escherichia coli* (ATCC 25922), ยีสต์ *Candida albicans* (ATCC 10231) และ ราเส้นใย *Aspergillus niger*

3.3.7.1 **การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ**

นำแบคทีเรียทดสอบขีด (steak) บนอาหาร Nutrient Agar (NA) (ภาคผนวก ก) เพื่อให้เป็นโคโลนีเดี่ยว บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ลูป (loop) เขี่ยโคโลนีเดี่ยว 4-5 โคโลนี ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (NB) (ภาคผนวก ก) 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C จนสังเกตเห็นว่าหลอดเชื้อขุ่น ปรับความขุ่นของแบคทีเรียทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ให้มีความขุ่นเทียบเท่า 0.5 McFarland Standard (ภาคผนวก ข) ซึ่งเทียบเท่ากับการอ่านค่าจาก spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ค่าความดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.08-0.10 เพื่อให้มีเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml

3.3.7.2 **การเตรียมยีสต์ทดสอบ**

นำยีสต์ทดสอบขีด (steak) บนอาหาร Malt-Yeast Extract Agar (MYA) (ภาคผนวก ก) เพื่อให้เป็นโคโลนีเดี่ยว บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใช้ลูป (loop) เขี่ยโคโลนีเดี่ยว 2-3 โคโลนี ละลายใน 0.85% NaCl ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปรับความขุ่นของยีสต์ทดสอบด้วย 0.85% NaCl ให้มีความขุ่นเทียบเท่า 0.5 McFarland Standard ซึ่งเทียบเท่ากับการอ่านค่าจาก spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร ค่าความดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.08-0.10 เพื่อให้มีเชื้อประมาณ $1x10^{-6}$ - $3x10^{6}$ CFU/ml

3.3.7.3 **การเตรียมราเส้นใยสำหรับทดสอบ**

เลี้ยงราในอาหารผิวเอียง Malt-Yeast Extract Agar (MYA) (ภาคผนวก ก) 3-5 วัน หรือจนมีการสร้างสปอร์ เติมสารละลาย 0.85% NaCl ใช้ลูป (loop) ขูดสปอร์ให้หลุดเป็นสปอร์แขวนลอย กรองสปอร์ด้วยสำลีปลอดเชื้อ จากนั้นเจือจางสปอร์ด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ปรับจำนวนสปอร์ให้เท่ากับ $1x10^{-4}$ - $3x10^{4}$ CFU/ml โดยนับด้วยฮีมาซัยโตมิเตอร์ (haemacytometer)

3.3.7.4 **การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธีไบโอออโตกราฟี**

(Bioautography)

นำสารสกัดของราที่ก่อให้เกิดไลเคนที่ถูกแยกบนแผ่น TLC จากข้อ 3.3.6.3 ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2 ชั่วโมง เพื่อให้ตัวทำละลายระเหยออกไปจนหมด หลังจากนั้นนำแผ่น TLC มาตั้งบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งอยู่ด้านล่าง นำเชื้อทดสอบแต่ละชนิดที่เตรียมได้จาก ข้อ 3.3.7.1-3.3.7.3 มาทดสอบการยับยั้งบนแผ่น TLC โดยปิเปตเชื้อทดสอบแขวนลอยปริมาตร 1% v/v ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งกึ่งเหลวที่มีวุ้น 0.7% (semi solid) โดยอาหารเลี้ยงเชื้อยังเป็นของเหลวมีอุณหภูมิ 42-45 °C เขย่าให้เชื้อทดสอบกระจายอย่างสม่ำเสมอในอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นทำการเทอาหารทับลงบนแผ่น TLC ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว ดังนั้นในจานอาหารเลี้ยงเชื้อจะประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งกึ่งเหลวที่แขวนลอยด้วยเชื้อทดสอบอยู่ชั้นบน ตรงกลางเป็นแผ่น TLC และชั้นล่างเป็นอาหารแข็ง อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับแบคทีเรียทดสอบ คือ Mueller-Hinton Agar (ภาคผนวก ก) และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับยีสต์และราเส้นใยคือ Malt-Yeast Extract Agar (ภาคผนวก ก) หลังจากอาหารแข็งตัวแล้วนำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในกรณีที่เชื้อทดสอบเป็นแบคทีเรีย, บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชม. ในกรณีที่เชื้อทดสอบเป็นยีสต์ และบ่มที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในกรณีที่เชื้อทดสอบเป็นราเส้นใย ตรวจสอบบริเวณใสบนแผ่น TLC

เปรียบเทียบกับตำแหน่งค่า retention factoc (Rf) ของสารที่แยกองค์ประกอบได้ จากข้อที่ 3.3.6.3 ในการทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ โดยมีชุดควบคุมลบคือ แผ่น TLC ที่หยดเฉพาะตัวทำละลายเมทานอล