บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสำรวจและรวบรวมเชื้อ *Metarhizium* spp.

1.1 การสำรวจและรวบรวม ตัวอย่างดินและตัวอย่างแมลงที่ตายด้วยเชื้อรา

สำรวจและรวบรวมตัวอย่างดินในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ด้วยการสุ่มเก็บตัวอย่าง สำหรับการเก็บตัวอย่างดินนั้นประยุกต์ตามวิธีการของ Bidochka และคณะ (1998) และอลงกต (2549) โดยปาดเศษใบไม้บริเวณผิวดินออก ขุด และเก็บตัวอย่างดินลึกจากผิวหน้าดิน 10 เซนติเมตร ประมาณ 0.5 กิโลกรัม โดยบรรจุใส่ถุงพลาสติก บันทึกข้อมูลของ สถานที่ วัน เดือน ปี และชนิดของพืชที่ปลูกบริเวณที่เก็บตัวอย่าง นำไปแยกหาเชื้อ *Metarhizium* spp. หากไม่สามารถแยกหาเชื้อได้ทันที ให้เก็บตัวอย่างดินไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการแยกหาเชื้อต่อไป สำหรับตัวอย่างแมลงที่ตายด้วยเชื้อราที่สำรวจพบให้เก็บใส่ถุงพลาสติกใสเพื่อการนำไปแยกหาเชื้อ *Metarhizium* spp. ส่วนการรอเพื่อนำไปแยกหาเชื้อ *Metarhizium* spp. ต่อไป นั้นมีการปฏิบัติเช่นเดียวกับตัวอย่างดิน นอกจากนั้นมีการรวบรวมเชื้อราเขียว *Metarhizium* spp. ซึ่งเป็นไอโซเลตท้องถิ่น (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) จากห้องปฏิบัติการโรควิทยาของแมลง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และ/หรือจากหน่วยงานอื่น

1.2 การแยกหาเชื้อ

1.2.1 ตัวอย่างดิน แยกหาเชื้อ *Metarhizium* spp. แต่ละไอโซเลต โดยวิธีใช้เหยื่อล่อ (baiting technique) (ดัดแปลงตามวิธีการของ Bidochka et al., 1998; Davet and Rouxel, 2000) ด้วยการนำตัวอย่างดิน 150 กรัม ใส่ลงในขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีฝาปิดสนิท แล้วปรับความชื้นในดินให้ได้ระหว่าง 75 - 85 เปอร์เซ็นต์ ตลอดช่วงของการทดลองด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำหนอนนก (yellow mealworm; *Tenebrio molitor*) วัย 3-5 จำนวน 5 ตัว ใส่ลงไปบนดินที่อยู่ในขวดด้วยปากคีบ ปิดฝาขวดให้สนิท บ่มที่อุณหภูมิ 28 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ไม่มีแสงสว่าง ตรวจผลหลังจากบ่มทุกวันนาน 21 วัน เมื่อตรวจพบหนอนตายที่คาดว่าเกิดจากเชื้อรา ให้ย้ายหนอนที่ตายไปแช่ลงในสารละลาย Clorox® 10 เปอร์เซ็นต์ (sodium hypochlorite 0.5 เปอร์เซ็นต์) นาน 3 นาที เพื่อฆ่าเชื้อที่ผิว จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วนาน 3 นาที เป็นจำนวน 2 ครั้ง (อลงกต, 2549) วางซากหนอนลงในจานชื้น (moist chamber) (ภาคผนวก ก) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส ตรวจผลหลังจากบ่มเชื้อทุกวัน เมื่อเชื้อสร้างเส้นใยและคาดว่าน่าจะเป็นเชื้อ *Metarhizium* spp. ให้แยกเดี่ยวไปไว้ใน moist chamber ใหม่ และ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ปล่อยไว้จนกระทั่งเชื้อสร้างโคนิเดีย นำโคนิเดียไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ซ้ำอีกครั้ง จึงนำไปแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์

1.2.2 ตัวอย่างแมลง นำตัวอย่างแมลงที่ตายด้วยเชื้อรา หรือคาดว่าตายเนื่องจากเชื้อรามาแยกหาเชื้อ หากพบโคนิเดียของเชื้อบนตัวอย่าง ให้นำมาตรวจสอบและวินิจฉัยด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อหาเชื้อ *Metarhizium* spp. สำหรับตัวอย่างที่พบเฉพาะเส้นใยและคาดว่าจะเป็นเชื้อ *Metarhizium* spp. หรือตัวแมลงที่คาดว่าตายด้วยเชื้อรา ให้ปฏิบัติต่อไปเช่นเดียวกับการแยกเชื้อราจากดิน โดยวิธีใช้เหยื่อล่อ เพื่อให้ได้เชื้อ *Metarhizium* spp.ที่บริสุทธิ์ (ข้อ 1.2.1)

1.3 การทำเชื้อให้บริสุทธิ์

แยกเชื้อราที่คาดว่าเป็นเชื้อ *Metarhizium* spp. จากตัวอย่างดังกล่าวข้างต้น (ข้อ 1.2.1 และ 1.2.2) โดยเมื่อเชื้อเจริญจนสร้างเส้นใยหรือโคนิเดียบนตัวหนอนนกหรือตัวอย่างแมลง ให้ใช้เข็มเขี่ยย้ายเส้นใยเชื้อราหรือใช้ลูป (loop) ที่ฆ่าเชื้อแล้วแตะสปอร์วางลงหรือ streak บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) (ภาคผนวก ข) ที่มี streptomycin จำนวน 0.5 กรัมต่อลิตร เพื่อแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ จากโคนิเดียเดี่ยวๆ โดยการทำ single spore isolation (ภาคผนวก ก) แล้วจึงเพิ่มปริมาณเชื้อ เพื่อใช้ในการบ่งชี้ให้ชัดเจนและเพื่อการนำไปศึกษาทดลองต่างๆ ต่อไป

1.4 การเก็บรักษาเชื้อ

ดำเนินการเก็บรักษาเชื้อด้วยการย้ายเชื้อที่คาดว่าเป็นเชื้อ *Metarhizium* spp. และที่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วลงในหลอดอาหาร Sabouraud dextrose agar (SDA) (ภาคผนวก ข) จากนั้นจึงเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เพื่อความสะดวกในการนำออกมาศึกษาทดสอบต่างๆ และเพื่อการนำไปศึกษาทดลองทางด้านชีวโมเลกุลต่อไป ยกเว้นกำหนดเป็นอื่น สำหรับการเก็บรักษาเชื้อเพื่อเป็นสต็อกนั้นจะเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสในเชิงกึ่งปริมาณของเชื้อ *Metarhizium* spp.

2.1 การเตรียม culture filtrate

เพาะเลี้ยงเชื้อ *Metarhizium* spp. จำนวน 100 ไอโซเลต ในอาหาร Sabouraud dextrose broth (SDB) (ภาคผนวก ข) ที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ในที่มืด เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที นาน 14 วัน นำมากรองเส้นใยของแต่ละไอโซเลตแยกจากกันด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำ culture filtrate ที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนน้ำใส (supernatant) ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ในการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์

2.2 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส

เตรียมอาหารแข็งที่ใช้ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสโดยใช้เจลลาตินผสมใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 และวุ้นผงอัตรา 20 กรัมต่อลิตร ให้ได้ความเข้มข้นเจลลาติน 1 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีของ Saksirirat and Hoppe (1991) (ภาคผนวก ข) หลังจากนั้นเจาะอาหารแข็งด้วย cork borer เส้นผ่าศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร ใช้เข็มเขี่ยนำชิ้นวุ้นที่ถูกเจาะออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วจึงนำ culture filtrate ของเชื้อ *Metarhizium* spp. ที่เตรียมจากข้อ 2.1 ปริมาตร 75 ไมโครลิตรต่อไอโซเลต มาหยอดลงในหลุมอาหาร นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน จากนั้นตรวจสอบโดยการเทราดสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_2)SO_4$] ที่อิ่มตัวท่วมผิวหน้าอาหารที่ทดสอบ ปล่อยทิ้งไว้ข้ามคืนแล้วจึงเทสารละลายออก ตรวจสอบบริเวณโปร่งแสงรอบหลุมวุ้นที่หยอด culture filtrate หากพบบริเวณโปร่งแสงแสดงว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสโดยมีการย่อยโปรตีนจากเจลลาติน หาค่าเฉลี่ยของบริเวณโปร่งแสงรอบหลุมวุ้นจากการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณโปร่งแสง 2 แนวตั้งฉากกันในหน่วยมิลลิเมตร วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test (DMRT) มี 100 กรรมวิธี (ไอโซเลต) และ 4 ซ้ำต่อ ไอโซเลต

3. การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสในเชิงปริมาณของเชื้อ *Metarhizium* spp.

3.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

นำ culture filtrate ของแต่ละไอโซเลตที่นำมาทดสอบซึ่งได้จากข้อ 2.1 มาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีการของ Bradford (1976) เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve) โดยใช้ bovine serum albumin เป็นโปรตีนมาตรฐาน (ภาคผนวก ก)

3.2 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส

นำ culture filtrate จำนวน 0.5 มิลลิลิตร บ่มร่วมกับสารละลายเคซีน (casein) 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0 (ภาคผนวก ค) จำนวน 1.0 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วย Trichloroacetic acid 10 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3.0 มิลลิลิตร ดูดส่วนน้ำใส 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ 2.5 มิลลิลิตรของ 0.4 M โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) และ 0.5 มิลลิลิตร ของ Folin Ciocalteu phenol reagent นำไปบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำ reaction mixture ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D.) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนที่ถูกย่อยออกจากเคซีนเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานซึ่งใช้ไทโรซีน (tyrosine) เป็นมาตรฐาน ดัดแปลงตามวิธีของ Yang และ Wang (1999) (ภาคผนวก ก) กิจกรรมของเอนไซม์ (total activity) ประเมินจากปริมาณ

กรดอะมิโน [amino acid (tyrosine equivalent)] คิดเป็นไมโครโมลของไทโรซีนที่ถูกย่อยออกจากเคซีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนในเวลา 1 ชั่วโมง วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test มี 100 กรรมวิธี (ไอโซเลต) และ 3 ซ้ำต่อไอโซเลต

4. การศึกษาประสิทธิภาพในการทำลายแมลงของเชื้อ *Metarhizium* spp.

การศึกษาประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงของเชื้อราเขียวนั้นดัดแปลงตามวิธีการของ Hartwig และ Oehmig (1992), Lezama-Gutierrez และคณะ (2000) และ Scholte และคณะ (2007) โดยมีการจัดเตรียมตัวอย่าง สิ่งทดสอบ และวิธีการทดลองดังนี้

4.1 เชื้อรา สุ่มเลือกเชื้อ *Metarhizium* spp. จำนวน 15 ไอโซเลตที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสในระดับต่างๆกัน (ภาคผนวก ก) แล้วจึง เพาะเลี้ยงด้วยอาหาร SDA ที่เติม yeast extract (SDAY) บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 14 วัน ในการทดสอบหนอนนกนั้นนำเชื้อที่ได้มาทำสารแขวนลอยโคนิเดีย (สปอร์) ของเชื้อแต่ละไอโซเลตโดยใช้สารละลาย Tween 80® 0.05 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเทลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 5 มิลลิลิตร เอาโคนิเดียของเชื้อที่ผลิตอยู่บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากจานอาหาร ด้วยการใช้สไลด์แก้วปลอดเชื้อขูดผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อเบาๆ เพื่อให้โคนิเดียของเชื้อหลุดออกมาอยู่ในสารละลาย Tween 80® 0.05 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นนำสารแขวนลอยโคนิเดียเชื้อราที่ได้แต่ละไอโซเลตนี้ไปตรวจนับหาปริมาณความเข้มข้นโดยใช้ haemacytometer และปรับให้มีความเข้มข้นของสารแขวนลอยโคนิเดียที่จะนำมาทดสอบให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 x 10^8 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ในการทดสอบ (อลงกต, 2549) (ภาคผนวก ก)

สำหรับการเตรียมเชื้อเพื่อทดสอบกับยุงลายบ้านปฏิบัติเช่นเดียวกันกับการเตรียมเชื้อเพื่อใช้ในการปลูกให้กับหนอนนก

4.2 แมลงทดสอบ

4.2.1 หนอนนก การเพาะเลี้ยงและเพิ่มปริมาณหนอนนก (*Tenebrio molitor* L.) โดยใช้อาหารเลี้ยงไก่ไข่ซี 1 (C1) และกล่องพลาสติกขนาด 15 x 20 x 9 เซนติเมตร ที่มีฝาเป็นตาข่าย ดำเนินการที่ห้องเลี้ยงแมลง (อุณหภูมิ 25 ± 0.9 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 65.90 ± 7.60 เปอร์เซ็นต์) สาขาวิชากีฏวิทยา ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

4.2.2 ยุงลายบ้าน เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณยุงลายบ้าน (*Aedes aegypti*) ที่สำนักงานควบคุมโรคที่ 6 จังหวัดขอนแก่น โดยเพาะเลี้ยงตัวอ่อนยุง (ลูกน้ำ) ด้วยอาหารกระต่ายแบบเม็ด

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ให้อาหารตัวเต็มวัย (ยุง) ด้วยน้ำหวาน 10 เปอร์เซ็นต์ผสมวิตามินรวม เพาะเลี้ยงในกรงขนาด 30 x 30 x 30 เซนติเมตร ที่มีฝาเป็นตาข่าย โดยดำเนินการที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส

4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ

4.3.1 หนอนนก โดยจุ่มหนอนวัย 5 จำนวน 10 ตัว 3 ซ้ำ ในสารแขวนลอยโคนิเดียของเชื้อแต่ละไอโซเลต นาน 10 วินาที หลังจากปลูกเชื้อ ย้ายหนอนลงในจานทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร โดยมีกระดาษกรองรองอยู่ที่ก้นจาน ให้ความชื้นที่กระดาษกรองด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทุกไอโซเลตทำ 3 ซ้ำ สำหรับกรรมวิธีควบคุม (control) จุ่มหนอนนกในสารละลาย Tween 80® 0.05 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ไม่ให้แสง เพิ่มความชื้นด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ ตรวจการตายของหนอนทุกวัน หนอนนกที่ตายนำไปฆ่าเชื้อที่ผิว (surface sterilization) ด้วย Clorox® 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 นาทีเพื่อฆ่าเชื้อที่ผิว จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วนาน 3 นาที จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นจึงนำมาวางลงในกล่องชื้น moist chamber และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส จนกระทั่งปรากฏเส้นใย ตัวอย่างใดที่ลักษณะเส้นใยคล้ายกับ เส้นใยของเชื้อ *Metarhizium* spp. จะนำไปแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ตามข้อ 1.3 แล้วตรวจวินิจฉัยเชื้อต่อไปโดยอาศัยกล้องจุลทรรศน์ อีกทั้งเพื่อตรวจว่าเป็นชนิดเดียวกับที่ได้ปลูกเชื้อให้หรือไม่ จากนั้นจึงนำไปหาเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงจากเชื้อรา *Metarhizium* spp. ที่ปลูกให้

4.3.2 ยุงลายบ้าน การปลูกเชื้อราเขียวให้กับตัวเต็มวัยของยุงลายบ้านนั้นประยุกต์ตามวิธีของ Scholte และคณะ (2003) โดย ใช้ไมโครปิเปตดูดสารแขวนลอยโคนิเดียที่ความเข้มข้น 1×10^8 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร จำนวน 5 มิลลิลิตร หยดลงบนกระดาษถ่ายเอกสารที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ขนาด 12 x 20 เซนติเมตร โดยหยดเชื้อให้กระจายทั่วกระดาษ รอจนกระดาษแห้งหมาด ๆ ใช้ปากคีบที่ฆ่าเชื้อแล้วนำกระดาษมาวางด้านในแก้วพลาสติกขนาด 20 ออนซ์ (เส้นผ่าศูนย์กลางปากแก้ว 9.5 เซนติเมตร) จากนั้นปล่อยตัวเต็มวัยยุงลายบ้านใส่ในแก้วที่เตรียมไว้จำนวน 50 ตัวต่อซ้ำ ทำ 3 ซ้ำต่อไอโซเลต และใช้แผ่นพลาสติกใสปิดปากแก้ว โดยใช้หนังยางรัดพลาสติก ในส่วนกรรมวิธีควบคุมใช้ Tween 20 0.05 เปอร์เซ็นต์ แทนการใช้สารแขวนลอยโคนิเดีย โดยปฏิบัติเช่นเดียวกันกับกรรมวิธีทดลอง และใช้สำลีชุบน้ำผึ้งความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์วางภายในแก้วสำหรับเป็นอาหารตัวเต็มวัย รวมทั้งใส่สำลีชุบน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อให้ความชื้นแก่การเข้าทำลายของเชื้อรา นำไปไว้ที่ตู้บ่ม 28 ± 2 องศาเซลเซียส โดยปล่อยให้ตัวเต็มวัยของยุงได้มีโอกาสสัมผัสกับโคนิเดียของเชื้อ *Metarhizium* spp. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาย้ายกระดาษที่มีโคนิเดียของเชื้อ

ราออกจากแก้ว เช็คผลโดยการตรวจสอบการตายของยุงทุกวัน เพื่อนำไปหาเปอร์เซ็นต์การตาย เนื่องจากเชื้อราเขียว *Metarhizium* spp. โดยปฏิบัติเช่นเดียวกันกับข้อ 4.3.1

5. การศึกษาการสกัดสารพิษ destruxin ของเชื้อ *Metarhizium* spp. (ดัดแปลงจาก Genthner et al., 1998)

5.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อ

คัดเลือกเชื้อจำนวน 8 ไอโซเลตจากความสามารถในการเข้าทำลายหนอนนก โดยการสุ่มเชื้อจากไอโซเลตของอลงกต (2549) ซึ่งแยกตามประสิทธิภาพ นำมาเพาะเลี้ยงในอาหาร SDA ที่ 28 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นย้ายเส้นใยเชื้อ *Metarhizium* spp. โดยใช้ cork borer เจาะชิ้นวุ้นที่ขอบโคโลนีแล้วย้ายชิ้นวุ้นนี้จำนวน 1 ชิ้นลงในอาหารเหลว glucose-yeast extract-basal salt broth (GYBS) (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 125 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเพาะเลี้ยงเชื้อจำนวน 1 flask (1 ซ้ำ) ต่อไอโซเลต นำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 12 วัน โดยไม่มีการเขย่า (Boucias et al.,1988)

5.2 การสกัดสารพิษ

กรองเอา culture filtrate ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในข้อ 5.1 จำนวน 100 มิลลิลิตร มาสกัดสารพิษโดยผสม methylene chloride จำนวน 100 มิลลิลิตร โดยผสมในกรวยแยกสาร (separating funnel) เขย่าให้เข้ากันหลาย ๆ ครั้งแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที แยกส่วนใสด้านล่างกรวยแยกสารออกมา นำสารที่ได้ไปทำให้เข้มข้นมากขึ้น โดยใช้เครื่องกลั่นระเหย (rotary evaporator) เพื่อให้เหลือเพียงคราบสีน้ำตาลที่ก้นขวด จากนั้นใช้ methylene chloride จำนวน 3 มิลลิลิตร ละลายคราบที่ได้ ดูดสารละลายนี้เก็บลงหลอด micro tube แล้วจึงนำไปตรวจสอบบน thin layer chromatography (TLC) ต่อไป

5.3 การตรวจหาสารพิษ

ตรวจสอบสารพิษด้วย thin layer chromatography (TLC) โดยหยดสารละลายที่ดูดจาก micro tube (ข้อ 5.2) จำนวน 100 ไมโครลิตร และหยดสารพิษ destruxin มาตรฐาน (ได้รับอนุเคราะห์มาจาก Prof. Dr. Boucias, University of Florida, Gainesville) ลงบนแผ่น silica gel 60, F254 (Merk co.) ขนาด 20 x 20 เซนติเมตร นำแผ่น silica gel ที่หยดสารละลายแล้วใส่ในโหลแก้ว โดยใช้สาร chloroform : methanol (19 : 1, ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นตัวเคลื่อนที่ (mobile phase) หลังจากเสร็จสิ้นการทดสอบจึงนำแผ่น silica gel ไปคำนวณหาค่าอัตราการเคลื่อนที่ (rate of flow, *Rf*) โดยการตรวจดูภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 และ 365 นาโนเมตร นำค่า *Rf* ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากสารพิษ destruxin มาตรฐาน

6. การโคลนยีนควบคุมการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อ *Metarhizium* spp.

6.1 การเตรียมเชื้อ นำเชื้อ *Metarhizium* sp. ไอโซเลต Lop2/2 มาเลี้ยงในอาหาร SDB บ่มที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ในที่มืด เขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที นาน 7 วัน เก็บเส้นใยด้วยวิธีการกรองออกจากอาหารเหลว แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับการสกัดดีเอ็นเอต่อไป

6.2 การเตรียมดีเอ็นเอ นำเส้นใยของเชื้อ *Metarhizium* sp. ที่เตรียมได้จากข้อ 6.1 มาสกัดดีเอ็นเอ โดยนำไปบดให้ละเอียดในโกร่งที่เติมไนโตรเจนเหลวแล้วเติม extraction buffer (ภาคผนวก ง) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้ส่วนผสมเข้ากัน จากนั้นเติม proteinase K (อัตราส่วนของสารละลายตัวอย่าง 400 ไมโครลิตรต่อ proteinase K 4 ไมโครลิตร) ดูดใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปบ่มที่ 60 - 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดทุกๆ 10 นาที เติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) (ภาคผนวก ง) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมเบาๆ โดยการกลับหลอดขึ้นลง นาน 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำใส (supernatant) ด้านบนสุด ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ แล้วเติม 3 M โซเดียมอะซีเตต (NaOAC) ปริมาตร 0.1 เท่า และเติม isopropanol ปริมาตร 0.6 เท่าของส่วนน้ำใส โดยค่อยๆ ผสมด้วยการกลับหลอดขึ้นลงอย่างช้า ๆ จะพบดีเอ็นเอเป็นสายสีขาวขุ่น นำไปแช่ในน้ำแข็ง 30 นาที และเก็บตะกอนดีเอ็นเอโดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ค่อยๆ เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้นิ้วดีดก้นหลอดจนกว่าตะกอนดีเอ็นเอจะหลุดออกจากก้นหลอด เพื่อให้การล้างตะกอนดีเอ็นเอดีขึ้น นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้งแล้วเปิดฝาหลอดไว้ ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง จึงนำไปละลายด้วย TE buffer (ภาคผนวก ง) ผสมกับเอนไซม์ย่อยอาร์เอ็นเอ (Rnase) ปริมาตร 20 - 30 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นหาความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่เตรียมได้ โดยการวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (ภาคผนวก ก) แล้วจึงวิเคราะห์คุณภาพและความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เตรียมได้ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) (ภาคผนวก ก) เก็บดีเอ็นเอที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

6.3 ขั้นตอนการโคลนยีนควบคุมการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส

6.3.1 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส

นำดีเอ็นเอจากข้อ 6.2 มาเพิ่มปริมาณในส่วนของยีนควบคุมการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส (*prl*) ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR) โดยการใช้ไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์โปรตีเอส ซึ่งได้ออกแบบโดยอาศัยส่วนที่ซ้ำกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (conserve region) จากฐานข้อมูลของ GenBank ซึ่งได้ไพรเมอร์ Pr1F1 ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้ 5'-CTCAGGCTGAGAGCATCATT-3' และไพรเมอร์ Pr1R1 ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'-TCATAATGTACTTGGTGAAG-3' ใช้สารละลายปฏิกิริยา (master mix) ทั้งหมดปริมาตร 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบจำนวน 200 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 2 ไมโครลิตร, ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) 1 มิลลิโมลาร์ จำนวน 1.5 ไมโครลิตร, 10X ImmoBuffer จำนวน 1.5 ไมโครลิตร, แมคนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) 50 มิลลิโมลาร์ จำนวน 0.5 ไมโครลิตร, เอนไซม์ *Tag* DNA polymerase (IMMOLASE™ DNA Polymerase; Bioline USA Inc.) 500 ยูนิตต่อไมโครลิตร จำนวน 0.1 ไมโครลิตร และไพรเมอร์ 5 ไมโครโมลาร์ อย่างละ 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 15 ไมโครลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionzied water) แล้วนำไปเข้าเครื่อง Thermal cycle โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

ขั้นที่ 1 : 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที, จำนวน 1 รอบ

ขั้นที่ 2 : 95 องศาเซลเซียส นาน 0.30 นาที, 58 องศาเซลเซียส นาน 0.30 นาที, 72 องศาเซลเซียสนาน 0.30 นาที, จำนวน 35 รอบ

ขั้นที่ 3 : 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที, จำนวน 1 รอบ

ขั้นที่ 4 : 4 องศาเซลเซียส เก็บรักษา (hold) จนกว่าจะเอาผลิตภัณฑ์ PCR ออก

ตรวจวิเคราะห์การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีนควบคุมการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อ *Metarhizium* spp. ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจล อิเล็กโทรโฟรีซีส

6.3.2 การทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์

นำผลิตภัณฑ์ PCR จากข้อ 6.3.1 จำนวน 10 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์เติม stock solution A (3 M sodium acetate : ethanol 95 เปอร์เซ็นต์, 2 : 50) ปริมาตร 52 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex mixer นาน 10 วินาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เทส่วนน้ำใสทิ้ง และล้างตะกอนด้วย ethanol 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมานาน 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เทส่วนน้ำใส

ทิ้ง รอให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วนำมาตรวจผลด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส โดยใช้ 1.2 เปอร์เซ็นต์ low melting point agar

6.3.3 การสกัดชิ้นดีเอ็นเอจากเจล

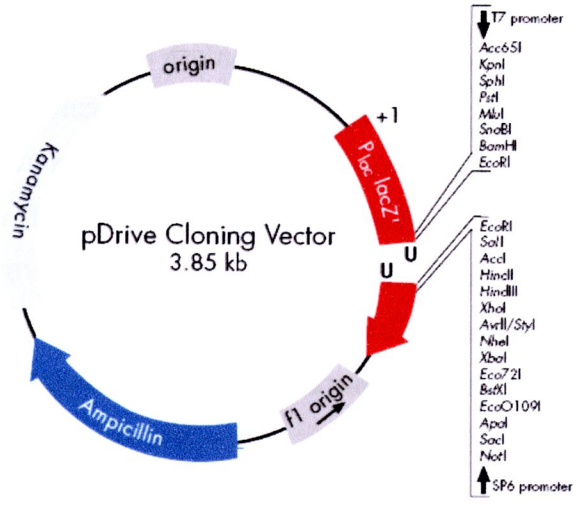
การสกัดชิ้นดีเอ็นเอจากเจลด้วยการใช้ชุด QIAquick® Gel Extraction Kit (50) ของบริษัท QIAGEN ตัดแถบดีเอ็นเอจากเจลที่ได้ในข้อ 6.3.2 ด้วยใบมีดที่สะอาดชั่งน้ำหนักเจล (มิลลิกรัม) แล้วใส่เจลลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ใหม่ เติม QG buffer 3 เท่าของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex mixer นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง โดยผสมให้เข้ากันทุก 15 นาทีด้วยเครื่อง vortex mixer ซึ่งสีของเจลที่ละลายได้ควรจะต้องเป็นสีเหลือง ถ้าสีที่ได้เป็นสีม่วงให้เติม 3 โมลาร์ของโซเดียมอะซีเตต (sodium acetate; $NaCH_3COO$) pH 5.0 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม isopropanol 1 เท่าของสารละลาย ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ใน collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ในชุดหลอดสกัด (QIA quick spin column) วางทิ้งไว้ 2-5 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงระยะสั้นๆ เป็นเวลา 1 นาที (spin down) เทส่วนใสที่อยู่ก้นหลอด collection tube ทิ้งไป แล้วประกอบหลอดเข้าที่เดิม เติม QG buffer อีกครั้งหนึ่งปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงระยะสั้นๆ เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสที่อยู่ก้นหลอดทิ้ง เติม PE buffer 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2-5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงระยะสั้นๆเป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสที่อยู่ก้นหลอดทิ้ง ในขั้นตอนนี้ให้แบ่งทำซ้ำสองครั้ง ในครั้งที่ 2 เมื่อทิ้งส่วนใสแล้ว ให้นำชุดหลอดสกัดไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเป็นเวลา 1 นาที นำคอลัมน์ QIA quick มาสวมในหลอดไมโครทิวชุดใหม่ เติม EB buffer (10mM Tris-Cl, pH 8.5) จำนวน 20 ไมโครลิตร ลงไปตรงกลางคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บสารละลายดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่ได้ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

6.3.4 การเชื่อมต่อดีเอ็นเอเป้าหมายกับเวคเตอร์

นำผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์จากข้อ 6.3.3 มาเชื่อมต่อกับเวคเตอร์ pDrive cloning vector ซึ่งมีแผนผัง restriction site ของพลาสมิดแสดงในภาพที่ 13 ตามวิธีการที่มีมากับชุดทดสอบ QIAGEN PCR Cloning Kit (บริษัท QIAGEN) ซึ่งประกอบด้วยพลาสมิดเวคเตอร์ pDrive cloning vector (ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร) จำนวน 0.5 ไมโครลิตร, ใช้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ (ความเข้มข้น 0.54 pmole) จำนวน 1 ไมโครลิตร, 2X ligation master mix จำนวน 2.5 ไมโครลิตร น้ำ (nuclease-free) 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครไปเปต บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 - 60 นาที จากนั้นเก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

6.3.5 การนำเวคเตอร์ลูกผสมเข้าสู่เซลล์

นำคอมพีเทนต์เซลล์ (QIAGEN EZ competent cell จากชุด QIAGEN PCR Cloning Kit, บริษัท QIAGEN) จำนวน 25 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย ligation ที่มี vector ที่เชื่อมกับดีเอ็นเอเป้าหมายแล้วจากข้อ 6.3.4 จำนวน 1 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันวางส่วนผสมนี้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นย้ายไปบ่มที่ 42 องศาเซลเซียส 30 วินาที (heat shock) แล้วย้ายมาวางบนน้ำแข็งต่ออีกเป็นเวลา 2 นาที เติม SOC medium (tryptone, yeast extract, NaCl, KCl, $MgCl_2$, $MgSO_4$, และน้ำปลอดเชื้อ) จำนวน 125 ไมโครลิตร แล้วนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลาย competent cell นี้จำนวน 100 ไมโครลิตร มา spread ลงบนอาหาร Luria Bertani medium ผสม ampicillin (LB-Ampicillin) (ภาคผนวก ข) ในอาหารที่มีการ spread สาร IPTG (isporopyl-β-D-thiogalactopyranoside) จำนวน 100 ไมโครลิตร แล้วตามด้วย X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopranoside) จำนวน 20 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ง) บ่ม competent cell ที่ spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-18 ชั่วโมง



ภาพที่ 13 แผนผัง restriction site ของพลาสมิด pDrive cloning vector

ที่มา : Anonymous (2009)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

6.4 การคัดเลือกโคลน

คัดเลือกโคลนของ competent cell แบบ blue-white selection ซึ่งจะเลือกโคลนจากโคโลนีที่มีสีขาว เลี้ยงโคลนของ competent cell ในอาหารเหลว LB-Ampicillin บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 12 - 16 ชั่วโมง นำโคลนที่เพาะเลี้ยงได้มาจำนวน 1.5 มิลลิลิตร ไปสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัด Gene Jet™ Plasmid Miniprep kit โดยใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง จะได้ตะกอนโคลนของ competent cell เติมสารละลาย (resuspension solution, RNase 10 ไมโครลิตรต่อ resuspension solution 1 มิลลิลิตร) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เพื่อให้เชื้อ competent cell กระจายในสารละลายดังกล่าว แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer หรือใช้ไมโครไปเปตดูดขึ้นลง เติม lysis solution จำนวน 250 ไมโครลิตร ผสมด้วยการพลิกหลอดกลับไปมา 4 - 6 ครั้ง เติมสารละลาย neutralization จำนวน 350 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับไปมา 4 - 6 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดส่วนน้ำใสใส่ในคอลัมน์สกัด (Gene JET™ spin column) ทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ทิ้งส่วนใสที่อยู่ก้นหลอดสกัด ประกอบคอลัมน์เช่นเดิม เติมสารละลายจำนวน 500 ไมโครลิตรจาก wash solution และ Ethanol 96 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 20 : 30 โดยปริมาตร ทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ทิ้งส่วนน้ำใสที่อยู่ก้นหลอดคอลัมน์สกัด ทำเช่นนี้ 3 ครั้ง โดยในครั้งที่ 3 ไม่ต้องเติมสารละลายที่เตรียมจาก wash solution และ Ethanol 96 เปอร์เซ็นต์ ในอัตรา 20 : 30 โดยปริมาตร ย้ายหลอด Gene Jet™ spin column สวมลงในหลอดไมโครเซนติฟิวจ์อันใหม่ เติม elution buffer (10mM tris-HCl, pH8.5) 25 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 15 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที เก็บส่วนน้ำใสที่อยู่ก้นหลอดคอลัมน์สกัด แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ซึ่งในส่วนน้ำใสนี้จะมีเฉพาะพลาสมิด

6.5 การหาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนยีน *prl* ที่โคลนได้

นำพลาสมิดที่มียีนเป้าหมาย *prl* ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยส่งพลาสมิดไปที่บริษัท 1st BASE

6.6 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *prl* ที่โคลนได้

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน *prl* ที่ได้จากข้อ 6.5 ไปตรวจสอบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม BlastN เพื่อตรวจสอบความเหมือน (similarity) ของยีน *prl* ที่โคลนได้