เอกสารอ้างอิง

คลังปัญญาไทย. 2553. ยุงลาย. (อ้างเมื่อ 26 พ.ย. 2553) สืบค้นจาก: URL: http://www.panyathai.or.th/wiki/index.php/ยุงลาย

ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2535. โรควิทยาของแมลง. ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิสันต์ สัตยาศัย. 2544. หลักการของพันธุวิศวกรรมในโปรคาริโอต. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2546. ยุงลายกับการแพร่ระบาดของโรคไข้เลือดออก. (อ้างเมื่อ 10 ก.พ. 2553) สืบค้นจาก: URL: http://www.uniserv.buu.ac.th/forum2/topic.asp?TOPIC_ID=265

มลิวัลย์ ปันยารชุน สุทธิชัย สมสุข อัครพล บูรณฤกษ์ และอุทัย เกตนุติ. 2517. การศึกษาเชื้อราเขียว Green muscardine, *Metarhizium anisopliae* กับหนอนเจาะสมอฝ้าย *Helicoverpa armigera* Hubner. รายงานผลการค้นคว้าวิจัยปี 2517. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

ยงยุทธ ยุทธวงศ์. 2549. บทความเทคโนโลยีชีวภาพ-โอกาสทองของไทย. (อ้างเมื่อ 1 มี.ค. 2549) สืบค้นจาก: URL: http://www.learn.in.th/articles/biot/bio_t.html.

ศิวิลัย สิริมังครารัตน์. 2546. โรควิทยาของแมลง. ภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สำนักโรคติดต่อจากแมลง. 2553. การป้องกันและควบคุมโรคไข้ปวดข้อยุงลาย. (อ้างเมื่อ 26 ม.ค. 2553) สืบค้นจาก: URL: http://www.thaivbd.org/cms/index.php?option= com_content&task=view&id=148&Itemid=0

สีวิกา แสงธาราทิพย์. 2553. ความรู้เรื่อง โรคไข้เลือดออก. (อ้างเมื่อ 26 ม.ค. 2553) สืบค้นจาก: URL: http://dhf.ddc.moph.go.th/Old/controlon.htm.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์: กรุงเทพฯ.

อลงกต โพธิ์ดี. 2549. ประสิทธิภาพและการบ่งชี้เชื้อ *Metarhizium* spp. ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลำดับเบส ITS1-5.8S-ITS2 rDNA. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชากีฏวิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

Acevedo, J.P.M., R.I. Samuels, I.R. Machado, and C. Doliski. 2007. Interactions between isolate of entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* JPM 4 during infection of the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Invertebrate Pathology (96): 187-192.

Alcamo, I.E. 1996. DNA Technology: The awesome skill. Wm. C. Brown. Publishers: Dubuque.

Alexopoulos, C.J., C.W. Mims, and M. Blackwell. 1996. Introductory mycology. 4th Edition. John Wiley & Sons, Inc.: New York.

Alonso-Días, M.A., L. García, E. Galindo-Velasco, R. Lezama-Gutierrez, C.A. Angel-Sahagún, R.I. Rodríguez-Vivas, and H. Fragoso-Sánchez. 2007. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) for control of *Boophilus microplus* (Acai: Ixodiae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. Veternary Parasitology 147: 336-340.

Alves, S.B., L.F.A. Alves, R.B. Lopes, R.M. Pereira, and S.A. Vieira. 2002. Potential of some *Metarhizium anisopliae* isolates for control of *Culex quinquefasciatus* (Dipt., Culicidae). J. Appl. Ent. 126: 504-509.

Anonymous. 1996. Green fungus hits black cricket. (cited 10 Jul 2007) Available from: URL: http://www.publish.csiro.au/helix/cf/issues/th46a2.cfm

Anonymous. 2007. *Alternaria brassicae* (cited 10 Jul 2007) Available from: URL: http://ag.arizona.edu/PLP/alternaria/online/picture_library/alternaria/brassicae/FrameSet.htm.

Anonymous. 2009. pDrive Cloning Vector (cited 20 Nov 2009) Available from: URL: http://www1.qiagen.com/literature/pDrive/pcr_cloning21.pdf.

Ansari, M.A., F.A. Shah, M. Whittaker, M. Prasad, and T.M. Butt. 2006. Control of western flower thrips (*Frankliniella occidentalis*) pupae with *Metarhizium anisopliae* in peat and peat alternative growing media. Biological Control 40: 239-297.

Bahiense, T.C., É.K.K. Fernandes, and V.R.E.P. Bittencount. 2006. Compatibility of the fungus *Metarhizium anisopliae* and deltamethrin to control a resistant strain of *Boophilus microplus* tick. Veternary Parasitology 141: 319-324.

Bidochka, M.J., J.E. Kasperskl, and G.A.M. Wild. 1998. Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soil from temperate and near northern habitats. Can. J. Bot. 76: 1198-1204.

Bioresource Collection and Research Center. 2009. *Metarhizium anisopliae* var. *major* (cited 20 Nov 2009) Available from: URL: http://www.bcrc.firdi.org.tw/fungi/fungal_detail.jsp ?id= FU200802250025

Boucias, D.G., and J.C. Pendland. 1998. Principles of insect pathology. Kluwer Academic Publishers: Massachusetts.

____, J.C. Pendland, and J.P. Latge. 1988. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. Appl. and Environ. Microbiol. 54(7): 1795-1805.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.

Briggs, L.L., D.D. Colwell, and R. Wall. 2006. Control of the cattle louse *Bovicola bovis* with the fungal pathogen *Metarhizium anisopliae.* Veternary Parasitology 142: 344-349.

Buchwaldt, L., and J.S. Jensen. 1991. HPLC purification of destruxins produced by *Alternaria brassicae* in culture and leaves of *Brassica napus,* Phytochemistry 30: 2311-2316.

Butt, T.M., C. Jackson, and N. Magan. 2001. Introduction-fungal biological control agents: progress, problems and potential, pp. 1-8. *In* Butt, T.M., C.W. Jackson, and N. Magan (eds.), Fungi as biocontrol agents progress, problems and potential. CABI Publishing: New York.

Campbell, L.G., M.A. Boetel, N.B. Jonason, S.T. Jaronski, and L.J. Smith. 2006. Grower-adoptable formulations of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales) for sugarbeet root maggot (Diptera: Ulidiiae) management. Environ. Entomol. 35(4): 986-991.

Cao, Y., G. Peng, Z. He, Z. Wang, Y. Yin, and Y. Xia. 2007. Transformation of *Metarhizium anisopliae* with benomyl resistance and green protein genes provides a tag for genetically engineered strains. Biotechnol Lett. 29: 907-911.

Center for biologic counterrorism and emerging diseases. 2009. Dengue. (cited 20 Nov 2009) Available from: URL : http://bepast.org/dataman.pl?c=lib&frame_nav=1&dir=docs/photos/dengue/ &finish=flib&d=.

Chen, H.C., C.K. Chou, C.M. Sun, and S.F. Yeh. 1997. Suppressive effects of destruxin B on hepatitis B virus surface antigen gene expression in human hepatoma cells. Antiviral Res. 34(3): 137-44.

Clarkson, J.M., and A.K. Charnley. 1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. Trends in Microbiology 4(5): 197-203.

Davet, P., and F. Rouxel. 2000. Detection and isolation of soil fungi. Science Publishers, Inc.: New Hampshire.

Department of Biology Memorial University of Newfoundland. nd. Sexual Reproduction, meiosis, and genetic recombination. (cited 17 May 2010) Available from: URL: http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/ BIOL4900/CB18_31.html.

Dumas, C., V. Matha, J.M. Quiot, and A. Vey. 1996. Effects of destruxins, cyclic depsipeptide mycotoxins, on calcium balance and phosphorylation of intracellular protein in lepidopteran cell line. Comp. Biochem. Physiol. 114(3): 231-219.

Fagade, O.E., S.A. Balogun, and C.J. Lomer. 2004. Microbial control of *Zonocerus variegates* using *Beauveria bassiana* and *Metarhizium* sp. African Journal of Biotechnology 4(1): 113-116.

Genthner, F.J., C.A. Chancy, J.A. Couch, S.S. Foss, D.P. Middaugh, S.E. George, M.A. Warren, and J.A. Bantle. 1998. Toxicity and pathogenicity testing of insect pest control fungus *Metarhizium anisopliae.* Arch. Envion. Toxicol. 35: 317-324.

Goettel, M.S., R.J. St. Leger, N.W. Rizzo, R.C. Staples, and D.W. Roberts. 1989. Ultrastructural localization of a cuticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexta*) cuticle. J. Gen. Microbiol. 135: 2233-2239.

Harrington, L.C., Edman, J.D., Scott, and T.W., 2001. Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood. J. Med. Entomol. 38: 411-422.

Hartwig, J., and S. Oehmig. 1992. Bio 1020-behaviour in the soil and important factors affecting its action. Pflanzenschutz Nachrichten Bayer 45(63): 159-176.

Hu, G., and R.J. St. Leger. 2002. Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere component. Applied and environmental microbiology 68(12): 6383-6387.

Hu, Q.B., S.X. Ren, J.M. Chang, and P.D. Musa. 2006. Investigation of destruxin A and B from 80 *Metarhizium* strains in China, and optimization of cultural conditions for the strain MaQ10. Toxicon. 48: 491-498.

Hozzank, A., R. Wegensteiner, W. Waitzbauer1, A. Burnell, Z. Mrácek, and G. Zimmermann. 2003. Investigations on the occurrence of entomopathogenic fungi and entomoparasitic nematodes in soils from Lower Austria. Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes IOBC wprs Bulletin 26(1): 77-80.

Jakubowski, H. 2005. Gene cloning. (cited 17 March 2006). Available from: URL: http://www.Accessexcellence.org/AB/GG/plasmid.html.

Kabaluk, J.T., and J.D. Ericson. 2007. *Metarhizium anisopliae* seed treatment increases yield of field corn when applied for wireworm control. Agron J. 99: 1377-1381.

Kannan, S.K., K. Murugan, A. N. Kumar, N. Ramasubramanian, and P. Mathiyazhagan. 2008. Adulticidal effect of fungal pathogen, *Metarhizium anisopliae* on malarial vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidea). African Journal of Biotechnology 7(6): 838-841.

Kobayashi, T., S. Ikeno, N. Hosokawa, Y. Uehara, M. Hori, and K. Tsuchiya. 2004. Destruxin E, a cyclodepsipeptides antibiotic, reduce cyclin D1 levels and inhibits anchorage-independent growth of v-Ki-ras-Expressed pMAM-ras-REFcells. Biol. Pharum. Bull. 27(4): 587-590.

Krishnaswami, S., M.N. Narasimhanna, S.K. Suryanarayan, and S. Kumararaj. 1973. Sericulture manual 2-silkworm rearing. Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome.

Lacey, C.M., L.A. Lacey, and D.R. Roberts. 1988. Route of invasion and histopathology of *Metarhizium anisopliae* in *Culex quinquefasciatus*. Journal of Invertebrate Pathology 52: 108-118.

Lezama-Gutierrez, R., A. Trujillo-De La Luz, J. Molina-Ochoa, O. Rebolledo-Dominguez, A.R. Pescador, M. Lopez-Edwards, and M. Aluja. 2000. Virulence of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina : Hyphomycetes) on *Anastrepha ludens* (Diptera : Tephritidae) : labolatory and field trials. J. Econ. Entomol. 93(4): 1080-1084.

Liu, B.L, and Y.M. Tzemg. 1999. Water content and water activity for production of cyclodepsipeptides in solid-state fermentation by *Metarhizium anisopliae.* Biotechnology Letter 21: 657-661.

____, J.W. Chen, and Y.M. Tzeng. 2000. Production of cyclodepsipeptides destruxin A and B from *Metarhizium anisopliae*. Biotechnol. Prog. 16: 993-999.

Liu, S.H., Z.H. Meng, J.K. Yang, Y.X. Fu, and K.Q. Zhang. 2007. Characterizing structural features of cuticle-degrading proteases from fungi by molecular modeling. BMC Structural Biology 7(3) doi: 10.1186/1472-6807-7-33.

Lomer, C.J., R.P. Bateman, D.L. Johnson, J. Langewald, and M. Thomas. 2001. Biological control of locusts and grasshoppers. Annual Review of Entomology 46: 667-702.

Luz, C., M.H.H. Tai, A.H. Santos, and H.H.G. Silva. 2008. Impact of moisture on survival of *Aedes aegypti* eggs and ovicidal activity of *Metarhizium anisopliae* under laboratory conditions. Mem Inst Oswaldo. 103(2): 214-215.

MacKenzie, J.S., Gubler, D.J., and Petersen, L.R., 2004. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis,West Nile, and dengue viruses. Nature Med. 10(12): 98-107.

Mazodze, E., and P. Zvoutete. 1999. Efficacy of *Metarhizium anisopliae* against *Heteronychus licas* (Scarabaedae: Dynastinae) in sugarcane in Zimbabwe. Crop Protection 18: 571-575.

Mercer, D.R., L. Nicolas, and I. Thiery. 1995. Evaluation of entomopathogenic bacteria against *Aedes polynesiensis*, the vector of lymphatic filariasis in French Polynesia. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 11(4): 485-488.

Mohanty, S.S., K. Raghavendra, P.K. Mittal, and A.P. Dash. 2008. Efficacy of culture filtrates of *Metarhizium anisopliae* against larvae of *Anopheles stephensi* and *Culex quinquefasciatus*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 35: 1199–1202.

Mycology Online. 2006. *Trichothecium roseum.* (cited 10 Jul 2007) Available from: URL: http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Trichothecium/ Trichothecium roseum.

NSW Health. 2009. Mosquito photos. (cited 20 Nov 2009) Available from: URL: http://www.arbovirus.health.nsw.gov.au/areas/arbovirus/mosquit/photos/mosquitophotos.htm#top.

Odier, F., A. Vey, and J.P. Bureau. 1992. In vitro effect of fungal cyclodepsipeptides on leukemic cell: study of destruxins A, B, and E. Biol. Cell. 74: 267-271.

Pal, S., R.J. St. Leger, and L.P. Wu. 2007. Fungal peptide destruxin a plays specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster.* The Journal of Biological Chemistry 282(12): 8969–8977.

Pava-Ripoll, M., F.J. Posada, B. Momen, C. Wang , R. St. Leger 2008. Increased pathogenicity against coffee berry borer, Hypothenemus hampei (Coleoptera: Curculionidae) by *Metarhizium anisopliae* expressing the scorpion toxin (AaIT) gene. Journal of Invertebrate Pathology 99: 220-226.

Pedras, M.S., I.L. Zabaris, and D.E. Ward. 2002. The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. Phytochemisty 59: 573-596.

Pinto, F.G.S., M.H.P. Fungaro, J.M. Ferreira, M.C. Valadares-Inglis, and M.C. Furlandeto. 2002. Genetic variation in the cuticle-degrading protease activity of the entomopathogen *Metarhizium flavoviride.* Genetic and Molecular Biology 25(2): 231-234.

Platt, K.B., K.J. Linthicum, K.S. Myint, B.L. Innis, K. Lerdthusnee, and D.W. Vaughan. 1997. Impact of dengue virus infection on feeding behavior of *Aedes aegypti.* Am.J.Trop. Med. Hyg. 57: 119-125.

Poprawski, T.J., P.-H. Robert, N.K. Maniania. 1994. Contact toxicity of the mycotoxin destruxin E to *Empoasca vitis* (Göthe) (Hom., Cicadellidae). Zeitschrift für Angewandte Entomologie. 117(2): 135-143.

Rao, Y.K., C.H. Tsou, and Y.M. Tzeng. 2006. Antioxidants enhanced production of destruxin E from cultivation of *Metarhizium anisopliae.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 73: 519-524.

Saksirirat, W., and H.-H. Hoppe. 1991. Secretion of extracellular enzymes by *Verticillium psalliotae* Treschow and *Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas during growth on uredospores of the soybean rust fungus (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) in liquid cultures. J. Phytopathology 131: 161-173.

Samson, R.A., H.C. Evans, and J.P. Latge. 1988. Atlas of entomopathogenic fungi. Springer-Verlag: Berlin.

Samuels, K.D.Z. 1986. Genetical studies and strain selection in *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin for the control of *Nilaparvata lugens* (Stal), the brown planthopper of rice. Ph.D. thesis, University of London.

____, J.B. Heale, and M. Llewellyn. 1989. Characteristics relating to the pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. Journal of Invertebrate Pathology 53: 25-31.

Samuels, R.I. 1998. A sensitive bioassay for destruxins, cyclodepsipeptides from the culture filtrates of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. An. Soc. Entomol. Brasil 27(2): 229-235.

____, A.K. Charnley, and S.E. Reynolds. 1988. The role of destruxins in the pathogenicity of 3 strains of *Metarhizium anisopliae* for the tobacco hornworm *Manduca sexta*. Mycopathologia 104: 51-58.

____, A.K. Charnley, and S.E. Reynolds. 1998. Application of reversed-phase HPLC in separation and detection of cyclodepsipeptide toxins produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. J. Chromatogr. Sci. 26: 15–19.

Schabel, H.G. 1976. Oral infection of *Hylobius pales* by *Metarhizium anisopliae*. Journal of Invertebrate Pathology 27: 377-387.

Scholte, E.-J., B.G.J. Knols, and W. Takken. 2004. Autodissemination of entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* amongst adults of malaria vector *Anopheles gambiae* s. s.. Malaria Journal 3(45): doi: 10.1186/1475-2875-3-45.

____, W. Takken, and B.G. Knols 2007. Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. alobopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Acta Tropica 102: 151-158.

Scholte, E.-J., B.N. Njiru, R.C. Smallegange, W. Takken, and B.G.J. Knols. 2003. Infection of malaria (*Anopheles gambiae*s. s. s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vector with entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Malaria Journal 2(29). (cited 22 Nov 2009) Available from: URL: http://www.malariajournal.com/content/2/1/29.

Skrobek, A., F.A. Shah, T.M. Butt. 2008. Destruxin production by the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* in insects and factors influencing their degradation. BioControl. 53: 361–373.

Small, C.L.N., and M.J. Bidochka. 2005. Up-regulation of Pr1, a subtilisin-like protease, during conidiation in the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. Mycol. Res. 109(3): 307–313.

St. Leger, R.J., R.M. Cooper, and A.K. Charnley. 1986. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: degradation in vitro by enzymes from entomopathogenens. Journal of Invertebrate Pathology 48: 167-177.

____, L. Joshi, and D. Roberts. 1998. Ambient pH is major determinant in expression of cuticle-degrading enzyme and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. Applied and Environmental Microbiology 64(2): 709-713.

____, R.C. Staples, and D.W. Roberts. 1993. Entomopathogenic isolates of *Metarhizium anisopliae, Beauveria bassiana,* and *Aspergillus flavus* produce multiple extracellular chitinase isozymes. Journal of Invertebrate Pathology 61(1): 81-84.

____, L. Joshi, M.J. Bidochka, and D.W. Roberts. 1996. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 6349-6354.

Tanada, Y., and H.K. Kaya. 1993. Insect pathology. Academic Press: San Diego.

Tiago, P.V., M.H.P. Fungaro, and M.C. Furlaneto. 2002. Cuticle-degrading proteases from the entomopathogen *Metarhizium flavoviride* and their distribution in secreted and intracellular fractions. Letters in Applied Microbiology 34: 91-94.

Tinline, R.D. 1971. Nuclear distribution in *Metarhizium anisopilae*. Mycologia 63: 713-721.

Villani, M.G., and S.R. Krueger. 1994. Soil application effect of *Metarhizium anisopliae* on Japanese beetle (Coleoptera : Scarabaeidae) behavior and survival in turfgrass microorganism. Environ. Entomol. 23(2): 502-513.

Wang, C., and R.J. St. Leger. 2007. A scorpion neurotoxin increases the potency of a fungal insecticide. Nature Biotechnology 25(12): 1455-1456.

____, M.A. Typas, and T.M. Butt. 2002. Detection and characterization of *pr1* virulent gene deficiencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. FEMS Microbiology Letters 213: 251-255.

Wikipedia. 2009. *Aedes aegypti*. (cited 20 Nov 2009) Available from: URL: http://en.wikipedia.org /wiki/Aedes_aegypti

Yang, S.S., and Y. Wang. 1999. Protease and amylase production of *Streptomyces rimosus* in submerged and solid state cultivations. Bot. Bull. Acad. Sin. 40: 259-265.

Zimmerman, G. 1992. *Metarhizium anisopliae* an entomopathogenic fungus. Pflanzenschutz Nachrichten Bayer 45(63): 113-128.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
วิธีการต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษา

วิธีการต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษา

1. การทำ moist chamber

ใช้จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษทิชชูรูปครึ่งวงกลมวางอยู่ภายใน โดยมีสำลีอยู่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้านตรงข้ามกับกระดาษทิชชู นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และให้ความชื้นด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว โดยไม่ให้สำลีสัมผัสกับกระดาษทิชชู และคอยเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วที่สำลีเพื่อเพิ่มความชื้นเสมอขณะทดลอง ส่วนซากของแมลงที่ต้องการนำมาแยกหาเชื้อราสาเหตุของโรคนั้น ถูกนำมาวางลงบนกระดาษทิชชู ซึ่งอุปกรณ์ทั้งหมดและทุกขั้นตอนต้องทำในสภาพปลอดเชื้อ

2. การทำ single spore isolation

การแยกให้ได้สปอร์ (โคนิเดีย) ของเชื้อราเดี่ยวๆ เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ (เจริญมาจากหนึ่งสปอร์) ดำเนินการทุกขั้นตอนในสภาพปลอดเชื้อ โดยการใช้ loop แตะโคนิเดียที่ขึ้นบนตัวแมลงหรืออาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณเพียงเล็กน้อย นำไปผสมกับน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตรประมาณ 1-2 มิลลิลิตร จึงนำไป streak บนอาหาร PDA (potato dextrose agar) ที่ได้ผสมกับ streptomycin จำนวน 0.5 กรัมต่อลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ตรวจผลการเจริญของสปอร์หลังจากการบ่มทุกวัน โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound จนกระทั่งเชื้อราเจริญขึ้นมาเป็นโคโลนีเดี่ยว ให้ย้ายโคโลนีเดี่ยวๆนี้ไปเพาะเลี้ยงต่อไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์และเพิ่มปริมาณ จึงนำไปเก็บรักษาไว้เพื่อเป็นสต็อกของเชื้อ และเพื่อใช้ผลิตสำหรับการทดลองในอาหาร SDA (Sabouraud dextrose agar) และ/หรืออาหารอื่นต่อไป

3. วิธีการใช้ haemacytometer และการคำนวณปริมาณโคนิเดีย (Tuite, 1969)

haemacytometer เป็นแผ่นแก้วสไลด์ที่ตีเส้นเป็นช่องตาราง รูปร่างเป็นรูปตัวอักษรตัว H ที่มีพื้นที่สำหรับการนับอยู่ 2 chamber บนตัวสไลด์มีตัวเลขระบุความลึกของช่องตาราง ซึ่งโดยทั่วไปมีความลึก 0.1 มิลลิเมตร ในบริเวณที่ใช้สำหรับนับจะแบ่งออกเป็น 9 ช่องใหญ่ๆ รวมพื้นที่ 9 ช่องใหญ่เท่ากับ 3 x 3 ตารางมิลลิเมตร ซึ่งแต่ละช่องของ 9 ช่องใหญ่ มีพื้นที่เท่ากับ 1 x 1 ตารางมิลลิเมตร และ ช่องแต่ละช่องของ 9 ช่องใหญ่ (หมายเลข 1, 2, 3 และ 4) จะถูกแบ่งย่อยออกเป็น 16 ช่องเล็ก มีพื้นที่ในแต่ละ 16 ช่องเล็กนี้เท่ากับ 0.25 x 0.25 ตารางมิลลิเมตร ในช่องตรงกลาง (หมายเลข 5) จะถูกแบ่งย่อยออกเป็น 25 ช่องเล็ก มีพื้นที่ในแต่ละช่องเล็กนี้เท่ากับ 0.2 x 0.2 ตาราง

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

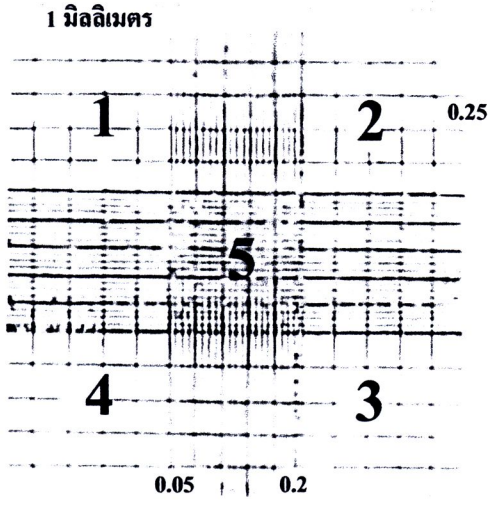
มิลลิเมตร และแต่ละ 25 ช่องเล็กนี้จะถูกแบ่งย่อยลงไปอีกเป็น 16 ช่องเล็ก โดยมีพื้นที่ใน แต่ละ 16 เล็กดังกล่าวนี้เท่ากับ 0.05 x 0.05 ตารางมิลลิเมตร

ขั้นตอนการใช้

1. ทำความสะอาด haemacytometer จากนั้นใช้ alcohol 70 เปอร์เซ็นต์ เช็ด แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง

2. หยดสารแขวนลอยโคนิเดียของเชื้อราที่เตรียมไว้ บนแผ่นสไลด์ที่ปิดด้วย cover glass แล้ว โดยหยดลงตรงตำแหน่งหยดของแต่ละ chamber (1 สไลด์มี 2 chamber)

3. นับโคนิเดียที่อยู่ในช่อง ที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ดังปรากฏในภาพของแต่ละ chamber รวมกัน โดยนับทั้ง 2 chamber จำนวนโคนิเดียที่นับได้จากแต่ละ chamber ต้องมีจำนวนอยู่ในช่วง 100 - 300 โคนิเดีย และมีความแตกต่างกันไม่เกิน 15 เปอร์เซ็นต์ จึงจะถือว่า dilution นั้นใช้ได้ ทั้งนี้จะต้องนับ 6 chamber จากนั้นหาค่าเฉลี่ยของทั้ง 6 chamber เพื่อนำไปแทนค่าในสูตร



4. คำนวณปริมาณ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร สำหรับโคนิเดียของเชื้อราหรือจุลินทรีย์ที่มีขนาดใหญ่จะใช้สูตร $2Px10^{3+a}$ โดยที่ P = จำนวนโคนิเดียรวมจากช่องที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 เฉลี่ยจาก 2 chamber

a = dilution ที่นับโคนิเดียได้ในช่วง 100-300 โคนิเดีย

ตัวอย่างการคำนวณปริมาณโคนิเดีย

ถ้านับโคนิเดียได้ค่าเฉลี่ย 127 โคนิเดีย ที่ dilution 10^{-3} เมื่อแทนค่าในสูตรจะได้

ความเข้มข้นของสต็อกเชื้อ = $2 (127) \times 10^{3+3}$

$= 2.54 \times 10^8$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร

หมายความว่าสต็อกเชื้อ (original concentration) มีความเข้มข้นเท่ากับ 2.54×10^8 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร จากนั้นเป็นการคำนวณให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ โดยกำหนดความเข้มข้นสำหรับใช้ในการพ่น คือ 1×10^7 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูตรที่ใช้คำนวณคือ $N_1V_1 = N_2V_2$

โดยที่ N_1 = ความเข้มข้นของสารแขวนลอยของโคนิเดียที่นำมาทำให้เจือจางลง

V_1 = ปริมาตรของสารแขวนลอยของโคนิเดียที่นำมาทำให้เจือจางลง

N_2 = ความเข้มข้นของสารแขวนลอยของโคนิเดียที่ต้องการ

V_2 = ปริมาตรของสารแขวนลอยของโคนิเดียที่ต้องการ

โจทย์ : ต้องการเตรียมสารแขวนลอยของโคนิเดียเข้มข้น 2.54×10^8 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร จำนวน 10 มิลลิลิตร ให้เข้มข้น 1×10^7 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร จะต้องเติมสารละลาย Tween 80® 0.05 เปอร์เซ็นต์ ลงไปจำนวนเท่าใด

แทนค่าในสูตร $2.54 \times 10^8 (V_1) = 1 \times 10^7 (10)$

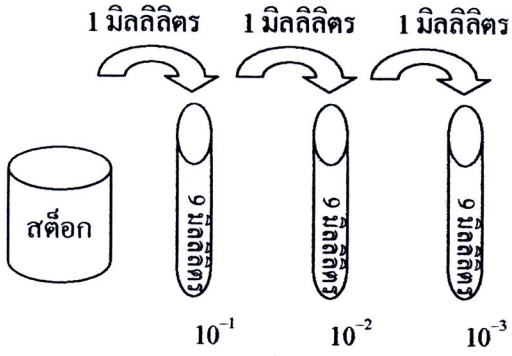
$$= \frac{1 \times 10^7 \times (10)}{2.54 \times 10^8}$$

$V_1 = 0.39$ มิลลิลิตร

เพราะฉะนั้น จะต้องดูดสารแขวนลอยโคนิเดียเข้มข้น 2.54×10^8 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร (สต็อกเชื้อ) มา 0.39 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย Tween 80® 0.05 เปอร์เซ็นต์ จำนวนเท่ากับ 10 - 0.39 = 9.61 มิลลิลิตร ก็จะได้สารแขวนลอยโคนิเดียเข้มข้น 1×10^7 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

แต่ถ้าสมมุติที่ dilution 10^{-3} นับไม่ได้เนื่องจากมีความหนาแน่นของ โคนิเดียมากเกินไป (375 โคนิเดีย) จึงต้องนำสารแขวนลอยของโคนิเดียที่ dilution 10^{-3} ไปเจือจางต่ออีกครั้งหนึ่ง เช่น เจือจางด้วยอัตรา 1 ต่อ 4 แล้วนำไปนับ สมมุติว่าจาก 5 ช่อง นับได้ 184 โคนิเดีย ดังนั้น ตัวอย่างขั้นตอนและคำนวณแสดงได้ดังนี้

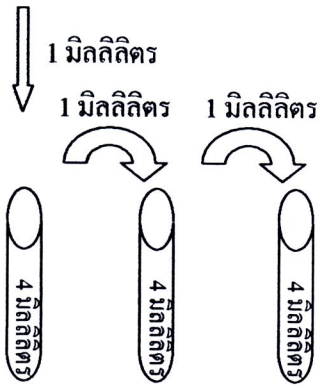
ขั้นที่ 1



= serial dilution ที่ต่างกัน 10 เท่า

$$\left(\frac{1}{1+9} = \frac{1}{10} = 10 \text{ เท่า} \right)$$

ขั้นที่ 2



= serial dilution ที่ต่างกันคือ 5 เท่า

(นำตัวเลขนี้ไปคูณเพิ่มในขั้นที่ 2)

$$\left(\frac{1}{1+4} = \frac{1}{5} = 5 \text{ เท่า} \right)$$

วิธีคำนวณ

แทนค่าในสูตร $2P \times 10^{3+a}$

ขั้นที่ 2 $= 2(184) \times 10^{3+3} \times (5)$ (dilution 10^{-3} ที่ถูกเจือจางไปอีก 5 เท่า ในขั้นที่ 2)

ดังนั้น ความเข้มข้นของโคนิเดียในสต็อก $= 2(184) \times 10^{6} \times 5$

$= 1.84 \times 10^{9}$ โคนิเดียต่อมิลลิลิตร

แทนค่าในสูตร $1.84 \times 10^{9} (V_1) = 1 \times 10^{7} \times (10)$

$$= \frac{1 \times 10^{7} \times (10)}{1.84 \times 10^{9}}$$

$V_1 = 0.054$ มิลลิลิตร

เพราะฉะนั้น จะต้องดูดสารแขวนลอยโคนิเดียที่มีอยู่ (สต็อกเชื้อ) มา 0.054 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย Tween 80® 0.05 เปอร์เซ็นต์ จำนวนเท่ากับ 10 - 0.054 = 9.946 มิลลิลิตร ก็จะได้สารแขวนลอยโคนิเดียเข้มข้น 1 x 10^7 โคนิเดียต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

4. การคำนวณการตายของแมลงทดสอบด้วย Abbott's formula

การคำนวณเพื่อหาค่าเปอร์เซ็นต์การตายในการทดลองที่ตรวจพบการตายในกรรมวิธีควบคุมโดยใช้สูตรดังนี้คือ

$$\text{เปอร์เซ็นต์การตาย} = \frac{(X - Y) \times 100}{(100 - Y)}$$

X = จำนวนการตายในการทดลอง

Y = จำนวนการตายในกรรมวิธีควบคุม

5. การคัดเลือกเชื้อรา *Metarhizium* spp. เพื่อใช้ทดสอบกับแมลง

การคัดเลือกเชื้อรา *Metarhizium* spp. เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายแมลงนั้น โดยการสุ่มเลือกจากผลของกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสในเชิงปริมาณ กำหนดเชื้อออกเป็น 4 กลุ่ม โดยเรียงลำดับของเชื้อจากค่ากิจกรรมของเอนไซม์จากมากไปหาน้อย โดยให้กลุ่มที่ 1 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในช่วง 0 - 25 ไทโรซีน-ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง ในกลุ่มที่ 2 อยู่ในช่วง 26 - 50 กลุ่มที่ 3 อยู่ในช่วง 51 - 75 และกลุ่มที่ 4 อยู่ในช่วงตั้งแต่ 76 ไทโรซีน-ไมโครโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมงขึ้นไป หลังจากนั้นสุ่มเลือกเชื้อในแต่ละกลุ่มออกมาด้วยการเลือกแบบสุ่มจากค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส สูง กลาง และต่ำ จำนวน 3 ถึง 4 ไอโซเลต ในแต่ละกลุ่มนั้น

6. การหาความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ

ความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ เป็นสิ่งที่จำเป็นมากในการศึกษาวิจัย ทั้งนี้เพราะในการเตรียมดีเอ็นเอ (จากเชื้อรา) จำเป็นที่จะต้องทราบความเข้มข้นในตัวอย่างนั้น เพื่อที่จะทราบว่าควรใช้สารละลายดีเอ็นเอปริมาตรเท่าใดไปใช้ในขั้นตอนต่อไป ซึ่งมีวิธีการเพื่อหาปริมาณความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ดังนี้

6.1 วิธีการหาปริมาณและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ซึ่งมีขั้นตอนคือ

1. แบ่งสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการหาความเข้มข้นมาจำนวน 2 ไมโครลิตร (μl) ใส่ลงในคูเวตต์ (cuvette) ชนิดที่ทำด้วยควอทซ์ (quartz) เติม TE buffer ลงไป 198 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปหาค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 260 และ 280 นาโนเมตร (nm) (A_{260} และ A_{280}) โดยใช้ TE buffer เป็น blank

2. คำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร ดังนี้

ความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ (ไมโครกรัม (μg) ต่อมิลลิลิตร)

= A_{260} x 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร x dilution factor

(dilution factor ในกรณีนี้ = (198 + 2) / 2 = 100)

หมายเหตุ: A_{260} มีค่าเท่ากับ 1 เมื่อสารละลายดีเอ็นเอมีความเข้มข้นเป็น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. ความบริสุทธิ์ของสารละลายดีเอ็นเอ สามารถพิจารณาได้จาก ค่าสัดส่วนระหว่าง A_{260} : A_{280} สารละลายดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ควรมีค่า A_{260} / A_{280} = 1.8 ในกรณีที่ต่ำกว่า 1.8 แสดงว่าดีเอ็นเอนั้นไม่บริสุทธิ์ มีโปรตีนปนเปื้อนอยู่ และในกรณีที่มีค่ามากกว่า 1.8 แสดงว่ามีอาร์เอ็นเอ (RNA) ปนเปื้อน

6.2 วิธีการวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอโดยอาศัยเทคนิคอะกาโรสเจลอีเล็กโทรโฟรีซิส

อะกาโรสเจลอีเล็กโทรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) เป็นวิธีการมาตรฐานที่ใช้ในการแยก วิเคราะห์ และทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ โดยอาศัยความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุล ซึ่งเป็นผลมาจากความแตกต่างของชนิดและปริมาณของประจุ ขนาดและโครงรูปของโมเลกุล ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมถาดรองเจล (gel mould) และเจลแชมเบอร์ (gel chamber) (Sunrise™ 96 Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus; Life Technologies, Inc.)

2. ชั่งอะกาโรส (SeaKem® LE agarose; BioWhittaker Molecular Applications, USA) ลงในขวดรูปชมพู่ (flask) เติม 1X TBE buffer (ภาคผนวก ง) ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ กรณีที่วิเคราะห์ผลการสกัดดีเอ็นเอจะใช้อะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ สำหรับผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) จะใช้อะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์

3. นำไปให้ความร้อนจนอะกาโรสละลายเป็นเนื้อเดียวกัน รอให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 60 องศาเซลเซียส เทลงในถาดรองเจลที่เตรียมไว้ พยายามอย่าให้เกิดฟองอากาศ วางหวี (comb) ลงที่ช่องวางหวีของถาดลองเจล รอให้เจลแข็งตัว

4. หลังจากเจลแข็งตัว นำถาดไปวางลงในเจลแชมเบอร์ เท 1X TBE buffer ลงไปจนท่วมเจลขึ้นมาประมาณ 1-2 มิลลิเมตร ค่อยๆ ดึงหวีออก

5. ผสมตัวอย่างดีเอ็นเอกับสีติดตาม (tracking dye) แล้วหยอดตัวอย่างลงในช่องโดยใช้ disposable micropipette และในการทำอีเล็กโทรโฟรีซิสทุกครั้งต้องมีดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler™ 1 kb DNA ladder และ GeneRuler™ 100 bp DNA ladder Fragment Sizes; MBI Fermentas) ที่ทราบขนาดแน่นอนเป็นตัวเปรียบเทียบ โดยการหยอดดีเอ็นเอมาตรฐานนี้ลงในช่องซ้ายสุดและขวาสุด สำหรับการหาปริมาณของดีเอ็นเอจะหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอเปรียบเทียบที่ทราบปริมาณที่มีความเข้มข้น 40, 80 และ 120 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยหยอดดีเอ็นเอเปรียบเทียบเรียงตามลำดับความเข้มข้น

6. เมื่อหยอดตัวอย่างเรียบร้อยแล้ว ปิดฝาอีเล็กโทรโฟรีซิสแชมเบอร์ (electrophoresis chamber) แล้วต่อขั้วไฟฟ้าเข้ากับเครื่องกำเนิดไฟฟ้า โดยใช้ความต่างศักย์อยู่ในช่วง 1-5 โวลต์ต่อเซนติเมตร ดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จากขั้วสีดำ (cathode) ไปยังขั้วสีแดง (anode) อย่าตั้งความต่างศักย์ให้สูงเกินไป เพราะจะทำให้เกิดความร้อนสูงซึ่งจะทำลายดีเอ็นเอ สังเกตการเคลื่อนที่ของสีติดตามเคลื่อนที่ไปได้ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ของความยาวเจล จึงหยุดกระแสไฟฟ้า

7. นำเจลอะกาโรสออกใส่ลงในกล่องพลาสติกที่บรรจุน้ำยาย้อมดีเอ็นเอ (ethidium bromide 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (ภาคผนวก ง) ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที แล้วย้ายอะกาโรสเจลลงในน้ำกลั่น ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที โดยเขย่าเป็นครั้งคราว

8. ตรวจวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจล ด้วยเครื่อง Gel Doc 2000™ Gel Documentation Systems (BIO-RAD)

7. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารแขวนลอยด้วยวิธี Bradford (1976)

7.1 Bradford's reagent

ชั่งสาร Coomassie brillint blue G-250 จำนวน 100 มิลลิกรัม ใส่บีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร กวนให้สารละลาย จากนั้นเติมเอทานอล(ethanol) 96 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และกรดฟอสฟอริค 85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากันปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร นำไปกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman

เบอร์ 1 และเก็บใส่ขวด สีชา สำหรับใช้ในการวิเคราะห์โปรตีน (ต้องเตรียมก่อนการวิเคราะห์ทุกครั้ง)

7.2 Protein solution

เตรียมสารละลาย stock protein solution ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งโปรตีน bovine serum albumin จำนวน 2 มิลลิกรัม ใส่ volumetric flask ขนาด 20 มิลลิลิตร จะได้สารละลายของโปรตีนเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 15 มิลลิลิตร เขย่าจนโปรตีนละลายหมด แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้มีความเข้มข้น 80, 60, 40, 20 และ 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

7.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

นำ protein solution ที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80, และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตรจากข้อ 7.2 ใส่หลอดทดลอง (ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ) จากนั้นเติม Bradford's reagent ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D) ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาทำกราฟเพื่อนำไปเป็นกราฟมาตรฐานในการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีน

8. การวิเคราะห์ปริมาณ tyrosine ตามวิธีของ Yang และ Wang (1999)

เตรียม stock tyrosine solution เช่นเดียวกับการเตรียม stock protein solution ในข้อ 7.2 โดยละลาย tyrosine ในน้ำกลั่น จากนั้นนำ tyrosine solution ที่มีความเข้มข้นของ tyrosine 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ) ใส่หลอดทดลอง เติม 0.4 M sodium carbonate (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเติม Folin Ciocalteu phenol's reagent ปริมาตร 0. 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D.) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้มาทำเป็นกราฟมาตรฐานของปริมาณของกรดอะมิโน เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบปริมาณของกรดอะมิโน

ภาคผนวก ข
สูตรอาหารสำหรับการแยก เลี้ยงเชื้อรา ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส และสูตรอาหารสำหรับสกัดสารพิษ destruxin

สูตรอาหารสำหรับการแยก เลี้ยงเชื้อรา ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส และสูตรอาหารสำหรับสกัดสารพิษ destruxin

1. Saboraud dextrose agar (SDA)

Bacto® peptone (Difco)	10	กรัม
Dextrose	40	กรัม
Agar	20	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

นำส่วนผสมมาละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร และอีก 500 มิลลิลิตรนำมาละลายวุ้น ต้มจนวุ้นหลอม ผสมให้ส่วนผสมเข้ากัน ปรับปริมาตรจนครบ 1 ลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที รอให้อุณหภูมิลดลง นำมาเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว

2. Saboraud dextrose broth (SDB)

มีส่วนผสมและการเตรียมเช่นเดียวกับอาหาร SDA เพียงแต่ไม่มีการเติมวุ้น

3. Saboraud dextrose agar ที่เติม yeast extract (SDAY)

มีส่วนผสมและการเตรียมเช่นเดียวกับอาหาร SDA แต่เติม yeast extract (Bacto® yeast extract, Difco) อีกจำนวน 2 กรัม

4. Potato dextrose agar (PDA)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	20	กรัม

นำมันฝรั่งที่ปอกเปลือกแล้ว 200 กรัม มาต้มในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แยกกากมันฝรั่งที่ต้มออกโดยการกรองเอาเฉพาะน้ำต้มมันฝรั่ง เติมน้ำตาล dextrose กวนให้ส่วนผสมเข้ากันดี ตวงน้ำอีก 500 มิลลิลิตร ละลายวุ้นต้มจนวุ้นหลอม แล้วนำมาผสมให้เข้ากันกับน้ำต้มมันฝรั่ง ปรับปริมาตรจนครบ 1 ลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที รอให้อุณหภูมิลดลง นำมาเทใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว

5. วุ้นแข็งที่ใช้ในการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ protease

Gelatin	10	กรัม
Agar	20	กรัม
0.1 M phosphate buffer, pH 7.0	1	ลิตร

ละลาย gelatin จำนวน 10 กรัม และวุ้นผงลงใน 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0 (ภาคผนวก ค) นำไปต้มจน gelatin และผงวุ้นละลาย ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เทใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งไว้จนวุ้นแข็งตัวจึงนำไปใช้ได้

6. Luria Bertani medium (LB) - Ampicillin

bacto tryptone	10	กรัม
yeast extract	5	กรัม
NaCl	10	กรัม
distilled water	1	ลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 7.5 ด้วย NaOH และปรับปริมาตรสุดท้ายให้ครบ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เมื่ออาหารเย็นลงเติม ampicillin 80 มิลลิกรัมกรัมต่ออาหาร LB 1 ลิตร สำหรับ LB agar ให้เติมผงวุ้นเพิ่มจำนวน 15 กรัม

7. Glucose-yeast extract-basal salt broth (GYBS)

Glucose	10	กรัม	NH_4NO_3	0.7	กรัม
Yeast extract	5	กรัม	$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	1.05	กรัม
KH_2PO_4	0.36	กรัม	KCl	1	กรัม
$MgSO_4$	0.6	กรัม	Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร			

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตรนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15-20 นาที

ภาคผนวก ค

การเตรียม buffer

และสารละลายที่ใช้ในการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส

1. 0.1 M Phosphate buffer (pH 7.0)

ชั่งสาร potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) จำนวน 13.6 กรัม ใส่ในบิกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำ 800 มิลลิลิตร กวนให้ละลาย ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 ด้วย disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) จำนวน 14.2 กรัม จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

2. 0.4 M Sodium carbonate (Na_2CO_3)

ชั่งสาร sodium carbonate (Na_2CO_3) จำนวน 42.39 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร เติมน้ำ 800 มิลลิลิตร กวนให้ละลายและปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

3. Folin Ciocalteu phenol's reagent

เตรียมโดยนำ Folin Ciocalteu phenol ผสมน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 เพื่อให้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 N

4. สารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] อิ่มตัว

ค่อยๆ เติมสารแอมโมเนียมซัลเฟตลงในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว กวนสารละลายตลอดเวลา จนกว่าแอมโมเนียมซัลเฟตไม่สามารถละลายได้อีกต่อไป

ภาคผนวก ง
สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาทางชีวโมเลกุล

1. Extraction buffer

[CTAB 2 เปอร์เซ็นต์, 100 mM Tris-HCI (pH 8.0), 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, Polyvinylpyrollidone (PVP) 1 เปอร์เซ็นต์]

CTAB	4	กรัม
1 M Tris-HCI (pH 8.0)	20	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA	8	มิลลิลิตร
NaCl	16.36	กรัม
PVP	2	กรัม

ละลายน้ำให้ได้ปริมาตรทั้งหมด 200 มิลลิลิตร จึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

1.1 M Tris – HCl (pH 8.0)

ละลาย Tris base 1.21 กรัม ในน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร เติม HCl (conc.) ประมาณ 0.60 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิเย็นลงถึงอุณหภูมิห้อง ปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย HCl หรือ NaOH ที่เจือจาง ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

1.2 0.5 M EDTA (pH 8.0)

ละลาย disodium ethylene diamine tetraaetate.$2H_2O$ (EDTA) จำนวน 1.861 กรัม ในน้ำกลั่น 8 มิลลิลิตร คนให้ละลายมากที่สุดโดยใช้เครื่องกวนสาร ปรับให้มี pH 8.0 โดยการเติม NaOH ประมาณ 0.2 กรัม จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

2. Chloroform : isoamyl alcohol* (อัตราส่วน 24 ต่อ 1)

ผสม chloroform ปริมาณ 240 มิลลิลิตร กับ isoamyl alcohol 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเก็บในขวดสีชาหรือขวดแก้ใสหุ้มอะลูมิเนียมฟอยล์ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

* ข้อควรระวังในการเตรียมนั้นต้องสวมถุงมือระหว่างการเตรียมทุกครั้ง และต้องเตรียมในตู้ดูดควัน เนื่องจาก chloroform เป็นสารอันตรายและมีกลิ่น

3. TE buffer (10 mM Tris – HCl pH 8.0, 1 mM EDTA)

ผสมสารต่างๆ ตามสูตรในหลอดที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ซึ่งสารผสมประกอบด้วย

1 M Tris – HCL (pH 8.0)	0.1	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA (pH 8.0)	0.02	มิลลิลิตร

4. 1X TBE buffer

เตรียม 10X TBE buffer ** (89 mM tris-OH, 89 mM boric acid, 2.5 mM EDTA)โดยละลาย Tris base จำนวน 108 กรัม, boric acid จำนวน 55 กรัม และ Na_2EDTA จำนวน 93 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจาง 10X TBE buffer นี้ให้เป็น 1X TBE buffer โดยการเติมน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ลงใน 10X TBE buffer จำนวน 100 มิลลิลิตร

** TBE เป็นบัฟเฟอร์ที่มีความจุสูง แถบดีเอ็นเอที่แยกได้จะเล็กและคมชัด บัฟเฟอร์ที่เตรียมไว้ในรูปที่มีความเข้มข้น 10 เท่า (10X) จะเก็บได้นานที่อุณหภูมิห้องโดยไม่มีจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้

5. Stock solution A

ผสม 3 M sodium acetate ปริมาตร 4 ไมโครลิตร กับ ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

6. Ethidium bromide

นำ ethidium bromide จำนวน 2.5 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บบรรจุไว้ในขวดสีชา

7. Ampicillin

เตรียม stock solution ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่ง ampicillin จำนวน 25 มิลลิกรัม นำมาละลายในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส อัตราในการใช้คือ 2 มิลลิลิตรต่ออาหาร Luria Bertani medium 1 ลิตร

8. IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)

เตรียม stock solution ความเข้มข้น 0.1 M ชั่ง IPTG จำนวน 1.2 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 50 มิลลิลิตร นำไปกรอง และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ อัตราในการใช้ คือ 40 ไมโครลิตรต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

9. X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside)

เตรียม stock solution ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ชั่ง X-gal จำนวน 20 มิลลิกรัม มาละลายใน N,N-dimethylformamide และปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 1 มิลลิลิตร อัตราในการใช้เหมือน IPTG

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย

ประวัติผู้เขียน

นาย อิทธิเดช พิริยะนิติ เกิดเมื่อวันที่ 2 สิงหาคม 2524 ปัจจุบันอายุ 28 ปี ภูมิลำเนาอยู่ที่จังหวัดเลย มีพี่น้องรวม 4 คน เป็นบุตรคนที่ 3 จากพี่น้องทั้งหมด 4 คนของครอบครัว มีพี่ชาย 2 คน และน้องสาว 1 คน สำเร็จการศึกษาในระดับประถมศึกษาจากโรงเรียนอนุบาลเลย จังหวัดเลย สำเร็จการศึกษาในระดับมัธยมศึกษาจากโรงเรียนราชวินิตบางเขน กรุงเทพมหานครฯ และสำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา) จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปัจจุบันศึกษาในระดับบัณฑิตศึกษา ในหลักสูตรจุลชีววิทยาทางการเกษตร ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ระหว่างการศึกษาในระดับปริญญาโท ได้รับทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์จาก ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตรมหาวิทยาลัยร่วม มหาวิทยาลัยขอนแก่น สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (AG-BIO/PERDO-CHE) ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืนและ กลุ่มวิจัยการเพาะเลี้ยงและพัฒนาผลิตภัณฑ์ไหมป่าเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่ม

ผลงานทางวิชาการ

1. Sirimungkararat S., A. Natongkham, **I. Piriyaniti**, H. Urairong, B. Kaewrat, and W. saksirirat. 2009. Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* northeastern isolate on mosquitoes and its chitinase gene cloning. The International Symposium Go Organic 2009. 19-21 August 2009. Pullman Bangkok King Power Hotel. Bangkok, Thailand.
2. Sirimungkararat S., **I. Piriyaniti**, A. Natongkham, H. Urairong, W. Saksirirat, and B. Kaewrat. 2009. Protease gene cloning and the efficiency of local isolates of *Metarhizium anisopliae*. Agricultural Biotechnology International Conference. 22-25 September 2009. Queen Sirikit National Convention Center. Bangkok, Thailand.