บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การคัดเลือกแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของพืชและการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์โปรตีเอสเพื่อการควบคุมไส้เดือนฝอยรากปมเป็นการศึกษาความเหมาะสมของแบคทีเรียที่ผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์โปรตีเอสในการทำลายตัวอ่อนของไส้เดือนฝอยที่ระยะ J2 ซึ่งไส้เดือนฝอยเป็นตัวการหนึ่งที่ทำลายและสร้างความเสียหายให้กับเพื่อไร่หลายชนิด ทั้ง มันฝรั่ง มันสำปะหลัง มะเขือเทศ และต้นพริก เป็นประโยชน์ในการศึกษาครั้งนี้ เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์โปรตีเอสสูงและนำสกัดเอนไซม์ไปใช้ในการผลิตชีวภัณฑ์ในการควบคุมไส้เดือยฝอยในแปลงเกษตรกร ซึ่งมีขั้นตอนการดำเนินงานวิจัยดังนี้

ประชากรและการสุ่มกลุ่มตัวอย่าง

ประชากรที่ใช้ศึกษาครั้งนี้ คือ เก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบรากพืชด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) เพื่อนำมาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการโดยเก็บจากพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังที่ไม่มีประวัติการเป็นโรครากปม ในเขตจังหวัดนครราชสีมา ขนาดพื้นที่ 400 เมตร x 400 เมตร โดยพืชแต่ละชนิดจะใช้สูตร Taro Yamane กำหนดขนาดตัวอย่างและใช้วิธีการสุ่มแบบจับสลาก

การเก็บรวบรวมข้อมูล

ข้อมูลต่างๆ ที่เก็บรวบรวม มีดังต่อไปนี้

1. การคัดแยกแบคทีเรีย PGPR
2. ทดสอบคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืช (Plant Growth Promoting Activities) ของแบคทีเรียรอบรากพืช
3. ศึกษาประสิทธิภาพของของเอนไซม์โปรตีเอส (protease) จากแบคทีเรีย PGPR ในการทำลายตัวอ่อนระยะที่ 2 (J2) ของไส้เดือนฝอยรากปม
4. จำแนกชนิดของแบคทีเรีย PGPR ที่สร้างเอนไซม์โปรตีเอสที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการทำลายตัวอ่อนระยะที่ J2 ของ *M. incognita*
5. ศึกษาการเพิ่มปริมาณยีนโปรตีเอส การโคลนยีนและและนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli*
6. ศึกษาการแสดงออกของยีนโปรตีเอสใน *E. coli*
7. การวิเคราะห์กิจกรรมของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์โปรตีเอส
8. ศึกษาประสิทธิภาพของรีคอมบิแนนท์โปรตีเอสต่อตัวอ่อนระยะ J2 ของ *M. incognita*

เครื่องมือในการวิจัย

อุปกรณ์

1. หลอดเก็บตัวอย่างดิน (soil tube) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร ยาว 8 เซนติเมตร
2. ถุงปราศจากเชื้อสำหรับบรรจุตัวอย่างดิน (sterile bag)
3. หลอดฝาเกลียว (screw cap test tube) ขนาด 50 ml
4. ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 10, 100 และ 1,000 ml
5. ขวดรูปชมพู่ (conical flask) ขนาด 125 และ 250 ml
6. บีกเกอร์ (beaker) ขนาด 25, 100 และ 500 ml
7. แท่งแก้วคน (stirring rod)
8. ปิเปตต์ (pipette) ขนาด 1 และ 10 ml
9. ไมโครปิเปตต์ (micropipette)
10. ปิเปตต์ทิป (pipette tip)
11. จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (plate)
12. ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)
13. ปากคีบ (forcep)

เครื่องมือ

1. ตู้บ่ม (Incubator)
2. เครื่องเขย่าสาร (shaker)
3. เครื่อง PCR (Polymerase Chain Reaction)
4. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)
5. อ่างอังไอน้ำ (Water Bath)
6. กล้องจุลทรรศน์ (Light Microscope)
7. เครื่อง Spectrophotometer (Vortex Mixer)
8. เครื่องปั่นควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated Centrifuge)
9. pH meter
10. เครื่อง Sonicator
11. ตู้อบความร้อน (Hot Air Oven)
12. เครื่องนับ โคโลนี (counter)
13. Affinity Chromatography Column

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Nutrient Agar (NA, Difco, USA)
2. Luria Broth (LB, Difco, USA)

3. Normal Saline (Sigma, Aldrich, Germany)
4. Phosphhate Buffer Saline (Gibthai, Thailand)
5. Chrome azurole S agar
6. Skimmed milk agar
7. Primers
8. อาหารเลี้ยงเชื้อ YPD
9. Special Vector
10. Isopropylthio β galactoside (IPTG)
11. Tris- Hcl buffer (pH8)
12. เคซีน เข้มข้น 1%
13. Trichloroacetic acid (TCA)
14. Folin-Ciocalten reagent
15. NaH_2PO_4
16. Glucine
17. NaOH
18. $Cacl_2$

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. การคัดแยกแบคทีเรีย PGPR

คัดแยกแบคทีเรีย PGPR โดยเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบรากพืชด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) เพื่อนำมาวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการโดยเก็บจากพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังที่ไม่มีประวัติการเป็นโรครากปม ในเขตจังหวัดนครราชสีมา ขนาดพื้นที่ 400 เมตร x 400 เมตร โดยพืชแต่ละชนิดจะใช้สูตร Taro Yamane กำหนดขนาดตัวอย่างและใช้วิธีการสุ่มแบบจับสลาก

2. ทดสอบคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืช (Plant Growth Promoting Activities) ของแบคทีเรียรอบรากพืช

นำรากพืชมาล้างด้วย 0.1 mol l^{-1} phosphate buffer ทำการเจือจางแล้วนำมา spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 2 วัน ก่อนนำมาทดสอบคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญของพืช

2.1 Phosphate solubilization assay (Nautiyal, 1999)

นำตัวอย่างดินใน Normal saline มา 0.1 ml มา spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ modified Pikovskaya agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลือกโคโลนีแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติ phosphate solubilizer ซึ่งจะให้โคโลนีที่มี halo zone รอบโคโลนี

2.2 Siderophore production

นำโคโลนีที่แยกได้จากข้อ 2.1 มาทดสอบคุณสมบัติในการสร้าง siderophore บนอาหารเลี้ยงเชื้อ chrome azurole S agar (CAS) ตามวิธีของ Clark & Bavoil (1994) โดย spot เชื้อลงบน CAS agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 5 วัน เลือกโคโลนีที่ให้สีเหลือง-ส้ม (yellow-orange halo) รอบๆ โคโลนี

2.3 Protease activity

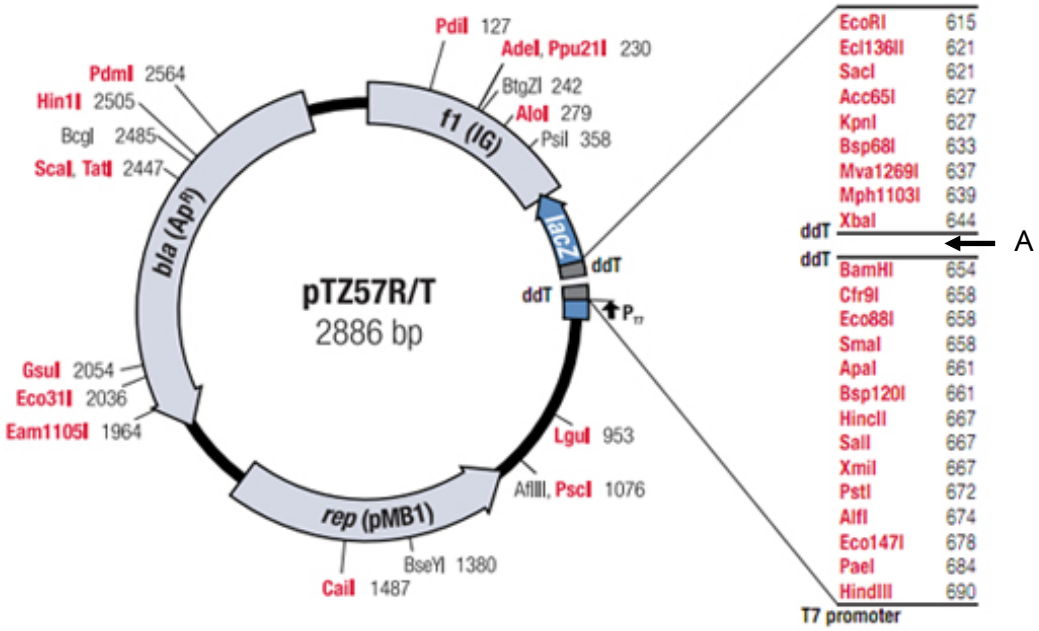
นำโคโลนีที่แยกได้จากข้อ 2.2 มาทดสอบคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสโดย spot เชื้อลงบน skimmed milk agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 5 วัน เลือกโคโลนีที่ให้โซนใส (clear zone) รอบๆ โคโลนี

3. จำแนกชนิดของแบคทีเรีย PGPR ที่สร้างเอนไซม์โปรตีเอสที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการทำลายตัวอ่อนระยะ J2 ของ *M. incognita*

จำแนกชนิดของแบคทีเรีย PGPR ที่มีประสิทธิภาพ โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ปฏิกิริยาชีวเคมี และลำดับเบสของ 16s rRNA ซึ่งการหาลำดับเบสของ 16s rRNA ยีน ทำได้โดยสกัด Genomic DNA ของแบคทีเรียและเพิ่มปริมาณ (amplify) DNA ด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะ ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ forward (5′-AGAGGTTACCTTGTTACGACTT-3′) และ reverse (5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′) (Lane, 1991) โดยใช้เครื่อง Thermocycler (ภาพที่ 3.2) และแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้เครื่อง Electrophoresis (ภาพที่ 3.3) นำ PCR product ไปทำให้บริสุทธิ์ก่อนนำมาวิเคราะห์ลำดับเบสโดยการทำ DNA sequencing และนำลำดับเบสที่ได้มาเทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม CLUSTAL X และ Mega (Thompson *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 2001)

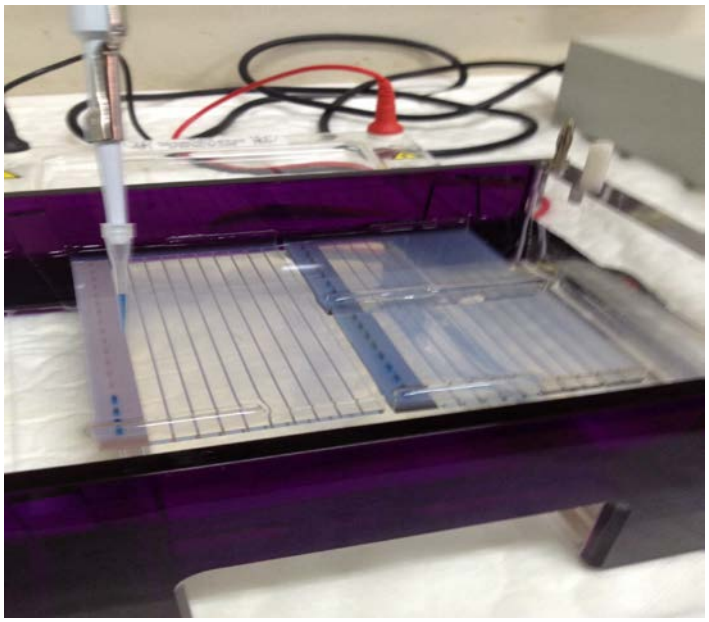
4. ศึกษาการเพิ่มปริมาณยีนโปรตีเอส การโคลนยีนและและนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli*

นำแบคทีเรีย PGPR ที่จัดจำแนกชนิดแล้ว มาสกัด Genomic DNA และเพิ่มปริมาณยีนโปรตีเอส (ยีน *npr*) ด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจำเพาะ ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ forward (5′-GGGGGATTTATTGTGGGTTT-3′) และ reverse (5′-TACAATCCGACAGCATTCCA-3′) นำ PCR product ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIA quick Gel Extraction Kit ก่อนโคลนเข้าเวคเตอร์ pTZ57R/T cloning vector โดยใช้ TA cloning method โดยใช้อัตราส่วนของ insert ต่อ vector เท่ากับ 3 : 1 ใช้ DNA ligase 1 µ และเติม buffer ลงไปให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 10 µl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 16 °C ข้ามคืน นำมา Transform เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* Hb 101 ด้วยวิธี heat shock โดยใช้ $CaCl_2$ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 39 °C เป็นเวลา 1 นาที คัดเลือก transformed colony บน LB agar amplicillin plate นำมาสกัดพลาสมิด โดยวิธี alkaline lysis ตรวจสอบ recombinant plasmids ด้วยเอนไซม์ต่อจำเพาะ NdeI และ Bam HI วิเคราะห์ลำดับเบสโดยการทำ DNA sequencing ก่อนนำเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* เพื่อชักนำให้เกิดการแสดงออก (expression) ของยีนโปรตีเอส



ภาพที่ 3.1 แสดงเวคเตอร์ pTZ57R/T ซึ่งนำมาใช้ในการเชื่อมต่อกับ DNA โดย A คือตำแหน่งแทรกชิ้นส่วน DNA

ภาพที่ 3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วน Conserved regions ของ 16S rRNA และยีนโปรตีเอสของแบคทีเรียโดยใช้เครื่อง Thermocycler



ภาพที่ 3.3 การแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้เครื่อง Electrophoresis

5. ศึกษาการแสดงออกของยีนโปรตีเอสใน *E. coli*

เพิ่มปริมาณยีนโปรตีเอสจาก recombinant plasmid ด้วยเทคนิค PCR ก่อนนำ PCR product ไปโคลนเข้า expression vector pET30b แล้วนำไป Transform เข้า *E. coli* BL21 (DE3) แล้วนำ *E. coli* BL21 (DE3) ที่มี recombinant plasmid มาเลี้ยงในอาหาร Luria Broth (LB) 100 ml ที่ใส่ยาปฏิชีวนะ เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C นำไปวัด optical density (O.D.) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ได้ค่า O.D. เท่ากับ 0.6 จึงเติม Isopropylthio - β - galactoside (IPTG) 0.5 mM (final concentration) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 5000 xg เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เก็บตะกอน (pellet) ใส่ 500 mM Tris - HCl buffer (pH 8) ลงใน pellet แล้วนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator ก่อน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12000 xg เป็นเวลา 20 นาที ตรวจสอบการแสดงออกของยีนโปรตีเอสใน crude lysate ด้วยวิธี SDS - PAGE โดยใช้ 12% running gel (Laemmli, 1970)

6. การวิเคราะห์กิจกรรมของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์โปรตีเอส

วิเคราะห์กิจกรรมของรีคอมบิแนนท์โปรตีเอส โดยนำเอนไซม์รีคอมบิแนนท์โปรตีเอสมา 1 ml เติมสารละลายเคซีนเข้มข้น 1% ปริมาตร 1 ml (บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C อย่างน้อย 10 นาที) ทำปฏิกิริยาที่ 37 °C นาน 10 นาที แล้วจึงหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 0. M Triichloroacetic acid (TCA) 2 ml เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนสมบูรณ์ที่ 37 °C นาน 20 นาที ส่วนหลอดควบคุม

(control) ใช้เอนไซม์รีคอมบิแนนท์โปรตีเอสมา 1 ml มาเติม TCA 2 ml ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 10 นาทีก่อน แล้วจึงเติมสารละลายเคซีน 1 ml เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนสมบูรณ์ที่ 37 °C นาน 20 นาที จากนั้นจึงกรองตัวอย่างและ control ด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วจึงนำส่วนใสที่กรองได้ 0.5 ml มาเติม 0.4 M Na_2CO_3 2.5 ml ผสมให้เข้ากันแล้วเติม 1 N Folin-ciocalteu reagent (7.5 ml ในน้ำกลั่น 22.5 ml) 0.5 ml ผสมให้เข้ากันอีกครั้งตั้งทิ้งไว้ที่ 37 °C นาน 10 นาทีนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ นำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ tyrosine โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์โปรตีเอสเท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยเคซีนให้ได้ tyrosine 1 µg ภายในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 37 °C

8. ศึกษาประสิทธิภาพของรีคอมบิแนนท์โปรตีเอสต่อตัวอ่อนระยะ J2 ของ *M. incognita*

นำรีคอมบิแนนท์โปรตีเอสมาทดสอบประสิทธิภาพในการทำลายตัวอ่อนระยะ J2 ของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita* (bioassay) โดยนำส่วนใส 300 µl ผสมกับตัวอ่อนระยะ J2 ของ *M. incognita* 200 ตัว บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ทำ 3 ซ้ำ) ส่วนชุดควบคุม (control) ได้แก่ ตัวอ่อนระยะ J2 ผสมรีคอมบิแนนท์โปรตีเอสที่ผ่านการต้ม 15 นาที ตรวจนับจำนวนตัวอ่อนที่ตาย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ light microscope เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการทำลายตัวอ่อน *M. incognita* ระยะ J2

9. สรุปผลการวิจัยและจัดทำรูปเล่มรายงานวิจัย