รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **ชุดโครงการวิจัย** : อนุรักษ์และใช้ประโยชน์จุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์อย่างยั่งยืน

2. **โครงการวิจัย** : **การอนุรักษ์จุลินทรีย์ทางการเกษตรเพื่อใช้ประโยชน์**

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การเก็บรวบรวม อนุรักษ์ และจำแนกชนิด *Bacillus thuringiensis*

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Collection, Conservation and Classification of *Bacillus thuringiensis*

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

   หัวหน้าการทดลอง : นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ
   สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

   ผู้ร่วมงาน : นางสาว**ภรณี สว่างศรี**
   สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
   นางนุชนารถ ตั้งจิตสมคิด
   สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

5. **บทคัดย่อ**

ในการอนุรักษ์จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ทางการเกษตร ได้ทำการเก็บรวบรวม อนุรักษ์ และจำแนกชนิดของบีที *(B.thuringiensis)* จากดินในภูมิภาคต่างๆทั่วประเทศ จากนั้นนำมาคัดแยกเชื้อ ด้วยวิธี Spread plate โดยคัดเลือกโคโลนีที่ขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะขนาดใหญ่ ผิวหน้าโคโลนีด้านไม่เป็นมันวาว และมีขอบไม่เรียบ ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* จากตัวอย่างดินทั้งหมด 288 ตัวอย่าง เมื่อนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อโดยการย้อมแกรมแล้ว เลือกโคโลนีที่ติดสีแกมบวกคือ Crystal Violet โดยมีลักษณะรูปร่างเป็นท่อนตรง มีผลึกโปรตีน และสปอร์อยู่ภายในเซลล์ การทดสอบเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยเทคนิคพีซีอาร์ด้วยไพเมอร์ btF-R และตรวจสอบผลด้วยการรันเจลด้วยเครื่อง Electro phoresis พบว่าได้ผลของพีซีอาร์ขนาดแถบแบนเท่ากับ 1500 pb นำผลพีซีอาร์ไปตรวจสอบลำดับ

นิวคลีโอไทด์ และนำผลที่ได้มาเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม NCBI พบว่าได้เชื้อ *Bacillus thuringiensis* จำนวน 57 ไอโซเลท จากการนำเชื้อ *B.thuringiensis* ตรวจสอบขนาดโปรตีน ด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้เครื่อง XCell SureLock™ (NOVEX Mini-Cell) และใช้ Protein marker 5 µl. เป็น standard marker ในการทดลอง ซึ่งประกอบด้วยแถบแบนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 11, 17, 25, 35, 48, 63, 75, 100, 135 และ 180 กิโลดาลตัน พบว่าแบนที่ได้ส่วนใหญ่จะผลิตโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 25-48 กิโลดาลตัน

6. คำนำ

แบคทีเรีย *B. thuringiensis* ควบคุมแมลง ได้มีการค้นพบแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* เป็นครั้งแรกราวศตวรรษที่ 20 โดย Ishiwata นักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่น โดยแยกเชื้อนี้ได้จากหนอนไหม (*Bombyx mori*) ที่เป็นโรค และตั้งชื่อแบคทีเรียนี้ว่า *Bacillus sotto* ต่อมาพบแบคทีเรียที่สร้างสปอร์จาก mediteranean flour moth (*Anagesta kueniellia*) ได้มีการตั้งชื่อแบคทีเรียชนิดนี้ว่า *Bacillus thuringiensis* ตามชื่อเมือง Thuringen แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* จัดจำแนกอยู่ใน Family Bacillaceae และ genus *Bacillus* เป็นกลุ่มของแบคทีเรียพวกที่สร้างสปอร์ได้ ติดสีแกรมบวก ต้องการออกซิเจน ให้ผลของปฏิกิริยา catalase เป็นผลบวก และให้ผลของปฏิกิริยา oxidase เป็นผลลบ ลักษณะรูปร่างเป็นแท่ง (rod shape) กว้าง 1.0-1.2 ไมโครเมตร ยาว 3.0-5.0 ไมโครเมตร โคโลนีค่อนข้างใหญ่ (5.0-10.0 มิลลิเมตร) ลักษณะกลม บางชนิดรูปร่างไม่แน่นอน ในระยะการออกสปอร์ *B. thuringiensis* หลายๆ สายพันธุ์จะผลิตโปรตีนผลึก (proteinaceous inclusions) พร้อมกับโปรตีนคริสตัล (Crystal, Cry toxin) ซึ่งเป็น ประเภท δ-endotoxins โปรตีนนี้เองที่มีฤทธิ์เป็นสารกำจัดแมลง บีทีท็อกซินหรือครายท็อกซิน (Bt toxin หรือ Cry toxin) เป็นสารฆ่าแมลงที่ไม่มีอันตรายต่อมนุษย์ เนื่องจากว่าบีทีจะทำงานในระบบกระเพาะซึ่งเป็นเบส ซึ่งกระเพาะแบบนี้ไม่พบในกลุ่มสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังเช่นมนุษย์ ดังนั้น จึงไม่มีอันตรายต่อสัตว์เลี้ยงทั่วไปและมนุษย์ ในปัจจุบัน มีบีทีท็อกซินอยู่ทั้งหมด 57 ชนิด แต่ละชนิดมีผลต่อแมลงแตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น Cry1Aa และ Cry2A มีผลต่อผีเสื้อและผีเสื้อกลางคืน ส่วน Cry5 มีผลต่อแมลงประเภทยุง บีทีจะทำงานก็ต่อเมื่อได้รับการบริโภคเข้าไปในแมลง ดังนั้น จึงมีผลเฉพาะแมลงบางกลุ่ม ทำให้แมลงที่ไม่ใช่ศัตรูพืชไม่ได้ถูกกำจัดไปด้วย จึงเป็นผลดีต่อระบบนิเวศน์ แต่พบว่าผลึกโปรตีนที่เป็นพิษส่วนใหญ่พบในหนอนผีเสื้อ (Lepidoptera) รองลงมาได้แก่ หนอนแมลงวันหรือยุง (Diptera) และด้วง (Coleoptera) (Vidyarthi *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2010)

ปัจจุบันมีการแยก *B. thuringiensis* (บีที) ออกมากกว่า 50,000 สายพันธุ์จากแหล่งต่าง ๆ (Sadder *et al.*, 2006) มีรายงานว่าสามารถพบ *B. thuringiensis* ได้ตามแหล่งต่าง ๆ เช่น ดิน ฝุ่นของพืชผลต่าง ๆ ที่เก็บในยุ้งฉาง ซากของแมลง เมล็ดธัญพืช ดินในพื้นที่เกษตร ใต้พุ่มไม้ เป็นต้น *B. thuringiensis* ถูกเริ่มใช้ใน

รูปแบบของยาฆ่าแมลงในปี 1956 ในชื่อของ Thuricide ในปี 1991 พืชชนิดแรกที่ได้รับการตัดต่อทางพันธุกรรมให้สามารถผลิต *B. thuringiensis* ได้ออกมาจำหน่าย นั่นคือ ฝ้ายที่ผลิตสารพิษของ *B. thuringiensis* ในขณะนี้ มีพืชที่สามารถผลิตสารพิษนี้ปลูกอยู่เกือบ 200 ล้านเอเคอร์ทั่วโลก ทั้งนี้ รวมถึงข้าวโพดบีที ผ้าฝ้ายบีที ยาสูบบีที ข้าว และมะเขือเทศ

เชื้อบีทีเป็นเชื้อที่มีความปลอดภัยสูงและไม่เป็นสาเหตุที่ก่ออันตรายต่อมนุษย์ ปลา สัตว์ป่า หรือแมลงที่มีประโยชน์ ซึ่งช่วยในการควบคุมแมลงศัตรูพืชชนิดต่างๆ โดยเข้าทำลายแมลงเมื่อหนอนกินสปอร์และผลึกโปรตีนของเชื้อเข้าสู่กระเพาะอาหาร น้ำย่อยในกระเพาะอาหารของแมลงที่มีความเป็นกรด-ด่าง เหมาะสมกับเชื้อบีที จะย่อยผลึกโปรตีน และบีทีจะปล่อยสารพิษออกมาทำลายผนังกระเพาะอาหารของหนอนศัตรูพืช บีทีผ่านเข้าสู่ช่องว่างลำตัวแมลง ซึ่งมีกระแสเลือดไหลเวียนอยู่ ไปเจริญและเพิ่มปริมาณในเลือด เซลล์ และเนื้อเยื่อของแมลง แมลงจะเป็นอัมพาตและตายเนื่องจากโลหิตเป็นพิษ แมลงที่ได้รับเชื้อบีทีจะไม่อยากกินอาหารหรือหยุดกินอาหาร เชื่องช้า ไม่ตอบสนองต่อสิ่งเร้า ลำตัวเป็นสีน้ำตาลดำ และตายในที่สุด

ในการจำแนกบีทีนิยมใช้เทคนิคการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16SrDNA genes ซึ่งเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีฐานข้อมูลอ้างอิงจำนวนมากใน GenBank (Ben-Dov *et al.*, 1997) นำมาเปรียบเทียบกันด้วยโปรแกรมบลาสต์ ก็จะสามารถทราบชนิดของบีทีได้อย่างง่ายดาย (Altschul *et al.*, 1990 อ้างอิงโดย Shishir *et al.*, 2012)

จุลินทรีย์เหล่านี้ นักวิจัยทั่วโลกได้ศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะการพยายามการเก็บรวบรวมสายพันธุ์ใหม่ๆ จากแหล่งต่างๆ ขึ้นมาใช้ประโยชน์ทั้งในเชิงอนุรักษ์ และพัฒนาต่อยอดให้สามารถนำไปใช้ได้จริง

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. ตัวอย่างดิน
2. NA agar
3. LB broth
4. หลอดทดลอง (tube)
5. ตู้บ่มเชื้อ
6. ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow)
7. spectrophotometer
8. microwave
9. pipette
10. หม้อนึ่งความดันไอ (autocave)
11. plate

12. Vortex

13. เครื่อง XCell SureLock™ (NOVEX Mini-Cell)

14. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน

15. เครื่องพีซีอาร์

16. กระดาษเซลโลเฟน

17. ขวดใส่อาหาร (Duran)

18. เครื่องชั่งสาร

19. water barth

20. เครื่องรันเจล

21. เครื่อง Gel doc

- วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างดินและการคัดแยกเชื้อ

1.1 การเก็บตัวอย่างดิน

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างดินในแหล่งต่าง ๆ ตามธรรมชาติ และทำการเก็บตัวอย่างดิน ด้วยวิธีของ Attathom *et al.* (1996) โดยเก็บดินที่ความลึก 3-5 เซนติเมตรจากผิวหน้าดิน และบรรจุในถุงพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว บันทึกวันและสถานที่เก็บตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างดินมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำดินเพื่อไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

1.2 การคัดแยกเชื้อ

ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียออกจากเชื้ออื่นที่ปะปนอยู่ในดินโดยนำตัวอย่างดินจำนวน 1 กรัม ผสมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 9 มิลลิลิตร ภายในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex นาน 5 นาที เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์กระจายตัวและแยกชั้นออกจากดิน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 20 นาที เพื่อให้ดินตกตะกอน แล้วเทน้ำใสที่อยู่ส่วนบนใส่ในหลอดทดลองหลอดใหม่ นำไปแช่ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส นาน 15 นาทีนำสารละลายดินมาเจือจางลง 10 เท่า ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วใน

อัตราส่วน 9:1 โดยใช้น้ำกลั่นจำนวน 1.8 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายดินจำนวน 0.2 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นจนได้สารละลายดินที่ความเข้มข้น 10-3, 10-4 และ 10-5 ตามลำดับ สำหรับทำการ Spread plate เพื่อแยกเชื้อต่อไป จากนั้นนำสาร ละลายดินที่ระดับความเข้มข้น 10-3, 10-4 และ 10-5 มาทำการ Spread plate โดยหยดสารละลายดินจำนวน 0.1 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหาร NA ที่เตรียมไว้ เกลี่ยด้วยแท่งแก้ว และนำไปบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการเลือกเก็บกลุ่มเชื้อ (Colony) ที่มีลักษณะขาวขุ่น ขนาดใหญ่ ผิวหน้าโคโลนีด้านไม่เป็นมันวาว และมีขอบไม่เรียบ ซึ่งเป็นลักษณะของโคโลนีเชื้อ *Bacillus thuringiensis* บันทึกผลจำนวนเชื้อ *Bacillus thuringiensis* isolate ที่ได้ในแต่ละตัวอย่างดินที่เก็บมา (อิศเรส, 2548)

1.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ Bt. isolate

นำเชื้อ *Bacillus thuringiensis* ที่แยกออกจากตัวอย่างดินมาทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ ด้วยวิธี streak plate จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวที่ได้มาย้อมแกรมเพื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อด้วยการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,500 เท่า ถ้าเป็นเชื้อ *Bacillus thuringiensis* จะพบเซลล์ที่มีรูปร่างเป็นท่อนตรง มีผลึกโปรตีน และสปอร์อยู่ภายในเซลล์ และจะติดสีของ Crystal Violet ทำการบันทึกลักษณะรูปร่างของเชื้อแต่ละ isolate จากนั้นเก็บเชื้อโคโลนีเดี่ยวอีกส่วนหนึ่งไปเลี้ยงต่อด้วยอาหารเหลว (Nutrient broth) สำหรับใช้เป็น Stock culture ซึ่งจะเก็บไว้ในกลีเซอโรลความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ในหลอดทดลองขนาดเล็กที่มีฝาปิด และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การจำแนกชนิดแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์

2.1 การสกัดดีเอ็นเอ (Kang *et al.*,2002)

ดูดตัวอย่างแบคทีเรียที่เลี้ยงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร มา 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาทีนาน 10 นาที หลังจากเติม 1XTE buffer 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาทีนาน 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสที่เป็นของเหลวทิ้งเอาแต่ตะกอน (ทำซ้ำ 2 รอบ) หลังจากนั้นทำการละลายตะกอนด้วย 1XTE buffer 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 10%SDS 40 ไมโครลิตร และ Proteinase K (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 8 ไมโครลิตร นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที (เขย่าทุก ๆ 15 นาที) หลังจากนำไปอุ่นเสร็จแล้วให้เติม 2X CTAB (นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้) 100 ไมโครลิตร นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที (เขย่าทุก ๆ 5 นาที จากนั้นเติมสาร Chloroform : Isoamyl alcohol (24 : 1) จำนวน 500 ไมโครลิตร คว่ำหลอดกลับไปกลับมาเพื่อให้สารละลายเข้ากันประมาณ 10นาที ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาทีนาน 10 นาที จากนั้นดูดส่วนใสชั้นบนใส่หลอดใหม่ นำหลอดไปวางบนน้ำแข็งที่เตรียมไว้ และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย Isopropanol 120 ไมโครลิตร กับ NaOAC 3M 10 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบา ๆ ประมาณ 10 ครั้ง หลังจากนั้นนำไปไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาทีนาน 20 นาที ทำการเทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้งแล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% Ethanol 300 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาทีนาน 20 นาที เทส่วนที่เป็นของเหลวทิ้ง ผึ่งตะกอนให้แห้งในอุณหภูมิห้องประมาณ 30 นาทีละลายตะกอนดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ด้วย TE buffer (ประกอบด้วย 10 mM Tris-HCl pH 8 และ 1 mM EDTA pH 8) จำนวน ไมโครลิตร

และ RNase จำนวน 2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาทีเพื่อกำจัดอาร์เอ็นเอ ทำการตรวจเช็คผลด้วยวิธี Gel Electro phoresis เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2 การทำพีซีอาร์ (Thermal cycler)

โดยมีการเตรียมปฏิกิริยาสำหรับทำ PCR ด้วย Taq Master mix 10 ไมโครลิตร น้ำ 7 ไมโครลิตร และไพเมอร์ 1 ไมโครลิตร รวมเป็น 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปทำปฏิริยา PCR ดังนี้

3 step cycling (number of : 35 cycles)

- Denaturation เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส
- Annealing เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส
- Extension เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส
- Final extension เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส

หลังสิ้นสุดปฏิริยา นำ PCR product มาแยกด้วย agarose gel electrophoresis โดยใช้ความเข้มข้น agarose 1.5 เปอร์เซ็นต์ และย้อมด้วย ethidium bromide และนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของแถบแบนดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator (Vilber)

2.3 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ (Purification) ด้วยชุด Nucleospin Gel and PCR Clean-up (บริษัท MACHERE-NAGEL)

นำตัวอย่างใส่หลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม NT1 (Binding Buffer) จำนวน 120 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากัน (กลับหลอดกลับไปกลับมา) หลังจากนั้นดูดใส่คอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที ทำการเทของเหลวส่วนล่างทิ้ง แล้วเติม NT3 (Wash buffer) 700 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที ต่อจากนั้นเทของเหลวส่วนล่างทิ้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที นำคอลัมน์ไปปะกบกับหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตรใหม่ แล้วเติม NE (Elution buffer 5 mM Tris/HCl, PH 8.5) จำนวน 35 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที (ทำซ้ำ 2 รอบ) นำส่วนที่เป็นคอลัมน์ส่วนบนทิ้ง แล้วเก็บส่วนข้างล่างที่เป็นหลอดพลาสติก 1.5 มิลลิลิตร ไว้ จากนั้นเก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA Sequence)

ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ กับฐานข้อมูลที่ได้มีการรายงานไว้ในฐานข้อมูลของ GenBank database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) โดยใช้โปรแกรม Blast

3. การสกัดโปรตีนและตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

- การเตรียมเชื้อ

ลงเชื้อ *B.thuringiensis* ที่คัดเลือกไว้ เลี้ยงลงในอาหาร NA agar ด้วยเทคนิค streak plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

- การสกัดโปรตีนและตรวจสอบขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

1. นำโคโลนีเดี่ยวเลี้ยงในอาหาร NA broth 5 ml.
2. วัดค่า OD_{600} ค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer
3. เก็บเชื้อที่เลี้ยงได้ปริมาณ 2 ml.ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็วรอบ เวลา 5 นาที และทิ้งส่วนใส
4. ล้างตะกอนด้วย 0.85 % NaCl 400 µl. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ เวลา 5 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง และทิ้งส่วนใส
5. ละลายด้วย 50 Mm NaOH 100 µl. และบ่มทันทีที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
6. ดูด 6x loading dye 20 µl. เติมลงในหลอด 100 µl. ของสารละลาย ผสมให้เข้ากันและนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 2 นาที
7. นำสารละลายที่ได้ load SDS-PAGE 30 µl. ด้วยเครื่อง XCell SureLock™ (NOVEX Mini-Cell) และใช้ Protein marker 5 µl. เป็น standard marker

- การตรวจสอบขนาดโปรตีน SDS-PAGE

สารละลายที่ได้ load SDS-PAGE 30 µl. ด้วยเครื่อง XCell SureLock™ (NOVEX Mini-Cell) โดยใช้ 1X NUPAGE buffer โดยตั้งค่าเครื่องที่ 150 โวล์ต 100 แอมป์ เวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์ขนาดโปรตีนโดยการนำแผ่นเจลที่ได้ย้อมสี ด้วย Simply Bule Safe Stain ให้ท่วมแผ่นเจล เขย่าทิ้งไว้ 60 นาที และล้างสีออกด้วย Destainning buffer เก็บแผ่นเจลที่ได้ด้วยการตรึงด้วยกระดาษเซลโลเฟน

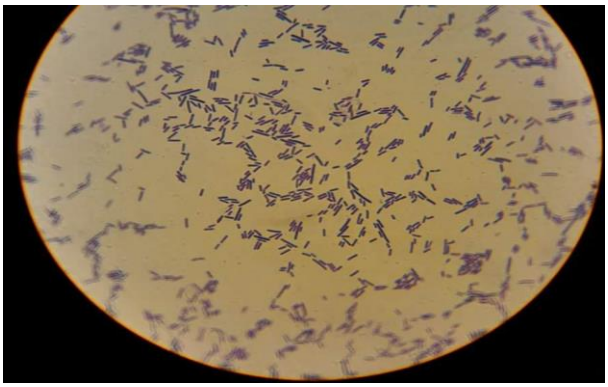
- ระยะเวลาเริ่มต้น ปี 2559 ถึงสิ้นสุด ปี 2561

- สถานที่ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการทดลอง

จากผลการคัดแยกเชื้อเบื้องต้น ด้วยวิธี Spread plate โดยคัดเลือกโคโลนีที่ขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีลักษณะขนาดใหญ่ ผิวหน้าโคโลนีด้านไม่เป็นมันวาว และมีขอบไม่เรียบ ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* จากตัวอย่างดินทั้งหมด 288 ตัวอย่าง เมื่อนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อโดยการย้อมแกรมแล้วตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,500 เท่า เลือกโคโลนีที่ติดสีแกมบวกคือ Crystal Violet โดยมีลักษณะรูปร่างเป็นท่อนตรง มีผลึกโปรตีน และสปอร์อยู่ภายในเซลล์

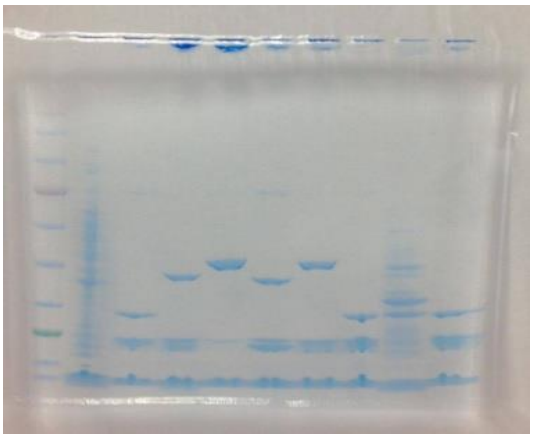


ภาพลักษณะของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,500 เท่า

ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรีย Bacillus thuringiensis ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ จากการทดสอบเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยเทคนิคพีซีอาร์ด้วยไพเมอร์ btF-R และตรวจสอบผลด้วยการรันเจลด้วยเครื่อง Electro phoresis โดยใช้ความเข้มข้น agarose 1.5 เปอร์เซ็นต์ 180 โวลต์ 60 นาที และย้อมด้วย ethidium bromide และนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของแถบแบนดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator (Vilber) พบว่าได้ผลของพีซีอาร์ขนาดแถบแบนเท่ากับ 1500 pb เมื่อส่งผลพีซีอาร์ที่ได้ไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำผลที่ได้มาเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม NCBI จำนวน 57 ไอโซเลท **การตรวจสอบขนาดโปรตีน ด้วยเทคนิค SDS PAGE** จากการนำ BT มาศึกษาการสร้างโปรตีน ด้วยเทคนิค SDS PAGE โดยใช้ NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel ของบริษัท NOVEX® by life technologise™ และใช้ protein molecular weight marker เป็น standard marker ซึ่งประกอบไปด้วยแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 11, 17, 25, 35, 48, 63, 75, 100,135 และ 180 กิโลดาลตัน พบว่า BT ผลิตโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 25-48 กิโลดาลตัน

-<u>ตารางแสดง number Bt. รูปที่1</u>

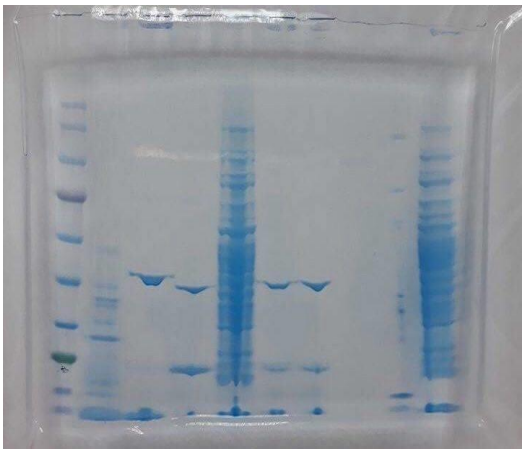
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Protein marker	94(10)	94(11)	94(22)	94(25)	95(11)	97(11)	97(13)	99(10)	99(16)



รูปที่1

-<u>ตารางแสดง number Bt. รูปที่2</u>

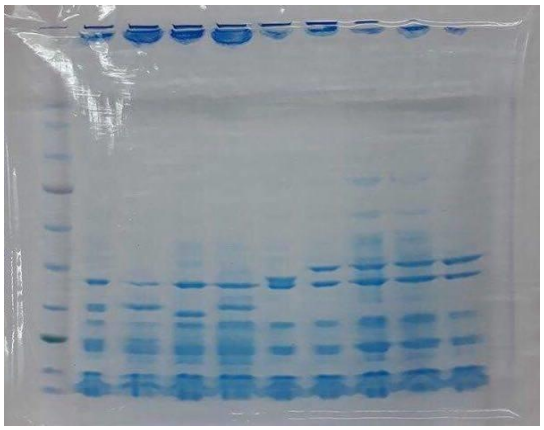
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Protein marker	97(1)	97(7)	97(14)	97(15)	98(5)	98(21)	98(22)	101(13)	101(16)



รูปที่2

-ตารางแสดง number Bt. รูปที่3

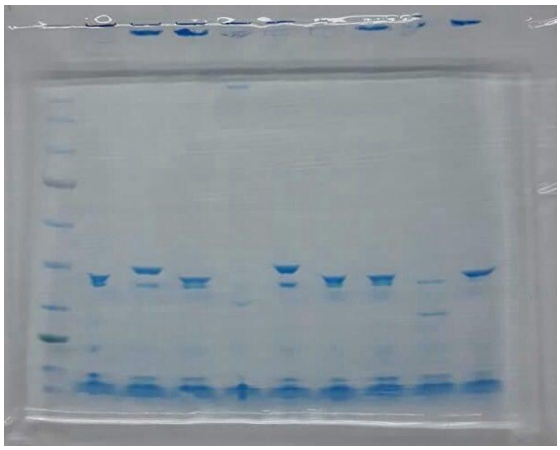
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Protein marker	98(8)	99(8)	99(21)	100(13)	101(12)	102(14)	103(4)	103(14)	103(15)



รูปที่3

-ตารางแสดง number Bt. รูปที่4

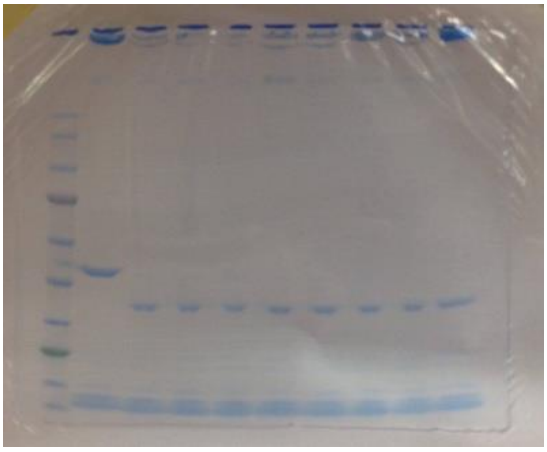
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Protein marker	102(3)	102(16)	102(20)	104(16)	105(8)	106(4)	108(1)	109(14)	110(13)



รูปที่4

-ตารางแสดง number Bt. รูปที่5

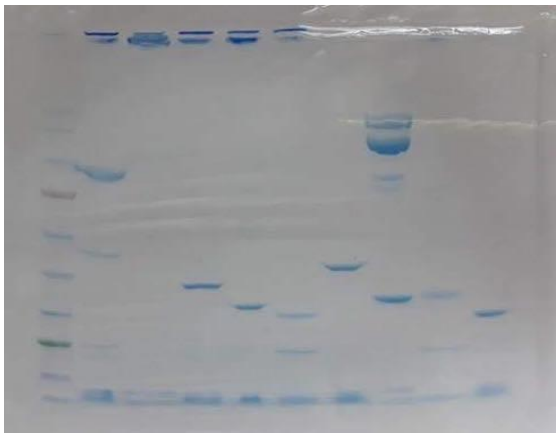
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Protein marker	108(11)	111(1)	111(15)	111(10)	111(14)	111(20)	111(21)	111(22)	111(24)



รูปที่5

-ตารางแสดง number Bt. รูปที่6

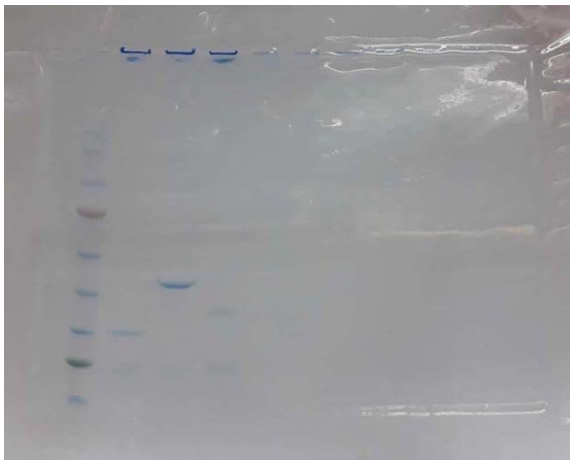
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Protein marker	109(1)	109(2)	109(4)	109(19)	109(20)	109(21)	109(23)	109(24)	109(25)



รูปที่6

-<u>ตารางแสดง number Bt. รูปที่7</u>

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Protein marker	111(6)	111(13)	111(17)	-	-	-	-	-	-



รูปที่7

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ผลการคัดแยกเชื้อ ด้วยวิธี Spread plate โดยคัดเลือกโคโลนีที่ขึ้นบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะขนาดใหญ่ ผิวหน้าโคโลนีด้านไม่เป็นมันวาว และมีขอบไม่เรียบ ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* จากตัวอย่างดินทั้งหมด 288 ตัวอย่าง เมื่อนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อโดยการย้อมแกรมแล้ว เลือกโคโลนีที่ติดสีแกมบวกคือ Crystal Violet โดยมีลักษณะรูปร่างเป็นท่อนตรง มีผลึกโปรตีน และสปอร์อยู่ภายในเซลล์ การทดสอบเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยเทคนิคพีซีอาร์ด้วยไพเมอร์ btF-R และตรวจสอบผลด้วยการรันเจลด้วยเครื่อง Electro phoresis พบว่าได้ผลของพีซีอาร์ขนาดแถบแบนเท่ากับ 1500 pb นำผลพีซีอาร์ไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำผลที่ได้มาเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม NCBI พบว่าได้เชื้อ *Bacillus thuringiensis* จำนวน 57 ไอโซเลท จากการนำเชื้อ *B.thuringiensis* ตรวจสอบขนาดโปรตีน ด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้เครื่อง XCell SureLock^{TM} (NOVEX Mini-Cell) และใช้ Protein marker 5 µl. เป็น standard marker ในการทดลอง ซึ่งประกอบด้วยแถบแบนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 11, 17, 25, 35, 48, 63, 75, 100, 135 และ 180 กิโลดาลตัน พบว่าแบนที่ได้ส่วนใหญ่จะผลิตโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 25-48 กิโลดาลตัน

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

เช่น ด้านวิชาการ ด้านนโยบาย ด้านเศรษฐกิจ/พาณิชย์ ด้านสังคมและชุมชน รวมถึงการเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

หน่วยงานที่นำไปใช้ประโยชน์

- หน่วยงานของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และกระทรวงพลังงาน ได้แก่ กรมส่งเสริมการเกษตร กรมพัฒนาที่ดิน สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
- สถาบันการศึกษาต่างๆ
- กลุ่มเกษตรกร

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี) : อาจมีหรือไม่มีก็ได้ เป็นการแสดงความขอบคุณแก่ผู้ช่วยเหลือให้งานวิจัยลุล่วงไปด้วยดี แต่มิได้เป็นผู้ร่วมปฏิบัติงานด้วย

12. เอกสารอ้างอิง

Ben-Dov, E., Zaritsky, A., Dahan, E., Barak, Z., Sýnal, R., Manasherob, R., Khamraev, A., Troitskaya, E., Dubitsky, A., Berezina, N. and Margalith, Y. 1997. Extended Screening by PCR for seven cry-group genes from field-collected Strains of Bacillus thuringiensis. Applied and Environmental Microbiology, 63: 4883-4890.

Martin, P.A., Gundersen, D.E. and Blackburn, M.B. 2010. Distribution of phenotypes among Bacillus thuringiensis strains. Systematic and Applied Microbiology, 33:204- 208.

Shishir, A., Akter, A., Hassan, Md. H., Kibria, G., Ilias, M., Khan, S. N. and Hoq, M. Md. 2012. Characterization of locally isolated Bacillus thuringiensis for the Development of Eco-friendly Biopesticides in Bangladesh. JBiopest, 5 (Supplementary) : 216-222 . (http://www.jbiopest.com/users/LW8/efiles/Vol_5_0_216_222F.pdf).

Vidyarthi, A. S., Tyagi, R. D., Valero, J. R., Surampalli, R. Y. 2002. Studies on the production of B. thuringiensis based biopesticides using wastewater sludge as a raw material. Water Research, New York, 36: 4850-4860.

http://www.lib.kps.ku.ac.th/SpecialProject/General_Science/2551/Bs/PongsakornKa/appdx.pdf

13. ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรียที่ใชในการทดลอง

การเตรียมอาหาร Nutrient agar (NA) สำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

<u>สารเคมี</u>

Beep extract	3 กรัม
Peptone	5 กรัม
ผงวุน	15 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

<u>วิธีการ</u>

1. beep exact 3 กรัม peptone 5 กรัม ผงวุน 15 กรัม และน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ผสมใหเขากัน นำไปตมจนผงวุนละลาย
2. เสร็จแลวตั้งทิ้งไวพออุน บรรจุใสหลอดทดลอง (tube) หรือขวดใสอาหาร (Duran) แลวนำไปนึ่งฆาเชื้อดวยหมอนึ่งความดันไอ 15 ปอนด/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องซาเซลเซียส นาน 15 นาที
3. เมื่อนำออกจากหมอนึ่งความดันไอแลวเก็บในที่สะอาด ใชเทใสจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (plate) โดยหลอมจนอาหารละลายแลวเทใสจานเลี้ยงเชื้อภายในตู laminar flow

การเตรียมอาหาร Nutrient broth (NB) สำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

<u>สารเคมี</u>

Beep extract	3 กรัม
Peptone	5 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

<u>วิธีการ</u>

1. beep exact 3 กรัม peptone 5 กรัม และน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ผสมใหเขากัน
นำไปตมจนส่วนผสมละลายเข้ากัน
2. นำมาบรรจุใสขวดทดลอง (Duran) แลวนำไปนึ่งฆาเชื้อดวยหมอนึ่งความดันไอ 15 ปอนด/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ภาคผนวก ข

ภาพเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

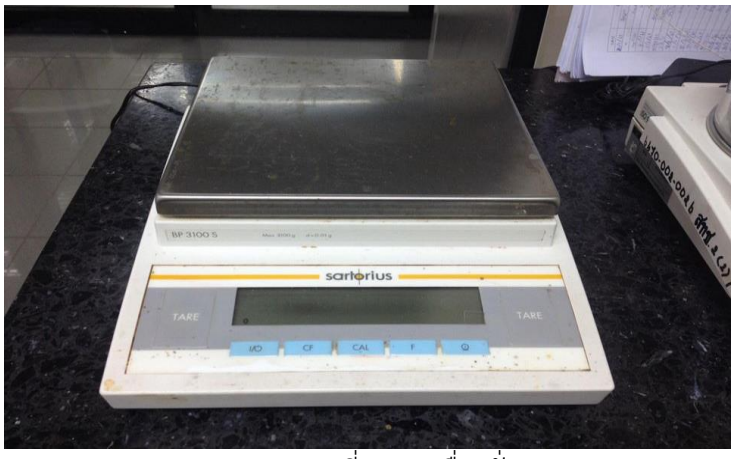
<u>ภาพภาคผนวกที่ ข1</u> เครื่องพีซีอาร์

<u>ภาพภาคผนวกที่ ข2</u> หม้อนึ่งความดันไอ (autocave)

<u>ภาพภาคผนวกที่ ข3</u> ตู้บ่มเชื้อ

<u>ภาพภาคผนวกที่ ข4</u> water barth

<u>ภาพภาคผนวกที่ ข5</u> เครื่อง spectrophotometer



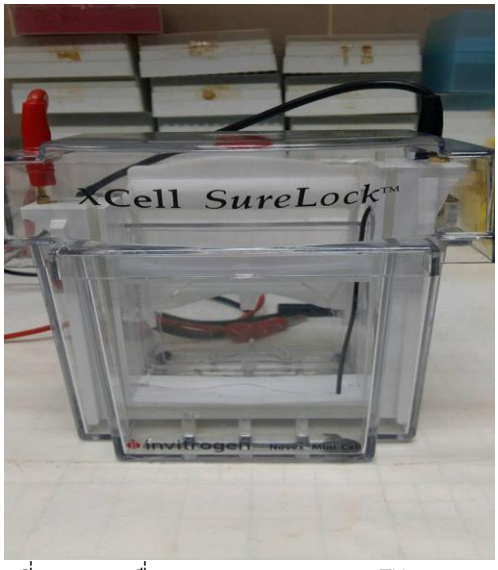
<u>ภาพภาคผนวกที่ ข6</u> เครื่องชั่งสาร

<u>ภาพภาคผนวกที่ ข7</u> ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow)

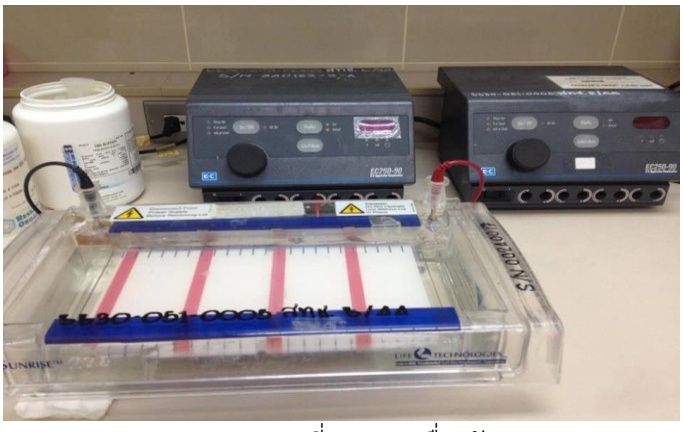
ภาพภาคผนวกที่ ข8 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน

ภาพภาคผนวกที่ ข9 microwave

ภาพภาคผนวกที่ ข10 pipette



<u>ภาพภาคผนวกที่ ข11</u> เครื่อง XCell SureLock™ (NOVEX Mini-Cell)



<u>ภาพภาคผนวกที่ ข12</u> เครื่องรันเจล

<u>ภาพภาคผนวกที่ ข13</u> เครื่อง Gel doc