2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

2.1 วัสดุ

2.1.1 จุลินทรีย์ สำหรับการทดสอบ

แบคทีเรีย

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Staphylococcus aureus* ที่ดื้อต่อยา methicillin สายพันธุ์ SK1 (MRSA SK1) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

ยีสต์

- *Candida albicans* ATCC 90028
- *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112

รา

- *Microsporum gypseum* SH-MU-4 ที่แยกได้จากผู้ป่วย ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล

2.1.2 สารเคมี

2.1.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

- Corn meal agar (CMA) added antibiotic (Difco)
- Malt extract agar (MEA) (Difco)
- Mueller Hinton agar (MHA) (Difco)
- Mueller Hinton broth (MHB) (Difco)
- Nutrient broth (NB) (Merck)
- Nutrient agar (NA) (Merck)
- Potato dextrose agar (PDA) (Difco)

- Potato dextrose broth (PDB) (Difco)
- Sabouraud dextrose agar (SDA) (Difco)
- Sabouraud dextrose broth (SDB) (Difco)

2.1.2.2 ยาต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial agents)

Standard antibiotic discs

Amphotericin B (10 µg/disc)	(เตรียมเอง ภาคผนวก ก)
Gentamicin (10 µg/disc)	(Difco)
Miconazole nitrate (10 µg/disc)	(Difco)
Vancomycin (30 µg/disc)	(Difco)

Antibacterial agents

Tetracycline	(Sigma)
Ampicillin	(Oxoid)
Vancomycin	(Fujisawa, USA)
Gentamicin	(Oxoid)

Antifungal agents

Amphotericin B	(Bristal-Myers Squibb)
Miconazole nitrate	(Oxoid)

2.1.2.3 สารเคมีทั่วไป

- 0.1 N HCl
- 0.1 M Phosphate buffer, pH 7.9
- 0.85% NaCl, normal saline solution (NSS)
- Lacto phenol cotton blue
- 5% Sodium hypochlorite (Clorox) (Haiter)
- 70% Ethanol (Fluka)
- 95% Ethanol (Fluka)
- Paraffin oil (วิทยาศรม)
- 15% Glycerol (Merck)
- McFarland Standard (ภาคผนวก ก)

2.1.2.4 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล (ภาคผนวก ข)

- CTAB lysis buffer (O' Donnell *et al*., 1997)

- Tris-hydrochloric acid (pH 8)
- Tris-EDTA (TE) buffer (pH 8.0)
- TAE buffer (Tris Acetate EDTA buffer, pH 8.0)
- 6X Loading dye
- Ammonium acetate (Bio Basic Inc.)
- Phenol (Carlo Erba reagenti)
- Chloroform (Lab-Scan Analytical Sciences)
- Isoamyl alcohol (Bio Basic Inc.)
- Isopropanol (Bio Basic Inc.)
- Absolute ethanol (Carlo Erba reagenti)
- 70% Ethanol (Carlo Erba reagenti)
- 95% Ethanol (Carlo Erba reagenti)
- Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Bio Basic Inc.)
- 1% Agarose minigel (Research Organics)
- Ethidium bromide (Fluka)
- 50mM $MgCl_2$ (Fermentas)
- 10X PCR buffer (Fermentas)
- 10 mM dNTPs mix (Fermentas)
- Taq DNA polymerase (Fermentas)

2.1.2.5 Universal fungal primers (White *et al*., 1990)

- ITS5 (5’ GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G 3’)
- ITS4 (5’ TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3’)

2.1.3 โปรแกรมวิเคราะห์การจัดเรียงลำดับเบส DNA และสร้าง phylogenetic tree

- BioEdit Version 7.0.5 (Hall, 2005)
- PAUP* Version 4.0b10 (Swofford, 2003)

2.1.4 อุปกรณ์วิทยาศาสตร์

- จานเลี้ยงเชื้อ (Petri dishes) (Pyrex)
- ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flasks) (Pyrex)

- กระบอกตวง (Cylinders) (Kimax)
- หลอดทดลอง (Test tubes) (Pyrex)
- หลอดฝาเกลียว (Screw cap tubes) (Pyrex)
- ปิเปตแก้ว (Glass pipettes) (Pyrex)
- บีกเกอร์ (Beakers) (Pyrex)
- Micro tubes (Eppendorf)
- Pasture's pipettes (Pyrex)

2.1.5 เครื่องมือวิทยาศาสตร์

- กล้อง Stereo zoom (Olympus)
- กล้องจุลทรรศน์ (Olympus)
- กล้องดิจิตอล (Pentax)
- Automatic pipette (Gilson)
- Multi channel automatic pipette (Eppendorf)
- Tip (Treflab)
- Vortex mixer (Ginie)
- Hot plate stirrer (Thermolyne)
- Water bath (Memmert)
- Gel electrophoresis machine (Amersham Bioscience)
- Power supply (Bio-Rad)
- Biosafety cabinet class II (Astec microflow)
- Autoclave (Tomy)
- Hot air oven (Binder)
- Shaker incubator 35 ^{0}C (New Brunswick Scientific)
- Incubator 25 ^{0}C (Sanyo)
- Incubator 35 ^{0}C (Gallenkamp)
- Freezer -20 ^{0}C (Sanyo)
- Deep freezer -80 ^{0}C (Sanyo)
- Refrigerator (Sanyo)
- Electronic balance (Sartorius)

- Freeze dryer (Labconco)
- Ultracentrifuge (Eppendorf, Centrifuge 5417R)
- PCR machine (MJ Research, DNA Engine DYAD ALD1244)
- UV-light transilluminator (Gel Documentation, Syngene Gene Genius SYDR 2/1729)

2.1.6 อุปกรณ์อื่นๆ

- Fine insect pins
- Surgical blade
- Loop, Needle
- Magnetic bar
- Stirring rod
- Forceps
- Vernier caliper
- Glass slides
- Cover slips
- PCR tube
- Mortar and Pestle
- Spatula
- Foil
- กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1
- กระดาษทิชชู่
- ถุงมือยาง
- กระติกน้ำแข็ง
- กรรไกร

2.2 การทดลอง

2.2.2 การแยกราเอนโดไฟท์

2.2.2.1 การเก็บตัวอย่างพืชสกุล *Garcinia*

ทำการเก็บตัวอย่างพืช ประกอบด้วย ส้มแขก (*Garcinia atroviridis*) มะพูด (*Garcinia dulcis*) มังคุด (*Garcinia mangostana*) ชะมวง (*Garcinia nigrolineata*) และ *Garcinia scortechinii* โดยเก็บตัวอย่างใบพืช และกิ่งที่มีลักษณะสมบูรณ์ สีเขียวเข้ม ไม่มีลักษณะอาการของโรค (รูปที่ 8-13) เก็บตัวอย่างต้นละ 5 ใบ และ 5 กิ่ง โดยพืช 1 ชนิด เก็บตัวอย่าง ชนิดละ 1-3 ต้น นำตัวอย่างพืชกลับมาทำการแยกราเอนโดไฟท์ทันที โดยนำตัวอย่างพืชมาล้างด้วย detergent และน้ำประปา ผึ่งให้แห้งภายใต้ laminar flow เมื่อตัวอย่างพืชแห้งแล้ว ใช้ใบมีดผ่าตัดจุ่ม 95% ethanol นำไปผ่านไฟแล้วตัดส่วนของ vein, midrib, lamina, petiole และ branch ออกเป็นชิ้นเล็กๆ ให้มีขนาด 1x1 ตารางเซนติเมตร จำนวน 2, 3, 3, 4 และ 10 ชิ้น ตามลำดับ (รูปที่ 14) สำหรับตัวอย่างพืชที่เหลือ นำไปอัดทับด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ แล้วอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 ^{o}C นาน 48-72 ชั่วโมง เมื่อตัวอย่างพืชแห้งเป็นอย่างดีแล้ว ทำการส่งตัวอย่างพืชไปเก็บรักษาที่พิพิธภัณฑ์พืช มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (PSU Herbarium) ต่อไป โดยบันทึกรายละเอียด การเก็บตัวอย่างของพืช ประกอบด้วยชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อพื้นเมือง รหัสพืช (plant code) รหัสสำหรับเก็บในพิพิธภัณฑ์พืช (collection number) สถานที่เก็บตัวอย่าง วันที่เก็บตัวอย่าง และลักษณะของพืช (ตารางที่ 1)

รูปที่ 8 ใบของต้นส้มแขก (*G. atroviridis*) จากจังหวัดยะลา (1GA)

รูปที่ 9 กิ่งมะพูด (*G. dulcis*) จากวัดหินเกลี้ยง จังหวัดสงขลา (1GD)

(ก)

(ข)

รูปที่ 10 กิ่งมะพูด (*G. dulcis*) จากวัดทรายขาว จังหวัดสงขลา (2GD)

(ก) : ใบและผล (ข) : กิ่งและใบ

รูปที่ 11 กิ่งมังคุด (*G. mangostana*) จากแปลงเพาะปลูกคณะทรัพยากรธรรมชาติมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (1GM)

(ก)

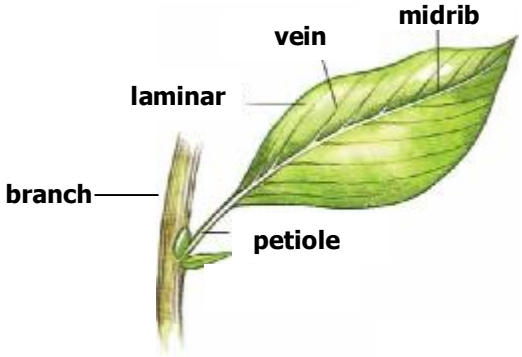
(ข)

รูปที่ 12 ต้นชะมวง (*G. nigrolineata*) จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าโตนงาช้าง จังหวัดสงขลา (1GN)
(ก) : ลำต้น (ข) : กิ่งและใบ

(ก)

(ข)

รูปที่ 13 ต้น *G. scortechinii* จากเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าโตนงาช้าง จังหวัดสงขลา (1GS)
(ก) : ลำต้น (ข) : กิ่งและใบ



รูปที่ 14 ส่วนต่างๆ ของพืชที่ทำการแยกตัวอย่าง (ดัดแปลงจาก Morales, 2006)

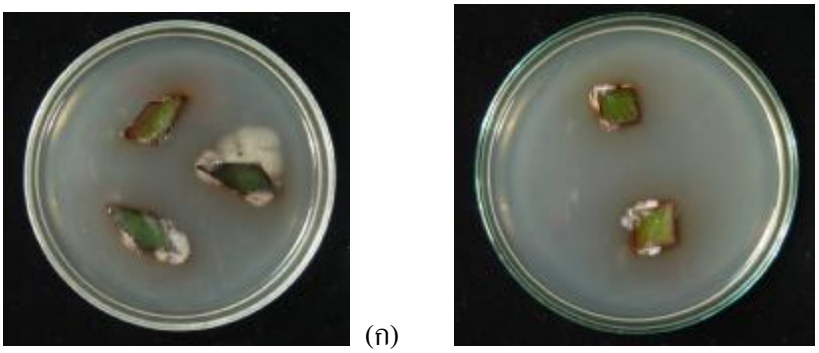
ตารางที่ 1 รายละเอียดการเก็บตัวอย่างพืชสกุล *Garcinia*

พืชสกุล ***Garcinia***	ชื่อพื้นเมือง	รหัสพืช	รหัสสำหรับพิพิธภัณฑ์พืช	สถานที่เก็บตัวอย่าง	วันที่เก็บตัวอย่าง	ลักษณะของพืช
Garcinia atroviridis	ส้มแขก	1GA	NR 003	อ. กาบัง จ. ยะลา	20 สิงหาคม 2547	ต้นอ่อนที่ทำการเพาะชำมาจากต้นใหญ่ ที่ขึ้นเองตามธรรมชาติ
G. atroviridis	ส้มแขก	2GA	NR 004	อ. สะเดา จ. สงขลา	20 สิงหาคม 2547	ต้นใหญ่ที่ขึ้นเองตามธรรมชาติ ต้นใหญ่อายุ 4 ปี สูงประมาณ 1.5 เมตร
G. atroviridis	ส้มแขก	3GA	-	จ.ยะลา	4 มกราคม 2548	ต้นสูงประมาณ 1-2 เมตร ขึ้นอยู่ในป่า
Garcinia dulcis	มะพูด, พูด	1GD	NR 001	วัดหินเกลี้ยง จ. สงขลา	28 กรกฎาคม 2547	ต้นสูงใหญ่ 4-5 เมตร อายุประมาณ 30 ปี
G. dulcis	มะพูด, พูด	2GD	NR 002	วัดทรายขาว จ. สงขลา	28 กรกฎาคม 2547	ต้นสูงขนาดกลาง 1-2 เมตร อายุประมาณ 6-7 ปี พบลูกมาก ขนาดเล็ก มีสีเขียวอ่อน มันวาว มียางสีเหลือง
G. dulcis	มะพูด, พูด	1Gd*	-	วัดหินเกลี้ยง จ.สงขลา	2 ธันวาคม 2547	ต้นเดียวกับ NR001
Garcinia mangostana	มังคุด	1GM	NR 007	แปลงเพาะปลูก คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	9 กุมภาพันธ์ 2548	ต้นสูงประมาณ 1-2 เมตร อายุประมาณ 3-5 ปี
G. mangostana	มังคุด	2GM	NR 008	สวนมังคุด จ.สุราษฎร์ธานี	17 เมษายน 2548	ต้นสูงใหญ่ ประมาณ 6-8 เมตร ลำต้นใหญ่ อายุ มากกว่า 30 ปี พบลูก สีม่วงอมแดง
G. mangostana	มังคุด	3GM	-	สวนมังคุด จ.สุราษฎร์ธานี	17 เมษายน 2548	ต้นสูงใหญ่ ประมาณ 6-8 เมตร ลำต้นใหญ่ อายุ มากกว่า 30 ปี
Garcinia nigrolineata	ชะมวง	1GN	NR 006	เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าโตนงาช้าง จ.สงขลา	18 ธันวาคม 2547	ต้นสูงใหญ่ 6-7 เมตร ไม่ทราบอายุแน่นอน ลำต้นมีสีน้ำตาลเปลือกแข็ง ใบมีขนาดเล็ก สีเขียวอ่อน พบดอกตูมขนาดเล็กสีเหลืองนวล
Garcinia scortechinii	-	1GS	NR 005	เขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าโตนงาช้าง จ.สงขลา	18 ธันวาคม 2547	ต้นสูงใหญ่ 7-8 เมตร ไม่ทราบอายุแน่นอน ลำต้นมีสีดำเข้ม เปลือกแข็ง มีคราบยาง พบดอก ขนาดเล็กประมาณ 0.3-0.5 ซม. ใบยาว สีเข้ม มันวาว

หมายเหตุ * = ทำการเก็บตัวอย่างซ้ำอีกครั้งที่ต้นเดิมคือต้น 1GD

2.2.2.2 การแยกเชื้อรา (ดัดแปลงจากวิธีของ Mekkamol and Whalley 1998)

นำตัวอย่างพืชที่ตัดเป็นชิ้นๆ มากำจัดเชื้อบริเวณผิว โดยแช่ใน 95% ethanol นาน 30 วินาที หลังจากนั้นนำไปแช่ใน 5% sodium hypochlorite นาน 5 นาที แล้วนำไปแช่ใน 95% ethanol อีกครั้ง นาน 30 วินาที นำตัวอย่างมาล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว นาน 3-5 วินาที แล้วจึงนำตัวอย่างพืชไปวางบนอาหาร corn meal agar (CMA) ที่เติมยา tetracycline และ ampicillin ความเข้มข้น 50 mg/L นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 25 ^{0}C เป็นเวลา 3-5 วัน สังเกตผลทุกวัน เมื่อพบว่ามีการเจริญของเชื้อรางอกมาจากชิ้นตัวอย่างพืช (รูปที่ 15) ให้ทำการตัดส่วน hyphal tip ของเชื้อรา ภายใต้กล้อง stereo zoom นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะ โดยทำการเก็บตัวอย่างเชื้อราเป็นเวลา 7 วัน นับจากวันแรกที่พบการงอกของเชื้อราจากชิ้นตัวอย่าง เมื่อแยกได้เชื้อราบริสุทธิ์แล้วทำการเก็บเชื้อใน 15% glycerol แล้วนำไปแช่ใน deep freezer อุณหภูมิ -80 ^{o}C



(ก) (ข)

รูปที่ 15 การแยกเชื้อราเอนโดไฟท์จากตัวอย่างพืชสกุล *Garcinia* บนอาหารCMA ที่ผสมยาปฏิชีวนะที่อุณหภูมิ 25 ^{0}C เป็นเวลา 5 วัน
(ก) : ชิ้นส่วนพืชบริเวณ lamina (ข) : ชิ้นส่วนพืชบริเวณ vein

2.2.3 การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ในอาหารเหลวเพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

นำราเอนโดไฟท์ที่แยกได้ ซึ่งมีลักษณะของ colony ที่แตกต่างกัน นำมาเพาะเลี้ยงใน PDA ที่ 25 ^{0}C นาน 3-4 วัน หรือจนกว่าจะพบว่ามีการเจริญของ colony ของเชื้อรา ใช้ใบมีดผ่าตัดจุ่ม 95% ethanol นำไปผ่านไฟ แล้วรอให้เย็น หลังจากนั้นนำไปตัดชิ้นส่วนบริเวณขอบ colony ให้มีขนาดชิ้นละ 1x1 ตารางเซนติเมตร จำนวน 5 ชิ้น แล้วทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว PDB ปริมาตร 300 ml ที่บรรจุใน flask ขนาด 500 ml นำไป incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (รูปที่ 16) ทำการเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อราในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 เพื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้น

รูปที่ 16 การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ในอาหารเหลว PDB ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 สัปดาห์ สำหรับนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

2.2.4 การสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อราด้วยตัวทำละลายทางเคมี เพื่อหาสารยับยั้งจุลินทรีย์

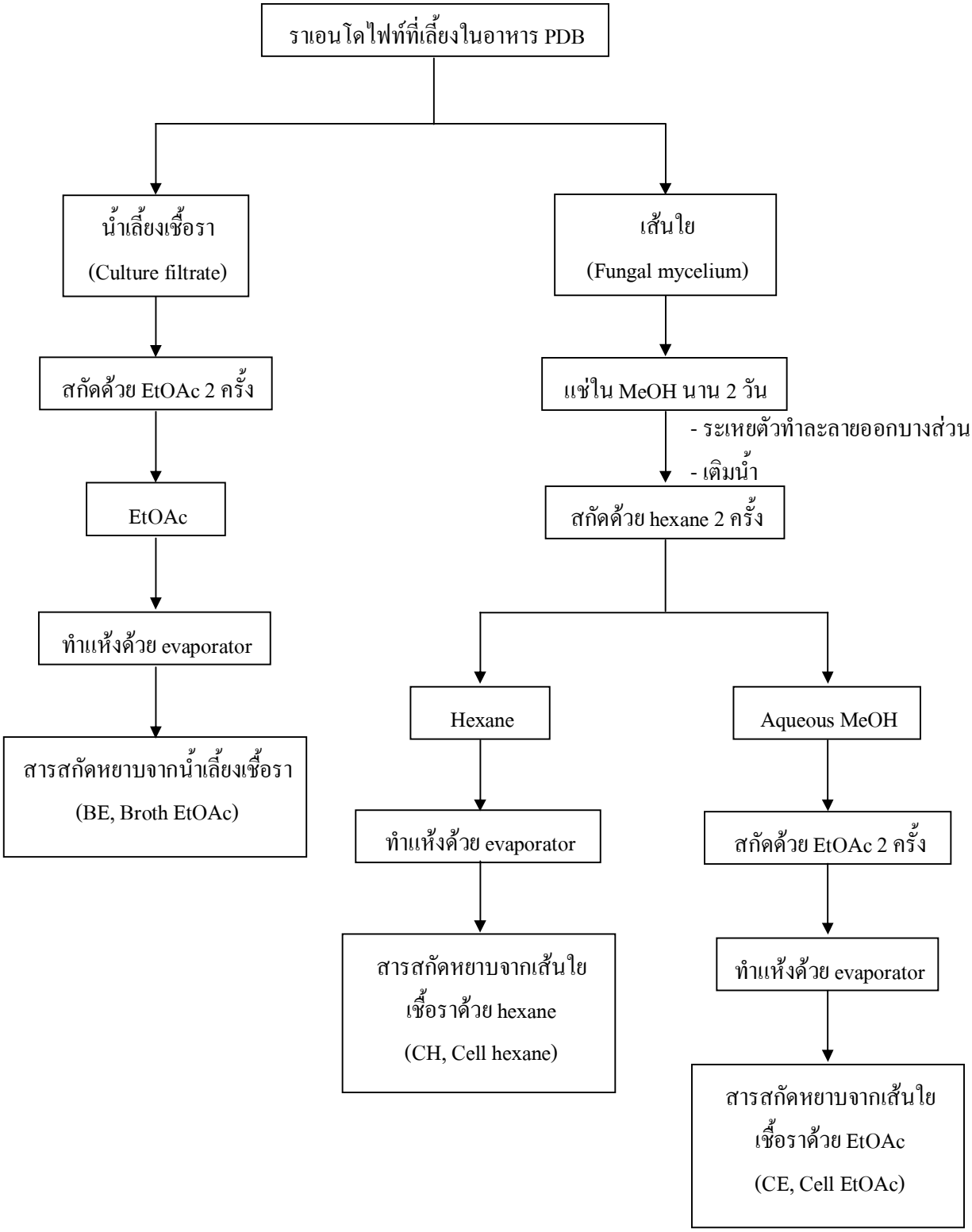
เมื่อพบว่าน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ใด สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ได้ จะนำไปสกัดด้วยตัวทำละลายทางเคมี เพื่อหาสารต้านจุลินทรีย์ที่ราเอนโดไฟท์ชนิดนั้นๆ สร้างขึ้น (รูปที่ 17) โดยทำการกรองแยกเส้นใยของเชื้อรา โดยกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และทำการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อรา (culture fitrate) และเส้นใยของเชื้อรา (fungal mycelium)

2.2.4.1 การสกัดน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์

ทำการสกัดโดยใช้ ethyl acetate (EtOAc, AR grade) โดยผสมน้ำเลี้ยงเชื้อรา กับ EtOAc ในอัตราส่วน 2:1 ในกรวยแยก (separatory funnel) แล้วเขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น โดยที่ EtOAc จะลอยอยู่ด้านบน และน้ำเลี้ยงเชื้อราอยู่ด้านล่าง หลังจากนั้นทำการแยกน้ำเลี้ยงเชื้อราที่สกัดแล้วออกมา แล้วเท EtOAc ไว้ใน flask อีกใบหนึ่ง นำน้ำเลี้ยงเชื้อราไปสกัดด้วย EtOAc ซ้ำอีกครั้ง แล้วนำ EtOAc ที่ได้จากการสกัดทั้งสองครั้งมารวมกัน แล้วใส่สารกำจัดน้ำ (dehydrating agent) คือ sodium sulphate anhydrous ลงไป เขย่า หลังจากนั้นกรองสารละลาย EtOAc ที่ได้โดยใช้สำลี ใส่สารละลาย EtOAc ที่กรองได้ในขวดรูปลูกแพร์ แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิประมาณ 40-45 ^{0}C หลังจากสารแห้ง ทำการเก็บสารสกัดใน vial แล้วทำการปั๊มด้วย vacuum pump เมื่อสารแห้งสนิท ได้สารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ (BE, Broth EtOAc) แล้วจึงนำไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ และตรวจองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นด้วย TLC และ ^{1}H NMR ต่อไป

2.2.4.2 การสกัดเส้นใยของราเอนโดไฟท์

ทำการสกัดคล้ายกับการสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อรา โดยนำเส้นใยของเชื้อราแช่ใน methanol (MeOH, commercial grade) เป็นเวลา 2 วัน นำสารละลาย MeOH ไปทำให้เข้มข้นโดยระเหยตัวทำละลายบางส่วนออกไป จากนั้นเติมน้ำลงไป แล้วสกัดด้วย hexane (AR grade) ในอัตราส่วน 2:1 โดยทำการสกัดซ้ำ 2 ครั้ง แล้วนำ hexane ที่ได้จากการสกัดไปทำแห้ง หลังจากนั้นนำสารละลาย aqueous MeOH ที่ผ่านการสกัดด้วย hexane แล้ว นำไปสกัดต่อด้วย EtOAc ในอัตราส่วน 2:1 เช่นกัน โดยสกัดด้วย EtOAc 2 ครั้ง ซึ่งจากการสกัดดังกล่าวจะได้สารสกัด 2 ส่วน คือ CH (Cell hexane) และ CE (Cell EtOAc) ตามลำดับ นำไปทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ และตรวจองค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้นด้วย TLC และ ^{1}H NMR ในการศึกษาครั้งนี้ทำการสกัดเส้นใยเชื้อราบาง isolate เท่านั้น



รูปที่ 17 แผนภูมิการสกัดทางเคมีของราเอนโดไฟท์ ด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

2.2.5 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์

2.2.5.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เบื้องต้น สำหรับน้ำเลี้ยงเชื้อรา ด้วยวิธี agar well diffusion (Lorian, 1996)

2.2.5.1.1 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อยีสต์

เตรียม inoculum ด้วยการ streak เชื้อแบคทีเรีย *S. aurues* ATCC29523, MRSA, *E. coli* ATCC25922 และ *P. aeruginosa* ATCC27853 บน NA และเชื้อยีสต์ *C. albicans* ATCC90028 และ *C. neoformans* ATCC90012 บน SDA แล้วนำไป incubate ที่ 35 ^{0}C นาน 18-24 ชั่วโมง ยกเว้น *C. neoformans* ATCC90012 incubate ที่อุณหภูมิห้อง นาน 48 ชั่วโมง เมื่อพบว่ามีการโตของเชื้อจุลินทรีย์ ให้ทำการเขี่ยเชื้อ 3-5 single colonies ลงในอาหาร NB สำหรับแบคทีเรีย และ SDB สำหรับเชื้อยีสต์ นำไป incubate ไว้ที่ 35 ^{0}C 3-5 ชั่วโมง ใน shaker incubator เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เพื่อให้เชื้อโตอยู่ในช่วง log phase หลังจากนั้นนำมาปรับให้ได้ความขุ่น 0.5 และ 2.0 McFarland standard สำหรับแบคทีเรีย และยีสต์ตามลำดับด้วย NSS ทำการลงเชื้อโดยใช้ sterile cotton swab จุ่มเชื้อ แล้วบิดให้หมาด ทำการ swab ให้ทั่ว plate อาหารที่มีความหนา 4 mm โดยแบคทีเรียใช้อาหาร MHA และยีสต์ใช้ SDA plate หลังจากลงเชื้อแล้ว จึงทำการเจาะวุ้นอาหารด้วยปลายที่จับของ Pasteur's pipette ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm 17 หลุมต่อ plate หลังจากนั้นหยอดน้ำเลี้ยงเชื้อของราเอนโดไฟท์ที่เพาะเลี้ยงใน PDB ที่อายุ 2 และ 3 สัปดาห์ ปริมาตร 80 µl ลงในหลุมที่เจาะไว้แล้ว โดยชุดควบคุมทดสอบด้วยแผ่นยาปฏิชีวนะ สำหรับแบคทีเรีย *S. aureus* ใช้ยา vancomycin 30 µg/แผ่น *E. coli* ATCC25922 และ *P. aeruginosa* ATCC27853 ใช้ยา gentamicin 10 µg/แผ่น ส่วนยีสต์ใช้ amphotericin B 10 µg/แผ่น จากนั้นนำไป incubate ที่ 35 ^{0}C 18-24 ชั่วโมง แต่สำหรับ *C. neoformans* ATCC90012 นำไป incubate ที่อุณหภูมิห้อง นาน 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาจึงทำการอ่านผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone โดยใช้ Vernier caliper หน่วยการวัดเป็น mm

2.2.5.1.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา (ดัดแปลงจากวิธีของ Huang *et al.*, 2000)

เตรียม inoculum ของเชื้อรา โดยเลี้ยง *M. gypseum* บนอาหาร SDA นำไป incubate ที่ 25 ^{0}C 3-4 วัน ให้ได้ colony ที่มีลักษณะกลม และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 cm หลังจากนั้นใช้ Pasteur's pipette เจาะวุ้นอาหารที่อยู่รอบ colony ของเชื้อรา *M. gypseum* ให้ห่างจากขอบของ colony ประมาณ 0.5 cm แล้วหยอดน้ำเลี้ยงเชื้อของราเอนโดไฟท์ที่เพาะเลี้ยงใน PDB ที่อายุ 2 และ

3 สัปดาห์ ปริมาตร 80 µl ลงในหลุมที่เจาะไว้แล้ว โดยทดสอบควบคุมด้วยยา miconazole nitrate (30 µg/แผ่น) แล้วจึงนำไป incubate ที่ 25 ^{0}C เป็นเวลา 3-4 วัน สังเกตผลการยับยั้งเชื้อทุกวัน หากมีการยับยั้งจะพบ inhibition zone เป็นรอยเว้าหรือพบว่าเชื้อไม่สามารถเจริญเลยหลุมไปได้

2.2.5.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ สำหรับสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ โดยวิธี agar disc diffusion (Lorian, 1996)

นำสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์มาละลายด้วย DMSO ให้ได้ความเข้มข้น 10 mg/ml เก็บไว้เป็น stock solution ที่อุณหภูมิ -20 ^{0}C แล้วทำการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์เช่นเดียวกับวิธี agar well diffusion แต่จะใช้ sterile blank disc (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm) วางบนผิวหน้าของวุ้นอาหาร แทนการเจาะหลุม แล้วทำการหยดสารสกัด (10 mg/ml) ปริมาตร 10 µl ทำให้ได้ปริมาณสารสกัด 100 µg/แผ่น แล้วทำการ incubate วัดขนาดของ inhibition zone นำสารสกัดที่ให้ค่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ inhibition zone มากกว่าหรือเท่ากับ 8 mm ไปทดสอบเพื่อหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC)

2.2.5.3 การหาค่า MIC ของสารสกัดหยาบจากน้ำเลี้ยงราเอนโดไฟท์ โดยวิธี agar microdilution (Lorian, 1996)

2.2.5.3.1 การเตรียมยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน

ชั่งยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน (standard antibiotic) โดยใช้เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง สำหรับยา vancomycin, gentamicin เตรียมความเข้มข้นเริ่มต้น 16 mg/ml ส่วนยา amphotericin B เตรียม 10 mg/ml หลังจากนั้นละลายยาโดยใช้น้ำกลั่นไร้เชื้อ แบ่งใส่หลอด eppendorf แล้วเก็บไว้เป็น stock solution ที่อุณหภูมิ -20 ^{0}C

2.2.5.3.2 การทดสอบหาค่า MIC ต่อเชื้อแบคทีเรีย

ทำการเตรียม inoculum แบบเดียวกับการทดสอบ agar well diffusion test สำหรับยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน เพื่อใช้ควบคุมในการทดสอบ จะใช้ยา vancomycin สำหรับเชื้อ *S. aureus* ATCC25922 และ MRSA และใช้ gentamicin สำหรับเชื้อ *E. coli* ATCC29523 และ *P. aeruginosa* ATCC27853 โดยเจือจาง 1:50 จาก stock solution ด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อ ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 0.32 mg/ml (320 µg/ml) แล้วนำไปเจือจางแบบ 2 fold dilution ทั้งหมด 10 ความเข้มข้น

สำหรับสารสกัดหยาบจากราเอนโดไฟท์ ทำการทดสอบที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.512 mg/ml (512 µg/ml) เตรียมโดยเจือจางจาก stock solution (10 mg/ml) ให้ได้ความเข้มข้น 5.12 mg/ml แล้วเจือจางแบบ 2 fold dilution ทั้งหมด 10 ความเข้มข้น แล้วทำการผสมสารสกัดแต่ละความเข้มข้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยการดูดสารสกัดหยาบ 80 µl ผสมกับ MHA ที่หลอมเหลวที่อุณหภูมิประมาณ 45-60 ^{0}C ปริมาตร 720 µl (อัตราส่วน 1:10) จะทำให้ได้สารสกัดมีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 0.512 mg/ml (512 µg/ml) แล้วดูดอาหารที่ผสมแล้ว ใส่ในแต่ละหลุมของ microtiter plate หลุมละ 200 µl ความเข้มข้นละ 3 หลุม ซึ่งสารสกัดหยาบจะมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 512-1 µg/ml สำหรับยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน ทดสอบที่ความเข้มข้น 32-0.0625 µg/ml

ทำการเตรียมแบคทีเรีย ตามข้อที่ 2.2.4.1.1 โดยนำเชื้อมาปรับความขุ่นให้ได้ 0.5 McFarland standard แล้วเจือจางด้วย 0.85% NSS ในอัตราส่วน 1:200 แล้วนำไปหยดลงในแต่ละหลุม ของ microtiter plate หลุมละ 20 µl (จะได้เชื้อ 1x10^4 CFU/หลุม) โดยใช้ multichannel pipette และทำการทดสอบควบคุมสำหรับสารละลายด้วย DMSO (ที่ไม่มียา หรือสารสกัด) และทดสอบภาวการณ์ไร้เชื้อของอาหารด้วยการใส่แต่อาหารอย่างเดียว ไม่ต้องหยดเชื้อลง นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 35 ^{0}C 16-18 ชั่วโมง ยกเว้น vancomycin อ่านผลที่ 24 ชั่วโมง แล้วทำการอ่านค่า MIC ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้โดยไม่พบการเจริญของเชื้อบนผิวหน้าอาหาร

2.2.5.3.3 การทดสอบหาค่า MIC ต่อเชื้อยีสต์

ทำการทดสอบเช่นเดียวกับแบคทีเรีย แต่อัตราส่วนระหว่างสารสกัดหยาบกับอาหาร ใช้อัตราส่วน 1:50 โดยเตรียม inoculum แบบเดียวกับการทดสอบ disc diffusion test ยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน เพื่อใช้ควบคุมในการทดสอบ สำหรับเชื้อยีสต์จะใช้ยา amphotericin B โดยเจือจาง จาก stock solution ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 mg/ml (800 µg/ml) แล้วนำไปเจือจาง แบบ 2 fold dilution ทั้งหมด 10 ความเข้มข้น

ทำการเตรียมสารสกัดหยาบ ซึ่งจะทำการทดสอบที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.128 mg/ml (128 µg/ml)เตรียมโดยเจือจาง จาก stock solution (10 mg/ml) ให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 6.4 mg/ml แล้วเจือจาง แบบ 2 fold dilution ทั้งหมด 10 ความเข้มข้น แล้วจึงทำการผสมสารสกัดหยาบแต่ละความเข้มข้น กับอาหารเลี้ยงเชื้อหลอมเหลว ด้วยการดูดสารสกัด 16 µl ผสมกับ SDA หลอมเหลวที่อุณหภูมิประมาณ 45-60 ^{0}C ปริมาตร 784 µl (อัตราส่วน 1:50) จะทำให้ได้สารสกัดความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 0.128 mg/ml (128 µg/ml) แล้วดูดอาหารที่ผสมแล้ว ใส่ในแต่ละหลุมของ microtiter plate หลุมละ 200 µl ความเข้มข้นละ 3 หลุม ซึ่งจะทำให้ได้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบอยู่ในช่วง

128-0.25 µg/ml (เนื่องจากสารสกัดที่ได้มีปริมาณน้อย จึงเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 128 µg/ml) และสำหรับยาต้านจุลินทรีย์มาตรฐาน amphotericin B ทดสอบที่ความเข้มข้นต่ำ 16-0.03125 µg/ml

เตรียมเชื้อยีสต์โดยนำเชื้อมาปรับความขุ่นให้ได้ 2.0 McFarland standard แล้วเจือจางต่อด้วย 0.85% NSS อัตราส่วน 1:20 นำไปหยดลงในแต่ละหลุม ของ microtiter plate หลุมละ 20 µl (จะได้เชื้อ $1x10^4$ CFU/หลุม) โดยใช้ multichannel pipette ทำการทดสอบควบคุม DMSO และตรวจสอบภาวการณ์ไร้เชื้อของอาหารทำนองเดียวกัน นำ microtiter plate ไป incubate ที่ 35 ^{0}C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สำหรับ *C. albicans* ATCC9028 และที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับ *C. neoformans* ATCC90012 เมื่อครบกำหนดจึงทำการอ่านค่า MIC

2.2.5.3.4 การทดสอบหาค่า MIC ต่อเชื้อรา *M. gypseum*

ทดสอบหาค่า MIC โดยดัดแปลงจากวิธี broth dilution ของ NCCLS M38-A (NCCLS, 2002) โดยนำเชื้อ *M. gypseum* มาเพาะบนอาหาร SDA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ จากนั้นเตรียม spore suspension ให้ได้ความเข้มข้นของ spore $1x10^4$-$1x10^5$ cfu/ml นำสารสกัดที่ละลายใน DMSO มาเจือจางในอาหารเหลว SDB แบบ 2-fold dilution ใน 96-well microtiter plates (100 µl) แล้วเติม spore suspension ลงไปหลุมละ 100 µl ความเข้มข้นละ 3 หลุม จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดเท่ากับ 128-0.25 µg/ml นำไป incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง อ่านค่า MIC ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ ยาต้านราที่ใช้ทดสอบเปรียบเทียบคือ miconazole ทดสอบที่ความเข้มข้น 128-0.25 µg/ml

2.2.6 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological study)

2.2.6.1 Macroscopic morphological characters

เลือกศึกษาเฉพาะราเอนโดไฟท์ที่สร้างสารต้านจุลินทรีย์ หรือสร้างสารที่มี NMR profile น่าสนใจ โดยเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์บนอาหาร PDA แล้วศึกษาถึงลักษณะของเชื้อรา โดยสังเกตด้วยตาเปล่า และดูภายใต้กล้อง stereo zoom ลักษณะที่ศึกษาได้แก่ รูปแบบของ colony และเส้นใย สีของ colony อัตราการเจริญเติบโต ทำการถ่ายภาพบันทึกผลการสังเกต

2.2.6.2 Microscopic morphological characters

หากพบว่าราเอนโดไฟท์ชนิดใด มีโครงสร้างการสืบพันธุ์ (reproductive structure) จะทำการศึกษาโดยย้อมด้วยสี lactophenol cotton blue แล้วศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ศึกษาถึงลักษณะของการมี/ไม่มีผนังกั้น สีของเส้นใย การสร้าง spore และถ่ายภาพบันทึกผลการทดลอง

2.2.7 การจัดจำแนกเชื้อราด้วยข้อมูลทางพันธุกรรม

2.2.7.1 การเพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์เพื่อสกัด DNA

เพาะเลี้ยงราเอนโดไฟท์ใน flask ขนาด 250 ml ด้วยอาหาร PDB ปริมาตร 50 ml แล้ว incubate ไว้ที่อุณหภูมิ 25 ^{0}C เป็นเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ หรือจนกว่าจะพบว่าราเอนโดไฟท์มีการเจริญเติบโตเต็มที่ หลังจากนั้นนำเชื้อราที่ได้ไปกรองผ่านกรวยแก้วที่รองด้วยผ้าก๊อซที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ล้างเส้นใยเชื้อราด้วยน้ำกลั่นไร้เชื้อ (อุณหภูมิประมาณ 40-50 ^{0}C) อย่างน้อย 2 ครั้ง หรือจนกว่าเส้นใยเชื้อราจะสะอาด ซับน้ำออกจากเส้นใยเชื้อราให้มากที่สุดด้วยกระดาษทิชชู่ไร้เชื้อ แล้วถ่ายเส้นใยเชื้อราใส่ในครกบดยา (mortar) ไร้เชื้อ แล้วนำไปแช่ในตู้แช่เยือกแข็ง deep freezer -80 ^{0}C นาน 1-2 ชั่วโมง หรือที่อุณหภูมิ -20 ^{0}C ข้ามคืน จากนั้นบดเส้นใยเชื้อราให้ละเอียด เพื่อจะนำไปสกัด DNA ต่อไป

2.2.7.2 การสกัด DNA ด้วยวิธี CTAB method (ดัดแปลงจาก O' Donnell *et al*., 1997)

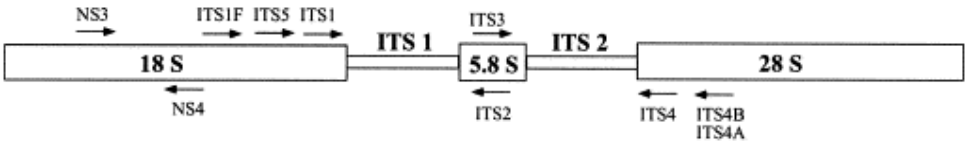
นำเส้นใยของเชื้อราที่บดจนได้เป็นผงละเอียด น้ำหนักประมาณ 50-100 mg ใส่ในหลอด microtube ขนาด 1.5 ml แล้วเติม CTAB lysis buffer ปริมาตร 500 µl ปั่นด้วย vortex mixer ผสมให้เข้ากันดี นำไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 70 ^{0}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิ 25 ^{0}C เป็นเวลา 10 นาที ถ่ายส่วนใส (supernatant) ใส่หลอดใหม่ เติมสารผสม phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) ในปริมาตรเท่ากัน แล้วเอียงหลอดไปมาเบาๆ เพื่อให้สารผสมเข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 ^{0}C เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติมสารผสม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ในปริมาตรที่เท่ากัน เอียงหลอดไปมาเบาๆ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงแบบเดิม หลังจากนั้นทำซ้ำขั้นตอนนี้อีกหนึ่งครั้ง หรือจนกว่าจะใส นำส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม 7.5 M ammonium acetate ครึ่งปริมาตรของส่วนใสและเติม absolute ethanol ที่แช่เย็นปริมาตร 650 µl นำไปแช่ที่อุณหภูมิ -20 ^{0}C เป็นเวลา 30 นาที หรือจนกว่าจะพบว่ามีการตกตะกอนของ DNA หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งไป ถ้าสามารถสกัด DNA ได้มากจะพบ DNA pellet สีขาวติดอยู่ก้นหลอด ล้าง DNA ที่ได้ 2 ครั้ง ด้วย 75% ethanol ที่แช่เย็น ปริมาตร 500 µl ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลาย DNA ที่ได้ด้วย 50 µl TE buffer หรือน้ำ nanopure ไร้เชื้อ เก็บ DNA ที่สกัดได้ ที่อุณหภูมิ -20 ^{0}C เพื่อรอใช้ในการศึกษาต่อไป

2.2.6.3 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของ DNA ที่สกัดได้

ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของ DNA ที่สกัดได้ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ใน TAE buffer ถ้าตรวจสอบแล้วมี band DNA เกิดขึ้น ทำการเจือจาง DNA ด้วยน้ำ nanopure ในอัตราส่วน 1:10 หรือ 1:100 ก่อนทำ PCR กรณีไม่พบ band DNA ให้นำตัวอย่าง DNA ไปใช้ทำ PCR ได้โดยไม่ต้องทำการเจือจาง

2.2.6.4 การเพิ่มปริมาณส่วน ITS1-5.8S-ITS2 (ITS) ของยีน rRNA โดยปฏิกริยา PCR

เพิ่มปริมาณส่วน ITS1-5.8S-ITS2 โดยใช้ universal fungal primers (White *et al*., 1990) ได้แก่ ITS5 (5' GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G 3') และ ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') ดังแสดงตำแหน่งในรูปที่ 18



รูปที่ 18 ตำแหน่งของส่วน ITS และบริเวณการจับของ primers (conserved region) ที่อยู่ในยีน ribosomal RNA ของเชื้อรา

2.2.6.4.1 การเตรียมส่วนผสมของ PCR (PCR mixture)

ชุดปฏิกิริยาของ PCR (ปริมาตรรวม 50 µl) จะบรรจุอยู่ในหลอด PCR ปริมาตร 0.2 ml ซึ่งรายละเอียดของส่วนผสม แสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR (PCR mixture)

ส่วนผสม	ความเข้มข้นเริ่มต้น	ปริมาตร (µl)	ความเข้มข้นสุดท้าย (ปริมาตรรวม 50 µl)
Nanopure water		38	
$MgCl_2$	50 mM	2.5	2.5 mM
PCR buffer	10X	5.0	1X
dNTPs mix	10 mM	1.0	0.2 mM
Forward primer	10 µM	1.0	0.2 µM
Reverse primer	10 µM	1.0	0.2 µM
Taq DNA polymerase	2 units/µl	0.5	0.2 units
DNA template	100-500 ng	1.0	2-10 ng

2.2.6.4.2 การทำปฏิกิริยา PCR

เมื่อทำการผสมส่วนผสมต่างๆ ดังตารางที่ 2 เรียบร้อยแล้ว นำไปทำปฏิกิริยาภายในเครื่อง PCR รุ่น MJ Research DYAD ALD 1244

2.2.6.4.3 PCR profile

ทำปฏิกิริยาตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

ขั้นที่ 1	94 ^{0}C	2 นาที
ขั้นที่ 2	94 ^{0}C	1 นาที
ขั้นที่ 3	55 ^{0}C	1 นาที
ขั้นที่ 4	72 ^{0}C	2 นาที
ขั้นที่ 5	ทำซ้ำขั้นที่ 2-4 ทั้งหมด 34 รอบ	
ขั้นที่ 6	72 ^{0}C	10 นาที

2.2.6.5 การตรวจสอบปริมาณของ PCR product ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis

ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของ PCR product ที่ได้ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยผสม PCR product ปริมาตร 3 µl กับ 6X loading dye ปริมาตร 3 µl แล้วตรวจสอบใน 1% agarose gel ที่แช่อยู่ใน TAE buffer กระแสไฟฟ้า 100 volts นาน 30-40 นาที ย้อม agarose gel ด้วย ethidium bromide (ความเข้มข้นสุดท้าย $2.5x10^{-5}$ mg/ml) เป็นเวลา 10 นาที แล้วตรวจสอบ PCR product ภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง UV transilluminator และบันทึกภาพโดยใช้ Gel Documentation (Syngene Gene Genius)

2.2.6.6 การกำจัดสิ่งเจือปนใน PCR product (PCR product purification)

ทำการกำจัดสิ่งเจือปนใน PCR product ที่ได้จากปฏิกริยา PCR ด้วยชุด Nucleospin® Extract DNA purification kit (Macherery-Nagel, Cat. No. 740 609.50) ตามคำแนะนำในคู่มือ โดยเริ่มจากนำ PCR product ผสมกับ binding buffer แล้วหยดลงใน Nucleospin column ที่ตั้งอยู่ใน collecting tube ขนาด 2 ml แล้วนำไปหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จะทำให้ PCR product ถูกจับอยู่บน membrane ใน Nucleospin column หลังจากนั้นเติม washing buffer แล้วนำไปหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำขั้นตอนนี้อีกครั้ง เทของเหลวที่อยู่ด้านล่างทิ้งไป เติม elution buffer แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง อย่างน้อย 1 นาที แล้วนำ Nucleospin column ไปใส่หลอด microtube แล้วนำไป centrifuge เพื่อให้ DNA ตกลง

มาในหลอด microtube ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของ DNA ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis อีกครั้ง หลังจากนั้นจึงทำการส่ง DNA ไปอ่านลำดับเบส DNA (DNA sequencing) ต่อไป

2.2.6.7 การอ่านลำดับเบส DNA (DNA sequencing)

ทำการส่ง PCR products ที่กำจัดสิ่งปนเปื้อนแล้ว ไปทำการอ่านลำดับเบส DNA ที่บริษัท Macrogen Inc. ประเทศเกาหลี ซึ่งทางบริษัทดังกล่าวจะส่งผลของ DNA sequence ของราเอนโดไฟท์กลับมาในรูปแบบไฟล์ข้อมูล สำหรับใช้วิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ต่อไป

2.2.6.8 การจัดเรียงลำดับเบส DNA (multiple sequence alignment)

ทำการตรวจสอบลักษณะและคุณภาพของลำดับเบส DNA ส่วน ITS ของราเอนโดไฟท์ โดยใช้โปรแกรม BioEdit V.7.0.5 (Hall, 2005) หลังจากนั้นนำลำดับเบส DNA ที่ได้ ใส่โปรแกรม BLAST search จากฐานข้อมูลของ GenBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) เพื่อหาเชื้อราที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันมากที่สุด แล้วนำลำดับเบส DNA ของราเอนโดไฟท์ มาจัดเรียงเปรียบเทียบกับลำดับเบส DNA ของเชื้อราอื่นๆ ที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน โดยใช้โปรแกรม BioEdit V.7.0.5 (Hall, 2005) ทำการจัดเรียงข้อมูลลำดับเบส DNA บางส่วนของ alignment ที่โปรแกรมคอมพิวเตอร์ไม่สามารถจัดเรียงได้ดีอีกครั้ง (manual adjustment) หาค่า %Identity ส่วน ITS ของราเอนโดไฟท์โดยเปรียบเทียบกับลำดับเบส DNA ที่มีความใกล้เคียงที่สุด แล้วจึงทำการแปลงไฟล์ข้อมูลเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของราเอนโดไฟท์ในขั้นตอนต่อไป

2.2.6.9 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis)

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของราเอนโดไฟท์ กับเชื้อราที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียง โดยใช้โปรแกรม PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002) โดยใช้วิธีการวิเคราะห์แบบ maximum parsimony (100 replicates stepwise addition of sequence) โดยกำหนดให้ช่องว่างในลำดับเบส DNA (gap) เป็น missing data และกำหนดให้ลำดับเบส DNA ทุกตัวที่ใช้เป็น character มีน้ำหนักและความสำคัญเท่ากัน ซึ่งจะทำให้ได้ Most Parsimonious Trees (MPTs) คำนวณค่าสถิติซึ่งประกอบด้วย tree length, Consistency Index (CI), Retention Index (RI) และค่าความเชื่อมั่น bootstrap ตามลำดับ เลือก MPTs ที่แสดงถึง topology ที่ดีที่สุด จากวิธีทางสถิติ K-H test (Kishino and Hasegawa, 1989)