รายงานการวิจัย

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอในเห็ดบางชนิดของสกุล *Pleurotus*

(Studies on DNA fingerprinting of some species of the genus *Pleurotus*)

พรรณี ฐิตาภิชิต

หัวหน้าโครงการวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณจิราพร นิลฉวี นักศึกษาระดับปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งเป็นนักศึกษาผู้ร่วมโครงการวิจัย ที่ได้ช่วยทำการทดลองตลอดจนพิมพ์ต้นฉบับ ขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2543 ท้ายสุดขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่อนุญาตให้ใช้อุปกรณ์การวิจัยและห้องปฏิบัติการ

พรรณี ฐิตาภิชัต

กุมภาพันธ์ 2545

RQH
QK
617
W 2725
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 43267
วัน, เดือน, ปี 15 ส.ค. 2545

b 11203092
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

ได้ทำการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเห็ดจำนวน 8 ชนิด(10 สายพันธุ์) ของสกุล *Pleurotus* โดยใช้เทคนิค PCR/RFLP การทดลองเริ่มจากการเพิ่มปริมาณ rDNA ในช่วง ITS ซึ่งเป็นช่วงที่มีลำดับเบสของดีเอ็นเอแตกต่างกันไปในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ขั้นต่อไปทำการตัด ผลผลิต PCR ที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*fI และ *Hae*III ผลการศึกษาพบว่าสามารถแบ่งเห็ดกลุ่มนี้ตามความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วย เห็ดนางฟ้า สายพันธุ์ 1 และ สายพันธุ์ 2 เห็ดนางรมฮังการี เห็ดนางรม เห็ดนางรมหลวง และ เห็ดเป๋าฮื้อ ส่วนกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย เห็ดนางฟ้าภูฐาน สายพันธุ์ 0 และ สายพันธุ์ 1 สำหรับเห็ดนางรมสีทอง และ เห็ดนางนวลไม่อาจจัดเข้ากลุ่มใดๆ ซึ่งผลการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดดังกล่าวมานี้โดยรวมแล้วเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ABSTRACT

Patterns of DNA fingerprinting of 8 species(10 strains) of the genus *Pleurotus* were studied using the techniques PCR/RFLP. The experiments were begun with the increasing of rDNA in the region of ITS by using the primers ITS1 and ITS4, followed by cutting the PCR products with *Hin*fI and *Hae*III as the restriction enzymes. The results found that these species could be divided into two groups according to their genetical relationships. Group I contained *P. sajor-caju* strain 1 and strain 2, *P. hungarian*, *P. ostreatus*, *P. eryngii* and *P. cystidiosus*, group II contained *P. Butan* strain 0 and strain 1, while *P. falabellatus* and *P. citrinopileatus* could not be grouped into any of these two groups. These DNA fingerprinting patterns were in general relevant to the morphological results.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
ABSTRACT	ข
สารบัญเรื่อง	ค
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย	1
วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย	1
วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุป	2
ทฤษฎีและ/หรือแนวความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย	3
การจัดหมวดหมู่ (classification) และลักษณะ โดยทั่วไปของเห็ดสกุล *Pleurotus*	3
ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ	3
ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction)	4
Restriction Fragment length Polymorphism	7
หลักการและปัจจัยในการทำอิเล็กโทร โฟรีซิส	9
Ribosomal DNA (rDNA)	11
วิธีดำเนินการวิจัย	14
วัสดุและอุปกรณ์	14
1. เชื้อจุลินทรีย์	14
2. สารเคมี	14
3. อุปกรณ์	15
วิธีการวิจัย	16
ก. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ	16
1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเห็ด	16
2. การเพาะเลี้ยงเส้นใยเพื่อสกัดดีเอ็นเอ	16
3. การสกัดดีเอ็นเอ	17
4. การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ	17
5. การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. การทำ RFLP และการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส 19
ข. การศึกษาสัณฐานวิทยาของเห็ดในสกุล *Pleurotus* 19
ผลการวิจัย 20
การวิเคราะห์ผลของ RFLP ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*fI 21
การวิเคราะห์ผลของ RFLP ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III 22
การสร้าง phylogenic tree จากการวิเคราะห์ผลของ PCR/RFLP 23
สรุปและข้อเสนอแนะ 24
บรรณานุกรม 25
ภาคผนวก 27
1. การเตรียมบัฟเฟอร์และสารเคมี 27
2. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 29
3. การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส 30
4. สัญฐานวิทยาของเห็ดในสกุล *Pleurotus* 31
5. ตัวอย่างเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ 34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมายและจำนวนรอบ	7
ตารางที่ 2	ความเข้มข้นของเกลือในบัฟเฟอร์ต่างๆ ที่ใช้ในเอนไซม์ตัดจำเพาะ	9
ตารางที่ 3	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของอะกาโรสเจลกับขนาดของดีเอ็นเอ	11
ตารางที่ 4	ลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ ของไพรเมอร์บางชนิดที่ใช้เพิ่มปริมาณ rDNA ในบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) region primers	13

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	6
ภาพที่ 2	การเรียงตัวของยีนไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอบนสายดีเอ็นเอ	12
ภาพที่ 3	บริเวณที่ไพรเมอร์จะเข้าจับกับ rDNA ในบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) region primers	12
ภาพที่ 4	ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 บนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 1.5%	20
ภาพที่ 5	ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 และทำการตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*fI บนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 2.0%	21
ภาพที่ 6	ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 และทำการตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III บนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 2.0%	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

เห็ดสกุล *Pleurotus* เป็นเห็ดที่พบได้มากชนิด (หรือพรรณ, species) และพบได้บ่อยมากในธรรมชาติรวมทั้งเป็นเห็ดสกุลที่มีการเพาะเลี้ยงเชิงการค้ามากที่สุด ตัวอย่างที่เพาะเลี้ยงในเชิงการค้าได้แก่ เห็ดนางฟ้า (*P. sajor-caju*, sajor-caju mushroom), เห็ดเป๋าฮื้อ (*P. cystidiosus* Hon *et. al.* Sp. Nov, abolone mushroom) และเห็ดนางรม (*P. ostreatus* (Fr.) Kummer, oyster mushroom) นอกจากนี้ยังมีเห็ดสกุล *Pleurotus* ชนิดอื่นๆ ที่เพาะเลี้ยงในเชิงการค้าแต่ยังไม่มีชื่อของชนิดที่ถูกต้องแน่นอน เช่น เห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดเป๋าฮื้อดำ เห็ดเป๋าฮื้อเหลือง เห็ดเป๋าฮื้อญี่ปุ่น และเห็ดเป๋าฮื้ออินเดีย เป็นต้น อย่างไรก็ตามงานอนุกรมวิธานโดยการศึกษารูปร่างลักษณะ (morphology) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กันมาตั้งแต่ดั้งเดิม (conventional method) เป็นงานที่ค่อนข้างน่าเบื่อหน่ายและไม่สามารถแยกความแตกต่างของกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่มีลักษณะใกล้เคียงกันมาก เช่น สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตถึงระดับสกุล (genus) ได้ดี แต่ในระดับชนิด (species) หรือโดยเฉพาะอย่างยิ่งระดับสายพันธุ์ (strain,variety) จะไม่สามารถแยกความแตกต่างได้เสมอไป ดังนั้นในปัจจุบันเมื่อความรู้ทางด้านชีวเคมีและพันธุศาสตร์ระดับอณูเจริญเติบโตขึ้นมามาก การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ (isozyme pattern) และลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprinting) จึงเข้ามามีบทบาทในการช่วยจัดจำแนกความหลากหลายระหว่างชนิดของสิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะอย่างยิ่งวิธีการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอนับวันจะได้รับความนิยมในการจัดจำแนกเพื่อประกอบการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ (biodiversity) ของสิ่งมีชีวิตเกือบทุกประเภท

วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

1. เพื่อศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเห็ดจำนวน 8 ชนิด (10 สายพันธุ์) ในสกุล *Pleurotus* ดังต่อไปนี้:-เห็ดเป๋าฮื้อ (*P. cystidiosus*), เห็ดนางฟ้าภูฐาน (*P. butan*) สายพันธุ์ 0 และ สายพันธุ์ 1, เห็ดนางรมสีทอง (*P. citrinopileatus*), นางรมหลวง (*P. eryngii*), เห็ดนางนวล (*P. flabellatus*), เห็ดนางรมฮังการี (*P. hungarian*), เห็ดนางรม (*P. ostreatus*), และ เห็ดนาง-ฟ้า (*P. sajor-caju*) สายพันธุ์ 1 และ 2
2. เพื่อเป็นแนวทางร่วมกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา(ทางอนุกรมวิธาน) ในการพิสูจน์ความแตกต่างและหรือความคล้ายคลึงกันเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างเห็ดชนิดต่างๆเหล่านี้ของสกุล *Pleurotus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุป

ก. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอในงานวิจัยนี้ จะใช้วิธี PCR/RFLP โดยมีขั้นตอนต่อไปนี้

1. เพาะเลี้ยงเส้นใยจากเนื้อเยื่อเห็ด
2. ขยายปริมาณเส้นใยเพื่อเตรียมเส้นใยสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ
3. สกัดดีเอ็นเอ
4. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบนส่วนของ ITS บน rDNA โดยการทำปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction,PCR)
5. ศึกษารูปแบบดีเอ็นเอ (DNA polymorphism) โดย ตัดผลผลิต PCR ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ
6. สร้างแผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ (phylogenetic tree) ระหว่างเห็ด 8 ชนิดนี้ (และระหว่างสายพันธุ์ของเห็ดชนิดเดียวกัน) รวมทั้งเปรียบเทียบกับเห็ดขอนขาว (*Lentinus squarrosulus*) ซึ่งเป็นเห็ดต่างพวก (สกุล)

ข. การศึกษาทางอนุกรมวิธาน

ทำการศึกษาสัณฐานวิทยาของเห็ดแต่ละชนิดเพื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาด้านลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้ทราบถึงความผันแปรทางพันธุกรรม ระหว่างเห็ดเป๋าฮื้อ เห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดนางรมสีทอง เห็ดนางรมหลวง เห็ดนางนวล เห็ดนางรมฮังการี เห็ดนางรม และ เห็ดนางฟ้า
2. เป็นการกระตุ้นให้มีการใช้เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลในการศึกษาการจำแนกสายพันธุ์เห็ดรา
3. เป็นการสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ด้านชีววิทยาระดับโมเลกุลของเห็ดรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทฤษฎีและ/ หรือแนวความคิดที่นำมาใช้ในการวิจัย

การจัดหมวดหมู่ (classificaton) และลักษณะโดยทั่วไปของเห็ดในสกุล *Pleurotus*

เห็ดในสกุล *Pleurotus* ถูกจัดจำแนกตาม Singer (1975), Smith (1978) และ Moore-Landcker (1990) เป็นหมวดหมู่ดังต่อไปนี้

Division Basidiomycota

Sub-division Basidiomycotina

Class Basidiomycetes

Sub-class Holobasidiomycetidae

Order Agaricales

Family Tricholomataceae

Genus Pleurotus

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดในสกุล *Pleurotus* ที่รายงานโดย Pegler (1983) มีดังต่อไปนี้ ดอกเห็ดขึ้นเป็นดอกเดี่ยว หรือ เป็นกลุ่ม ทรงดอกเป็นรูปทรงพัด (flabellate) หรือคล้ายเปลือกหอย (dimidiate) ก้านดอกเห็ด (stipe,stalk) มีลักษณะอวบสั้นและบางชนิดอาจจะไม่มีก้าน ผิวดอกด้านบนบางชนิดอาจจะพบเม็ดสี ครีบดอก (gills) เจริญล้ำเป็นแนวต่ำลงมาบนก้าน (decurrent) ขอบดอกเรียบหรืออาจมีลักษณะคล้ายซี่ฟัน (denticulate) อาจจะมีหรือไม่มีวงแหวน (partial veil, ring) ลักษณะเนื้อเยื่อ (context) ของดอกที่อยู่ภายในหมวกดอกและก้าน มีสีขาว สด และอ่อนนุ่ม เมื่อเจริญเต็มที่ เนื้อจะแน่นขึ้น มีระบบเส้นใยแบบ monomitic ซึ่งจะมีการเรียงตัวของเส้นใยเพียงแบบเดียว เส้นใยมีสีใส ส่วนของ generative hypha ไม่บวมโป่ง ผนังของเส้นใย หนา เส้นใยมีผนังขวางกั้น (septum) และมี clamp connection สปอร์พิมพ์ (spore print) มีสีขาว ครีม เทา ชมพูอ่อนหรือสีม่วงอ่อนแล้วแต่ชนิดของเห็ด รูปร่างของสปอร์โดยทั่วไปมีลักษณะยาวรี มี cystidium ชนิด pleurocystidium

สำหรับเห็ดแต่ละชนิด (species) ในสกุล *Pleurotus* จะแตกต่างกันในรายละเอียด เช่น สี และขนาดในส่วนประกอบต่างๆ ของดอกเห็ด (ภาคผนวก 4)

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ หรือ DNA fingerprinting มาจากคำว่า DNA และ fingerprinting ซึ่ง DNA ย่อมาจาก deoxyribonucleic acid ซึ่งเป็นแหล่งที่เก็บข้อมูลทางพันธุกรรม มีโมเลกุลยาว และเป็นส่วนประกอบหลักของโครโมโซม (chromosome) ของสิ่งมีชีวิต ดีเอ็นเอประกอบด้วยหน่วยย่อยคือนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ซึ่งมี 4 ชนิด คือ dATP (deoxyadenine triphosphate), dCTP

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(deoxycytosine triphosphate), dGTP (deoxyguanosine triphosphate) และ dTTP (deoxythymine triphosphate) องค์ประกอบทั้ง 4 นี้จะมาต่อกันเป็นสายดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นตัวควบคุมกิจกรรมต่างๆ ภายในเซลล์ เช่นการถ่ายทอดข้อมูลจากเซลล์หนึ่งไปสู่อีกเซลล์หนึ่ง หรืออาจจะกล่าวว่าดีเอ็นเอทำหน้าที่เป็นยีน(gene) ซึ่งจะส่งผลให้เกิดลักษณะเฉพาะของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (Lewin, 1993) โดยปกติดีเอ็นเอจะอยู่เป็นสายคู่ ดังนั้นหน่วยของดีเอ็นเอจึงเป็นคู่เบส (base pair, bp) ในเซลล์พวกยูคาริโอติก (eukaryotic cell) โมเลกุลของดีเอ็นเอมีลักษณะเป็นสายคู่อยู่รวมกับโปรตีน ที่เรียกว่า โครมาทิน (chromatin) หรือ โครโมโซม ซึ่งอยู่ภายในนิวเคลียสของเซลล์ ดีเอ็นเอที่พบในไมโทคอนเดรีย (mitocondria) และในคลอโรพลาสต์ (chloroplast) มีลักษณะเป็นวงแหวนสายคู่ ดีเอ็นเอ 98% จะพบในนิวเคลียส (อาภัสสรา, 2537) ส่วนคำว่า fingerprinting แปลได้ตรงตัวว่า ลายนิ้วมือ ดังนั้น การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ก็คือการตรวจสอบเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ดีเอ็นเอเป็นตัวบ่งบอกความแตกต่างในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (ยุคลธร, 2542)

การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 วิธีใหญ่ๆ คือ วิธีที่ใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) และวิธีที่ต้องตรวจสอบโดยการทำ hybridization (เช่น เทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism,RFLP) ซึ่งต่อมาได้มีการผสมผสาน 2 วิธีนี้เข้าด้วยกันและประยุกต์เป็นเทคนิคต่างๆ ทำให้ได้วิธีการที่มีชื่อใหม่ๆจำนวนมาก เช่น Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), DNA Amplification Fingerprinting (DAF) และ Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

สำหรับในเห็ดรานั้น การตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อพิสูจน์สายพันธุ์ยังมีการศึกษากันไม่มาก เช่น Jungehulsing และ Tudzynski (1997) ได้ทำการวิเคราะห์ความหลากหลายของสายพันธุ์เห็ดรา *Claviceps purpurea* ที่ทำให้เกิดโรค ergot of rye ในข้าวไรย์และพืชตระกูลหญ้าอื่นๆ รวม 29 สายพันธุ์ ผลการทดลองพบว่า วิธี RAPD เป็นวิธีการที่มีประโยชน์ต่อการตรวจสอบ (identification) สายพันธุ์ *C. purpurea* ได้ดีมาก และพบว่าในบรรดาเชื้อที่แยก (isolate) จากข้าวไรย์มีความผันแปรทางพันธุกรรมน้อยกว่าพวกที่แยกจากพืชตระกูลหญ้าอื่นๆ Bunzard และคณะ (1996)ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดสกุล Agaricus จำนวน 21 ชนิด 54 ตัวอย่าง โดยใช้วิธี PCR/RFLP พบว่าสามารถแบ่งเห็ดเหล่านี้ออกเป็น 4 กลุ่ม โดยที่เห็ดชนิด(species)เดียวกันจะถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยไม่จำเป็นต้องทำให้ดีเอ็นเอดังกล่าวบริสุทธิ์ก่อนและสามารถแยกส่วนของดีเอ็นเอที่สนใจได้โดยไม่ต้องนำไปขยายเพิ่มปริมาณในเซลล์หรือนำไปโคลน (clone) การทำ PCR คือ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ DNA polymerase ซ้ำกันหลายๆรอบเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณแบบ exponential

การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นได้จำเป็นต้องมีไพรเมอร์ (primer) 2 ชนิดที่มีเบสคู่สม (compliment) กับปลายทั้ง 2 ด้านของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ โดยไพรเมอร์จะเกาะกับดีเอ็นเอคนละสายและมีปลาย 3′และปลาย 5′ ในทิศทางเข้าหากันซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotide) ซึ่งโดยทั่วไปมีความยาวประมาณ 18-30 เบส ดังนั้นข้อกำหนดในการทำ PCR คือ ต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ซึ่งอาจจะทราบทั้งหมดหรือทราบเฉพาะส่วนปลาย เพื่อการออกแบบสังเคราะห์ไพรเมอร์มาใช้ในปฏิกิริยาต่อไป ทำให้บริเวณหรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณขึ้นจะมีขนาดความยาวเท่ากับชิ้นดีเอ็นเอจากปลายของไพรเมอร์หนึ่งถึงปลายของไพรเมอร์อีกชนิดหนึ่งนั่นเอง

ขั้นตอนการทำ PCR เริ่มจากการนำโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (ไพรเมอร์) ทั้งสองชนิด บัฟเฟอร์ และดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTP)ใส่รวมกับดีเอ็นเอที่สกัดได้ (genomic DNA) ดีเอ็นเอต้นแบบจะแยกเป็นสายเดี่ยวเมื่อได้รับความร้อน ขั้นต่อไปลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วเพื่อให้ไพรเมอร์เกิดเบสคู่สมกับส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ จากนั้นเปลี่ยนอุณหภูมิให้พอเหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase พร้อมทั้งใส่เอนไซม์ลงไปจะทำให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เมื่อปฏิกิริยาดำเนินครบทั้ง 3 ขั้นตอน โมเลกุลของดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ขั้นต่อไปจะทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นรอบที่ 2 ดังนั้น ถ้าดำเนินปฏิกิริยาซ้ำกันหลายๆ รอบ จำนวนผลผลิต (PCR product) จะคำนวณได้เท่ากับ 2^n (n = จำนวนรอบของปฏิกิริยา) ถ้าปฏิกิริยา PCR มีประสิทธิภาพ 100 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 1

การนำเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสไปใช้จะต้องคำนึงถึงสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดของปฏิกิริยาจากองค์ประกอบดังต่อไปนี้

1. ไพรเมอร์ต้องเป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้น มีความยาวประมาณ 18-30 เบส มีการเรียงลำดับเบสเป็นคู่สมกับ ปลาย 3′ และปลาย 5′ ของดีเอ็นเอต้นแบบ และควรมีปริมาณ G + C ใกล้เคียงกับชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ซึ่งควรมีปริมาณระหว่าง 50-60 เปอร์เซ็นต์

2. ความเข้มข้นของเอนไซม์ *Taq* DNA Polymerase ควรอยู่ในช่วง 0.5-5 units ต่อ µl ถ้าใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์มากเกินไปจะทำให้เกิดการสะสมของ nonspecific background แต่ถ้าความเข้มข้นของเอนไซม์ต่ำเกินไปจะทำให้เกิดผลผลิตที่ต้องการในปริมาณน้อย อุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ *Taq* DNA Polymerase อยู่ระหว่าง 75 – 80 องศาเซลเซียส (Fanning and Gibbs,1997)

3. ความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออน (magnesium ion) ควรอยู่ระหว่าง 0.5-2.5 mM ทั้งนี้เนื่องจากความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออนมีผลต่อปรากฏการณ์ต่างๆ ดังต่อไปนี้

3.1 การจับกันของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ

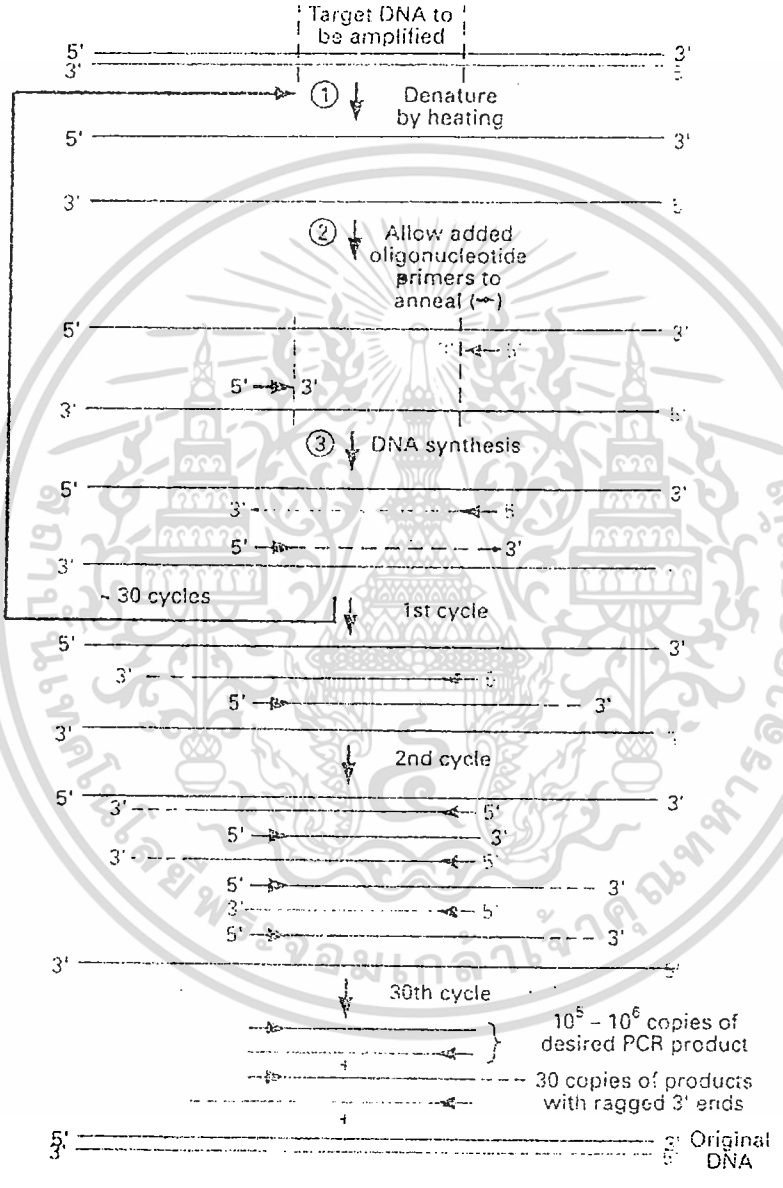
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 อุณหภูมิที่ทำให้เกิดการแยกออกจากกันของดีเอ็นเอต้นแบบ

3.3 ผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

3.4 ความจำเพาะของผลผลิตจากดีเอ็นเอต้นแบบ

3.5 ความถูกต้องในการทำงานของเอนไซม์



ภาพที่ 1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (ภาควิชาพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2542)

4. ความเข้มข้นของดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) ปกติควรอยู่ระหว่าง 50-200 μM ที่ pH 7.0 ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสความเข้มข้นของนิวคลีโอไท์แต่ละชนิดควรสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดุลกันอย่างพอเหมาะ เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างจำเพาะ ถูกต้อง ได้ผลผลิตสูง และลดความผิดพลาดในการเรียงลำดับเบสคู่สม

5. บัฟเฟอร์ที่ใช้สำหรับปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ประกอบด้วยสารต่อไปนี้

5.1 10-15 mM Tris-HCl ที่ pH 8.3-8.8 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

5.2 50 mM KCl เพื่อเร่งการจับกันของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ

5.3 เจลาติน และ โบวาย ซีรัม อัลบูมิน(bovine serum albumn , BSA) ซึ่งมีคุณสมบัติในการรักษาความคงสภาพของเอนไซม์

6. สภาวะที่เหมาะสมในแต่ละขั้นตอน

6.1 Denaturation เป็นขั้นตอนในการแยกดีเอ็นเอต้นแบบให้เกิดเป็นสายเดี่ยว อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 90 – 95 องศาเซลเซียส

6.2 Annealing เป็นขั้นตอนในการจับกันระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบที่ผ่านขั้นตอน denaturation มาแล้ว อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 50 – 60 องศาเซลเซียส

6.3 Extention เป็นขั้นตอนในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยต่อปลายกับไพรเมอร์ อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 72 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (วัชรีและมนตรี,2539)

7. ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมายที่เหมาะสมกับจำนวนรอบของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสได้แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมายและจำนวนรอบของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (วัชรีและมนตรี, 2539)

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย	จำนวนรอบ
3.0×10^5	25-30
1.5×10^4	30-35
1.0×10^3	35-40
50	40-45

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)หมายถึงความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (สุรินทร์, 2539) การทำ RFLP ทำโดยเริ่มจากการย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzymes) เอนไซม์ประเภทนี้จะสามารถจดจำลำดับเบสบนดีเอ็นเอที่จำเพาะและตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งนั้นๆ หลังจากนั้นจึงทำการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกันซึ่งได้ถูกตัดโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนแผ่นเจลจะได้แถบย่อยๆ มากมายทำให้ไม่สามารถแยกแถบย่อยแต่ละแถบได้ จึงต้องทำการย้ายดีเอ็นเอจากแผ่นเจลมาไว้บนแผ่นเมมเบรนฟิลเตอร์(membrane filter) หลังจากนั้นจึงนำไปตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจโดยนำไปจับคู่ (hybridize) กับ โพรบ (probe) ที่มีเบสคู่สมกัน ซึ่งโพรบ คือ ตัวตรวจสอบที่บ่งชี้ความแตกต่างของแต่ละจีโนม (genome) ซึ่งอาจจะเป็นดีเอ็นเอ หรืออาร์เอ็นเอ (Meyers, 1995) ปกติแล้วเทคนิค RFLP สามารถตรวจสอบได้กับทุกส่วนของสิ่งมีชีวิต และชนิดของโพรบที่มีจำนวนไม่จำกัด แต่วิธีการจะยุ่งยากและเสียค่าใช้จ่ายสูง (Morgante, 1994)

ปัจจุบันได้มีการประยุกต์วิธี RFLP ให้ง่ายขึ้นโดยไม่ต้องทำขั้นตอนการทำ hybridization โดยการนำเทคนิค PCR มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่มีลำดับเบสที่ต้องการศึกษาแล้วจึงนำผลผลิต PCR (PCR products)ที่ได้ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (= เทคนิค PCR/RFLP) ซึ่งในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้ใช้วิธีนี้

เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzymes หรือ restriction endonuclease) เป็นเอนไซม์ที่สกัดจากแบคทีเรีย ปัจจุบันสามารถแยกได้มากกว่า 400 ชนิด ทำหน้าที่ในการป้องกันดีเอ็นเอแปลกปลอมที่บุกรุกเข้าสู่เซลล์ ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้จะมีความจำเพาะต่อเบสบนดีเอ็นเอเพื่อป้องกันการย่อยตัวเอง การเรียกชื่อเอนไซม์จะใช้ระบบ 3 ตัวอักษร ตัวแรกเป็นตัวพิมพ์ใหญ่ซึ่งเป็นตัวอักษรแรกของชื่อสกุล ตัวที่ 2 และ 3 เป็นตัวพิมพ์เล็กซึ่งเป็น 2 ตัวอักษรแรกของชื่อชนิด ส่วนตัวเลขโรมันจะบอกถึงลำดับของเอนไซม์(ที่อาจจะมากกว่า 1 ชนิด) ที่แยกจากแบคทีเรียตัวนั้นๆ (ภาคผนวก 5)

อาจแบ่งเอนไซม์ตัดจำเพาะออกเป็น 3 ประเภท ดังต่อไปนี้

ประเภทที่ 1 เป็นเอนไซม์ที่ประกอบด้วยการทำงาน 2 อย่าง คือ การตัดจำเพาะ (restriction) และ การปรับปรุงแก้ไข (modification) ซึ่งการปรับปรุงแก้ไขจะอาศัยการทำงานของเอนไซม์เมธิเลส (methylase) โดยเติมหมู่เมธิล (methyl) ลงที่เบสอะดีนีน (adenine หรือ A) หรือเบสไซโตซีน(cytosine หรือ C) บนดีเอ็นเอ เพื่อป้องกันการตัดจำเพาะ ในการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้จะต้องการ ATP (Adenine triphosphate), S-adenosyl methionine และ แมกนีเซียม โดยจดจำเบสบนดีเอ็นเอที่ไม่ถูกเติมหมู่เมธิลและจะย่อยดีเอ็นเอในตำแหน่งถัดจากเบสที่เอนไซม์จดจำอย่างไม่จำเพาะเจาะจง

ประเภทที่ 2 เป็นเอนไซม์ที่มีการจดจำลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอจำนวน 4 ถึง 8 เบส ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดแน่นอน ส่วนใหญ่ทางพันธุวิศวกรรมจะใช้นิยมใช้เอนไซม์ประเภทนี้ การตัดของเอนไซม์ประเภทนี้จะมี 3 ลักษณะ ดังต่อไปนี้

1. การตัดจากปลาย 5′ ไป 3′ ทำให้ได้สายดีเอ็นเอที่มีปลายเหนียว เช่น *Eco*RI
2. การตัดจากปลาย 3′ ไป 5′ ทำให้ได้สายดีเอ็นเอที่มีปลายเหนียว เช่น *Pst*I
3. การตัดในลักษณะตรง ทำให้ได้สายดีเอ็นเอที่มีปลายทู่ เช่น *Sma*I

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประเภทที่ 3 เป็นเอนไซม์ที่มีลักษณะคล้ายกับประเภทที่ 1 ต่างกันตรงที่เอนไซม์ชนิดที่ 3 จะตัดดีเอ็นเอนตำแหน่งเบสที่ถัดจากตำแหน่งจดจำอย่างจำเพาะเจาะจง

เอนไซม์ตัดจำเพาะจะมีประสิทธิภาพในการทำงานสูง และไวต่ออุณหภูมิ ดังนั้นจึงต้องทำการเก็บเอนไซม์เหล่านี้ในอุณหภูมิต่ำๆ เช่นที่ –20 องศาเซลเซียสซึ่งปกติที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส สารละลายในเอนไซม์จะแข็งตัว โครงสร้างในการแข็งตัวของสารละลายจะทำให้เอนไซม์ถูกทำลายได้เมื่อนำเอนไซม์มาละลายและแช่แข็งบ่อยๆ โดยทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็ว การป้องกันปัญหาการเก็บรักษาเอนไซม์จึงต้องอาศัยกลีเซอรอล (glycerol) ซึ่งเป็นสารละลายเฉื่อยที่มีความหนืด การที่ กลีเซอรอลเป็นสารละลายเฉื่อยจะทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยาต่อเอนไซม์ และยังคงรักษาสภาพของสารละลายไม่ให้แข็งตัวได้ นอกจากนี้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์จะขึ้นกับสภาวะของปฏิกิริยานั้นๆซึ่งควบคุมด้วยบัฟเฟอร์ สามารถแบ่งชนิดของเอนไซม์ที่ต้องการสภาวะเกลือแตกต่างกันเป็น 4 จำพวก คือ

1. เอนไซม์ที่ต้องการเกลือมาก (high salt)
2. เอนไซม์ที่ต้องการเกลือปานกลาง (medium salt)
3. เอนไซม์ที่ต้องการเกลือในปริมาณต่ำ (low salt)
4. เอนไซม์ที่ต้องการเกลือที่มีความเฉพาะเจาะจง (specific)

สำหรับเกลือที่ใช้สำหรับเอนไซม์ 3 จำพวกแรกคือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ส่วนเกลือสำหรับเอนไซม์จำพวกสุดท้าย คือโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของเกลือในบัฟเฟอร์ต่างๆ ที่ใช้ในเอนไซม์ตัดจำเพาะ (สุมาลี, 2533)

บัฟเฟอร์	NaCl	Tris-HCl pH7.5	$MgCl_2$	DTT (mM)
low salt	0	10	10	1
medium salt	50	10	10	1
high salt	100	50	10	1
specific	KCl 120 mM	10	10	1

หลักการและปัจจัยในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

การทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นวิธีการทางชีวเคมีที่แยกสารออกจากกันในสนามไฟฟ้าโดยอาศัยความแตกต่างของชนิดและปริมาณของประจุไฟฟ้าและในบางกรณีอาจจะรวมทั้งขนาดและรูปร่างของสารตัวอย่างที่ต้องการแยกด้วยเทคนิคทางอิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นเทคนิคหนึ่งที่มีประโยชน์และใช้กันอย่างแพร่หลายในหมู่นักวิจัยด้านชีวเคมีเพื่อวิเคราะห์โปรตีนและกรดนิวคลีอิค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจัยที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสารในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

1. คุณสมบัติของสารตัวอย่าง

1.1 ชนิดของประจุ เป็นตัวกำหนดทิศทางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้า คือโมเลกุลที่มีประจุบวกจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วลบของสนามไฟฟ้า ในทางตรงกันข้ามโมเลกุลที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวกของสนามไฟฟ้า

1.2 ปริมาณของประจุจะมีผลต่ออัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้าโดยโมเลกุลที่มีประจุมากจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าโมเลกุลที่มีประจุน้อยกว่า

1.3 ขนาดของโมเลกุล อัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่จะช้ากว่าโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก เนื่องจากโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่จะมีแรงเสียดทานและมี eletrostatic force สูงกว่า

1.4 รูปร่างของโมเลกุล อัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลที่มีรูปร่างต่างกันจะไม่เท่ากัน เนื่องจากโมเลกุลของสารที่มีรูปร่างไม่เหมือนกันจะเกิดแรงเสียดทานและ eletrostatic force ต่างกัน

2. สนามไฟฟ้า

อัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้าเป็นสัดส่วนโดยตรงกับกระแสไฟฟ้า ความต่างศักย์ และระยะเวลาในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส แต่แปรผกผันกับความต้านทานไฟฟ้า ดังสมการ

อัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุล (electrophoretic mobility) ต่อหน่วยสนามไฟฟ้า = Ze/f

เมื่อ Z คือ จำนวนประจุลบบนโมเลกุล

e คือ หน่วยอิเล็กตรอนสถิตในหนึ่งหน่วยประจุ

f คือ สัมประสิทธิ์ของความฝืด (ขึ้นอยู่กับขนาด รูปร่างของโมเลกุล และชนิดของตัวกลาง)

ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เพื่อให้ได้ผลดีควรใช้กระแสไฟฟ้าหรือความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสม เนื่องจากการใช้กระแสไฟฟ้าที่สูงเกินไปจะทำให้สารละลายระเหย และเกิดความร้อนสูง มีผลทำให้สารตัวอย่างที่นำมาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเสียสภาพ และผลของการแยกสารจากการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสจะให้ผลไม่ดีเท่าที่ควร แต่ถ้ากระแสไฟฟ้าต่ำเกินไปทำให้ต้องใช้เวลาในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสนานขึ้น

3. บัฟเฟอร์

เป็นสารละลายที่รักษาสภาวะความเป็นกรด-ด่างของตัวกลางค้ำจุน (support medium) และเป็นตัวทำละลายของสารตัวอย่าง นอกจากนี้บัฟเฟอร์ยังเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้า

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ตัวกลางค้ำจุน

ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสต้องการตัวกลางค้ำจุนที่เหมาะสมกับสารตัวอย่างที่ต้องการแยก เนื่องจากตัวกลางค้ำจุนบางชนิดเกิดการดูดซับสารตัวอย่างกับตัวกลางค้ำจุน หรือ อาจจะมีการแลกเปลี่ยนประจุของสารตัวอย่างกับตัวกลางค้ำจุน ซึ่งตัวกลางค้ำจุนที่ดีควรมีลักษณะทั่วไปดังนี้

1. ไม่ไวในการทำปฏิกิริยา
2. ยอมให้สารตัวอย่างผ่านได้อย่างรวดเร็ว
3. สามารถแยกสารตัวอย่างได้ชัดเจน
4. สามารถถูกแยกเป็นส่วนๆ ได้ง่าย

ตัวกลางค้ำจุนมีหลายชนิด เช่น โพลีอะคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel), เจลแป้ง (starch gel) และ อะกาโรสเจล (agarose gel) เป็นต้น ในการแยกดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล ดีเอ็นเอจะต้องเคลื่อนที่ผ่านรูภายในเจล ถ้ารูมีขนาดใหญ่อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอจะสูง ซึ่งขนาดของรูภายในเจลขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของอะกาโรสเจล กล่าวคือ ความเข้มข้นของอะกาโรสสูงขนาดของรูจะเล็ก

ตารางที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของอะกาโรสเจลกับขนาดของดีเอ็นเอ (สุรินทร์, 2539)

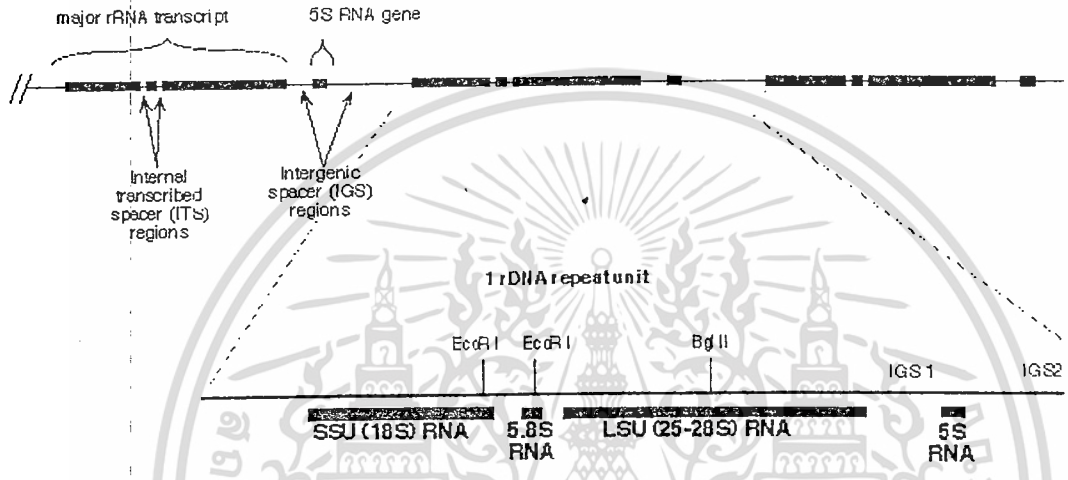
ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล (เปอร์เซ็นต์)	ขนาดของดีเอ็นเอ (กิโลเบส)
0.3	60-5
0.6	20-1
0.7	10-0.8
0.9	7-0.5
1.2	6-0.4
1.5	4-0.2
2.0	3-0.1

Ribosomal DNA (rDNA)

rDNA เป็นสายดีเอ็นเอที่มียีนส่วนของไรโบโซมมอล อาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA) ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่กำหนดรหัสในการสังเคราะห์ ไรโบโซมมอล อาร์เอ็นเอ ยีนนี้จะมีจำนวนซ้ำมากและชุดที่ซ้ำนี้จะอยู่ติดกันเป็นช่วงยาวและอยู่เป็นกลุ่ม เรียกว่า cluster gene ในเห็ดรา rDNA จะมียีน

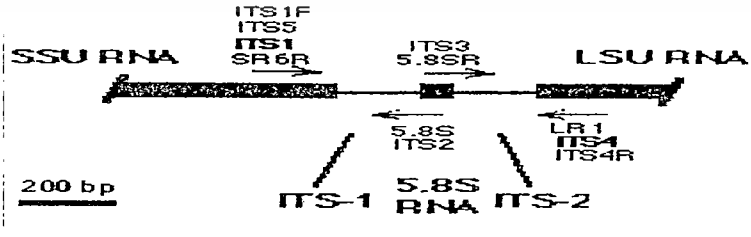
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับการถอดรหัสให้ได้ ไรโบโซมมอล อาร์เอ็นเอ เรียงลำดับจาก 18SRNA, 5.8SRNA, 25SRNA และ 5SRNA ตามลำดับ ซึ่งจะมีจำนวนชุดที่ซ้ำถึง 40-240 ซ้ำ (Boss, 1996) ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 การเรียงตัวของยีนไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอบนสายดีเอ็นเอ (Vilgalys lab,1999)

บน rDNA จะมีบริเวณที่มียีนที่ไม่ถูกแปลรหัสเป็นโปรตีน (noncoding region) และเป็นส่วนที่มีลำดับเบสที่แตกต่างกันไปในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด บริเวณนี้มีชื่อว่า Internal Transcribed Spacer (ITS) ซึ่งในเห็ดราส่วนใหญ่จะใช้ลำดับเบสของไพรเมอร์ในบริเวณ ITS นี้ เนื่องจากในบริเวณนี้มีความผันแปรทางพันธุกรรมสูงกว่าในบริเวณอื่นๆของ rDNA จึงใช้แยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตทั้งในระดับระหว่างชนิด (interspecific) และภายในชนิด (intraspecific) ของเห็ดราได้ (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 แสดงบริเวณที่ไพรเมอร์จะเข้าจับกับ rDNA ในบริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) region (Vilgalys lab,1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 ลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์บางชนิดที่ใช้เพิ่มปริมาณ rDNA ในบริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) region (Vilgalys lab,1999)

Primer Name	Sequence(5′———> 3′)
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC
ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
ITS1-F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA
ITS4-B	CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG

ITS1-TS4 เป็นไพรเมอร์ที่พัฒนาโดย White etal., 1990

ITS1-F และ ITS4-B เป็นไพรเมอร์ที่พัฒนาโดย Gardes และ Bruns,1993

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อพันธุ์เห็ดที่ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์รวมสวนเห็ดบ้านอรัญญิก

1. เห็ดขอนขาว (*Lentnus squarrosulus*)
2. เห็ดเป๋าฮื้อ (*P. cystidiosus*)
3. เห็ดนางรมสีทอง (*P. citrinopleatus*)
4. เห็ดนางนวล (*P. flabellatus*)
5. เห็ดนางรมฮังการี (*P. hungarian*)
6. เห็ดนางฟ้าภูฐาน (*P. butan*)สายพันธุ์ 0

เชื้อพันธุ์เห็ดที่ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์รวบรวมเชื้อพันธุ์เห็ดแห่งประเทศไทย

1. เห็ดนางรม (*P.ostreatus*)
2. เห็ดนางฟ้า (*P. sajor-caju*) สายพันธุ์ 1
3. เห็ดนางฟ้า (*P. sajor-caju*) สายพันธุ์ 2
4. เห็ดนางฟ้าภูฐาน(*P. butan*) สายพันธุ์ 1

เชื้อพันธุ์เห็ดที่ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย คือ เห็ดนางรมหลวง (*P.eryngii* Quel.)

2. สารเคมี

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป PDA (potato dextrose agar)
- อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป PDB (potato dextrose broth)
- อาหารเลี้ยงเชื้อ CYM (complete yeast medium) ภาคผนวก1

2.2 เอนไซม์

- *Taq* DNA polymerase (Promega Coorporation Co.Ltd., ประเทศไทย)
- Restriction endonucleases ที่ซื้อจาก Promega Coorporation Co.Ltd., ประเทศไทย : *Hin*fI, *Hin*dIII,*Bam*HI และ*Eco*RII,
- Restriction endonucleases ที่ซื้อจาก Boehringer Mannheim Biochemica, ประเทศสหรัฐอเมริกา : *Hae*III, *Rsa*I, *Kpn*I,*Xba*I,*Sma*I และ *Pst*I

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 DNA มาตรฐาน

- λ DNA *Hin*dIII (Promega Coorporation Co.Ltd., ประเทศไทย)
- EZ Load™ 100 bp Molecular Ruler (Promega Coorporation Co.Ltd., ประเทศไทย)

2.4 สารเคมีสำหรับศึกษา DNA

- Agarose (USB, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- Ethidium bromide (Life Technologies Inc., ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- dNTPs (Amersham Pharmacia Biotech., ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- Tracking dye (ภาคผนวก 2)
- Tris-boric-EDTA buffer (TBE buffer) (ภาคผนวก 2)
- TE-EDTA buffer (TE buffer) (ภาคผนวก 2)
- Extraction buffer (ภาคผนวก 2)
- ไนโตรเจนเหลว (TIG, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- แอลกอฮอล์ 70%
- Isopropanol
- Sodium acetate

3. อุปกรณ์

- เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) (HRAYAMA, HV-50, ประเทศญี่ปุ่น)
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) (บริษัทเคลตาแล็บบอราตอรี่ จำกัด, ประเทศไทย)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (Shimadzu, UV-1601, ประเทศออสเตรเลีย)
- ตู้ถ่ายเชื้อ (larminar air flow) (International Scientific Supply Co.Ltd., ประเทศไทย)
- เครื่องชั่งละเอียด 3 และ 4 ตำแหน่ง (balance) (Scientfic Promotion Co.Ltd., ประเทศไทย)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) (Hermle-Labortech, ประเทศเยอรมัน)
- เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) (Denver Instrument, สหรัฐอเมริกา)
- เครื่องกวน (magnetic stirrer)
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) (Delta Laboratory, ประเทศไทย)
- ไมโครปิเปต (micropipette) (บริษัทกิบไทย, ประเทศไทย)
- เครื่องอิเล็กโทรโฟรีซีส (electrophoresis equipment) (Pharmacia Biotech., ประเทศสวีเดน)
- เครื่องอัตโนมัติควบคุมปฏิกิริยา PCR (PCR machine) (Perkin Elmer,ประเทศญี่ปุ่น)
- เครื่องถ่ายรูปโพลาลอยด์
- เครื่องฉายแสง UV (gel documentation) (Advision of synoptic Ltd., ประเทศแคนนาดา)
- เครื่องผสมสาร (vortex mixer) (Scientic industries Inc., ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- Micro tip
- เครื่องแก้วชนิดต่างๆ
- โกร่ง
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply) (EC APPARATUS Inc., ประเทศไทย)
- กล้องจุลทรรศน์
- Thermo-block (ห้างหุ้นส่วนจำกัดหริกุล, ประเทศไทย)

วิธีการวิจัย

ก. การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเห็ด

ฉีกดอกเห็ดและเขี่ยเนื้อเยื่อที่อยู่ตรงกลางดอกเห็ดสดและถ่ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปพีดีเอ (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ เส้นใยของเห็ดจะเจริญเต็มจานเพาะเลี้ยง

2. การเพาะเลี้ยงเส้นใยเพื่อนำไปใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

นำเส้นใยที่ได้จากข้อ 1. มาตัดให้เป็นแผ่นกลมด้วย cork borrer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ถ่ายลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อซีวายเอ็ม (CYM,Complete Yeast Medium,ภาคผนวก 2) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

3. การสกัดดีเอ็นเอ (ตามวิธีที่ปรับปรุงโดย Cens,J.L. 1992) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

3.1 กรองเส้นใยของเห็ดโดยการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้งแล้วนำเส้นใยใส่หลอดเซ็นตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ประมาณ 0.1-0.3 กรัม

3.2 ล้างเส้นใยด้วย TE buffer แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที

3.3 รินสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง แล้วนำเส้นใยใส่ลงในโกร่งที่เย็นจัด เติมไนโตรเจนเหลวให้ท่วม บดเส้นใยให้ละเอียดอย่างรวดเร็วจนมีลักษณะคล้ายผงแป้ง แล้วถ่ายลงในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ใหม่ ในขณะบดอยู่ถ้าไนโตรเจนเหลวระเหยหมดให้เติมใหม่

3.4 เติม extraction buffer 300 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติม 3M sodium acetate 150 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.5 นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.6 ดูดสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดเซ็นตริฟิวจ์หลอดใหม่ ผสม isopropanol ลงในหลอดในปริมาตรที่เท่ากันเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 5 นาที

3.7 นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.8 รินสารละลายส่วนใสทิ้งจะเหลือดีเอ็นเอติดอยู่ที่ก้นหลอด ล้างดีเอ็นเอด้วยเอธานอล 70% จากนั้นดูดเอธานอลที่เหลือทิ้งแล้วคว่ำหลอดเซ็นตริฟิวจ์ บนกระดาษทิชชูจนกระทั่งแห้ง

3.9 ละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer 50 ไมโครลิตร

3.10 เก็บดีเอ็นเอในอุณหภูมิ –20° C จนกว่าจะนำมาใช้งาน

4. การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ

โดยทั่วไปการตรวจสอบสารละลายดีเอ็นเอมี 2 วิธี คือ

4.1 การหาความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. นำสารละลายดีเอ็นเอใน TE buffer มาวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance,A) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ถ้าค่า A_{260} มากกว่า 1.0 ให้เจือจางสารละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงใหม่

2. คำนวณความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอจากสูตร : -

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

43267

$1.0A_{260}$ = 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ของดีเอ็นเอเกลียว)

3. ตรวจสอบคุณภาพของกรดนิวคลีอิก โดยการหาอัตราส่วนของค่า A_{260}/ A_{280} ถ้าได้ค่าระหว่าง 1.65 ถึง 1.85 แสดงว่า ดีเอ็นเอบริสุทธิ์เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในขั้นต่อไป ถ้าได้ค่ามากกว่า 1.85 แสดงว่า ดีเอ็นเอที่เตรียมได้มีอาร์เอ็นเอปนในปริมาณมาก แต่ถ้าค่าน้อยกว่า 1.65 แสดงว่า มีโปรตีนหรือฟีนอลปะปนอยู่

4.2 การแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

การวิเคราะห์สารละลายดีเอ็นเอโดยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสจะสามารถบอกถึงปริมาณของดีเอ็นเอโดยประมาณได้ นอกจากนี้ยังสามารถบอกถึงคุณภาพได้อีกด้วย วิธีการทำอยู่ที่ภาคผนวก 3

5. การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วงบริเวณ ITS ทำโดย เติมส่วนผสมที่อยู่ข้างล่างนี้ ลงในหลอด microfuge tube

DNA template (200 ng)	5	µl
Primer ITS1 (25 µM)	2	µl
Primer ITS4 (25 µM)	2	µl
dNTP (10 mM)	1	µl
10X PCR Buffer	5	µl
$MgCl_2$ (50 mM)	2.5	µl
Taq polymerase (5U/µl)	0.3	µl
H_2O	32.2	µl
ปริมาตรรวม	50	µl

ต่อไปนำหลอดที่มีส่วนผสมครบทุกอย่างนี้ไปทำการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที แล้วหยด mineral oil 50 ไมโครลิตรทับบนสารละลายที่ผสมแล้ว จากนั้นนำหลอดทั้งหมดใส่ในเครื่อง Programmable DNA Thermal Cycler ตามสภาวะการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสดังนี้

ขั้นที่ 1	Initial Denaturation	94°C	5 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 2	Denaturation	94°C	30 วินาที	
	Annealing	55°C	30 วินาที	40 รอบ
	Extension	72°C	5 นาที	
ขั้นที่ 3	Final Extenson	72°C	7 นาที	1 รอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อจบปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ให้นำ ผลผลิต PCR ที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็ก-โทรโฟรีซิส บนอะกาโรสเจล ที่มีความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ย้อมสีด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และทำการตรวจวัดแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (ภาคผนวก 3)

6. การทำ RFLP และการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

นำ ผลผลิตPCR ที่ได้มาทำ RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดแต่ละชนิดมาเติมสารต่างๆดังต่อไปนี้

การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิด เติมสารต่างๆ ดังนี้

PCR Product	5	µl
Restriction enzyme	1	µl
Buffer	2	µl
BSA	2	µl
H_2O	10	µl
ปริมาตรรวม	20	µl

ต่อไปนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็ก-โทรโฟรีซิส บนอะกาโรสเจล ที่มีความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ จากนั้นตรวจวัดแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต (ภาคผนวก 3)

ขั้นตอนสุดท้ายเป็นการสร้าง phylogenic tree โดยการนำรูปแบบดีเอ็นเอ ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ไปคำนวนหาค่า Jaccard coefficient โดยใช้โปรแกรมไมโครซอฟท์-เอ็กซ์เซล

ข. การศึกษาสัณฐานวิทยาของเห็ดในสกุล *Pleurotus*

ทำการศึกษาโดยการถ่ายภาพลักษณะของดอกเห็ดที่เจริญอยู่บนก้อนขี้เลื่อย และทำการศึกษาและบันทึกลักษณะที่แตกต่างกันของเห็ดทุกชนิด (ยกเว้นเห็ดนางรมหลวง เพราะเห็ดชนิดนี้ไม่สามารถเพาะให้เกิดดอกได้เนื่องจากเห็ดชนิดนี้ชอบอากาศเย็น) ผลการศึกษาอยู่ในภาคผนวก 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ผลของ RFLP ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*fI

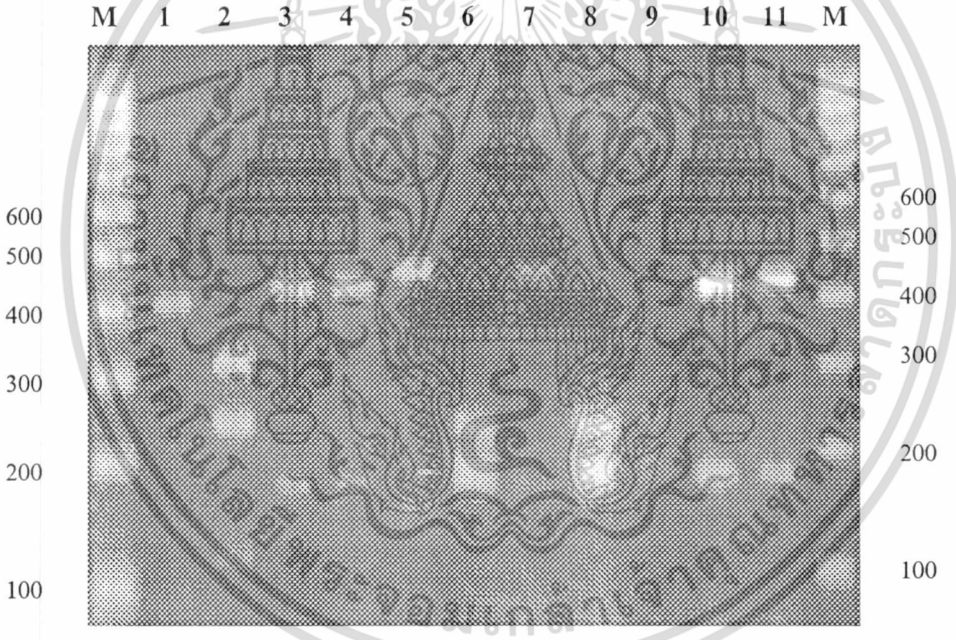
เอนไซม์ *Hin*fI สามารถตัดสายดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเห็ดทุกตัวในการศึกษาครั้งนี้ รูปแบบการตัดในเห็ดเป๋าฮื้อจะพบขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอประมาณ 245 และ 323 คู่เบส, เห็ดนางรม เห็ดนางฟ้าสายพันธุ์ 1 และสายพันธุ์ 2 ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 245 และ 366 คู่เบส, ในเห็ดนางฟ้าภูฐานสายพันธุ์ 0 และสายพันธุ์ 1 มีขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอประมาณ 234 และ 350 คู่เบส ในเห็ดนางรมหลวงและเห็ดนางรมฮังการี ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 245 และ 250 คู่เบส ส่วนในเห็ดนางนวลพบขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป็นแถบคู่ขนานกันที่ประมาณ 350 และ 378 คู่เบส นอกจากนี้ จะพบขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอประมาณ 245 และ 366 คู่เบส ในเห็ดนางรมสีทอง และ เห็ดขอนขาว ตามลำดับ ดังภาพที่ 5

ภาพที่ 5 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแล้วทำการตัด ผลผลิต PCR ด้วยเอนไซม์ *Hin*fI โดยเรียงลำดับของแต่ละช่องดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker (100 bp ladder), ช่อง 1. เห็ดขอนขาว (*L.squarrosulus*), ช่อง 2. เห็ดเป๋าฮื้อ (*P.cystidiosus*) , ช่อง 3. เห็ดนางฟ้าภูฐาน (*P.butan*) สายพันธุ์ 0 ,ช่อง 4. เห็ดนางฟ้าภูฐาน (*P.butan*) สายพันธุ์ 1, ช่อง 5. เห็ดนางรมสีทอง (*P. citrinopileatus*) , ช่อง 6. เห็ดนางรมหลวง (*P.eryngii*), ช่อง 7. เห็ดนางนวล (*P.flabellatus*) , ช่อง 8. เห็ดนางรมฮังการี (*P.hungarian*), ช่อง 9. เห็ดนางรม (*P.ostreatus*), ช่อง10. เห็ดนางฟ้า (*P.sajor-caju*) สายพันธุ์1 และ ช่อง 11. เห็ดนางฟ้า (*P.sajor-caju*) สายพันธุ์ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ผล RFLP ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III

เอนไซม์ *Hae*III สามารถตัดสายดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเห็ดทุกตัวในการศึกษาครั้งนี้ รูปแบบการตัดในเห็ดเป๋าฮื้อพบขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอประมาณ 141, 270 และ 316 คู่เบส, ในเห็ดนางฟ้าภูฐานสายพันธุ์ 0 และ สายพันธุ์ 1 เห็ดนางฟ้าสายพันธุ์ 1 และ สายพันธุ์ 2 ขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอประมาณ 200 และ 420 คู่เบส ส่วนในเห็ดนางรมสีทอง มีขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอประมาณ 173 และ 424 คู่เบส, เห็ดนางนวลพบขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอประมาณ 200 และ 420 คู่เบส ส่วนแถบดีเอ็นเอที่พบแตกต่างออกไปคือจะพบเป็นแถบคู่ในเห็ดนางรมหลวง และเห็ดนางรมฮังการีโดยมีขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอประมาณ 200 และ 250 คู่เบส, ส่วนในเห็ดนางรมพบขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอประมาณ 211 และ 270 คู่เบส สำหรับในเห็ดขอน-ขาวจะพบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวยาวประมาณ 410 คู่เบส ดังภาพที่ 6

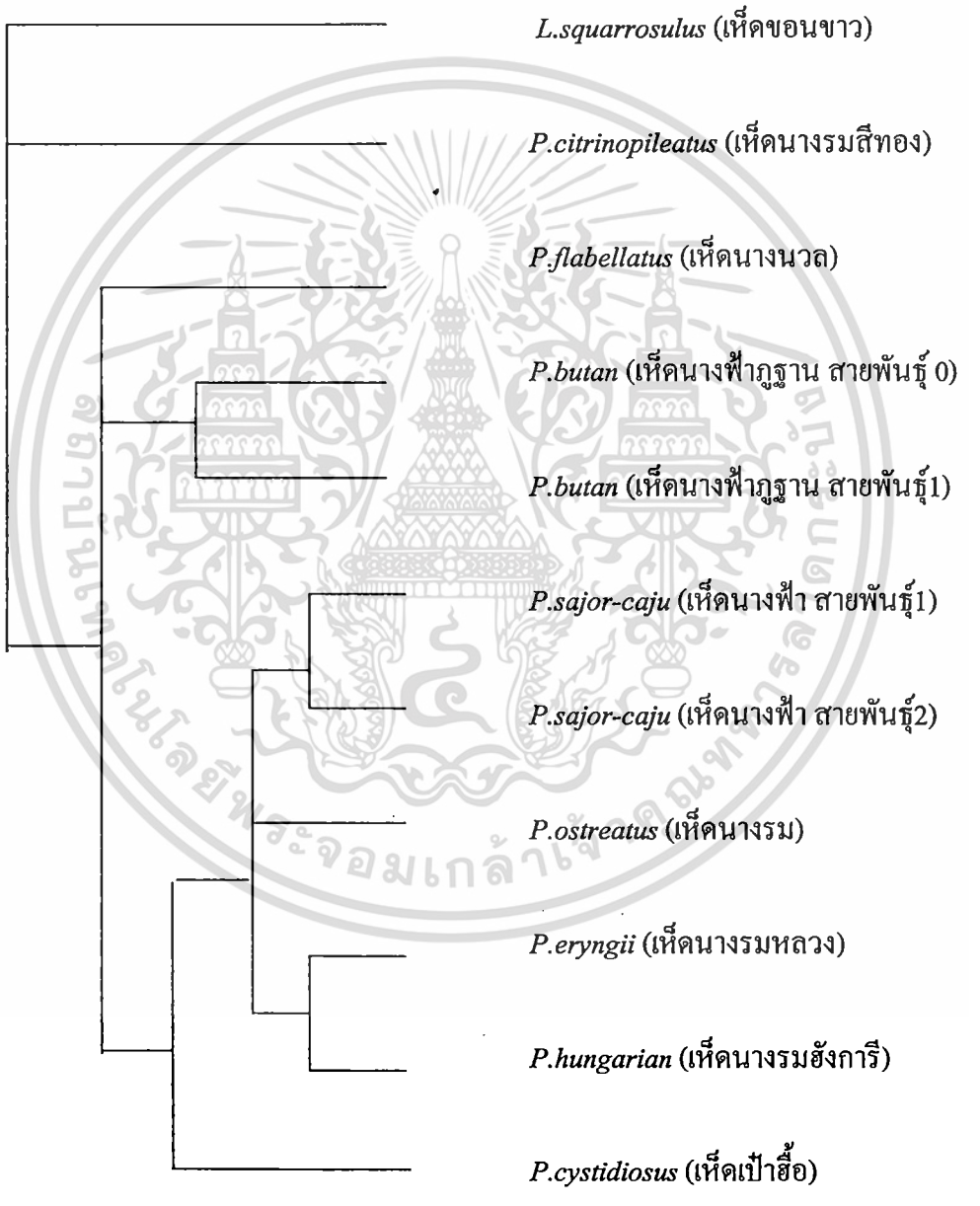


ภาพที่ 6 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสโดยใช้ไพรเมอร์ ITS1และITS4 แล้วทำการตัดด้วยเอนไซม์ *Hae*III บนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 2.0% โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker (100 bp ladder) ช่อง 1. เห็ดขอนขาว (*L.squarrosulus*), ช่อง 2. เห็ดเป๋าฮื้อ (*P.cystidiosus*), ช่อง 3. เห็ดนางฟ้าภูฐาน (*P.butan*) สายพันธุ์ 0, ช่อง 4. เห็ดนางฟ้าภูฐาน (*P.butan*) สายพันธุ์1, ช่อง 5. เห็ดนางรมสีทอง (*P.citrinopileatus*), ช่อง 6. เห็ดนางรมหลวง (*P.eryngii*), ช่อง 7. เห็ดนางนวล (*P.flabellatus*), ช่อง 8. เห็ดนางรมฮังการี (*P. hungarian*), ช่อง 9. เห็ดนางรม (*P.ostreatus*), ช่อง 10. เห็ดนางฟ้า (*P.sajor-caju*) สายพันธุ์ 1 และ ช่อง 11. เห็ดนางฟ้า (*P.sajor-caju*) สายพันธุ์ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสร้าง phylogenic tree จากการวิเคราะห์ผลของ PCR/RFLP

จากการวิเคราะห์โพลีมอร์ฟิซึมของผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในบริเวณ ITS ของ rDNA แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสามารถนำมาสร้างเป็น phylogenic tree ที่ได้จากการคำนวณค่า Jaccard coefficient ซึ่งคำนวณจากความเหมือนกันและต่างกันของแถบดีเอ็นเอโดยการใช้โปรแกรมไมโครซอฟท์เอ็กซ์เซล



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

ในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสในช่วงบริเวณ ITS แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเห็ดแต่ละชนิดที่ศึกษาได้ เนื่องจากแถบขนาดชิ้นดีเอ็นเอของเห็ดทุกชนิดมีความใกล้เคียงกันมาก (ประมาณ 600-700 คู่เบส)จึงได้นำเอาผลผลิต PCR ไปทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ(ดังรายชื่อเอนไซม์ในหน้า 14) แต่พบว่ามีเพียง *Hin*fI และ *Hae*III ที่สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดทุกชนิดได้ ซึ่งผลจากการใช้เอนไซม์แต่ละชนิดจะแสดงแถบขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ไม่เหมือนกันทำให้สามารถแยกความแปรผันทางพันธุกรรมของเห็ดที่ศึกษาในสกุล *Pleurotus* ได้ ดัง phylogenetic tree ที่สร้างขึ้นมา ซึ่งพบว่าสามารถจำแนกเห็ดชนิดต่างๆในสกุล *Pleurotus* ที่ได้ศึกษา ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 เห็ดนางฟ้าสายพันธุ์ 1 และ สายพันธุ์ 2 เห็ดนางรม เห็ดนางรมหลวง เห็ดนางรมฮังการี และเห็ดเป๋าฮื้อ

กลุ่มที่ 2 เห็ดนางฟ้าภูฐานสายพันธุ์ 0 และ สายพันธุ์ 1

สำหรับเห็ดนางนวล เห็ดนางรมสีทองและเห็ดขอนขาว ไม่สามารถจัดเข้ากับกลุ่มทั้ง 2 กลุ่มดังกล่าวได้ แต่เห็ดนางนวลจะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเห็ดในกลุ่มทั้งสองมากกว่าเห็ดนางรมสีทองและเห็ดขอนขาว นอกจากนี้ยังเป็นที่น่าสังเกตว่า เห็ดนางรมหลวงและเห็ดนางรมฮังการีมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมาก ซึ่งควรจะได้รับความสนใจเพื่อการศึกษาให้ถ่องแท้ต่อไป สำหรับเห็ดขอนขาวซึ่งเป็นเห็ดนอกกลุ่มพบว่ามีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมน้อยกว่าเห็ดชนิดอื่นๆ ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าเห็ดชนิดเดียวกันจะมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมมากกว่าเห็ดต่างชนิดกัน ซึ่งจะเห็นได้จากคู่ของ เห็ดนางฟ้าภูฐานสายพันธุ์ 0 และ สายพันธุ์ 1 และคู่ของเห็ดนางฟ้าสายพันธุ์ 1 และสายพันธุ์ 2 นอกจากนี้ ยังได้พบว่า ผลของการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอในครั้งนี้โดยทั่วไปมีทิศทางเดียวกันกับลักษณะความแปรผันทางสัณฐานวิทยา (เทียบกับภาคผนวก 4)

อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองครั้งนี้ซึ่งได้จากการตัดด้วยเอนไซม์เพียง 2 ชนิดยังเป็นผลการจัดจำแนกที่ไม่ละเอียดแม่นยำเพียงพอ สมควรที่จะต้องมีการทดลองใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดอื่นๆ รวมทั้งควรใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะมาตัดพร้อมกันทีละ 2 ชนิด ซึ่งน่าจะทำให้การผลการศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของเห็ดต่างๆเหล่านี้ในสกุล *Pleurotus* มีความถูกต้อง และแม่นยำยิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

ภาควิชาพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2542. เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง เทคนิคพื้นฐานทางพันธุวิศวกรรม. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ยุคลธร สถาปนศิริ. 2542. การวิเคาะห์จีโนมของพืชบางชนิดในสกุล *Garcnia* โดยเทคนิคเอเอฟแอลพี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วัชรี อัตถทิพพหลกุล และ มนตรี อัตถทิพพหลกุล. 2539. **ทฤษฎีการประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR Technology.** คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.

สมศักดิ์ อภิสิทธิวาณิช. 2543. **พันธุศาสตร์กับสังคม.** สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุมาลี ตั้งประดับกุล. 2533. **คู่มือปฏิบัติการทางพันธุวิศวกรรม 1 : การขยายยีนและการตัดต่อยีนจากโครโมโซม (Genomic DNA Cloning).** Text and Journal Cororation Co. Ltd., กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2539. **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น.** ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อาภัสสรา ชมิดท์. 2537. **ชีวเคมี.** พิมพ์ครั้งที่ 2. เค.ยู.เพลส์, กรุงเทพฯ.

Boss, C.T. 1996. "Biology of fungi" in **Fungal Genetics. Principles and Practice.** (eds. C.T. Boss) Marcel Dekker ,Inc., New York. 97-118p.

Bunyard, B. A., Nicholson, M. S. and Royse, D. J. 1996. Phylogeny of the Genus Agaricus inferred from restriction analysis of enzymatically amplified ribosomal DNA. **Fungal Genetics and Biology.** 20 : 243-253

Cennis, J.L. 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. **Nucl. Acids. Res.** 20: 2380.

Chang, S.T. 1993. "Mushroom and mushroom biology" in **Genetic and Breeding of Edible Mushrooms.** (eds. Chang, S.T., Miles, P.G. and Buswell, J.A.) Gordon and Breach Science Publishers, Berlin.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fanning, S. and Gibbs, R. A. 1997. "PCR in genome analysis" in **Genome Analysis : A Laboratory Manual.** Vol. 1,p 249-299.(eds. Bruce. B. , et al.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York .

Jungehulsing, U. and Tudzynski, P. 1997. Analysis of genetic diversity in *Claviceps purpurea* by RAPD marker. **Mycological Research** 101(1): 1-6.

Lewin, B. 1993. **Gene V.** Oxford University Press, Oxford.

Meyers, R.A. 1995. **Molecular Biology and Biotechnology.** VCH Publishers, Inc., New York.

Moore-Landecker, E. 1990. **Fundamentals of Fungi.** 3rd ed. Prentice-Hall. Inc., New Jersey.

Morgante, M. 1994. Applications of molecular markers in plant genetics and breeding. Proc. of PBA,Rogla,Slovania.

Pegler. 1983. **Agaric Flora of the Lesser Antlles.** Additional Series IX. Kew Buletin, London.

Smith, A.H. 1978 . "Morphology and classification" in **The Biology and Cultivation of Edible Mushroom.p 132-145** (eds. Chang, S.T. and Hayes, W.A.) Academic Press ,Inc., New York.

Singer, R. 1975. **The Agaricales in Modern Taxanomy.** J Crames, Berlin.

Vilgalys Lab, Duke University.1999. Converved primer sequences for PCR amplification and sequencing from nuclear ribosomal RNA. [Online]. Available : http:// www. Duke University.ac.uk. 1999.

White, T. J., Bruns, S. L, and Taylor,T.W. 1990. "Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic" in **PCR Protocal: A Guide to Methods and Applications.** (eds. Innis,M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J.) Acedemic Press ,Inc., New York.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก 1

การเตรียมบัฟเฟอร์และสารเคมี

3 M Sodium acetate, pH 5.2

ละลาย $CH_3COONa.3H_2O$ จำนวน 408.1 กรัมในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pHให้เท่ากับ 5.2 ด้วย glacial acetic acid ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

0.5 % Sodium dodecyl sulfate (SDS)

ละลาย SDS 0.5 กรัมในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร นำไปอุ่นใน water bath ที่มีอุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส ปรับ pHให้เท่ากับ 7.2 ด้วย 1 M HCl และปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร

0.5 M EDTA

ละลาย disodium ethylene diaminetetra-acetate จำนวน 186.1 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ใช้ magnetic stirrer ในการหมุนเพื่อช่วยละลาย ปรับ pHให้เท่ากับ 8.0 ด้วย NaOHเข้มข้น (ชนิดที่เป็นเม็ด) และปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

5 M NaCl

ละลาย sodium chloride 292.2 กรัมในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

1 M Tris-HCl

ละลาย Tris-base 121.1 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วย 1 M HCl ปริมาตรดังนี้

pH	7.4	7.6	8.0
HCl (ml)	70	60	42

ขณะที่ปรับ pH ควรให้อุณหภูมิของสารละลายเท่ากับอุณหภูมิห้อง เนื่องจาก pH ของ Tris-HCl จะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น 1 องศาเซลเซียส pH ของสารละลายจะลดลง 0.03 unit ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ethidium bromide (10 mg/ml)

ชั่ง ethidium bromide 1 กรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร กวนจนกว่าจะละลาย เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

1 M HCl

สำหรับสารละลาย 1M HCl ที่มีปริมาตร 1 ลิตร จะเตรียมโดยเติม HCl เข้มข้น 86.2 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 913.8 มิลลิลิตรและผสมให้เข้ากัน

Tracking dye

เตรียมจากการนำ 1 M Tris-HCl (pH 7.6) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร 0.5 M EDTA (pH 8.0) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผง bromophenol blue 0.5 กรัม และ ซูโครส 40 กรัม มาผสมกันในน้ำกลั่น ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ใช้ magnetic stirrer คนเพื่อช่วยละลายสารเคมี แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของสารแต่ละตัวดังนี้ : 50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 50 mM EDTA, 0.5 %(w/v) bromophenol blue และ ซูโครส 40 %

Tris-boric-EDTA buffer (TBE buffer)

ละลาย Tris-base 54 กรัม, boric acid 27.5 กรัม และ 0.5 M EDTA (pH 8.0) 20 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

TE-EDTA buffer (TE buffer)

เตรียมจากการนำ 1 M Tris-HCl, pH 8.5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรผสมกับ 0.5 M EDTA pH 8.0 ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร ซึ่งบัฟเฟอร์ที่ได้จะมีความเข้มข้นของสารละลายดังต่อไปนี้ : 10 mM Tris-HCl และ 1 mM EDTA (pH 8.0)

Extraction buffer

นำ 1 M Tris-HCl pH 8.5 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมกับ1 mM EDTA pH 8.0 , 5M N และ 0.5% SDS อย่างละ 5 มิลลิลิตรแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร ซึ่งบัฟเฟอร์ที่ได้จะมีความเข้มข้นของสารละลายดังต่อไปนี้ : 200 mM Tris-HCl , 250 mM NaCl , 25 mM EDTA และ 0.5% SDS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก 2
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อซีวายเอ็ม (CYM; Complete Yeast Medium)

กลูโคส	20	กรัม
Bactopeptone	2	กรัม
Yeast extract	2	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
KH_2PO_4	0.46	กรัม
K_2HPO_4	1	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก 3

การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

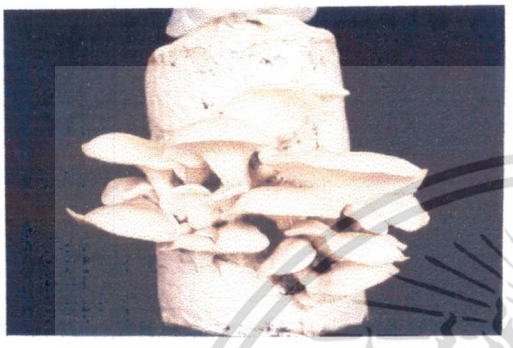
1. เตรียมถาด (chamber) สำหรับเทเจลในแนวราบและหวี (well comb)ให้เรียบร้อย
2. ชั่งผงอะกาโรสเจล 0.8 กรัม มาเติมด้วย TBE buffer 100 มิลลิลิตร ในกรณีที่ต้องการเตรียมเจล 0.8 เปอร์เซ็นต์
3. หลอมอะกาโรสเจลโดยอุ่นให้ร้อนหรือใช้ไมโครเวฟให้ผงอะกาโรสละลายจนหมด
4. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงจนพอที่จะสามารถสัมผัสได้ แล้วเทลงในถาดที่เตรียมไว้ในข้อ 1. โดยให้เจลหนาประมาณ 0.5 มิลลิเมตร เสียบหวีลงในเจลเพื่อให้เกิดร่องสำหรับหยอดสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว
5. เมื่อเจลแข็งตัวให้ค่อยๆ ดึงหวีออก นำเจลใส่ลงเครื่องสำหรับทำอิเล็คโทรโฟรีซิส เท TBE buffer ให้ท่วมเจล และให้สูงกว่าผิวเจลประมาณ 2-3 มิลลิเมตร
6. ดูดสารละลายดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading buffer 1 ไมโครลิตร แล้วหยอดลงในช่องในแผ่นเจล ให้ช่องที่ 1 เป็นช่องสำหรับการหยอด DNA marker เพื่อการเปรียบเทียบ
7. ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วเปิดกระแสไฟฟ้า 60 วัตต์
8. เมื่อดีเอ็นเอเคลื่อนที่ไปพอประมาณ ให้ปิดเครื่อง
9. นำเจลมาย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ที่มีความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 10-20 นาที
10. นำเจลมาล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5-10 นาที
11. นำเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต แล้วถ่ายภาพและทำการบันทึกแถบโพลี-มอร์ฟีซึมลงแผ่น floppy disk

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก 4

สัณฐานวิทยาของเห็ด ในสกุล *Pleurotus* ที่ได้ศึกษา

ลักษณะของเห็ดในสกุล *Pleurotus* ที่ได้ทำการศึกษา (ยกเว้นเห็ดนางรมหลวง) ที่เจริญบนก้อนขี้เลื่อย



เห็ดเป๋าฮื้อ

นางฟ้าภูฐาน สายพันธุ์ 0

เห็ดนางฟ้าภูฐาน สายพันธุ์ 1

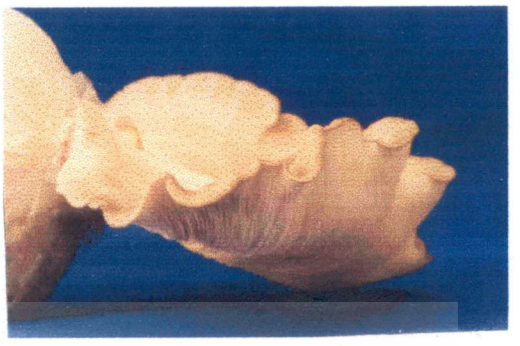
เห็ดนางรมสีทอง

เห็ดนางนวล

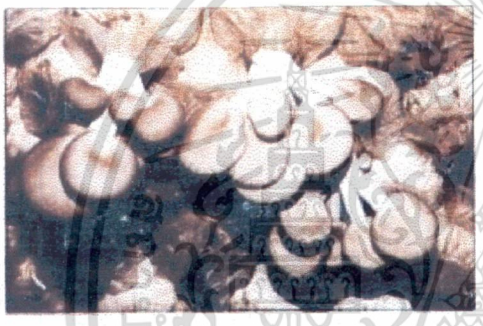
เห็ดนางรมอังการี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เห็ดนางรม



เห็ดนางฟ้า สายพันธุ์ 1



เห็ดนางฟ้า สายพันธุ์ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะโดยทั่วไปที่แตกต่างกันของเห็ดเป๋าฮื้อ, เห็ดนางฟ้าภูฐาน สายพันธุ์ 0,เห็ดนางฟ้าภูฐาน สายพันธุ์ 1, เห็ดนางรมสีทอง, เห็ดนางรมหลวง, เห็ดนางนวล, เห็ดนางรมฮังการี, เห็ดนางรม, เห็ดนางฟ้าสายพันธุ์ 1 และเห็ดนางฟ้าสายพันธุ์ 2

ชนิดของเห็ด	หมวกเห็ด		ความยาวของก้านดอก (เฉลี่ย) (เซนติเมตร)	สีของสปอร์พิมพ์	ขนาดสปอร์ (เฉลี่ย) (ไมโครเมตร)	ขนาดเส้นใย (เฉลี่ย) (ไมโครเมตร)	การสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศ (oidia)
	ขนาด (เฉลี่ย) (เซนติเมตร)	สี					
เห็ดเป๋าฮื้อ	4.93 x 8.03	สีน้ำตาลปนเทา	2.87	สีน้ำตาลอ่อน	6.84 x 15.59	6.84 x 15.59	พบ
เห็ดนางฟ้าภูฐาน สายพันธุ์ 0	3.7 x 4.06	สีเทาปนน้ำตาลอ่อน	2.96	สีครีม	3.75 x 9.15	3.75 x 9.15	ไม่พบ
เห็ดนางฟ้าภูฐาน สายพันธุ์ 1	4.12 x 5.12	สีเทาปนน้ำตาลอ่อน	1.93	สีครีม	5.07 x 9.26	5.07 x 9.89	ไม่พบ
เห็ดนางรมสีทอง	3.02 x 3.2	สีเหลือง	2.71	สีเทา	3.75 x 8.6	3.75 x 8.6	ไม่พบ
เห็ดนางนวล	3.6 x4.91	สีชมพู	1.21	สีชมพู	3.39 x 7.62	3.93 x 8.6	ไม่พบ
เห็ดนางรมฮังการี	5.34 x 5.51	สีขาวปนครีมอ่อน	0.69	สีขาว	4.875 x 10.187	4.875 x 10.185	ไม่พบ
เห็ดนางรม	4.73 x 5.53	สีครีมปนน้ำตาล	1.41	สีครีม	5.14 x 7.845	4.687 x 7.875	ไม่พบ
เห็ดนางฟ้า สายพันธุ์ 1	9.7 x 17.2	สีเทาปนน้ำตาล	2.1	สีครีม	5.28 x 9.89	528 x 9.89	ไม่พบ
เห็ดนางฟ้า สายพันธุ์ 2	4.6 x 5.52	สีเทาปนน้ำตาล	2.45	สีครีม	4.71 x 9.93	4.71 x 9.93	ไม่พบ

หมายเหตุ เห็ดนางรมหลวงไม่สามารถเพาะให้ออดดอกได้เนื่องจากต้องการอุณหภูมิต่ำจึงไม่มีรายละเอียดของส่วนต่างๆของดอกเห็ด

ภาคผนวก 5

ตัวอย่างเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดต่างๆ (สมศักดิ์, 2543)

เอนไซม์	แบคทีเรียที่ผลิต	ลำดับเบสและตำแหน่งที่ตัด
*Alu*I	*Arthrobacter luteus*	5′--A----G----C—T—3 3′--T----C----G----A—5
*Bam*H	*Bacillus amyloliquefaciens H*	5′--G---G---A---T---C---C --3′ 3′--C---C---T---A---G---G-- 5′
*Eco*RI	*Escherichia coli*	5′ --G--A---A---T---T---C--3′ 3′ --C---T---T---A---A---G--5
*Eco*RII	*Escherichia coli*	5′ --C---C---T---G---G--3′ 3′--G---G---A---C---C--5′
*Hae*III	*Haemophilus aegyptius*	5′--G---G---C---C---3′ 3′--C---C---G---G---5′
*Hin*dIII	*Haemophilus influenzae* b	5′--A---A---G---C---T---T--3′ 3′--T---T---C---G---A---A--5′

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้