

รายงานการวิจัย

การรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรม เห็ดนางรมทองและ
เห็ดนางนวล

**Protoplast Fusion between *Pleurotus ostreatus*, *P. citrinopileatus*
and *P. djamora***



รศ. ดร. พรรณี จิตาภิชิต
หัวหน้าโครงการ

REH

OK

617

พ๒๕๔๙

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน..... 58449

วัน,เดือน,ปี..... 6 ส.ค. 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์อื่นใด
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

MLA 2017
b.....
i.....

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดีด้วยทุนอุดหนุนการวิจัย จากงบประมาณแผ่นดินของบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปีงบประมาณปี พ.ศ. 2547 และการอนุเคราะห์ให้ใช้ห้องปฏิบัติการและเครื่องมือของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ตลอดจนคุณพรเพ็ญ ลูกสอน ที่ได้ช่วยทำการทดลองและคุณนันทวี คำสงค์ ที่พิมพ์ต้นฉบับ



พรรณณี ฐิตาภิชิต

มีนาคม 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
I
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	I
บทคัดย่อ.....	II
ABSTRACT.....	II
สารบัญ.....	III
สารบัญตาราง.....	IV
สารบัญภาพ.....	IV
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร.....	2
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย.....	16
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	26
บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	47
บรรณานุกรม.....	48
ภาคผนวก.....	55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมายและจำนวนรอบ (วัชริและมนตรี, 2539)	8
2.2 ความสัมพันธ์ของเกลือในบัฟเฟอร์ต่างๆที่ใช้ในเอนไซม์ตัดจำเพาะ (สุมาลี, 2533)	10
2.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์บางชนิดที่ใช้เพิ่มปริมาณ rDNA ในบริเวณ Internal Internal Transcribed Spacer (ITS) region (Vilglys Lab, 1999)	14
2.4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์บางชนิดที่ใช้เพิ่มปริมาณ rDNA ในบริเวณ Intergenic Spacer (IGS) region (Vilglys Lab, 1999)	14
4.1 การเจริญของเส้นใยเห็ดลูกผสมเปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่เมื่อเลี้ยงบนอาหาร MEA พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน.....	30
4.2 รายละเอียดของสัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดลูกผสม Fu1, Fu2 และFu3 เปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่.....	30
4.3 รายละเอียดของสัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดลูกผสม Fu4 และ Fu5 เปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่.....	31

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรส.....	7
2.2 แสดงบริเวณที่ไพรเมอร์จะเข้าจับกับ rDNA ในบริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) region.....	14
2.3 แสดงบริเวณที่ไพรเมอร์จะเข้าจับกับ rDNA ในบริเวณ Intergenic Spacer (IGS) region ...	14
4.1 โพรโตพลาสต์ที่มีการสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่และเจริญเป็นเส้นใยบนอาหารสำหรับการสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ของโพรโตพลาสต์.....	27
4.2 รูปแบบของลูกผสมที่อาจจะเกิดขึ้นได้จากการรวมโพรโตพลาสต์.....	28
4.3 ลักษณะโคโลนีของเห็ดลูกผสมเปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่โดยเลี้ยงบนอาหารมอลต์สกัดอาคารี พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วันแสดง	29
4.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดลูกผสม Fu1.....	31
4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดลูกผสม Fu4	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 IV
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6	ลักษณะทางพันธุกรรมของยีนที่ถอดออกมาและภายในของเห็ดลูกผสม Fu5.....	33
4.7	ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ทำการตัดด้วยเอนไซม์ <i>HinfI</i> , <i>Sau3AI</i> และ <i>Dd36</i> บนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 2.0% ของเห็ด Fu1, Fu2 และ Fu3.....	35
4.8	ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ IGS ทำการตัดด้วยเอนไซม์ <i>HinfI</i> , <i>Sau3AI</i> และ <i>DdeI</i> บนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 2.0% ของเห็ด Fu1, Fu2 และ Fu3.....	35
4.9	ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ที่ทำการตัดด้วยเอนไซม์ <i>EcoRI</i> , <i>HaeIII</i> และ <i>HindIII</i> บนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 2.0% ของเห็ด Fu1, Fu2 และ Fu3.....	36
4.10	ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ IGS ที่ทำการตัดด้วยเอนไซม์ <i>EcoRI</i> , <i>HaeIII</i> และ <i>HindIII</i> บนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 2.0% ของเห็ด Fu1, Fu2 และ Fu3.....	36
4.11	ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ทำการตัดด้วยเอนไซม์ <i>HinfI</i> , <i>Sau3AI</i> และ <i>DdeI</i> บนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 2.0% ของเห็ด Fu4 และ Fu5.....	38
4.12	ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ IGS ทำการตัดด้วยเอนไซม์ <i>HinfI</i> , <i>Sau3AI</i> และ <i>DdeI</i> บนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 2.0% ของเห็ด Fu4 และ Fu5.....	38
4.13	ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ทำการตัดด้วยเอนไซม์ <i>EcoRI</i> , <i>HaeIII</i> และ <i>HindIII</i> บนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 2.0% ของเห็ด Fu4 และ Fu5.....	39
4.14	ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ IGS ทำการตัดด้วยเอนไซม์ <i>EcoRI</i> , <i>HaeIII</i> และ <i>HindIII</i> บนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 2.0% ของเห็ด Fu4 และ Fu5.....	39
4.15	ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ทำการตัดด้วยเอนไซม์ <i>EcoRI</i> , <i>HaeIII</i> , <i>HindIII</i> และ <i>HinfI</i> บนโพลีอะครีลาไมด์เจล ของเห็ด Fu1, Fu2 และ Fu3.....	40
4.16	ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ IGS ทำการตัดด้วยเอนไซม์ <i>EcoRI</i> , <i>HaeIII</i> , <i>HindIII</i> และ <i>HinfI</i> บนโพลีอะครีลาไมด์เจล ของเห็ด Fu1, Fu2 และ Fu3.....	41
4.17	ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS และ IGS ทำการตัดด้วยเอนไซม์ <i>EcoRI</i> , <i>HaeIII</i> , <i>HindIII</i> และ <i>HinfI</i> บนโพลีอะครีลาไมด์เจลของเห็ด Fu4 และ Fu5.....	42
4.18	ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS และ IGS ทำการตัดด้วยเอนไซม์ <i>Sau3AI</i> และ <i>DdeI</i> บนโพลีอะครีลาไมด์เจลของเห็ด Fu1, Fu2, Fu3, Fu4 และ Fu5.....	43
4.19	รูปแบบไอโซไซม์ของเห็ดสายพันธุ์ลูกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 เปรียบเทียบกับ เห็ดสายพันธุ์พ่อแม่.....	45
4.20	รูปแบบไอโซไซม์ของเห็ดสายพันธุ์ลูกผสม Fu4 และ Fu5 เปรียบเทียบกับ เห็ดสายพันธุ์พ่อแม่.....	46

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

การรวมโปรโตพลาสต์ (protoplast fusion) เป็นเทคนิคอย่างหนึ่งที่นำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อให้ได้พืชที่มีคุณสมบัติตามความต้องการ และเป็นการสร้าง fusant (ลูกผสม) สายพันธุ์ใหม่ที่มีโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็นชุดจากเดิมที่เป็น โมนอพลอยด์ (monoploid) ให้เป็น ดิพลอยด์ (diploid) หรือ โพลีพลอยด์ (polyploid) ซึ่งอาจทำให้ได้ดอกเห็ดที่ใหญ่และแข็งแรงขึ้น (Peberdy *et al.* 1976) การรวมโปรโตพลาสต์ของเห็ดสามารถทำได้ทั้งระหว่างเห็ดต่างสายพันธุ์ (interspecific protoplast fusion) เห็ดต่างชนิด (interspecific protoplast fusion) และเห็ดต่างสกุล (intergeneric protoplast fusion) แต่การรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดต่างสกุลนั้น จะเกิดขึ้นได้ยากกว่าการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดต่างชนิดหรือต่างสายพันธุ์ เนื่องจากความสำเร็จในการรวมโปรโตพลาสต์ น่าจะเกิดขึ้นได้ยากกว่า ตามความใกล้ชิดมากน้อยทางพันธุกรรมของคู่เห็ด (Anne and Peberdy. 1976)

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 ทำการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรม เห็ดนางรมทอง และเห็ดนางนวล
- 1.2.2 พิสูจน์ความเป็นลูกผสมโดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและรูปแบบไอโซไซม์หรือลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ทำการรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรม เห็ดนางรมทอง และเห็ดนางนวลโดยใช้สาร PEG (polyethylene glycol) และทำการคัดเลือกฟิวเซนท์ (fusant) โดยการตรวจหาแคลมป์คอนเนคชั่น (clamp connection, clamps) ในเส้นใย ตามด้วยการพิสูจน์ความเป็นลูกผสมโดยการฟิวเซนท์ที่ได้ไปทำการพิสูจน์ความเป็นลูกผสมโดยการทดลอง 3 วิธี ดังต่อไปนี้ 1. เพาะให้เกิดดอก ตามด้วยการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายใน 2. ศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ และหรือ 3. ศึกษารูปแบบไอโซไซม์ ทั้งนี้ได้เปรียบเทียบลักษณะของฟิวเซนท์ เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ทั้ง 3 วิธี

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถสร้างลูกผสมระหว่างเห็ดนางรม เห็ดนางรมทอง และเห็ดนางนวล โดยวิธีการรวมโปรโตพลาสต์ และสามารถนำวิธีการรวมโปรโตพลาสต์ไปประยุกต์ใช้กับเห็ดชนิดอื่น ๆ เพื่อสร้างลูกผสมสายพันธุ์ใหม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

2.1 ลักษณะทางชีววิทยาของเห็ดนางรม เห็ดนางรมทอง และเห็ดนางนวล

2.1.1 การจัดจำแนก

เห็ดนางรม เห็ดนางรมทอง และเห็ดนางนวล เป็นเห็ดที่อยู่ในสกุล (genus) เดียวกันแต่ต่างชนิด (species) กัน ซึ่งสามารถจัดจำแนก (classification) ได้ดังนี้ (Alexopoulos and Mim. 1979)

Kingdom:	Mycota (Fungi)
Division	Amastigomycota
Subdivision	Basidiomycotina
Class	Basidiomycetes
Subclass	Holobasidiomycetidae II
Order	Agaricales
Family	Tricholomataceae
Genus	<i>Pleurotus</i>

ชื่อวิทยาศาสตร์และชื่อสามัญของเห็ดทั้ง 3 ชนิด มีดังต่อไปนี้ (Stamets. 2000):-

เห็ดนางรม (oyster mushroom) : *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kummer

เห็ดนางรมทอง (golden oyster mushroom) : *Pleurotus citrinopileatus* Singer

เห็ดนางนวล (pink oyster mushroom) : *Pleurotus djamor* (Fr. Boedjin)

นอกจากนี้ยังพบว่ามีการจัดจำแนกเห็ดนางรมทองและเห็ดนางนวลในชื่ออื่นๆอีกดังต่อไปนี้ เห็ดนางรมทอง คือ *P. cornucopiae* var. *citrinopileatus* (Sing.) Ohira หรือ *P. citrinopileatus* Singer (Hilber, 1982; Ohira.,1990) ส่วนเห็ดนางนวล คือ *P. flabellatus* (Berk.&Br.) Saccardo หรือ *P. djamor* (Fr.) Boedjin หรือ *P. salmoneo-stramineus* Vasil. (Corner,1981; Stamets, 1993)

2.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เห็ดนางรม เห็ดนางรมทอง และเห็ดนางนวล เป็นเห็ดในสกุล *Pleurotus* ซึ่งเห็ดในสกุลนี้จะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาค่อนข้างคล้ายกัน คือ ดอกเห็ดเกิดเดี่ยวๆหรือเป็นกลุ่ม รูปทรงของดอกเห็ดคล้ายพัด (flabellate) หรือเปลือกหอย (dimidiate) มีก้านดอก (stalk, stipe) อวบน้ำอยู่บริเวณตรงกลางหรือด้านข้างของขอบหมวกดอก (cap, pileus) ผิวด้านบนของหมวกดอกอาจพบเม็ดสี (pigment) ครีบดอก (gill,lamellae) เจริญกล้าแนวต่ำลงมาบนก้าน (decurrent) เนื้อเยื่อของดอกเห็ด (context) มีความสดและอ่อนนุ่ม เส้นใยมีสีใส (hyaline) และมีผนังกัน (septate) แบบ dolipore แบ่งเส้นใยเป็นการค้า ไม่ว่าจะรับประทานอีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ช่องๆ และมีแคลมป์คอนเนคชั่น ดอกเห็ดมีการสร้างสปอร์ (basidiospore) ที่บริเวณด้านข้างของครีบ ซึ่งอยู่ใต้หมวกดอก สปอร์จะมีรูปร่างยาวรี และมีสีใส สปอร์พิมพ์ (spore print) มีสีขาว สีชมพู หรือ สีเทา (Pegler, 1983) ส่วนสีของดอกเห็ดมีทั้งสีขาว สีเทา (เห็ดนางรม) สีทอง (เห็ดนางรมทอง) หรือ สีชมพู (เห็ดนางรม) (Stamets, 1993)

2.2 ขั้นตอนการรวมโพรโตพลาสต์

การรวมโพรโตพลาสต์ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

2.2.1 การแยกโพรโตพลาสต์ (protoplast isolation หรือ protoplast preparation) เป็นขั้นตอนของการเปลี่ยนแปลงเซลล์เป็นโพรโตพลาสต์

2.2.2 การรวมหรือการหลอมโพรโตพลาสต์ (protoplast fusion) เป็นขั้นตอนที่เหนี่ยวนำให้โพรโตพลาสต์ตั้งแต่สองโพรโตพลาสต์เข้ามารวมกันเป็นโพรโตพลาสต์เดียว

2.2.3 การเปลี่ยนโพรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์ (protoplast regeneration) เนื่องจากโพรโตพลาสต์เป็นโครงสร้างที่พินิจจำนวนไม่ได้ จึงจำเป็นต้องเปลี่ยนโพรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์ปกติ โดยการทำให้โพรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ แม้ว่าโดยธรรมชาติโพรโตพลาสต์ต้องสามารถสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาเอง เมื่อโพรโตพลาสต์เปลี่ยนกลับเป็นเซลล์ปกติจึงจะสามารถเพิ่มจำนวนและเจริญเติบโตจนนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้

2.3 การรวมโพรโตพลาสต์ (protoplast fusion)

เนื่องจากการรวมโพรโตพลาสต์เป็นขั้นตอนที่มีการหลอมรวมกันของโพรโตพลาสต์ตั้งแต่ 2 โพรโตพลาสต์ขึ้นไป จึงทำให้สารพันธุกรรมจากแต่ละโพรโตพลาสต์เข้ามาอยู่ด้วยกัน จึงอาจทำให้ยีนที่ควบคุมลักษณะที่สนใจจากสายพันธุ์ต่างๆ เข้าไปอยู่รวมกันในโพรโตพลาสต์เดียวกัน

ลูกผสมที่ได้จากการรวมโพรโตพลาสต์มีชื่อเรียกว่า recombinant หรือ fusion hybrid หรือ fusion product หรือ fusant

วิธีการรวมโพรโตพลาสต์ทำได้ 2 วิธี คือ การใช้สารเคมี และการใช้กระแสไฟฟ้า โดยวิธีการใช้สารเคมีเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมากกว่าวิธีการใช้กระแสไฟฟ้า

2.3.1 การรวมโพรโตพลาสต์โดยใช้สารเคมี มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

สารเคมีที่นิยมใช้ในการรวมโพรโตพลาสต์ คือ PEG (polyethylene glycol) ซึ่งมีสูตรโมเลกุล ดังนี้ $\text{CH}_2\text{OH}-(\text{CH}_2-\text{OCH}_2)-\text{CH}_2-\text{OH}$ โดยจะใช้ร่วมกับแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) การนำ PEG มาช่วยเหนี่ยวนำทำให้เกิดการรวมโพรโตพลาสต์นั้นเริ่มทำโดย Kao and Michayluk (1974) ที่พบว่าสาร PEG เป็นสารพอลิเมอร์ที่ทำให้เกิดการรวมตัวกันของโพรโตพลาสต์ (fusing agent) เนื่องจากมีพันธะไฮโดรเจนเป็นไฮโดรเจนที่สร้างพันธะกับโปรตีนที่เกาะติดกันอยู่ การนำ PEG มาใช้จะช่วยให้พันธะไฮโดรเจนเหล่านี้แตกออก ทำให้โพรโตพลาสต์เข้าใกล้กันมากขึ้น การนำ PEG มาใช้จะช่วยให้พันธะไฮโดรเจนเหล่านี้แตกออก ทำให้โพรโตพลาสต์เข้าใกล้กันมากขึ้น การนำ PEG มาใช้จะช่วยให้พันธะไฮโดรเจนเหล่านี้แตกออก ทำให้โพรโตพลาสต์เข้าใกล้กันมากขึ้น

อีเธอร์ (ether bond) ทำให้มีประจุไฟฟ้าเป็นลบเล็กน้อย จึงทำให้เกิดพันธะไฮโดรเจนกับประจุบวกของน้ำ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และสารอื่นๆที่อยู่บนผิวของโพรโตพลาสต์ ซึ่งยังผลให้เกิดการเกาะตัวกันของโพรโตพลาสต์ ส่วนแคลเซียมไอออนทำหน้าที่เชื่อมระหว่างกลุ่มของโปรตีนที่ผิวของโพรโตพลาสต์ (Anne and Peberdy. 1976) สิ่งที่ควรคำนึงถึงในการใช้ PEG ให้ได้ผลสูงสุด คือ น้ำหนักโมเลกุล ความเข้มข้น และเวลาที่ใช้ในการบ่ม

2.4 การคัดเลือกลูกผสมและการพิสูจน์ความเป็นลูกผสมในเห็ด

การคัดเลือกลูกผสมในเห็ดที่ง่ายที่สุด คือ การตรวจหา clamps ถ้าพบแสดงว่าสายพันธุ์นั้นน่าจะเป็นลูกผสม ซึ่งสามารถพิสูจน์ให้แน่ใจมากขึ้นโดยการเพาะให้เกิดดอกเห็ดและตามด้วยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการศึกษารูปแบบไฮไซไซม์หรือลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

การคัดเลือกลูกผสมด้วยวิธีการตรวจสอบการสร้าง clamps ต้องใช้เส้นใยสายพันธุ์พ่อแม่ที่เป็นโมโนคาริโออนมา (monokaryon, n) มาทำการรวมโพรโตพลาสต์ โดยที่ถ้าเป็นลูกผสมจริงจะมีเส้นใยเป็นแบบเฮเทอโรคาริโออน (heterokaryon, n+n) หรือไดคาริโออน (dikaryon, n+n) ซึ่งสามารถสร้าง clamps ได้

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการรวมโพรโตพลาสต์

จรัสรัช มั่นถาวร (2544) ได้ทำการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดหอม พบว่ามีเชื้อลูกผสม 5 สายพันธุ์ จากเชื้อทั้งหมด 475 สายพันธุ์ ที่แสดงความเป็นลูกผสมโดยสามารถต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อรา nistatin และ iodine และเมื่อทำการวัดขนาดของเส้นใยและปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด พบว่าลูกผสมทั้ง 5 สายพันธุ์ มีขนาดของเส้นใยและปริมาณดีเอ็นเอมากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

ประภัสสร โชคสวนทรัพย์ (2540) ได้ทำการผสมพันธุ์เห็ดหอม (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) กับเห็ดขอนขาว (*L. squarrosulus* (Mont.) Pegler) โดยวิธีการรวมโพรโตพลาสต์ พบว่าได้ลูกผสม 3 สายพันธุ์ที่มีขนาดและน้ำหนัก รวมทั้งปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมดของเส้นใยมากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่และแม่อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ และเมื่อนำลูกผสมทั้ง 3 สายพันธุ์ไปเพาะเลี้ยงจนเกิดดอกในถุงซีลี่ย พบว่าดอกเห็ดของลูกผสม 2 สายพันธุ์ มีรูปร่างลักษณะทั้งภายนอกและภายในเป็นลักษณะผสมระหว่างเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว ส่วนอีก 1 สายพันธุ์ มีรูปร่างลักษณะทั้งภายนอกและภายในคล้ายคลึงกับเห็ดหอม

Wang (1992) ได้ทดลองใช้โพลีเอทธิลีนไกลคอลในการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดฟาง (*Volvarella volvacea*) กับเห็ด *V. displasia* พบว่ามีความถี่ของการรวมโพรโตพลาสต์เท่ากับร้อยละ 95 และมีความถี่ของการเปลี่ยนโพรโตพลาสต์กลับไปเป็นเซลล์เท่ากับร้อยละ 4 และเมื่อทำการคัดเลือก

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลูกผสมโดยใช้สีของดอกเห็ด ปริมาณของโปรตีนและกรดอะมิโนของลูกผสมเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ พบว่าลูกผสมที่ได้มีปริมาณโปรตีนและกรดอะมิโนมากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังคัดเลือกลูกผสมโดยการวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์ พบว่าลูกผสมที่ได้มีลักษณะบางอย่างแตกต่างไปจากสายพันธุ์พ่อแม่

Takehara *et al.* (1993) ได้ทำการรวม โพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kummer) กับเห็ด *P. pulmonarius* (Fr.) Quel และระหว่างเห็ด *P. pulmonarius* (Fr.) Quel กับเห็ด *P. cornucopiae* (Paul.) Rolla. Var. *citrinopileatus* (Sing.) Ohira โดยใช้โพรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเส้นใยที่มีนิวเคลียสเดี่ยวสายพันธุ์กลายที่ต้องการสารบางชนิดในการเจริญเติบโต พบว่า ลูกผสมที่ได้จากทั้ง 2 คู่ผสมพันธุ์ มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับเห็ด *P. pulmonarius*

2.6 บัญชีกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) (สุรินทร์, 2545)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส หรือ PCR (Polymerase Chain Reaction) เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ (DNA) เป้าหมาย โดยไม่จำเป็นต้องทำให้ดีเอ็นเอดังกล่าวบริสุทธิ์ก่อนและสามารถแยกส่วนของ ดีเอ็นเอที่สนใจได้โดยไม่ต้องนำไปขยายเพิ่มปริมาณในเซลล์หรือนำไปโคลน (clone) การทำ PCR คือ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส (DNA polymerase) ซ้ำกันหลายๆรอบเพื่อให้ได้ดีเอ็นเอปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณแบบ exponential โดยการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะเกิดขึ้นได้จำเป็นต้องมีไพรเมอร์ (primer) 2 ชนิดที่มีเบสคู่สม (complement) กับปลายทั้ง 2 ด้านของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ โดยไพรเมอร์จะเกาะกับ ดีเอ็นเอคนละสายและมีปลาย 3' ในทิศทางเข้าหากันซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้เป็น โอลิโกนิวคลีโอไทด์ (oligonucleotide) ซึ่งทั่วไปมีความยาวประมาณ 18-30 เบส ดังนั้นข้อกำหนดในการทำ PCR คือ ต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการเพิ่มปริมาณ ซึ่งอาจจะทราบทั้งหมดหรือ ทราบเฉพาะส่วนปลาย เพื่อการออกแบบสังเคราะห์ไพรเมอร์มาใช้ในปฏิกิริยาต่อไป ทำให้บริเวณหรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณขึ้น และมีขนาดความยาวเท่ากับชิ้นดีเอ็นเอจากปลายของไพรเมอร์อีกชนิดหนึ่งนั่นเอง

ขั้นตอนการทำ PCR เริ่มจากการนำโอลิโกนิวคลีโอไทด์ (ไพรเมอร์) ทั้งสองชนิด บัฟเฟอร์ และ ดีออกซีนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) ใส่มารวมกับดีเอ็นเอที่สกัดได้ (genomic DNA) ดีเอ็นเอต้นแบบจะแยกเป็นสายเดี่ยวเมื่อได้รับความร้อน ต่อไปลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วเพื่อให้ไพรเมอร์เกิดเบสคู่สมกับส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ จากนั้นเปลี่ยนอุณหภูมิให้พอเหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ดีเอ็นเอ โพลีเมอเรส (DNA polymerase) พร้อมทั้งใส่เอนไซม์ลงไปจะทำให้เกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ เมื่อปฏิกิริยาดำเนินครบทั้ง 3 ขั้นตอน โมเลกุลของดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ขั้นตอนต่อไปจะทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นรอบที่ 2 ดังนั้น ถ้าดำเนินปฏิกิริยาซ้ำกันหลายๆ รอบ จำนวนผลผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(PCR product) จะคำนวณได้เท่ากับ $2n$ (n = จำนวนรอบของปฏิกิริยา) ถ้าปฏิกิริยาถูกใช้โพลีเมอเรสมีประสิทธิภาพ 100 เปอร์เซ็นต์

การนำเทคนิคปฏิกิริยาถูกใช้โพลีเมอเรสไปใช้จะต้องคำนึงถึงสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดของปฏิกิริยาจากองค์ประกอบดังต่อไปนี้

1. ไพริเมอร์เป็น โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้น มีความยาวประมาณ 18-30 เบส มีการเรียงลำดับเบสเป็นคู่สมกับ 3'-end และ 5'-end ของดีเอ็นเอต้นแบบ และควรมีปริมาณ G+C ใกล้เคียงกับซีเอ็นเอที่ต้องการขยาย ซึ่งควรมีปริมาณระหว่าง 50 – 60 เปอร์เซ็นต์

2. ความเข้มข้นของเอนไซม์ *Taq* DNA Polymerase ควรอยู่ในช่วง 0.5 – 5 units ต่อไมโครลิตร 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 ดังนี้คือ

3.1 การเกิดการจับกันของไพริเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ

3.2 อุณหภูมิที่ทำให้การแยกออกจากกันของดีเอ็นเอต้นแบบ

3.3 ผลผลิตจากปฏิกิริยาถูกใช้โพลีเมอเรส

3.4 ความจำเพาะของผลผลิตจากดีเอ็นเอต้นแบบ

3.5 ความถูกต้องในการทำงานของเอนไซม์

4. ความเข้มข้นของดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTP) ปกติควรอยู่ระหว่าง 50 – 200 ไมโครโมลาร์ ที่ pH 7.0 ในปฏิกิริยาถูกใช้โพลีเมอเรสความเข้มข้นของนิวคลีโอไทด์แต่ละชนิดควรสมดุลกันอย่างพอเหมาะ เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างจำเพาะ ได้ผลผลิตสูง มีความถูกต้อง และความผิดพลาดในการเรียงลำดับเบสคู่สม

5. บัฟเฟอร์ที่ใช้สำหรับปฏิกิริยาถูกใช้โพลีเมอเรส ประกอบด้วยสารต่อไปนี้

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

5.2 50 มิลลิโมลาร์ KCl เพื่อเร่งการจับกันของไพริเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ

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

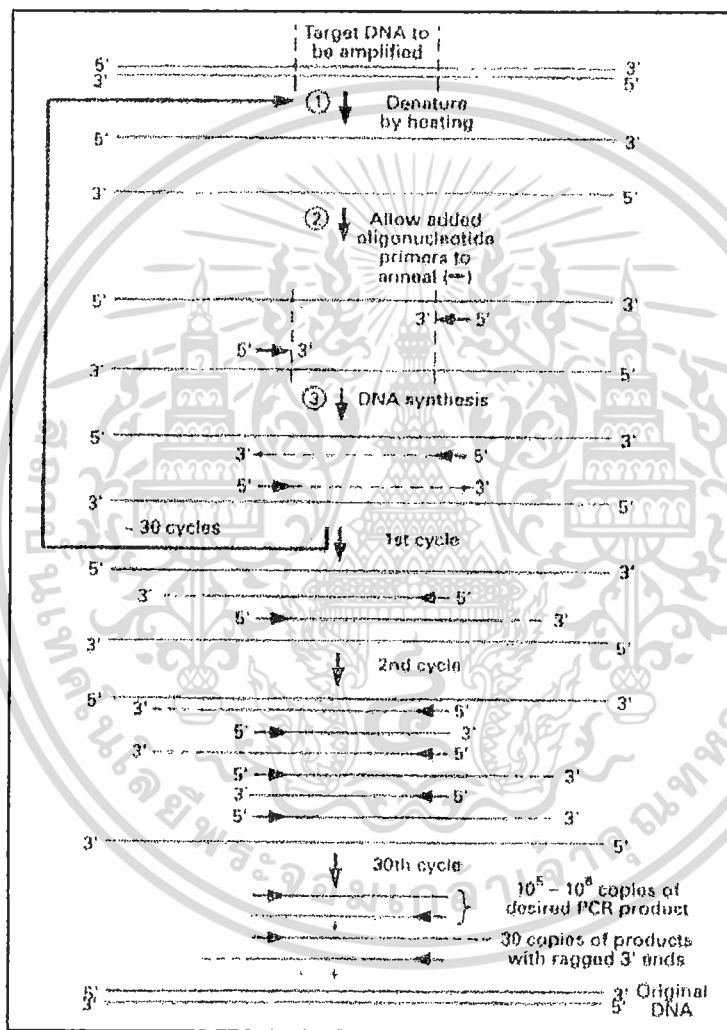
6. สภาวะที่เหมาะสมในแต่ละขั้นตอน

6.1 Denaturation เป็นขั้นตอนในการแยกดีเอ็นเอต้นแบบให้เกิดเป็นสายเดี่ยว อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 90-95 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.2 Annealing เป็นขั้นตอนในการจับกันระหว่างไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบที่ผ่านขั้นตอน denaturation มาแล้ว อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 50- 60 องศาเซลเซียส

6.3 Extention เป็นขั้นตอนในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยต่อปลายกับไพรเมอร์ อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 72 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ *Taq* DNA Polymerase (ภาพที่ 2.1) (วัชรวิและมนตรี. 2539)



ภาพที่ 2.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (สุรินทร์. 2545)

7. ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมายที่เหมาะสมกับจำนวนรอบของการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสได้แสดงในตารางที่ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมายและจำนวนรอบ (วัฏรี และมนตรี. 2539)

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย (ng/ μ l)	จำนวนรอบ
3.0×10^5	25 – 30
1.5×10^4	30 – 35
1.0×10^3	35 – 40
50	40 – 45

2.7 อาร์เอฟแอลพี (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism) (สุรินทร์. 2545)

อาร์เอฟแอลพี หมายถึงความแตกต่างของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) เนื่องจากการตรวจสอบในระดับโปรตีนทำได้ไม่กว้างขวางเท่าที่ควร จึงมีการตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอ ซึ่งมีข้อได้เปรียบ คือ สามารถวิเคราะห์จากส่วนใดก็ได้ โดยไม่ขึ้นกับเนื้อเยื่อ ระยะการเจริญเติบโต และสภาพแวดล้อม ทั้งยังสามารถตรวจสอบได้ทั้งส่วนของยีนและส่วนที่ไม่ใช่ยีน ส่วนของดีเอ็นเอในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตอยู่ในนิวเคลียสและออร์แกเนลบางชนิด ได้แก่ คลอโรพลาสต์และไมโทคอนเดรีย โมเลกุลของดีเอ็นเอนี้มีความสามารถที่จะจำลองโมเลกุลได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ เพื่อถ่ายทอดไปสู่เซลล์ลูกและคงลักษณะที่คงที่เหมือนเดิมตลอดไป แต่บางครั้งก็อาจมีการเปลี่ยนแปลงของเบสภายในดีเอ็นเอได้ เนื่องจากสภาพแวดล้อมหรือข้อผิดพลาดของเซลล์เอง นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงของเบสแต่ละตัวแล้ว อาจมีการเปลี่ยนแปลงของชิ้นดีเอ็นเอขนาดใหญ่หรือเปลี่ยนแปลงในระดับโครโมโซม เช่น มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอหรือโครโมโซมหายไป (deletion) มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอบางส่วนเพิ่มขึ้นมา (insertion) มีการจัดเรียงตัวใหม่ของดีเอ็นเอภายในโครโมโซม (chromosome rearrangement) หรือมีการเปลี่ยนตำแหน่งของดีเอ็นเอบางส่วนภายในโครโมโซมหรือจากต่างโครโมโซม (transposition) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้ทำให้เกิดความหลากหลายภายในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (DNA sequencing) แล้วนำมาเปรียบเทียบกัน แต่เป็นวิธีที่ทำได้ยากและใช้เวลานาน วิธีง่ายกว่า คือ นำดีเอ็นเอที่ต้องการหาความแตกต่างนั้น มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิด แล้วเปรียบเทียบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์นั้น

การทำอาร์เอฟแอลพีทำได้โดยเริ่มจากการย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เอนไซม์ประเภทนี้จะสามารถจดจำลำดับเบสบนดีเอ็นเอที่จำเพาะและตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งนั้นๆ หลังจากนั้นจึงทำการแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน ซึ่งได้ถูกตัดโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนแผ่นเจลจะได้แถบย่อยๆ มากมายทำให้ไม่สามารถแยกแถบย่อยแต่ละแถบได้ จึงต้องทำการย้ายดีเอ็นเอจากแผ่นเจลมาไว้บนแผ่นเมมเบรนฟิลเตอร์ (membrane filter) หลังจากนั้นจึงนำไปตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจโดยนำไปเอกซเรย์เป็นเอกซเรย์สวอนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จับคู่ (hybridize) กับโพรบ (probe) ซึ่งอาจจะเป็นดีเอ็นเอ หรืออาร์เอ็นเอ (Meyers, 1995) ปกติแล้วเทคนิคอาร์เอฟแอลพี สามารถตรวจสอบได้กับทุกส่วนของสิ่งมีชีวิต และชนิดของโพรบที่มีจำนวนไม่จำกัด แต่วิธีการจะยุ่งยากและเสียค่าใช้จ่ายสูง (Morgante, 1994)

ปัจจุบันได้มีการประยุกต์วิธีอาร์เอฟแอลพีให้ง่ายขึ้นโดยไม่ต้องทำขั้นตอนการทำ hybridization โดยการนำเทคนิคพีซีอาร์ มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณที่มีลำดับที่ต้องการศึกษาแล้วจึงนำผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ที่ได้ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (เทคนิค PCR/RFLP) ซึ่งในศีกษาวิจัยครั้งนี้ได้ใช้ วิธีนี้

เอนไซม์ตัดจำเพาะ เป็นเอนไซม์ที่สกัดจากแบคทีเรีย ปัจจุบันสามารถแยกได้มากกว่า 400 ชนิด ทำหน้าที่ในการป้องกันดีเอ็นเอแปลกปลอมที่บุกรุกเข้าสู่เซลล์ ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้จะมีความจำเพาะต่อเบสบนดีเอ็นเอเพื่อป้องกันการย่อยตัวเอง การเรียกชื่อเอนไซม์จะใช้ระบบ 3 ตัวอักษร ตัวแรกเป็นตัวพิมพ์ใหญ่ซึ่งเป็นตัวอักษรแรกของชื่อสกุล ตัวที่ 2 และ 3 เป็นตัวพิมพ์เล็กซึ่งเป็น 2 ตัวอักษรแรกของชื่อชนิด ส่วนตัวเลขโรมันจะบอกถึงลำดับของเอนไซม์ (ที่อาจมากกว่า 1 ชนิด) ที่แยกจากแบคทีเรียตัวนั้นๆ

อาจแบ่งเอนไซม์ตัดจำเพาะออกเป็น 3 ประเภท ดังต่อไปนี้

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

ประเภทที่ 2 เป็นเอนไซม์ที่มีการจดจำลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอจำนวน 4 ถึง 8 เบส ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดดีเอ็นเอที่มีขนาดแน่นอน ส่วนใหญ่ทางพันธุวิศวกรรมจะใช้นิยมใช้เอนไซม์ประเภทนี้การตัดเอนไซม์ประเภทนี้จะมี 3 ลักษณะ ดังต่อไปนี้

1. การตัดจากปลาย 5' ไป 3' ทำให้ได้สายดีเอ็นเอที่มีปลายเหนียว เช่น *EcoRI*
2. การตัดจากปลาย 3' ไป 5' ทำให้ได้สายดีเอ็นเอที่มีปลายเหนียว เช่น *PstI*
3. การตัดในลักษณะตรง ทำให้ได้สายดีเอ็นเอที่มีปลายทู่ เช่น *SmaI*

ประเภทที่ 3 เป็นเอนไซม์ที่มีลักษณะคล้ายกับประเภทที่ 1 ต่างกันตรงที่เอนไซม์ชนิดที่ 3 จะตัดดีเอ็นเอตำแหน่งเบสที่ถัดจากตำแหน่งเบสที่ถัดจากตำแหน่งจดจำอย่างจำเพาะเจาะจง

เอนไซม์ตัดจำเพาะจะมีประสิทธิภาพการทำงานสูง และไวต่ออุณหภูมิ ดังนั้นจึงต้องทำการเก็บเอนไซม์เหล่านี้ในอุณหภูมิต่างๆ เช่นที่ -20 องศาเซลเซียสซึ่งปกติที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลายในเอนไซม์จะแข็งตัว โครงสร้างในการแข็งตัวของสารละลายจะทำให้เอนไซม์ถูกทำลายได้ เมื่อนำเอนไซม์มาละลายและแช่แข็งบ่อยๆ โดยทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็ว การป้องกันปัญหาการเก็บรักษาเอนไซม์จึงต้องอาศัยกลีเซอรอล (glycerol) ซึ่งเป็นสารละลายเยื่อที่มีความหนืด การที่กลีเซอรอลเป็นสารละลายเยื่อจะทำให้ไม่เกิดปฏิกิริยาต่อเอนไซม์ และยังคงรักษาสภาพของสารละลายไม่ให้แข็งตัวได้ นอกจากนี้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์จะขึ้นกับสถานะของปฏิกิริยานั้นๆ ซึ่งควบคุมด้วยบัฟเฟอร์ (buffer) สามารถแบ่งชนิดเอนไซม์ที่ต้องการสถานะเกลือแตกต่างกันเป็น 4 จำพวก คือ

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

สำหรับเกลือที่ใช้สำหรับเอนไซม์ 3 จำพวกแรก คือ เกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ส่วนเกลือสำหรับเอนไซม์จำพวกสุดท้าย คือ โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 2.2 ความเข้มข้นของเกลือในบัฟเฟอร์ต่างๆ ที่ใช้ในเอนไซม์ตัดจำเพาะ (สุมาลี, 2533)

บัฟเฟอร์	NaCl	Tris-HCl PH 7.5	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

2.8 การแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis of DNA) (สุรินทร์, 2545)

อิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลของสารที่มีประจุออกจากกัน โดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยให้สารที่มีประจุนั้นเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางชนิดหนึ่งในสารละลาย สารที่มีประจุต่างกันจะเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางชนิดหนึ่งในสารละลาย สารที่มีประจุต่างกันจะเคลื่อนที่ไปในทิศทางตรงกันข้าม นอกจากประจุแล้วอัตราการเคลื่อนที่ที่ยังขึ้นอยู่กับขนาดรูปร่าง โมเลกุล แรงเคลื่อนไฟฟ้าและตัวกลางที่ใช้ด้วย

โมเลกุลของดีเอ็นเอประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตจำนวนมาก สารละลายของดีเอ็นเอ (หรืออาร์เอ็นเอ) จึงมีประจุเป็นลบที่ pH เป็นกลาง เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้า โมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่จากขั้วแคโทดไปขั้วแอโนด (ขั้วลบไปขั้วบวก) สำหรับการแยกดีเอ็นเอในเจล agarose โดยทั่วไปจะใช้แรงดันไฟฟ้าประมาณ 100-200 โวลต์ต่อเซนติเมตร (V/cm) ไม่ควรเกิน 200 V/cm อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลบไปยังขั้วบวก เนื่องจากหมู่ฟอสเฟตเป็นส่วนประกอบของนิวคลีโอไทด์ทุกชนิด ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะมีหมู่ฟอสเฟตอยู่น้อยกว่าโมเลกุลขนาดใหญ่ อย่างไรก็ตามมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเอด้วย ดังนี้

1. ขนาดโมเลกุลดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอขนาดใหญ่ดีเอ็นเอที่มีโมเลกุลแบบเส้นตรง (linear) เคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่เคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอแบบวงแหวนที่มีช่องเปิด (open circular หรือ nick circular) ซึ่งจะพบรูปแบบทั้ง 3 ของดีเอ็นเอได้ในการสกัดพลาสมิด ดังนั้นถ้าต้องการทราบขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอ สามารถทำได้โดยนำอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดโมเลกุลแล้ว นำมาเขียนกราฟระหว่างระยะทางที่เคลื่อนที่และ log ของน้ำหนักโมเลกุลเพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐาน ทั้งนี้ต้องเปรียบเทียบในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสครั้งเดียวกันเท่านั้น เนื่องจากเป็นค่าแบบสัมพัทธ์

2. รูปแบบของดีเอ็นเอ (configuration) กรณีที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากันนั้น ดีเอ็นเอที่มีรูปแบบเป็นวงแหวนที่พันเกลียวซ้อน (supercoil หรือ covalently closed circular) จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอปลายเปิดแบบเส้นตรง และดีเอ็นเอแบบเส้นตรงจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอแบบวงแหวนที่มีช่องเปิด (open circular หรือ nick circular) ซึ่งจะพบรูปแบบทั้ง 3 ของดีเอ็นเอได้ในการสกัดพลาสมิด

3. เฟอร์เซนต์และชนิดของเจล ถ้าเพิ่มความเข้มข้นหรือเปอร์เซนต์เจล โมเลกุลของดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้ช้าลง โดยเจลที่นิยมใช้กับกรดนิวคลีอิกอีกคือ โพลีอะครีลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) และอะกาโรสเจล (agarose gel) โดยโพลีอะครีลาไมด์เจลใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็กระหว่าง 6-1,000 คู่เบส (ตารางที่ 3) ส่วนอะกาโรสเจลใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ประมาณ 100 คู่เบสจนถึงกว่า 50,000 คู่เบส (ตารางที่ 4)

4. แรงเคลื่อนไฟฟ้า (voltage) ถ้าเพิ่มแรงเคลื่อนไฟฟ้าดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ได้เร็วขึ้น ในการแยกขนาดดีเอ็นเอโดยอิเล็กโทรโฟรีซิสนี้ ต้องใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าที่เหมาะสม ถ้าใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าสูงเกินไปดีเอ็นเอจะเคลื่อนที่ช้า แยกตัวได้ดี แต่แถบดีเอ็นเอจะไม่คมชัด เพราะเกิดการแพร่ (diffusion) ของดีเอ็นเอ

5. บัฟเฟอร์ที่ใช้ ชนิดของบัฟเฟอร์มีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้มี 3 ชนิด คือ TAE (Tris-acetate, EDTA), TBE (Tris-borate, EDTA) และ TPE (Tris-phosphate, EDTA) ซึ่งมีข้อดีและข้อเสียต่างกัน TBE นิยมใช้ที่มีความเข้มข้น 0.5 เท่า ใช้แยกดีเอ็นเอได้ดี มีความสามารถเป็นบัฟเฟอร์ (buffering capacity) ได้ดี แต่สามารถเกิดปฏิกิริยากับอะกาโรสได้ จึงไม่เหมาะถ้าต้องการนำดีเอ็นเอกลับมาใช้อีก TAE ใช้ได้ทั่วไปและใช้ได้ดีในกรณีที่ต้องการนำดีเอ็นเอกลับมาใช้อีก แต่มีความสามารถในการเป็นบัฟเฟอร์ต่ำ จึงไม่ควรใช้ในกรณีที่ทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นเวลานานมากหรือควรให้มีการหมุนเวียนของบัฟเฟอร์ (recirculation) ส่วน TPE มีความสามารถเป็นบัฟเฟอร์ได้ดี แยกดีเอ็นเอสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอ็นเอ ได้เร็ว แต่ไม่เหมาะถ้ามีการสกัดเอ็นเอจากเจลและตกตะกอนด้วยเอธานอล เพราะจะเกิดการตกตะกอนของฟอสเฟตด้วยการเลือกใช้บัฟเฟอร์แต่ละชนิดจึงขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการทดลอง

2.9 การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอ (สุรินทร์, 2545)

การตรวจสอบคุณภาพและวัดปริมาณดีเอ็นเอทำได้พร้อมๆ กัน วิธีที่ใช้โดยทั่วไปมี 2 วิธีคือวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตโดยใช้ spectrophotometer หรือวัดการเรืองแสงของดีเอ็นเอที่จับตัวกับ เอธิเดียมโบรไมด์หลังจากแยกขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

2.9.1 วิธีวัดการดูดกลืนแสง

เนื่องจากเบสที่เป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิกสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุด ที่ความยาวช่วงคลื่นประมาณ 260 นาโนเมตร (ส่วนโปรตีนจะดูดแสงได้ดีที่สุดที่ความยาวช่วงคลื่นประมาณ 280 นาโนเมตร) ดังนั้นจึงใช้หาปริมาณของกรดนิวคลีอิกได้ โดยสารละลายดีเอ็นเอเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมสามารถดูดแสงได้ค่า absorbance ที่ 260 นาโนเมตร (A_{260} หรือ OD_{260}) เท่ากับ 1 ส่วน สารละลายอาร์เอ็นเอหรือ โอลิโกนิวคลีโอไทด์ที่ดูดแสงได้ $OD_{260} = 1$ มีความเข้มข้น 40 และ 33 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมตามลำดับ การวัดปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธีนี้จะใช้ได้ดีในกรณีที่สารละลายดีเอ็นเอค่อนข้างบริสุทธิ์ ไม่มีอาร์เอ็นเอและ โอลิโกนิวคลีโอไทด์เจือปน และต้องมีปริมาณมากพอที่จะอ่านค่า OD ได้ ซึ่งอยู่ในระดับไมโครกรัม ปริมาณที่วัดได้โดยวิธีนี้จะแน่นอนและยังตรวจสอบคุณภาพได้ด้วยโดยเปรียบเทียบค่า OD_{260} และ OD_{280} สารละลายดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์จะมีค่าอัตราส่วนระหว่าง OD_{260}/OD_{280} สารละลายดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์จะมีค่าอัตราส่วนระหว่าง OD_{260}/OD_{280} ประมาณ 1.8 ถ้าได้ค่ามากแสดงว่าอาจมีอาร์เอ็นเอปนและถ้าค่าต่ำแสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนหรือฟีนอล วิธีปฏิบัติคือนำสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมได้มาทำให้เจือจางลงแล้ววัดค่า OD_{260}/OD_{280} แล้วจึงคำนวณกลับเป็นความเข้มข้นที่ถูกต้อง

2.9.2 วิธีวัดการเรืองแสงรวมเอธิเดียมโบรไมด์

ทำโดยนำดีเอ็นเอที่เตรียมได้มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล แล้วย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ โมเลกุลของเอธิเดียมโบรไมด์จะเข้าไปแทรกอยู่ในเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ และเมื่อนำไปส่องแสงอัลตราไวโอเลตจะเกิดการเรืองแสง โดยความเข้มของแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอ เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณแล้ว จะสามารถบอกปริมาณของดีเอ็นเอตัวอย่างโดยประมาณได้ โดยปริมาณที่ตรวจสอบได้เป็นระดับนาโนกรัม ดังนั้นกรณีที่ปริมาณดีเอ็นเอน้อยไม่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้จะใช้วิธีนี้ นอกจากนี้การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสยังสามารถบอกคุณภาพของดีเอ็นเอได้ด้วยการปนเปื้อนจากอาร์เอ็นเอ ซึ่งจะเห็นเป็นปื้นเคลื่อนที่เร็วกว่าดีเอ็นเอหรือไม่ และดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดโมเลกุลใหญ่ขนาดไหน มีการแตกหักของโมเลกุลมากเพียงใดวิธีปฏิบัติทำโดยหยอดดีเอ็นเอที่เตรียมได้ปริมาณแน่นอนลงในแผ่นอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาดและปริมาณหลายๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

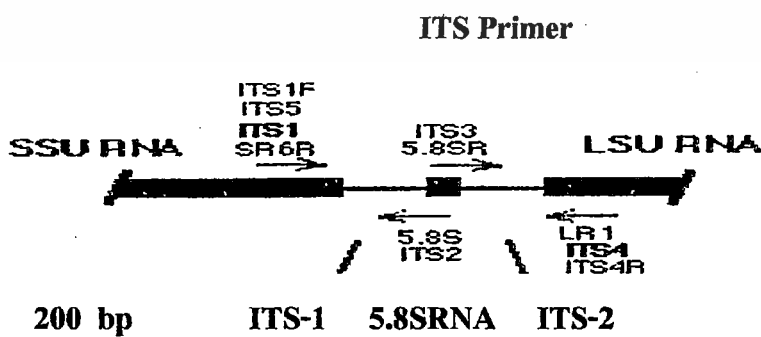
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร เมื่อนำไปส่องผ่านด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต และเปรียบเทียบการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐาน สำหรับรายละเอียดการทำอิเล็กโทรโฟริซิสจะอธิบายในภายหลัง

2.10 Ribosomal DNA (rDNA)

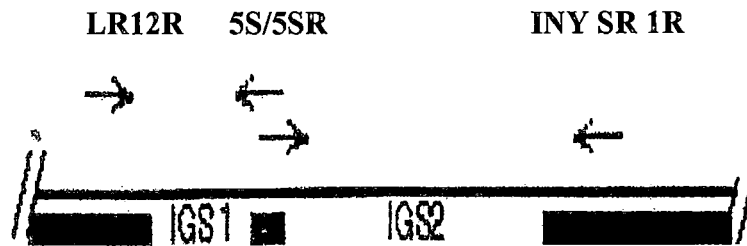
rDNA เป็นสายดีเอ็นเอที่มีเป็นส่วนของไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA) ซึ่งเป็นยีนที่ทำหน้าที่กำหนดรหัสในการสังเคราะห์ไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอ ยีนนี้มีจำนวนมากและชุดที่ซ้ำนี้จะอยู่ติดกันเป็นช่วงยาวและอยู่เป็นกลุ่ม เรียกว่า cluster gene ในเห็ดรา rDNA จะมียีนสำหรับการถอดรหัสให้ได้ ไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอ เรียงลำดับจาก 18SRNA, 5.8SRNA, 25SRNA และ 5SRNA ตามลำดับ ซึ่งจะมีจำนวนชุดที่ซ้ำถึง 40-240 ชุด และจากความรู้ทางเทคนิคของพันธุศาสตร์ ทำให้สามารถทราบลำดับเบสของไพรเมอร์ และบริเวณที่ไพรเมอร์จะเข้าจับกับ rDNA ในปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอในบริเวณที่ต้องการซึ่งสามารถแบ่งไพรเมอร์ออกเป็น 4 กลุ่มคือ

1. small subunit RNA (17-18S) primer sequences
2. large subunit (25-28S) primer sequences
3. internal transcribed spacer (ITS) region primers ในเห็ดราส่วนใหญ่จะใช้ลำดับเบสของไพรเมอร์ในบริเวณ ITS นี้ เนื่องจากในบริเวณนี้มีความผันแปรทางพันธุกรรมสูงกว่าในบริเวณอื่นๆ ของ rDNA จึงใช้แยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตทั้งในระดับระหว่างชนิด (interspecific) และภายในชนิด (intraspecific) ของเห็ดราได้ (ภาพที่ 2.2, ตารางที่ 2.3)
4. intergenic spacer (IGS) region primers ซึ่งพบใน 5S RNA primer sequences ของเห็ดรา ในชั้นเบสดีไอไมซิทิส ภายในเขต IGS เป็นบริเวณที่ไม่มีกรดลอครหัส บริเวณนี้จะมีขนาดตั้งแต่ 2 กิโลเบสขึ้นไป ดังนั้น ภายในบริเวณ IGS นี้ จะไม่ใช้วิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมที่สูงมากๆ (ภาพที่ 2.3, ตารางที่ 2.4)



ภาพที่ 2.2 แสดงบริเวณที่ไพรเมอร์จะเข้าจับกับ rDNA ในบริเวณ Internal Transcribed Spacer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.3 แสดงบริเวณที่ 5S RNA และ SSU RNA จับกับ rDNA ในบริเวณ Intergenic Spacer (IGS) region (Vilgalys lab, 1999)

ตารางที่ 2.3 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	CTTGGTCAATTTAGAGGAAGTAA
ITS4-B	CAGGAGACTTGTACACGGTCCAG

ITS1-ITS4 เป็นไพรเมอร์ที่พัฒนาโดย White et al., 1990

ITS และ ITS4-B เป็นไพรเมอร์ที่พัฒนาโดย Gardes และ Bruns, 1993

ตารางที่ 2.4 ลำดับโอลิโกนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์บางชนิดที่ใช้เพิ่มปริมาณ rDNA ในบริเวณ Intergenic Transcribed Spacer (IGS) region (Vilgalys lab, 1999)

Primer name	Sequence (5'-----> 3')
LR12R	GAACGCCTCTAAGTCAAATCC
InvSR1R	ACTGGCAGAATCAACCAGGTA
5SRNA	ATCAGACGGGATGCGGT
5SRNAR	ACGGCATCCCCGTCTGAT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์

ไอโซไซม์ (isozyme) หรือไอโซเอนไซม์ (isoenzyme) คือเอนไซม์ชนิดเดียวกันแต่มียีนต้นแบบมากกว่าหนึ่งยีน ทำให้มีรูปแบบโมเลกุลที่แตกต่างกันหลายรูปแบบ (เนื่องจากการเรียงตัวของ subunit ที่แตกต่างกัน) แต่ต่างก็ควบคุมปฏิกิริยาชีวเคมีชนิดเดียวกัน มีความจำเพาะต่อสับสเตรท (substrate) ตัวเดียวกันและเร่งปฏิกิริยาเดียวกันในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน และยังมีคุณสมบัติคงตัวไม่ขึ้นอยู่กับสิ่งแวดล้อม ทำให้มีการนำไอโซไซม์มาใช้ในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิต (ชวณพิศ อรุณรังสิกุล. 2538) และใช้ในการพิสูจน์ความเป็นลูกผสมที่เกิดจากการรวม โพรโตพลาสต์ได้ด้วย (Yokono *et al.* 1995)

การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ทำได้โดยใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟเรซิส (electrophoresis) ซึ่งเป็นวิธีทางชีวเคมีที่แยกสารออกจากกันในสนามไฟฟ้า โดยอาศัยความแตกต่างของชนิดและปริมาณประจุ หรือรวมทั้งขนาดและรูปร่างของสารที่ต้องการแยก การตรวจสอบการเคลื่อนที่ของสารในสนามไฟฟ้าดังกล่าวทำได้โดยนำสารละลายที่มีสับสเตรทกับโคเอนไซม์ (co-enzyme) ไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่สนใจแล้วจะเกิดตะกอนปรากฏขึ้นเป็นแถบซึ่งแสดงความแตกต่างระหว่างตัวอย่างที่ทำการศึกษา

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 ชนิดของเห็ดที่ใช้ในงานวิจัย ได้แก่

เห็ดนางรม (oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*) ได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์รวบรวมเชื้อพันธุ์เห็ดแห่งประเทศไทย กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

เห็ดนางรมทอง (golden oyster mushroom, *P. citrinopileatus*) และเห็ดนางนวล (pink oyster mushroom, *P. djamor*) ได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์รวมสวนเห็ดบ้านอรุณฤกษ์ จังหวัดนครปฐม

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารเคมี

3.2.1.1 ฐันผง (Agar) จากบริษัท Difco, U.S.A.

3.2.1.2 มอลต์สกัด (malt extract) จากบริษัท Fluka, Switzerland

3.2.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อพีดีเอ (potato dextrose agar, PDA) จากบริษัท Difco, U.S.A.

3.2.1.4 ไลซิงเอนไซม์ (Lysing Enzyme: L-1412) จากบริษัท Sigma, Germany

3.2.1.5 โพลีเอทรีดีนไกลคอล (polyethylene glycol-6000) จากบริษัท Sigma, Germany

3.2.1.6 แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl₂) จากบริษัท Merck, Germany

3.2.2 เอนไซม์

3.2.2.1 Taq DNA polymerase จาก Promega Corporation Co.Ltd., ประเทศไทย

3.2.2.2 restriction endonuclease *EcoRI* จาก Promega Corporation Co.Ltd.,

ประเทศไทย

3.2.2.3 restriction endonuclease *Sau3AI* จาก Promega Corporation Co.Ltd.,

ประเทศไทย

3.2.2.4 restriction endonuclease *HinfI* จาก Promega Corporation Co.Ltd.,

ประเทศไทย

3.2.2.5 restriction endonuclease *HindIII* จาก Promega Corporation Co.Ltd.,

ประเทศไทย

3.2.2.6 restriction endonuclease *DdeI* จาก Promega Corporation Co.Ltd.,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญต์เห็นใบเซอร์โชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประเทศไทย

3.2.2.7 restriction endonuclease *Hae*III จาก Boehringer Mannheim Biochemica.

ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.3.3 เคมีภัณฑ์สำหรับการศึกษา DNA

2.3.3.1 agarose (USB., ประเทศสหรัฐอเมริกา)

2.3.3.2 gel star

2.3.3.3 dNTPs จาก Amersham Pharmacia Biotech, ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.3.3.4 tracking dye (ภาคผนวก 2)

2.3.3.5 tris-borate-EDTA buffer (TBE buffer) (ภาคผนวก 2)

2.3.3.6 TE- EDTA buffer (TE buffer) (ภาคผนวก 2)

2.3.3.7 extraction buffer (ภาคผนวก 2)

2.3.3.8 ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) จาก TIG, ประเทศไทย

2.3.3.9 แอลกอฮอล์ 70%

2.3.3.10 ไอโซโพรพานอล (isopropanol)

2.3.3.11 โซเดียมอะซิเตท (sodium acetate)

2.3.4 สารเคมีสำหรับการศึกษาไอโซไซม์

2.3.4.1 อะซิโตน (acetone) จากบริษัท Sharlau Chemie S.A., Spain

2.3.4.2 แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate) จากบริษัท Pharmacia

Biotech, Sweden

2.3.4.3 อะครีลาไมด์ (acrylamide) จากบริษัท Amersham International, England

2.3.4.4 บีส-อะครีลาไมด์ (bis-acrylamide) จากบริษัท Amersham International,

England

2.3.4.5 กรดซิตริก (citric acid) จากบริษัท Baker analyzed, U.S.A.

2.3.4.6 เทตระเมทิลีนไดอามีน (tetramethylenediamine) จากบริษัท Sigma,

Germany

2.3.4.7 บรอมฟีโนลบลู (bromphenol blue) จากบริษัท Pharmacia Biotech, Sweden

2.3.4.8 กลีเซอรอล (glycerol) จากบริษัท Pharmacia Biotech, Sweden

2.3.4.9 บิวทานอล (butanol) จากบริษัท Merck, Germany

2.3.4.10 ทริส-เบส (tris base) จากบริษัท Promaga Corporation, U.S.A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.4.11 ไกลซีน (glycine) จากบริษัท Promaga Corporation, U.S.A

2.3.4.12 ฟาสท์บลูอาร์ซอลท์ (fast blue RR salt) จากบริษัท จากบริษัท Sigma,

Germany

2.3.4.13 อัลฟาเนปทิล (fast blue RR salt) จากบริษัท จากบริษัท Sigma, Germany

2.3.4.14 กรดมาลิก (malic acid) จากบริษัท Sigma, Germany

2.3.4.15 แมกนีเซียมคลอไรด์ (magnesium chloride) จากบริษัท Fluka, Switzerland

2.3.4.16 ฟีนาไซค์เมโทรซัลเฟต (phenazine metrosulphate) จากบริษัท Sigma,

Germany

2.3.4.17 ไนโตรบลูเททราโซเลียม (nitro blue tetrazolium, NBT) จากบริษัท Sigma,

Germany

2.3.4.18 เมทิลไทโซลิอัม (methyl thiazolium, MTT)

2.3.4.19 นิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟต (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADP).

3.3 วิธีการวิจัย

3.3.1 การเตรียมแผ่นสปอร์พิมพ์

นำดอกเห็ดเห็ดนางรม เห็ดนางรมทอง และเห็ดนางรมวุ้นที่เจริญเต็มที่มาตัดส่วนก้านออก แล้วนำมาคว่ำลงบนบีกเกอร์ที่อยู่ในบรรจุแผ่นกระดาษกรองตัดเป็นแผ่นกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม. ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ทิ้งไว้ในที่ปลอดลม เป็นเวลาประมาณ 12-24 ชั่วโมงหรือตลอดคืน นำหมวกเห็ดออกแล้วปิดบีกเกอร์ด้วยกระดาษฟอยล์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว จะได้สปอร์พิมพ์ที่ค่อนข้างปราศจากเชื้อบนกระดาษกรอง ซึ่งสามารถเก็บไว้ในตู้เย็นจนกว่าจะใช้งาน

3.3.2 การเตรียมเส้นใยเห็ดสายพันธุ์โมโนคาร์บอน

ทำการเตรียมสารแขวนลอยสปอร์โดยนำแผ่นสปอร์พิมพ์ 1 แผ่นใส่ลงในน้ำกลั่น 5 มล. ที่มี tween 80 ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และได้ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำสารแขวนลอยสปอร์ที่มีปริมาณของสปอร์ประมาณ 1×10^3 สปอร์/มล. ปริมาณ 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ย (spread) ลงบนอาหาร WA (water agar) ที่มีความแข็งมากกว่าปกติ (วุ้นร้อยละ 1.8) และมี chloramphenicol ที่มีความเข้มข้น 50 มก./มล. (เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย) อยู่ด้วย บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ตามด้วยการนำมาส่องกล้องจุลทรรศน์ เพื่อตรวจสอบการงอกของสปอร์ โดยสังเกตการสร้าง germ tube ต่อไปทำการตัดชิ้นวุ้นที่มีสปอร์เดี่ยวๆ และกำลังงอก germ tube มาเลี้ยงบนอาหารผิวเยือก MEA (malt extract agar) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อเส้นใยเจริญดีแล้วได้ทำการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะโดยทางตรงหรือทางอ้อม หากมีให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจสอบการเกิด clamps ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่าเพื่อให้แน่ใจว่าได้เส้นใยชนิดโมโนคาร์บอนจริง (เส้นใยสายพันธุ์โมโนคาร์บอนต้องไม่สร้าง clamps)

3.3.3 การแยกโพรโตพลาสต์

นำเส้นใยสายพันธุ์โมโนคาร์บอนของเห็ดนางรม เห็ดนางรมทองและเห็ดนางรมกล (ทำแยกกันในเห็ดแต่ละชนิด) ที่ได้เลี้ยงในอาหารเหลว ME broth พีเอช 7.0 ปริมาตร 30 มล. (ในขวดรูปชมพู่ขนาด 150 มล.) มาแล้วเป็นเวลา 4 วัน ที่อุณหภูมิห้อง มาเจียเอาเฉพาะเส้นใยเห็ดมาเลี้ยงในอาหารเหลวมอลต์สกัด (ME broth) พีเอช 7.0 ปริมาตร 50 มล. (ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล.) ที่มีลูกปัดแก้ว (glass bead, ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม.) บรรจุอยู่ 20 ลูก และนำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ต่อไปทำการเก็บเส้นใยโดยนำเส้นใยใส่ลงในหลอดทดลองและนำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วยทำการล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง และล้างด้วย osmotic stabilizer ซึ่งประกอบด้วย $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.9 โมลาร์ ใน sodium maleate buffer 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.0 (ภาคผนวก 1) ทั้งนี้ได้ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ทุกครั้งที่ล้างโพรโตพลาสต์ นำเส้นใยที่ได้มาทำการแยกโพรโตพลาสต์ตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก Hashiba (1992) กล่าวคือนำเส้นใยเห็ดปริมาณ 0.3 กรัมมาบ่มด้วย 3 ml ของสารละลาย Lysing Enzyme (เป็นชื่อทางการค้าของเอนไซม์ ซึ่งสกัดมาจากเชื้อรา *Trichoderma harzianum*) ที่มีการฆ่าเชื้อทำโดยกรองผ่าน membrane Millipore filter ที่มีขนาด 0.45μ ความเข้มข้น 9 มก./มล. ของ osmotic stabilizer ซึ่งประกอบด้วย $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.6 โมลาร์ ใน sodium maleate buffer 0.05 โมลาร์ พีเอช 5 มาย่อยสลายผนังเซลล์ และทำการเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตามด้วยการนำโพรโตพลาสต์ที่แขวนลอยอยู่ในสารละลาย Lysing Enzyme มากกรองแยกเอาเส้นใยออกด้วย sinter glass filter ต่อบนนำสารแขวนลอยโพรโตพลาสต์ที่ได้ไปตกตะกอนที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสซึ่งเป็นส่วนของ Lysing Enzyme ที่ยังขุ่นๆ แล้วล้างด้วย osmotic stabilizer 2 ครั้ง ทำการกระจายโพรโตพลาสต์ใน osmotic stabilizer โดยเติม osmotic stabilizer ประมาณ 5 มล. ลงในหลอดทดลองที่มีโพรโตพลาสต์ดังกล่าว และให้มีจำนวนโพรโตพลาสต์ประมาณ 1×10^6 โพรโตพลาสต์/มล.

3.3.4 การรวมโพรโตพลาสต์

ทำการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมทอง เห็ดนางรมกับเห็ดนางรมกล และเห็ดนางรมทองกับเห็ดนางรมกล โดยการนำเส้นใยของเห็ดทั้ง 3 ชนิดมาแยกโพรโตพลาสต์จากข้อ 3.4.3 โดยนำสารแขวนลอยโพรโตพลาสต์ของเห็ดที่ต้องการรวมโพรโตพลาสต์ชนิดละ 1 มล. มาใส่รวมกันในหลอดแก้วแล้วนำไปปั่นแยกให้โพรโตพลาสต์ตกตะกอนที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วดูดสารละลาย PEG/Ca^{2+} (ภาคผนวก 1) ปริมาตร 1 มล. ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีโพรโตพลาสต์ดังกล่าว บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที โดยเขย่าหลอด เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เบาๆ ทุก 5 นาที จากนั้นเติม osmotic stabilizer (ดูภาคผนวก) ลงไป 9 มล. และนำไปปั่นแยกที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำการล้างโพรโตพลาสต์ด้วย osmotic stabilizer 2 ครั้ง ต่อไปทำการเจือจางให้ได้โพรโตพลาสต์ ประมาณ 1×10^4 โพรโตพลาสต์/มล. ขึ้นต่อไปดูดสารแขวนลอย โพรโตพลาสต์ที่ผ่านการรวมกันแล้วจำนวน 0.1 มล. ไปเลี้ยงในอาหารที่ใช้สำหรับการสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ของโพรโตพลาสต์ ซึ่งมีความเข้มข้นของวุ้นร้อยละ 3 ต่อไปทำการเททับด้วยอาหารชนิดเดิมที่มีความเข้มข้นของวุ้นร้อยละ 0.5 ตามด้วยการแล่นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ของโพรโตพลาสต์ทุกวัน เมื่อพบว่ามิโคโลนีเกิดขึ้นจะทำการเก็บโคโลนีที่เจริญอยู่เดี่ยวๆ มาเลี้ยงบนอาหารผิวเยี่ยง MEA โดยเลี้ยง 1 โคโลนี ต่อ 1 หลอดทดลอง ทำการเก็บโคโลนีให้ได้จำนวนมากที่สุดเท่าที่ทำได้

3.3.5 การคัดเลือกลูกผสม

ทำการคัดเลือกลูกผสมโดยสังเกตจากการเกิด clamps บนเส้นใยในแต่ละโคโลนีซึ่งทำโดย นำเส้นใยที่ตัดจากโคโลนีที่เก็บได้หลังจากการรวม โพรโตพลาสต์มาทำสไลด์ แล้วตรวจสอบการเกิด clamps ภายใต้อ่างกล้องจุลทรรศน์และคัดเลือกโคโลนีที่เกิด clamps เพื่อนำไปทดสอบความเป็นลูกผสมในข้อต่อไป

3.3.5.1 การวัดการเจริญเติบโตและขนาดของเส้นใย

นำโคโลนีที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4.5 มาเลี้ยงบนอาหาร MEA เป็นเวลา 9 วัน ตามด้วยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (เพื่อเป็นการหาค่าการเจริญของเส้นใยและขนาดเส้นใย) และวัดความกว้างของเส้นใยด้วยไมโครมิเตอร์ (micrometer) ภายใต้อ่างกล้องจุลทรรศน์ที่มี eyepiece micrometer ที่เทียบค่าแล้วติดตั้งอยู่ที่เลนส์ใกล้ตา ต่อไปทำการเปรียบเทียบผลการทดลองกับเส้นใยสายพันธุ์พ่อแม่ (โมโนคาร์บอน) ทั้งนี้ได้ทำการวัดแบบสุ่มทั้งหมด 100 ซ้ำ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย และวิเคราะห์ค่าโดยใช้หลักสถิติ

3.3.5.2 การเพาะเห็ดลูกผสมให้เกิดดอกและการศึกษาลักษณะฐานวิทยา

นำเส้นใยของเชื้อลูกผสมที่ได้เลี้ยงใน MEA พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน มาทำการขยายปริมาณในเมล็ดข้าวฟ่างที่ต้มสุกแล้ว เมื่อเส้นใยเห็ดเจริญเต็มเมล็ดข้าวฟ่าง นำเมล็ดข้าวฟ่าง (ประมาณ 10 เมล็ด) ใส่ลงในก้อนขี้เลื่อยสำเร็จรูปสำหรับเพาะเห็ด เมื่อเส้นใยเจริญเต็มก้อนขี้เลื่อยแล้วจึงทำการเปิดดอก โดยการรดน้ำและตั้งไว้ในที่ๆมีแสงแคดราไร นำดอกเห็ดที่ได้ มาทำการศึกษาลักษณะภายนอกของดอกเห็ด สีของสปอร์พิมพ์ และขนาดของสปอร์ โดยบันทึกและถ่ายภาพสีของลักษณะดังกล่าว

3.3.5.3 การศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

3.3.5.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

นำเส้นใยจากหัวเชื้อเห็ดมาตัดให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มม. ด้วย cork borer ถ่ายลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ MEA pH 8 จำนวน 50 มล. บ่มที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์แล้วนำเส้นใยมาสกัดดีเอ็นเอตามรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. กรองเส้นใยของเห็ดโดยการกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้งแล้วนำเส้นใยประมาณ 0.1-0.3 กรัมใส่หลอดเซนตริฟิวจ์ ขนาด 1.5 มล.
2. ล้างเส้นใยด้วย TE buffer นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12000 รอบต่อ นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที
3. รินสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง แล้วนำเส้นใยใส่ลงในโกร่งที่เย็นจัด และเติมไนโตรเจนให้ท่วม บดเส้นใยให้ละเอียดอย่างรวดเร็วจนมีลักษณะคล้ายผงแป้ง ต่อไปถ่ายลงใน หลอดเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ ในขณะที่บดถ้าไนโตรเจนเหลวระเหยหมดให้เติมใหม่
4. เติม extraction buffer 300 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติม 3 M sodium acetate 150 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
5. นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
6. ดูดสารละลายส่วนใสที่อยู่ด้านบนมาใส่หลอดเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ ผสม isopropanol ลงในหลอดในปริมาตรที่เท่ากันเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 5 นาที
7. นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
8. รินสารละลายส่วนใสทิ้งจะเหลือดีเอ็นเอติดอยู่ที่ก้นหลอด ล้างดีเอ็นเอ ด้วยเอทานอล 70% จากนั้นดูดเอทานอลที่เหลือทิ้ง แล้วคว่ำหลอดเซนตริฟิวจ์ บนกระดาษทิชชูจน กระจ่างแห้ง
9. ละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer จำนวน 50 ไมโครลิตร
10. เก็บดีเอ็นเอในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้งาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.5.3.2 การตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ

ทำการตรวจสอบสารละลายดีเอ็นเอด้วยวิธี 2 วิธี คือ

1. การหาความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอ ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1.1 นำสารละลายดีเอ็นเอใน TE buffer มาวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance; A) ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ถ้าค่า A_{260} มากกว่า 1.0 ให้เจือจาง สารละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงใหม่

1.2 คำนวณความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอจากสูตร: $-1.0 A_{260} = 50$ ไมโครกรัมต่อมล. ของดีเอ็นเอเกลียวคู่

1.3 ตรวจสอบคุณภาพของกรดนิวคลีอิก โดยการหาอัตราส่วนของค่า A_{260} / A_{280} ถ้าได้ค่าระหว่าง 1.65 ถึง 1.85 แสดงว่า ดีเอ็นเอบริสุทธิ์เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในขั้นตอนต่อไป ถ้าได้ค่ามากกว่า 1.85 แสดงว่า ดีเอ็นเอที่เตรียมได้มีอาร์เอ็นเอปนในปริมาณมาก แต่ถ้าค่าน้อยกว่า 1.65 แสดงว่ามีโปรตีนหรือฟีนอลปนอยู่

2. การแยกขนาดโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

การวิเคราะห์สารละลายดีเอ็นเอจะสามารถบอกถึงปริมาณของดีเอ็นเอโดยประมาณได้ นอกจากนี้ยังสามารถบอกคุณภาพได้อีกด้วย (ภาคผนวก 3)

3.3.5.3.3 การทำ PCR/RFLP ของ rDNA

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ ITS

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ ITS ใช้ไพรเมอร์ 2 ตัว คือ ITS1 ซึ่งมีปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ ITS ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' และไพรเมอร์ ITS4 ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (White *et al.* 1990) โดยมีวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังนี้

ทำการเตรียมสารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพและทราบความเข้มข้น โดยเติมส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ตามรายการดังต่อไปนี้

DNA template (50 ng)	5	μl
primer ITS1 (25 μM)	2	μl
primer ITS4 (25 μM)	2	μl
dNTP (10 mM)	1	μl

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10X PCR Buffer	5	μl
MgCl ₂ (25 mM)	2.5	μl
Tag polymerase (5U/μl)	0.3	μl
H ₂ O	32.2	μl
ปริมาตรรวม	50	μl

นำหลอดที่มีส่วนผสมครบทุกอย่างไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อ นาทีเป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นนำหลอดทั้งหมดใส่ในเครื่อง Programmable DNA Thermal Cycle ตามสภาวะการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้

ขั้นที่ 1	initial Denaturation	94°C	5 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 2	denaturation	94°C	30 วินาที	
	annealing	55°C	30 วินาที	
	extension	72°C	1 นาที	
	ทำซ้ำ 40 รอบ			
ขั้นที่ 3	Final Extension	72°C	7 นาที	1 รอบ

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปริมาณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ IGS

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณ rDNA ที่อยู่ในบริเวณ IGS ใช้ไพรเมอร์ 2 ตัว คือ O-1 ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ 5'-AGTCCTATGGCCGTGGAT-3' และไพรเมอร์ LR12 ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้ 5'-CTGAACGCCTCTAAGTCAGAA-3' (Kim *et. al.* 2001, Nicholson *et. al.* 1995, Otieno *et al.* 2003) โดยมีวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังนี้

เตรียมสารละลายดีเอ็นเอที่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพและทราบความเข้มข้นแล้วมาเติมส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ตามรายการดังต่อไปนี้

DNA template (50 ng)	5	μl
primer O-1 (25 μM)	2	μl
primer LR12R (25 μM)	2	μl
dNTP (10 mM)	1	μl
10X PCR Buffer	5	μl
MgCl ₂ (25 mM)	2.5	μl
Tag polymerase (5U/μl)	0.3	μl
H ₂ O	32.2	μl
ปริมาตรรวม	50	μl

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำหลอดที่มีส่วนผสมครบทุกอย่างไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นนำหลอดทั้งหมดใส่ในเครื่อง Programmable DNA Thermal Cycle ตามสภาวะการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้

ขั้นที่ 1	initial denaturation	95°C	5 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 2	denaturation	90°C	30 วินาที	
	annealing	60°C	40 วินาที	
	extension	72°C	2 นาที	
	ทำซ้ำ 30 รอบ			
ขั้นที่ 3	Final Extension	72°C	7 นาที	1 รอบ

เมื่อจบปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้ว นำผลผลิตพีซีอาร์ (PCR Product) ที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส บนอะกาโรสเจล ที่มีความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วย ethidium bromide ตรวจสอบด้วยแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต (ภาคผนวก 3)

3.3.5.3.4 การทำ RFLP และการตรวจสอบจีนดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาทำ RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 6

ชนิด คือ *EcoRI*, *DdeI*, *HaeIII*, *HindIII*, *HinfI* และ *Sau3AI*

ขั้นตอนการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแต่ละชนิด จะเติมสารต่างๆ ดังนี้

PCR Products	5	μl
restriction enzyme	0.5	μl
buffer	2	μl
BSA	2	μl
H ₂ O	10.5	μl
ปริมาตรรวม	20	μl

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง ตามด้วยการนำมาตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ แล้วย้อมด้วย ethidium bromide จากนั้นตรวจสอบด้วยแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต (ภาคผนวก 3 และ 4)

3.3.6 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของเส้นใยเห็ดลูกผสม

การศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของเส้นใยเห็ดลูกผสมและเปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อและแม่ ได้ทำตามวิธีที่ดัดแปลงมาจาก *Pasteur et al.* (1988) และ *กนิษฐา พรเจริญโรจน์* (2543) โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะตีพิมพ์ใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำเส้นใยเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่และลูกผสมที่เลี้ยงในอาหาร ME broth พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน มากรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น แล้วล้างเส้นใยเห็ดด้วยน้ำกลั่นมาซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นนำมาบดในโกร่งให้ละเอียดในไนโตรเจนเหลว ตักเส้นใยที่บดแล้วใส่หลอดไมโครฟิวซ์ (microfuge tube) เติมนัฟเฟอร์ (extraction buffer) สำหรับใช้ในการสกัด ต่อไปนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ซึ่งทำโดยนำส่วนใส ปริมาณ 15 ไมโครลิตร มาผสมกับ sample buffer ซึ่งประกอบด้วย Tris-HCl พีเอช 6.8 ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์, glycerol ร้อยละ 10 และ bromphenol blue ร้อยละ 0.025) 5 ไมโครลิตร ต่อไปนำไปใส่ในช่องของเจลที่อยู่ในชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส ช่องละ 1 ตัวอย่าง ขึ้นตอนต่อไปเปิดเครื่อง power supply ปรับค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าเป็น 200 โวลต์ และควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 4 องศาเซลเซียส ปิดเครื่อง power supply เมื่อแถบสีบรอมฟีนอลบลูห่างจากขอบล่างของแผ่นเจลประมาณ 1 ซม. (ใช้เวลาประมาณ 45 นาที) ขึ้นต่อไปนำแผ่นเจลมาข้อมด้วยสารละลาย substrate ของเอนไซม์ esterase, malate dehydrogenase และ alcohol dehydrogenase บันทึกการแสดงออกของไอโซไซม์แต่ละชนิด เป็นภาพถ่าย

บทที่ 4

ผลการวิจัย

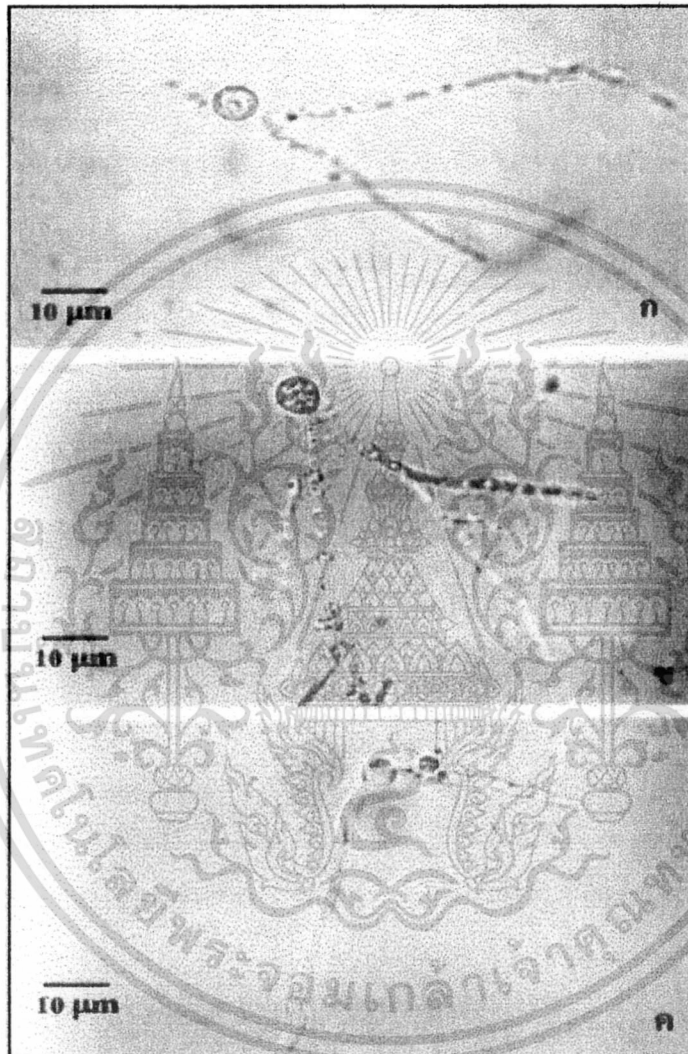
4.1 การรวมโพรโตพลาสต์

จากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมทอง เห็ดนางรมกับเห็ดนางนวล และเห็ดนางรมทองกับเห็ดนางนวล โดยใช้สารละลาย PEG แล้วนำโพรโตพลาสต์ที่ผ่านขั้นตอนการรวมโพรโตพลาสต์แล้วมาเลี้ยงบนอาหารสำหรับการสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ พบว่าโพรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่และเจริญเป็นเส้นใยในวันที่ 2-5 ของการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 4.1) และประมาณวันที่ 7-12 จะพบโคโลนีเล็กๆบนอาหารสำหรับการสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ โดยสามารถเก็บโคโลนีเดี่ยวที่เกิดจากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมทอง เห็ดนางรมกับเห็ดนางนวล และเห็ดนางรมทองกับเห็ดนางนวล ได้ทั้งหมด 487, 412 และ 391 โคโลนี ตามลำดับ

4.2 การคัดเลือกลูกผสม

เนื่องจากการทดลองนี้โพรโตพลาสต์ที่นำมาใช้ในขั้นตอนการรวมโพรโตพลาสต์เป็นโพรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเส้นใยสายพันธุ์โมโนคาร์บอนซึ่งเจริญมาจากสปอร์เดี่ยวของเห็ด ดังนั้นถ้ามีการรวมกันระหว่างโพรโตพลาสต์ของเห็ดชนิดเดียวกันแล้ว เมื่อโพรโตพลาสต์สร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่และเจริญเป็นเส้นใย เส้นใยนี้จะไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชัน ในทางกลับกันถ้าเกิดการรวมโพรโตพลาสต์ของเห็ดต่างชนิดกันแล้ว เมื่อโพรโตพลาสต์ลูกผสมนี้สร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่และเจริญเป็นเส้นใย เส้นใยนี้อาจจะสร้างหรือไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชันก็ได้ โดยถ้าเส้นใยไม่สร้างแคลมป์คอนเนคชันอาจเกิดเนื่องมาจากเส้นใยสายพันธุ์โมโนคาร์บอนของเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ที่นำมาผสมพันธุ์กันมี mating tupe ที่ไม่สามารถผสมกันได้ หรือเมื่อมีการผสมกันแล้วนิวเคลียสไดนิวเคลียสหนึ่งอาจสลายตัวไปทำให้เส้นใยมีสภาพเป็นแฮพลอยด์ (Gadau and Lingg, 1992) ซึ่งทำให้ไม่เกิดการสร้างแคลมป์คอนเนคชัน และในการรวมกันของโพรโตพลาสต์เมื่อใช้สารละลาย PEG เป็นตัวเหนี่ยวนำนั้นอาจทำให้เกิดการรวมกันของโพรโตพลาสต์มากกว่า 2 โพรโตพลาสต์ (ภาพที่ 4.2) ซึ่งในการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมทองสามารถเก็บโคโลนีเดี่ยวได้ 487 โคโลนี โดยพบว่า มี 3 โคโลนี ที่มีการสร้างแคลมป์คอนเนคชัน เห็ดนางรมกับเห็ดนางนวลสามารถเก็บโคโลนีเดี่ยวได้ 412 โคโลนี แต่พบว่า มีเพียง 2 โคโลนี ที่มีการสร้างแคลมป์คอนเนคชัน และเห็ดนางรมทองกับเห็ดนางนวลเก็บโคโลนีเดี่ยวได้ 391 โคโลนี แต่ไม่พบโคโลนีที่มีการสร้างแคลมป์คอนเนคชัน ดังนั้นในการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมทอง เห็ดนางรมกับเห็ดนางนวล และเห็ดนางรมทองกับเห็ดนางนวล ได้ลูกผสมโดยวิธีการตรวจสอบแคลมป์คอนเนคชัน ทั้งหมด 5 สายพันธุ์ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

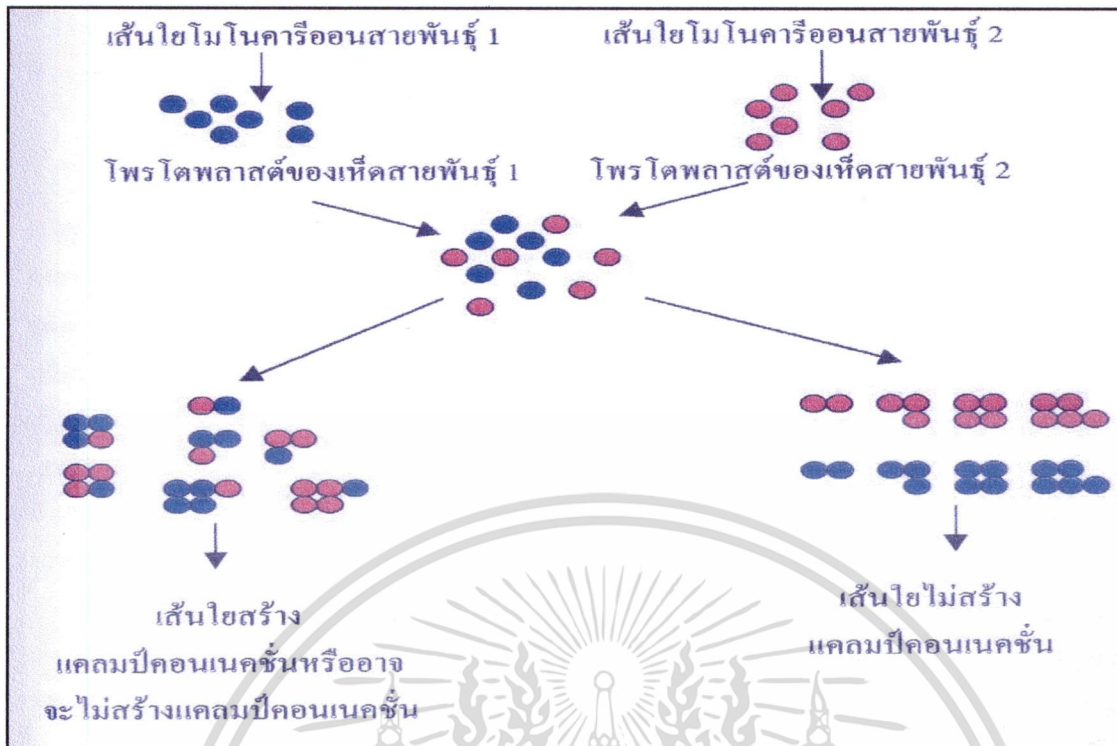
โดย 3 สายพันธุ์ ซึ่งกำหนดชื่อเป็น Fu1, Fu2 และ Fu3 เป็นลูกผสมที่เกิดจากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมทอง ซึ่งสามารถคำนวณค่าความถี่ของการเกิดลูกผสมได้เท่ากับร้อยละ 0.62 และอีก 2 สายพันธุ์ ซึ่งกำหนดชื่อเป็น Fu4 และ Fu5 เป็นลูกผสมที่เกิดจากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางนวลและสามารถคำนวณค่าความถี่ของการเกิดลูกผสมได้เท่ากับร้อยละ 0.49 ส่วนการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมทองกับเห็ดนางนวลไม่พบลูกผสม



ภาพที่ 4.1 โพรโตพลาสต์ที่มีการสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่และเจริญเป็นเส้นใยบนอาหารสำหรับการสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ของโพรโตพลาสต์

- ก. การสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ของโพรโตพลาสต์ที่เกิดจากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมทอง
- ข. การสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ของโพรโตพลาสต์ที่เกิดจากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางนวล
- ค. การสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ของโพรโตพลาสต์ที่เกิดจากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมทองกับเห็ดนางนวล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 รูปแบบของลูกผสมที่อาจจะเกิดขึ้นได้จากการรวม โพรโตพลาสต์

4.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลูกผสมเปรียบเทียบกับลักษณะของพ่อแม่

4.3.1 การศึกษาขนาดของเส้นใย

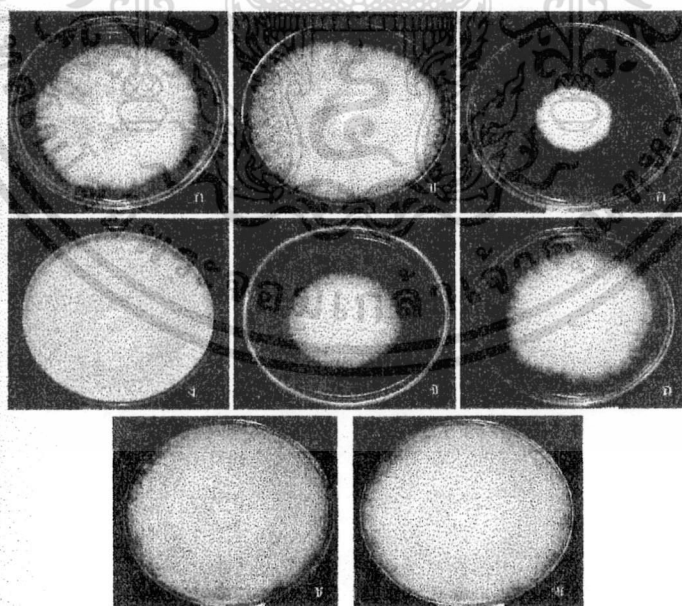
จากการศึกษาขนาดของเส้นใยเห็ดลูกผสมเปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่โดยเลี้ยงเส้นใยเห็ดลูกผสมบนอาหาร MEA พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน ตามด้วยการวัดขนาดของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ลูกผสมระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมทอง ซึ่งได้แก่ เห็ดลูกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 มีขนาดเส้นใยเฉลี่ย 3.0, 3.68 และ 2.84 ไมโครเมตร ตามลำดับ ในขณะที่เห็ดนางรมและเห็ดนางรมทองซึ่งเป็นเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่และแม่มีขนาดเส้นใยเฉลี่ย 2.43 และ 2.38 ไมโครเมตร ตามลำดับ เมื่อทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นใยโดยวิธี DMRT พบว่าเส้นใยของเห็ดลูกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 กับสายพันธุ์พ่อแม่และแม่ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ สำหรับเห็ดลูกผสมระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมวล ซึ่งได้แก่ Fu4 และ Fu5 มีขนาดเส้นใยเฉลี่ย 2.76 และ 3.00 ไมโครเมตร ตามลำดับ ขณะที่เห็ดนางรมและเห็ดนางรมวล ซึ่งเป็นเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่และแม่มีขนาดเส้นใยเฉลี่ย 2.43 และ 2.24 ไมโครเมตร ตามลำดับ เมื่อทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นใยโดยวิธี DMRT พบว่าเส้นใยของเห็ดลูกผสม Fu4 และ Fu5 กับสายพันธุ์พ่อแม่และแม่ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดลูกผสม

ผลการศึกษาลักษณะการเจริญของโคโลนีของเห็ดลูกผสมเปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ พบว่าลูกผสมระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมทอง ซึ่งได้แก่ เห็ดลูกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 มีการเจริญของโคโลนีที่แตกต่างกัน โดยเห็ดลูกผสม Fu1 มีการเจริญดีกว่าเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ แต่มีลักษณะเส้นใยคล้ายกับเห็ดนางรม ส่วนเห็ดลูกผสม Fu2 มีการเจริญช้ามากและมีลักษณะเส้นใยคล้ายกับเห็ดนางรมทอง และเห็ดลูกผสม Fu3 มีการเจริญของโคโลนีใกล้เคียงกับสายพันธุ์พ่อแม่ และมีลักษณะของเส้นใยคล้ายทั้งเห็ดนางรมและเห็ดนางรมทอง สำหรับลูกผสมระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมวล ซึ่งได้แก่ เห็ดลูกผสม Fu4 และ Fu5 พบว่า เห็ดลูกผสมทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ มีการเจริญของโคโลนีดีกว่าเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ และมีลักษณะของเส้นใยคล้ายกับเห็ดนางรม (ภาพที่ 4.3 และตารางที่ 4.1)

เมื่อนำเห็ดลูกผสมทั้ง 5 สายพันธุ์ ไปเพาะให้เกิดดอกในก้อนขี้เลื่อย พบว่ามีเฉพาะลูกผสม 3 สายพันธุ์ที่สามารถเพาะให้เกิดดอกได้ คือ Fu1, Fu4 และ Fu5 (ภาพที่ 4.4-4.6 และตารางที่ 4.2-4.3) โดยมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาดังต่อไปนี้ เห็ดลูกผสม Fu1 (ภาพที่ 4.4) ขณะที่ยังไม่โตเต็มที่รูปทรงของดอกเห็ดคล้ายปากแตรและดอกเห็ดมีสีเหลืองคล้ายกับเห็ดนางรมทอง ส่วนเห็ดลูกผสม Fu4 (ภาพที่ 4.5) มีลักษณะภายนอกคล้ายคลึงกับเห็ดนางรมมาก แต่มีสีของสปอร์พิมพ์และขนาดของสปอร์เป็นลักษณะผสมระหว่างเห็ดนางรมและเห็ดนางรมวล สำหรับเห็ดลูกผสม Fu5 (ภาพที่ 4.6) มีรูปทรงของดอกคล้ายเห็ดนางรมวลผสมกับเห็ดนางรม แต่มีสีของดอกเห็ดคล้ายเห็ดนางรม



ภาพที่ 4.3 ลักษณะโคโลนีของเห็ดลูกผสมเปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ โดยเลี้ยงบนอาหาร

MEA พิเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ก. เห็ดนางรมทอง ข. เห็ดนางรม ค. เห็ดนางรมวล ง. เห็ดลูกผสม Fu1

เอกสารนี้เป็จ.เห็ดลูกผสม Fu2 ารข.เห็ดลูกผสม Fu3 ารข.เห็ดลูกผสม Fu4 ารข.เห็ดลูกผสม Fu5 ารนด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 แสดงการเจริญของเส้นใยเห็ดลูกผสมเปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่เมื่อเลี้ยงบนอาหาร MEA พิเศษ 7.0 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

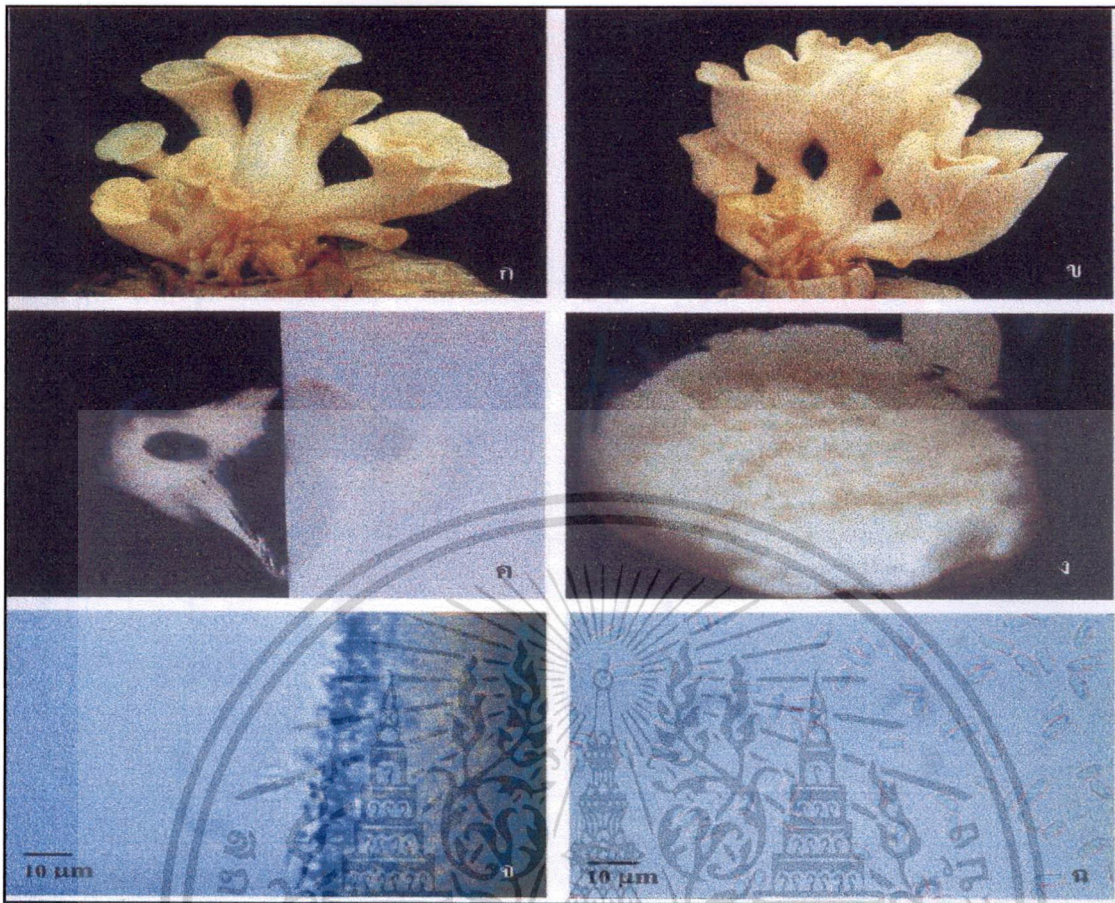
คู่ผสมพันธุ์	ชนิดของเห็ด	เส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี
เห็ดนางรม×เห็ดนางรมทอง	เห็ดนางรม	8.83b
	เห็ดนางรมทอง	7.32c
	เห็ดลูกผสม Fu1	>9.00a
	เห็ดลูกผสม Fu2	5.00e
	เห็ดลูกผสม Fu3	7.07d
เห็ดนางรม×เห็ดนางนวล	เห็ดนางรม	8.83b
	เห็ดนางนวล	3.24c
	เห็ดลูกผสม Fu4	9.00a
	เห็ดลูกผสม Fu5	9.00a

ตัวอักษรที่แตกต่างในแนวตั้งของกลุ่มพันธุ์เดียวกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ .05

ตารางที่ 4.2 รายละเอียดของลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดลูกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 เปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อและแม่

ลักษณะทาง สัณฐานวิทยา	ชนิดของเห็ด				
	เห็ดนางรม	เห็ดนางรมทอง	เห็ดลูกผสม Fu1	เห็ดลูกผสม Fu2	เห็ดลูกผสม Fu3
สีหมวกดอก	สีขาวครีม	สีเหลือง	ขณะที่ยังไม่โตเต็มที่มีสีเหลืองเมื่อโตเต็มที่มีสีขาวอมเหลือง	ไม่เกิดดอก	ไม่เกิดดอก
ขนาดดอกเฉลี่ย (ซม.)	4.93×5.68	3.34×3.72	3.23×4.38		
สีก้านดอก	สีขาวครีม	สีขาวอมเหลือง	สีขาวอมเหลือง		
ความยาวก้านดอกเฉลี่ย (ซม.)	3.24±0.56	2.65±0.34	2.15±0.43		
เนื้อของเห็ด	เนื้อหนานุ่ม	เนื้อบางลึกขาดง่าย	เนื้อบางลึกขาดง่าย		
ขนาดของเส้นใยเฉลี่ย (ซม.)	2.43±0.69	2.38±0.47	3.0±0.52		
ขนาดสปอร์เฉลี่ย (ไมครอน)	4.00×8.42	3.32×7.42	4.09×11.48		
สีของสปอร์พิมพ์	สีขาวครีม	สีเทาอมชมพู	สีขาวครีม		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

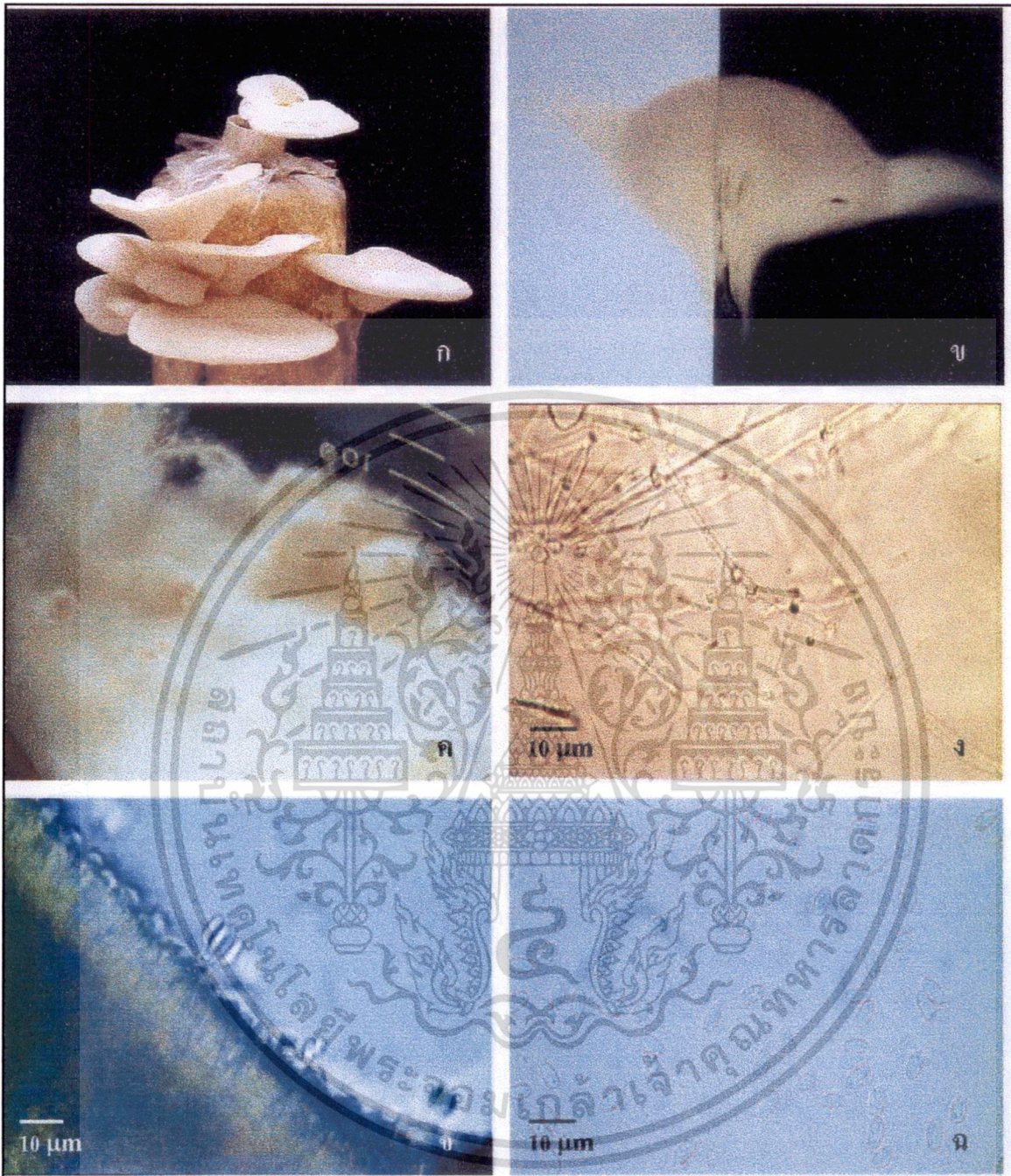


ภาพที่ 4.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดลูกผสม Fu1
 ก. ดอกเห็ดที่ยังไม่เจริญเต็มที่ ข. ดอกเห็ดที่เจริญเต็มที่ ค. สปอร์พิมพ์
 ง. คู่ดอกบน MEB จ. hymenium ฉ. basidiospores

ตารางที่ 4.3 รายละเอียดของสัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดลูกผสม Fu4 และ Fu5
 เปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่

ลักษณะทาง สัณฐานวิทยา	ชนิดของเห็ด			
	เห็ดนางรม	เห็ดนางนวล	เห็ดลูกผสม Fu 4	เห็ดลูกผสม Fu 5
สีหมวกดอก	สีขาวครีม	สีชมพู	สีขาวครีม	สีขาวครีม
ขนาดของดอกเฉลี่ย (ซม.)	4.93×5.68	3.75×4.91	5.46×5.90	8.26×9.44
สีของก้านดอก	สีขาวครีม	สีชมพูหรือสี ชมพูอมส้ม	สีขาวครีม	สีขาวครีม
ความยาวก้านดอกเฉลี่ย (ซม.)	3.24±0.56	1.24±0.49	3.27±0.41	4.02±0.48
เนื้อของเห็ด	เนื้อหนานุ่ม	เนื้อบางนุ่ม	เนื้อหนานุ่ม	เนื้อหนานุ่ม
ขนาดของเส้นใยเฉลี่ย (ซม.)	2.43±0.69	2.24±0.51	2.76±0.62	3.00±0.58
ขนาดสปอร์เฉลี่ย (ไมครอน)	4.00×8.42	4.00×7.58	4.17×8.60	3.51×8.03
สีของสปอร์พิมพ์	สีขาวครีม	สีชมพูอมส้ม	สีเทาอมชมพู	สีครีมอมเทา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

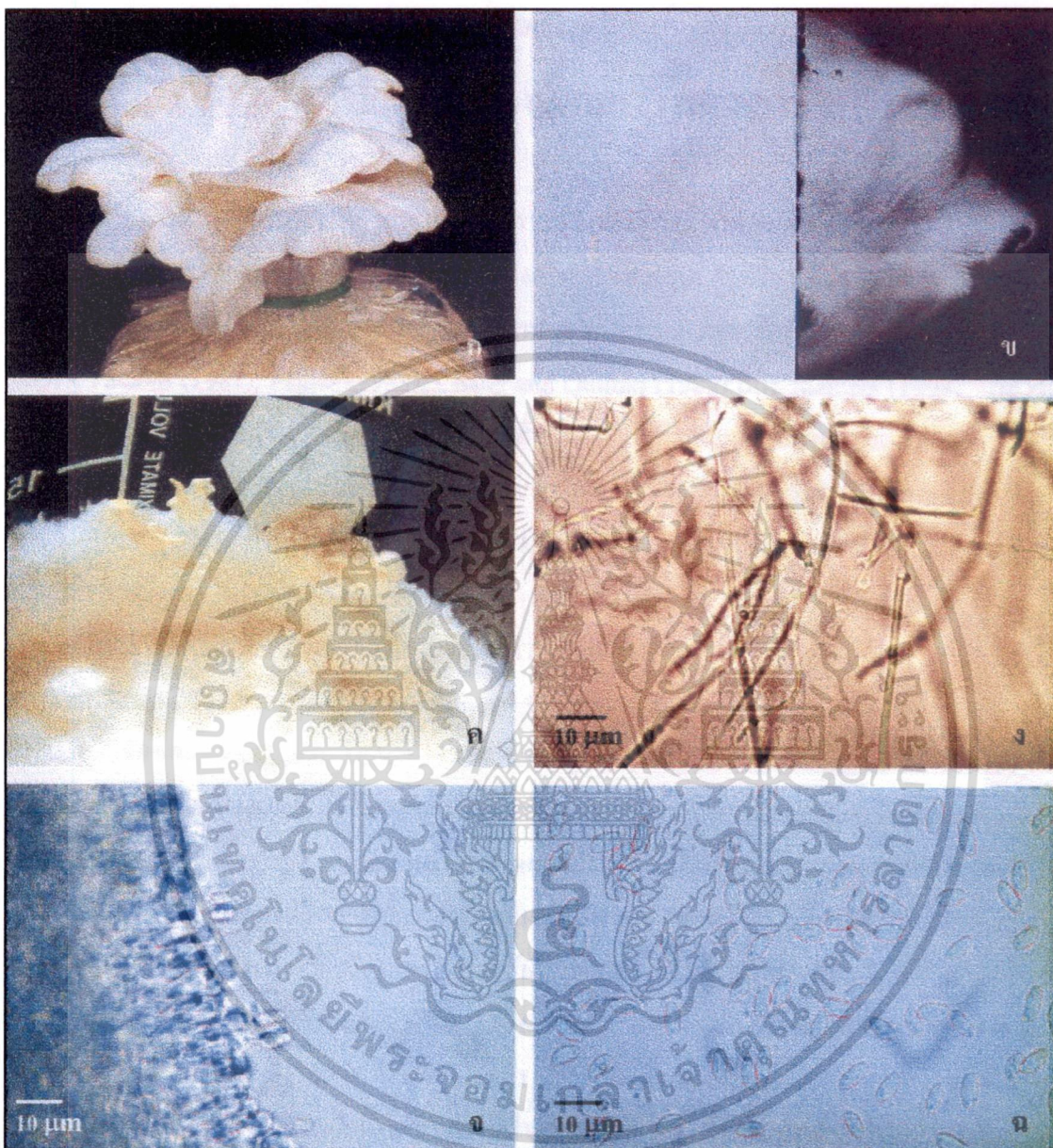


ภาพที่ 4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดลูกผสม Fu4

ก. ดอกเห็ด ข. สปอร์พิมพ์ ค. คู่ดอกบน MEA ง. เส้นใย

จ. hymenium ฉ. basidiospores

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในของเห็ดลูกผสม Fu5

ก. ดอกเห็ด ข. สปอร์พิมพ์ ค. ตุ่มดอกบน MEA ง. เส้นใย

จ. hymenium ฉ. basidiospores

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การวิเคราะห์ผลของ PCR/RFLP ของ rDNA โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

4.4.1. การตัดด้วยเอนไซม์ *HinfI*, *Sau3AI* และ *DdeI* ของลูกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 เปรียบเทียบกับเห็ดนางรมและเห็ดนางรมทอง

4.4.1.1 ในบริเวณ ITS เอนไซม์ *HinfI* สามารถตัดสายดีเอ็นเอของเห็ดนางรม เห็ดลูกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 โดยพบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 360, 225 และ 100 คู่เบส ส่วนเห็ดนางรมทอง พบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 210, 160, 140 และ 110 คู่เบส เอนไซม์ *Sau3AI* สามารถตัดสายดีเอ็นเอของเห็ดนางรม เห็ดลูกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 โดยพบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 400, 155 และ 90 คู่เบส ส่วนเห็ดนางรมทองพบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 430 และ 250 คู่เบส และเอนไซม์ *DdeI* ไม่สามารถตัดสายดีเอ็นเอของเห็ดนางรม เห็ดลูกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 ส่วนเห็ดนางรมทองพบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 630 และ 70 คู่เบส (ภาพที่ 4.7)

4.4.1.2 ในบริเวณ IGS เอนไซม์ *HinfI* สามารถตัดสายดีเอ็นเอของเห็ดนางรม เห็ดลูกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 โดยพบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 200, 195, 180, 88, 85 และ 60 คู่เบส ส่วนเห็ดนางรมทอง พบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 350, 280, 140 และ 120 คู่เบส ส่วนเอนไซม์ *Sau3AI* สามารถตัดสายดีเอ็นเอของเห็ดนางรม เห็ดลูกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 โดยพบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 295, 255, 230 และ 95 คู่เบส ส่วนเห็ดนางรมทอง พบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 350, 290 และ 215 คู่เบส และเอนไซม์ *DdeI* สามารถตัดสายดีเอ็นเอของเห็ดนางรม เห็ดลูกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 โดยพบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 660 และ 225 คู่เบส ส่วนเห็ดนางรมทองพบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 420, 230 และ 150 คู่เบส (ภาพที่ 4.8)

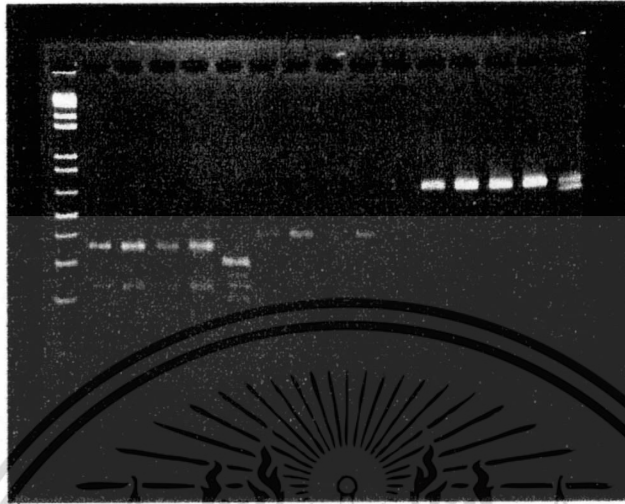
4.4.2. การตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*, *HaeIII* และ *HindIII* ของเห็ดลูกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 เปรียบเทียบกับเห็ดนางรมและเห็ดนางรมทอง

4.4.2.1 ในบริเวณ ITS เอนไซม์ *EcoRI* สามารถตัดสายดีเอ็นเอของเห็ดนางรม เห็ดลูกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 โดยพบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 360, 280 และ 85 คู่เบส ส่วนเห็ดนางรมทองพบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 340, 260 และ 85 คู่เบส เอนไซม์ *HaeIII* สามารถตัดสายดีเอ็นเอของเห็ดนางรม เห็ดลูกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 โดยพบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 250, 210 และ 190 คู่เบส ส่วนเห็ดนางรมทองพบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 500 และ 150 คู่เบส และเอนไซม์ *HindIII* ไม่สามารถตัดสายดีเอ็นเอของเห็ดนางรม เห็ดลูกผสม Fu1, Fu2, Fu3 และเห็ดนางรมทอง (ภาพที่ 4.9)

4.4.2.2 ในบริเวณ IGS เอนไซม์ *EcoRI* ไม่สามารถตัดสายดีเอ็นเอของเห็ดนางรม เห็ดลูกผสม Fu1, Fu2, Fu3 และเห็ดนางรมทอง เอนไซม์ *HaeIII* สามารถตัดดีเอ็นเอของเห็ดนางรม เห็ดลูกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 โดยพบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 410, 300 และ 145 คู่เบส ส่วนเห็ดนางรมทองพบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 430, 290 และ 150 คู่เบส และเอนไซม์ *HindIII*

สามารถตัดสายดีเอ็นเอของเห็ดนางรม เห็ดถุกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 โดยพบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ประมาณ 705 และ 180 คู่เบส และไม่สามารถตัดสายดีเอ็นเอของเห็ดนางรมทอง (ภาพที่ 4.10)

M 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5



ภาพที่ 4.7 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกใช้โพลีเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ตามด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*II, *Sau*3AI และ *Dde*I ตามลำดับ บนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 2.0% โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker (100 bp ladder), ช่องที่ 1 คือ เห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ Fu1, ช่อง 3 คือ Fu2, ช่อง 4 คือ Fu3 และช่อง 5 คือเห็ดนางรมทอง

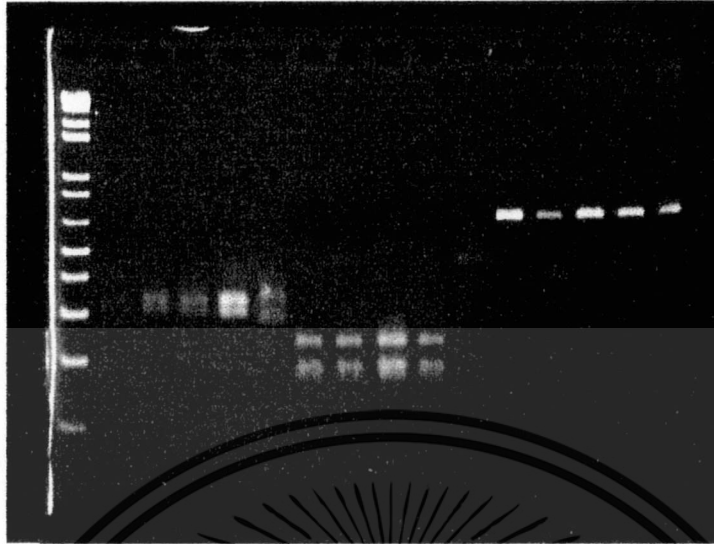
M 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5



ภาพที่ 4.8 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ IGS ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกใช้โพลีเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ O-1 และ LR12R ตามด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*II, *Sau*3AI และ *Dde*I ตามลำดับ บนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 2.0% โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker (100 bp ladder) ช่องที่ 1 คือเห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ Fu1, ช่อง3 คือ Fu2, ช่อง4 คือ Fu3 และช่อง 5 คือเห็ดนางรมทอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

M 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5



ภาพที่ 4.9 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ตามด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*, *HaeIII* และ *HindIII* ตามลำดับบนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 2.0% โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker (100 bp ladder) ช่องที่ 1 คือเห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ Fu1, ช่อง 3 คือ Fu2, ช่อง 4 คือ Fu3 และช่อง 5 คือเห็ดนางรมทอง

M 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5



ภาพที่ 4.10 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ IGS ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ O-1 และ LR12R ตามด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*, *HaeIII* และ *HindIII* ตามลำดับ บนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 2.0% โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker (100 bp ladder) ช่องที่ 1 คือเห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ Fu1, ช่อง 3 คือ Fu2,

ช่อง 4 คือ Fu3 และช่อง 5 คือเห็ดนางรมทอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.3 การตัดด้วยเอนไซม์ *HinfI*, *Sau3AI* และ *DdeI* ของลูกผสม *Fu4* และ *Fu5* เปรียบเทียบกับเห็นนางรมและเห็นนางนวล

4.4.3.1 ในบริเวณ ITS เอนไซม์ *HinfI* สามารถตัดสายดีเอ็นเอของเห็นนางรม เห็นลูกผสม *Fu4* และ *Fu5* โดยพบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 360, 225 และ 100 คู่เบส ส่วนเห็นนางนวลพบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 390 และ 330 คู่เบส เอนไซม์ *Sau3AI* สามารถตัดสายดีเอ็นเอของเห็นนางรม เห็นลูกผสม *Fu4* และ *Fu5* โดยพบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 400, 155 และ 90 คู่เบส ส่วนเห็นนางนวลพบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 400 และ 265 คู่เบส และเอนไซม์ *DdeI* ไม่สามารถตัดสายดีเอ็นเอของเห็นนางรม เห็นลูกผสม *Fu4*, *Fu5* และเห็นนางนวล (ภาพที่ 4.11)

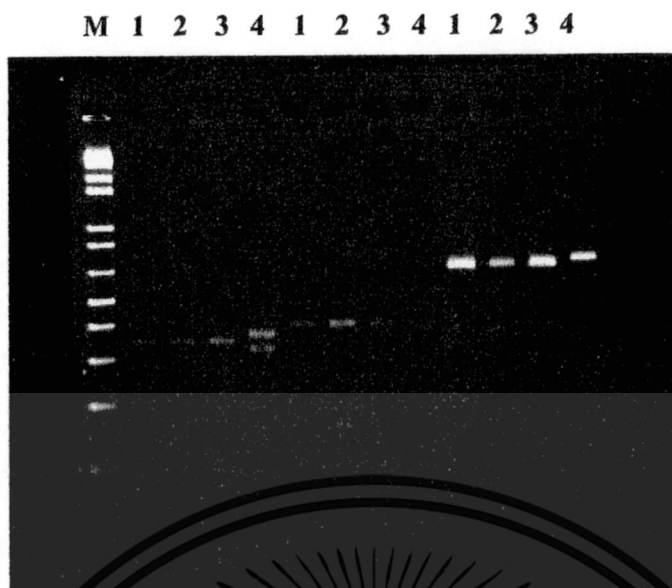
4.4.3.2 ในบริเวณ IGS เอนไซม์ *HinfI* สามารถตัดสายดีเอ็นเอของเห็นนางรม เห็นลูกผสม *Fu4* และ *Fu5* โดยพบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 200, 195, 180, 88, 85 และ 60 คู่เบส ส่วนเห็นนางนวล พบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 290, 230, 120 และ 90 คู่เบส ส่วนเอนไซม์ *Sau3AI* สามารถตัดสายดีเอ็นเอของเห็นนางรม เห็นลูกผสม *Fu4* และ *Fu5* โดยพบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 295, 255, 230 และ 95 คู่เบส ส่วนเห็นนางนวล พบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 400 และ 280 คู่เบส และเอนไซม์ *DdeI* สามารถตัดสายดีเอ็นเอของเห็นนางรม เห็นลูกผสม *Fu4* และ *Fu5* โดยพบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 660 และ 225 คู่เบส ส่วนเห็นนางนวลพบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 580 และ 225 คู่เบส (ภาพที่ 4.12)

4.4.4. การตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*, *HaeIII* และ *HindIII* ของลูกผสม *Fu4* และ *Fu5* เปรียบเทียบกับเห็นนางรมและเห็นนางนวล

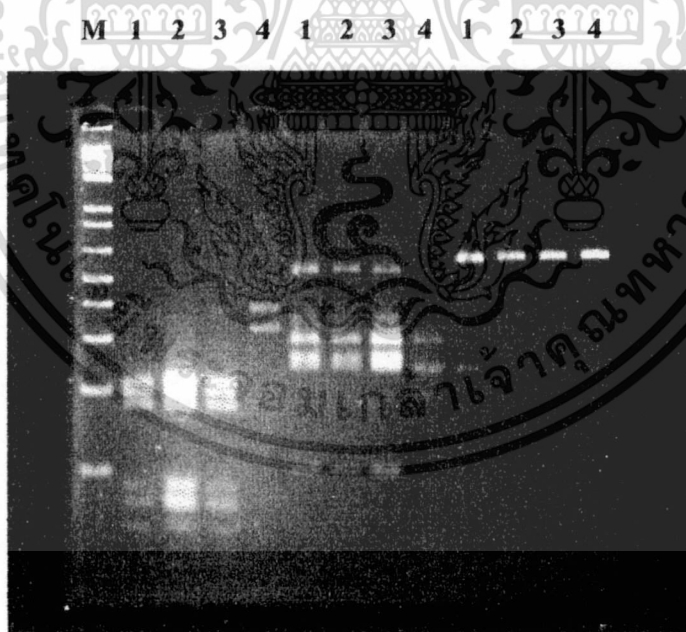
4.4.4.1 ในบริเวณ ITS เอนไซม์ *EcoRI* สามารถตัดสายดีเอ็นเอของเห็นนางรม เห็นลูกผสม *Fu4* และ *Fu5* โดยพบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 360, 280 และ 85 คู่เบส ส่วนเห็นนางนวลพบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 325, 250 และ 85 คู่เบส เอนไซม์ *HaeIII* สามารถตัดสายดีเอ็นเอของเห็นนางรม เห็นลูกผสม *Fu4* และ *Fu5* โดยพบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 250, 210 และ 190 คู่เบส ส่วนเห็นนางนวลพบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 490, 160 และ 70 คู่เบส และเอนไซม์ *HindIII* ไม่สามารถตัดสายดีเอ็นเอของเห็นนางรม ลูกผสม *Fu4*, *Fu5* และเห็นนางนวล (ภาพที่ 4.13)

4.4.4.2 ในบริเวณ IGS เอนไซม์ *EcoRI* ไม่สามารถตัดสายดีเอ็นเอของเห็นนางรม ลูกผสม *Fu4*, *Fu5* และเห็นนางนวล ส่วนเอนไซม์ *HaeIII* สามารถตัดสายดีเอ็นเอของเห็นนางรม เห็นลูกผสม *Fu4* และ *Fu5* โดยพบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 410, 300 และ 145 คู่เบส ส่วนเห็นนางนวลพบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 785 และ 170 คู่เบส และเอนไซม์ *HindIII* สามารถตัดสายดีเอ็นเอของเห็นนางรม เห็นลูกผสม *Fu4* และ *Fu5* โดยพบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 705 และ 180 คู่เบส ส่วนเห็นนางนวล พบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 800 และ 170 คู่เบส (ภาพที่ 4.14)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

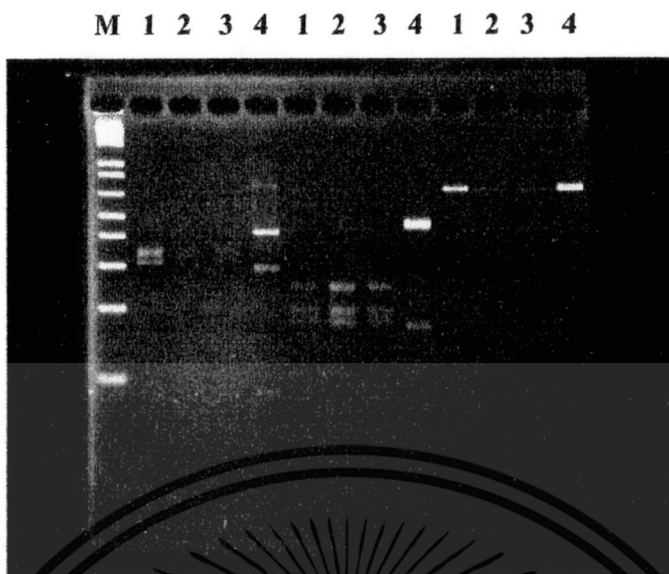


ภาพที่ 4.11 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ตามด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*FI, *Sau*3AI และ *Dde*I ตามลำดับบนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 2.0% โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker (100 bp ladder) ช่องที่ 1 คือเห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ Fu4, ช่อง 3 คือ Fu5, และช่อง 4 คือเห็ดนางนวล

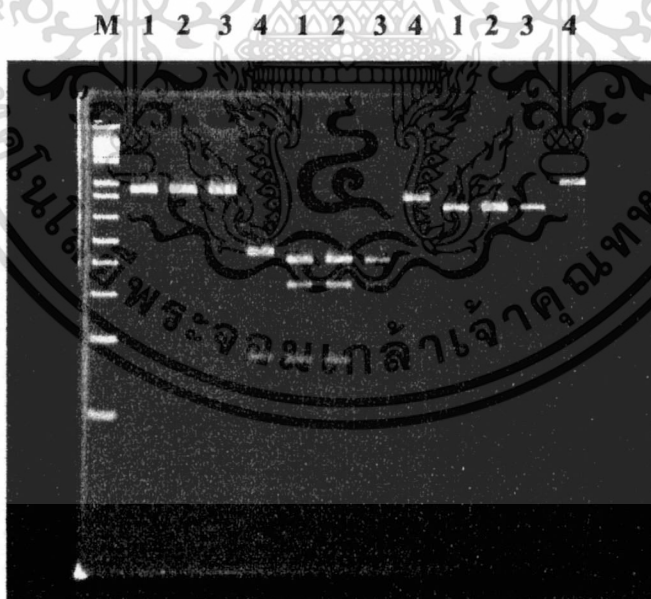


ภาพที่ 4.12 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ IGS ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ O-1 และ LR12R ตามด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ *Hin*FI, *Sau*3AI และ *Dde*I ตามลำดับบนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 2.0% โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker (100 bp ladder) ช่องที่ 1 คือเห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ Fu4, ช่อง 3 คือ Fu5, และช่อง 4 คือเห็ดนางนวล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.13 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ตามด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*, *HaeIII* และ *HindIII* ตามลำดับบนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 2.0% โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker (100 bp ladder) ช่องที่ 1 คือเห็นนางรม, ช่อง 2 คือ Fu4, ช่อง 3 คือ Fu5, และช่อง 4 คือเห็นนางนวล



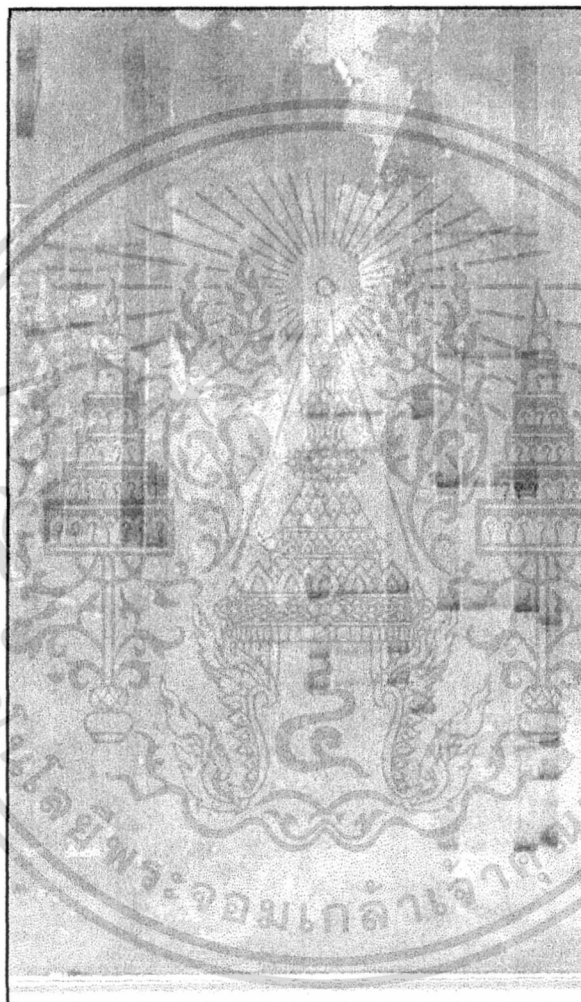
ภาพที่ 4.14 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ IGS ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ O-1 และ LR12R ตามด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*, *HaeIII* และ *HindIII* ตามลำดับบนอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้น 2.0% โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker (100 bp ladder) ช่องที่ 1 คือเห็นนางรม, ช่อง 2 คือ Fu4, ช่อง 3 คือ Fu5, และช่อง 4 คือเห็นนางนวล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การวิเคราะห์ผลของ PCR/RFLP ของ rDNA โดยวิธีโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

4.5.1 จากการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*, *HaeIII*, *HindIII*, *HinfI*, *Sau3AI* และ *DdeI* ในบริเวณ ITS ของลูกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 เปรียบเทียบกับเห็นนางรมและเห็นนางรมทอง ได้ผลดังภาพที่ 4.15

M 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5

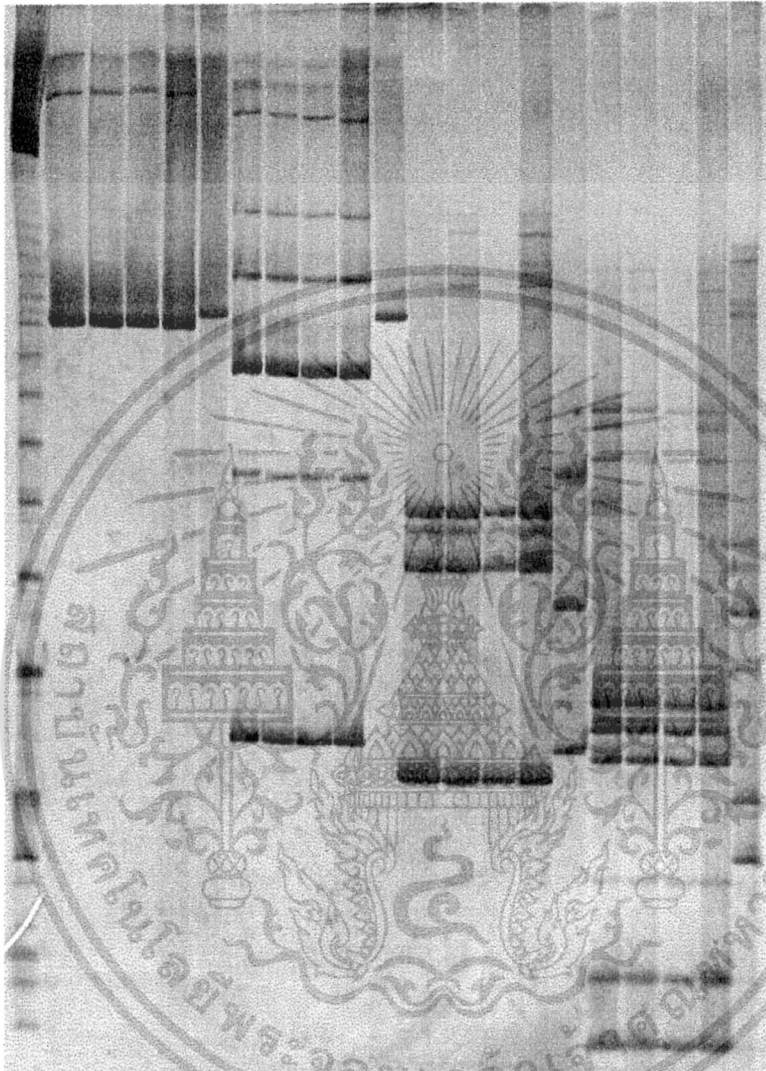


ภาพที่ 4.15 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ตามด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*, *HaeIII*, *HindIII*, *HinfI*, *Sau3AI* และ *DdeI* ตามลำดับ บน โพลีอะครีลาไมด์เจลที่มีความเข้มข้น 6.0% โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker (100 bp ladder) ช่องที่ 1 คือเห็นนางรม, ช่อง 2 คือ Fu1, ช่อง 3 คือ Fu2, ช่อง 4 คือ Fu3 และช่อง 5 คือเห็นนางรมทอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.2 จากการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*, *HaeIII*, *HindIII*, *HinfI*, *Sau3AI* และ *DdeI* ในบริเวณ IGS ของลูกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 เปรียบเทียบกับเห็ดนางรมและเห็ดนางรมทอง ได้ผลดังภาพที่ 4.16

M 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5 1 2 3 4 5

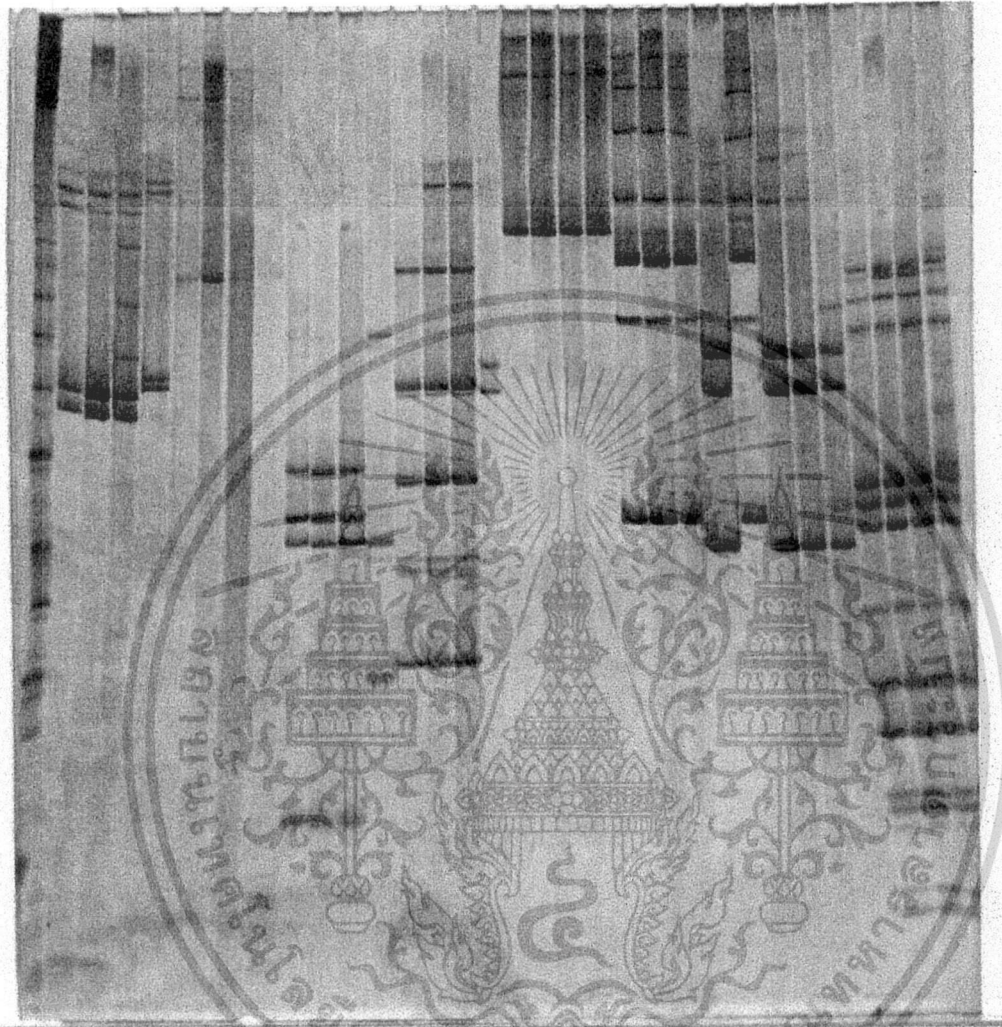


ภาพที่ 4.16 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ IGS ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ O-1 และ LR12R ตามด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*, *HaeIII*, *HindIII*, *HinfI*, *Sau3AI* และ *DdeI* ตามลำดับ บนโพลีอะครีลาไมด์เจลที่มีความเข้มข้น 6.0% โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker (100 bp ladder) ช่องที่ 1 คือเห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ Fu1, ช่อง 3 คือ Fu2, ช่อง 4 คือ Fu3 และช่อง 5 คือเห็ดนางรมทอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.3 การตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*, *HaeIII*, *HindIII*, *HinFI*, *Sau3AI* และ *DdeI* ในบริเวณ ITS และ IGS ของลูกผสม Fu4 และ Fu5 เปรียบเทียบกับเห็ดนางรมและเห็ดนางนวล ได้ผลดังภาพที่ 4.17

M 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4



ภาพที่ 4.17 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS และ IGS ตามด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI*, *HaeIII*, *HindIII*, *HinFI*, *Sau3AI* และ *DdeI* ตามลำดับ บนโพลีอะครีลาไมด์เจลที่มีความเข้มข้น 6.0% โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker (100 bp ladder) ช่องที่ 1 คือเห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ Fu4, ช่อง 3 คือ Fu5, และ ช่อง 4 คือเห็ดนางนวล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.4 จากการตัดด้วยเอนไซม์ *Sau3AI* และ *DdeI* ในบริเวณ ITS และ IGS ของลูกผสม Fu1 Fu2, Fu3, Fu4 และ Fu5 เปรียบเทียบกับเห็ดนางรม เห็ดนางรมทองและเห็ดนางนวล ตามลำดับได้ผล ดังภาพที่ 4.18



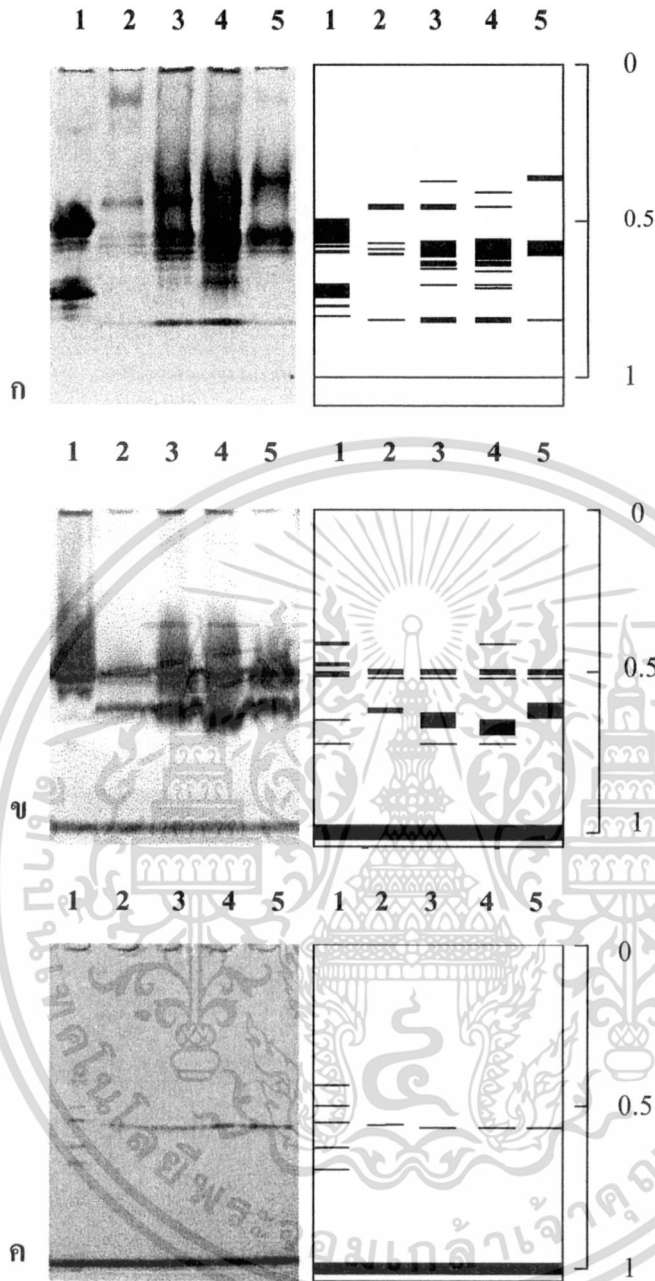
ภาพที่ 4.18 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS และ IGS ตามด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ *Sau3AI* และ *DdeI* ตามลำดับ บนโพลีอะครีลาไมด์เจลที่มีความเข้มข้น 6.0% โดยเรียงลำดับดังนี้ ช่อง M คือ ขนาดของ marker (100 bp ladder) ช่องที่ 1 คือเห็ดนางรม, ช่อง 2 คือ Fu1, ช่อง 3 คือ Fu2, ช่อง 4 คือ Fu2, ช่อง 5 คือ เห็ดนางรมทอง, ช่อง 6 คือ Fu4, ช่อง 7 คือ Fu5 และช่อง 8 คือเห็ดนางนวล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์

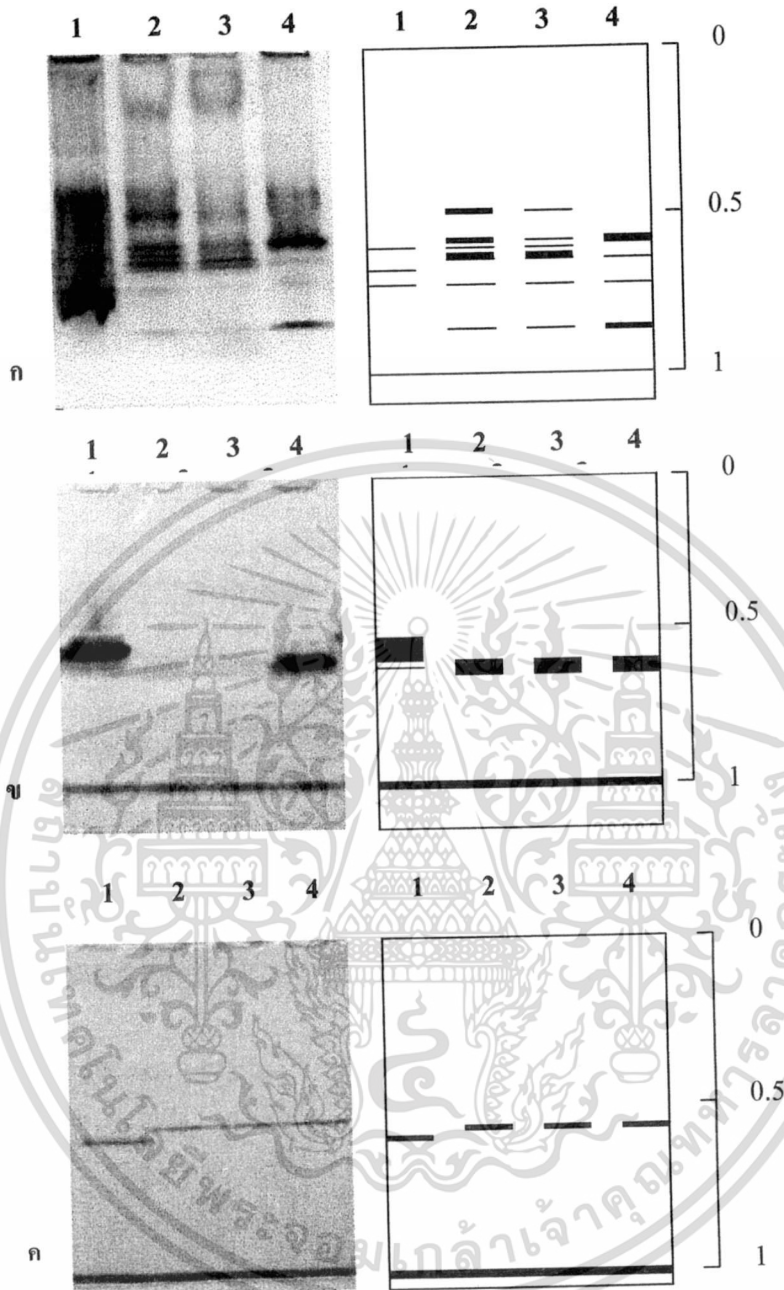
4.6.1 จากการศึกษาารูปแบบไอโซไซม์ของเส้นใยเห็ดลูกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 โดยทำการศึกษารูปแบบไอโซไซม์เอสเทอเรส (esterase) มาเลทดีไฮโดรจีเนส (malate dehydrogenase) และ แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) พบว่าเห็ดลูกผสมทั้ง 3 สายพันธุ์แสดงความเป็นลูกผสมเมื่อใช้เอ็นไซม์เอสเทอเรสและมาเลทดีไฮโดรจีเนส โดยพบว่าลูกผสมทั้ง 3 สายพันธุ์ปรากฏแถบไอโซไซม์ 3 แบบ คือ แบบที่ไม่เหมือนทั้งเห็ดนางรมและเห็ดนางรมทอง แบบที่เหมือนเห็ดนางรมหรือเห็ดนางรมทอง และแบบที่เหมือนทั้งเห็ดนางรมและเห็ดนางรมทอง ส่วนแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสจะปรากฏแถบที่เหมือนเฉพาะเห็ดนางรม (ภาพที่ 4.19)

4.6.2 จากการศึกษาารูปแบบไอโซไซม์ของเส้นใยเห็ดลูกผสม Fu4 และ Fu5 โดยทำการศึกษารูปแบบไอโซไซม์เอสเทอเรส มาเลทดีไฮโดรจีเนส และ แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส พบว่ารูปแบบไอโซไซม์เอสเทอเรสเท่านั้นที่แสดงความเป็นลูกผสมของเห็ดทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยปรากฏแถบไอโซไซม์ 3 แบบ คือ แบบที่ไม่เหมือนทั้งเห็ดนางรมและเห็ดนางนวน แบบที่เหมือนเห็ดนางรมหรือเห็ดนางนวน และแบบที่เหมือนทั้งเห็ดนางรมและเห็ดนางนวน ส่วนมาเลทดีไฮโดรจีเนสนั้นปรากฏแถบเพียงแบบเดียวคือแถบที่เหมือนทั้งเห็ดนางรมและเห็ดนางนวน และสำหรับแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสจะปรากฏแถบที่เหมือนเฉพาะเห็ดนางรม (ภาพที่ 4.20)



ภาพที่ 4.19 รูปแบบไอโซไซม์ของเห็ดสายพันธุ์ลูกผสม Fu1, Fu2 และ Fu3 เมื่อเปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ ก. รูปแบบไอโซไซม์เอสเทอร์เอส ข. รูปแบบไอโซไซม์มาเลทดีไฮโดรจีเนส ค. รูปแบบไอโซไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส แถบที่ 1 คือ เห็ดนางรมทอง, แถบที่ 2 คือ เห็ดลูกผสม Fu1, แถบที่ 3 คือ เห็ดลูกผสม Fu2, แถบที่ 4 คือ เห็ดลูกผสม Fu3 และแถบที่ 5 คือ เห็ดนางรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.20 รูปแบบไอโซไซม์ของเห็ดสายพันธุ์ลูกผสม Fu4 และ Fu5 เมื่อเปรียบเทียบกับเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่ ก. รูปแบบไอโซไซม์เอสเทอร์ส ข. รูปแบบไอโซไซม์มาเลทดีไฮโดรจีเนส ค. รูปแบบไอโซไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส แถบที่ 1 คือ เห็ดนางนวล, แถบที่ 2. เห็ดลูกผสม Fu4, แถบที่ 3 คือ เห็ดลูกผสม Fu5 และ แถบที่ 4 คือเห็ดนางรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมทอง เห็ดนางรมกับเห็ดนางนวล และเห็ดนางรมทองกับเห็ดนางนวล ได้ลูกผสมทั้งหมด 5 สายพันธุ์ โดย 3 สายพันธุ์ ซึ่งกำหนดชื่อเป็น Fu1, Fu2 และ Fu3 เป็นลูกผสมที่เกิดจากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางรมทอง และอีก 2 สายพันธุ์ ซึ่งกำหนดชื่อเป็น Fu4 และ Fu5 เป็นลูกผสมที่เกิดจากการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมกับเห็ดนางนวล ส่วนการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดนางรมทองกับเห็ดนางนวลไม่พบลูกผสม แม้ว่าในการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ด 2 ชนิด ไม่ควรถูกจำกัดโดย mating type ก็ตาม ดังนั้นการรวมโพรโตพลาสต์ระหว่างเห็ด 2 ชนิดนี้โดยใช้โพรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเส้นใยไมโทคอนไดรียนของเห็ดเพียงชนิดละ 1 สายพันธุ์ จะไม่ประสบความสำเร็จถ้าเส้นใยคู่ที่นำมาผสมกันนั้นมี mating type เหมือนกันหรือเข้ากันไม่ได้ทางเพศ กล่าวคือ คู่ผสมพันธุ์ต้องมี mating type เป็น A_1B_1 กับ A_2B_2 หรือ A_1B_2 กับ A_2B_1 เท่านั้นที่จะรวมกันได้

จากการศึกษาลักษณะของลูกผสมเปรียบเทียบกับพ่อแม่ โดยการวัดขนาดเส้นใยและศึกษาสัณฐานวิทยาของดอกเห็ดนั้น พบว่าเส้นใยของเห็ดลูกผสมมีขนาดใหญ่กว่าเห็ดสายพันธุ์พ่อแม่อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับที่วีรวุฒิ กนกนุเคราะห์ (2534), ประภัสสร โชคสวนทรัพย์ (2540), จรัสรัช มั่นถาวร (2544) และ Abe *et al.* (1982) ที่ได้รายงานไว้ว่า ลูกผสม ที่ได้จากการรวมโพรโตพลาสต์จะมีขนาดของเซลล์ของเส้นใยใหญ่กว่าสายพันธุ์พ่อแม่ ซึ่งอธิบายได้ว่าลูกผสมมีจำนวนชุดของโครโมโซม (ระดับ ploidy) มากกว่าของพ่อแม่และแม่ เช่น ลูกผสมอาจเป็น $2n$, $3n$... ในขณะที่สายพันธุ์พ่อแม่เป็น โมนอพลอยด์ (n)

จากผลพิสูจน์ความเป็นลูกผสมโดยเทคนิค PCR/RFLP โดยใช้เอนไซม์ทั้งหมด 6 ชนิด แม้ว่ารูปแบบดีเอ็นเอของพ่อแม่ คือเห็ดนางรม เห็ดนางรมทอง เห็ดนางนวล และลูกผสมทั้งหมด ในแต่ละเอนไซม์จะมีความแตกต่างกันบ้าง แต่ยังไม่สามารถบอกความเป็นลูกผสมได้อย่างชัดเจน

ในงานวิจัยครั้งนี้ จึงได้ทำการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของเห็ดลูกผสมเปรียบเทียบกับพ่อแม่ ซึ่งพบว่าในเห็ด Fu1, Fu2 และ Fu3 สามารถพิสูจน์ความเป็นลูกผสมได้โดยการศึกษาแบบไอโซไซม์เอสเทอร์เอสและมาเลทดีไฮโดรจีเนส สำหรับเห็ด Fu4 และ Fu5 สามารถพิสูจน์ความเป็นลูกผสมได้เฉพาะเมื่อศึกษารูปแบบไอโซไซม์เอสเทอร์เอส โดยที่เอนไซม์ที่ได้ศึกษามีทั้งหมด 3 ชนิด คือ เอสเทอร์เอส, มาเลทดีไฮโดรจีเนส และอัลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส

บรรณานุกรม

- จรัสรัช มั่นถาวร. 2544. การสร้างลูกผสมระหว่างเห็ดหอม (*Lentinula edodes*) และเห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) โดยการรวมโพรโตพลาสต์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- จิราพร นิลฉวี. 2546. การศึกษาพื้นฐานวิทยาและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเห็ดบางชนิดในสกุล *Pleurotus* โดยเทคนิค PCR/RFLP. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ชนินันท์ พรสุริยา. 2546. การศึกษาปัจจัยในการรวมโพรโตพลาสต์ของเห็ดกินได้บางชนิดชนิดในสกุล *Pleurotus*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ประภัศร โชคสวนทรัพย์. 2540. การผสมพันธุ์ระหว่างเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- วัชร อรรถทิพพหลกุล และ มนตรี อรรถทิพพหลกุล. 2539. ทฤษฎีการประยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR technology. กรุงเทพมหานคร : คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- วีรวัฒน์ กนกนุเคราะห์. 2534. การปรับปรุงสายพันธุ์เห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*) โดยการรวมโพรโตพลาสต์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สาวิตรี ถิมทอง. 2536. โพรโตพลาสต์ฟิวชันของจุลินทรีย์. กรุงเทพมหานคร : ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุมาลี พิษญากร. 2541. เห็ดโคนและลูกผสมฟิวแอสันท์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก.
- สาธินี ชื่อดตรง. 2546. การศึกษาระบบ Mating Type ของเห็ดในสกุล *Pleurotus* วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2539. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ : ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Alexopoulos, C. J. and Mims, C. W. 1979. *Introductory Mycology*. 3rd ed., New York : John Wiley & Sons. Singapore.
- Anne, J. and Peberdy, J.F. 1976. "Induce Fusion of Fungus Protoplast Following Treatment with Polyethylene Glycol". *J. of Gen. Microbial.* 92 : 413-417.
- Atlas, R. M. 1993. *Handbook of Microbiological Media*. Florida : CRC Press, INC.
- Corner, E. J. H. 1981. "The Agaric Genera *Lentinus*, *Pinus* and *Pleurotus* with Particular Reference to Malaysian Species." *Beihefte Zur Nova Hedwigia* : 69 : 1-169.
- Gadau, M. E. and Ling, A. J. 1992. "Protoplast Fusion in Fungi." 101-128. In Arora, D. K., Elander, R. P. and Mukerji, K. G. *Handbook of Applied Mycology Volume 4 : Fungal Biotechnology*. New York : Marcel Dekker, Inc.
- Hanson, L. E. and Howell, C. R. 2002. "Biocontrol Efficiency and Other Characteristics of Protoplast Fusants between *Trichoderma koningii* and *T. virens*" *Mycological Research* 106(3) : 321-328.
- Hashiba, T. 1992. "Isolation of Fungal Protoplasts" p.129-149. In Arora, D. K., Elander, R. P. and Mukerji, K. G. *Handbook of Applied Mycology Volume 4 : Fungal Biotechnology*. New York : Marcel Dekker, Inc.
- Hilber, O. 1982. "Die Gattung *Pleurotus*". *Bibliotheca Mycologica*. 87 : 1-448.
- Kao, K. N. and Michayluk, M. R. 1974. "A Method for High-Frequency Intergeneric Fusion of Plant Protoplasts". *Planta*. 115 : 355-367.
- Kim, M. *et. al.* 2001. "Use of Flow Cytometry, Fluorescence Microscopy, and PCR-Based Techniques to Assess Intraspecific and Interspecific Mating of *Armillaria* Species" *Mycol. Res.* 105(2) : 153-163.
- Nicholson, M.S. *et al.* 1995. "Phylogeny of the genus *Lentinula* Based on Ribosomal DNA Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis". *Mycologia*. 89(3) : 400-407.
- Peberdy, J. F. 1976. "Isolation and Properties of Protoplasts from Filamentous Fungi". P. 39-50. In Peberdy, J.F., Rose, A. H., Rogers, H. J. and Cocking, E. C. *Microbial and Plant Protoplasts*. London : Academic Press, Inc.
- Pegler. 1983. "Agaric Flora of the Lesser Antilles". Addition Series IX. London : Kew Bulletin.

- Stamets, P. 1993. "Growing Gourmet and Medicinal Mushroom", 2nd ed. Hong Kong : Ten Speed Press.
- Stamets, P. 2000. "Growing Gourmet and Medicinal Mushroom" . 1st ed. Canada. : Ten Speed Press.
- Takehara, T., Kumata, A. and Aono, S. 1993. "Interpecific Protoplast Fusion between Some Pleurotus Species Using Auxotrophic Mutants." Mokuzaigakkaishi. 39(7) : 855-859.
- Vilgalys lab. "Ribosomal DNA." [Online]. Available : www.vilgalyslab.com. 1999.
- Wang, F. D. 1992. "Interspecific Protoplast Fusion of Straw Mushroom and Behavior of Regeneration Strains". Acta-Agriculture-Shanghai. 8(1) : 14-19.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก 1

อาหารเลี้ยงเชื้อ สารที่ใช้ในการแยกและรวมโพรโตพลาสต์

1. อาหารแข็งมอลต์สกัด (MEA, malt extract agar) (Harrington *et al.* 2001 ; Atlas. 1993, Isikhuemhen *et al.* 2000)

น้ำตาลกลูโคส	20.0	กรัม
มอลต์สกัด	20.0	กรัม
เปปโตน	1.0	กรัม
ผงวุ้น	20.0	กรัม

ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มล. แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตร. นิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเหลวมอลต์สกัด (MEB, malt extract broth)

น้ำตาลกลูโคส	20.0	กรัม
มอลต์สกัด	20.0	กรัม
เปปโตน	1.0	กรัม

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1,000 มล. คนให้ส่วนประกอบทั้งหมดละลายเข้ากัน จากนั้นบรรจุลงขวดอาหาร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตร. นิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. การเตรียม sodium malate buffer (protoplast buffer) 0.05 โมลาร์

การเตรียมสารละลาย ก : สารละลาย sodium malate 0.2 โมลาร์

ละลาย NaOH 8 กรัม ผสมกับ maleic anhydride 19.6 กรัม ในน้ำกลั่นแล้ว

ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มล.

การเตรียมสารละลาย ข : ละลาย NaOH 8 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น

1,000 มล.

การปรับค่าพีเอชของบัฟเฟอร์ให้ใช้สารละลาย ก ปริมาตร 50 มล. ผสมกับสารละลาย ข ปริมาตร×มล. (จนกระทั่งได้พีเอชที่ต้องการ) แล้วเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 200 มล.

4. การเตรียม osmotic stabilizer ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)

osmotic stabilizer ที่ใช้คือ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.6 โมลาร์ เตรียมโดยละลาย $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 147.84 กรัม ในสารละลาย sodium malate buffer ปริมาตร 1,000 มล.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. calcium chloride 0.05 โมลาร์

ชั่ง calcium chloride 0.7351 กรัม และละลายในสารละลาย sodium maleate buffer 0.05 โมลาร์ พีเอช 0.5 ปริมาตร 100 มล.

6. PEG (polyethylene glycol) 6000 ความเข้มข้นร้อยละ 40

ชั่ง PEG ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 6000 มา 40 กรัม และละลายใน $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.05 โมลาร์ ปริมาตร 100 มล. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

7. อาหารสำหรับการสร้างผนังเซลล์ขึ้นมาใหม่ของโพรโตพลาสต์

แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ

a. อาหารที่ใช้เลี้ยงโพรโตพลาสต์ ประกอบด้วย

glucose	20.0	กรัม
malt extract	20.0	กรัม
peptone	1.0	กรัม
ผงวุ้น	30.0	กรัม
Sucrose 0.6 โมลาร์	1.0	ลิตร

b. อาหารที่ใช้เททัพบิวหน้า

กลูโคส	20.0	กรัม
malt extract	20.0	กรัม
peptone	1.0	กรัม
ผงวุ้น	5.0	กรัม
sucrose 0.6 โมลาร์	1.0	ลิตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน นำไปต้มให้อาหารละลายเข้ากับน้ำจนมีลักษณะใส จากนั้นบรรจุลงขวดอาหาร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สำหรับอาหารที่ใช้เททัพบิวหน้า เป็นอาหารที่เททับลงบนสารแขวนลอยของโพรโตพลาสต์ ดังนั้นต้องใช้ในสภาพที่อุณหภูมิประมาณ 40-45 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก 2

การเตรียมบัฟเฟอร์และสารเคมีในการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

1. 3 M Sodium acetate, pH 5.2

ละลาย $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ จำนวน 408.1 กรัมในน้ำกลั่น 800 มล. ปรับ pH ให้เท่ากับ 5.2 ด้วย glacial acetic acid ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร นำไปนั่งฆ่าเชื้อ

2. 0.5% Sodium dodecyl sulfate (SDS)

ละลาย SDS 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มล. นำไปอุ่นใน water bath ที่มีอุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.2 ด้วย 1 N HCl และปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร

3. 0.5 M EDTA

ละลาย disodium ethylene diamine tetra-acetate จำนวน 186.1 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มล. ใช้ magnetic stirrer ในการหมุนเพื่อช่วยให้ละลาย ปรับ pH ให้เท่ากับ 8.0 ด้วย NaOH เข้มข้น (ชนิดที่เป็นเม็ด) และปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปนั่งฆ่าเชื้อ

4. 5 M NaCl

ละลาย sodium chloride 292.2 กรัมในน้ำกลั่น 800 มล. ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร แล้วนำไปนั่งฆ่าเชื้อ

5. 1 M Tris-HCl

ละลาย Tris-base 121.1 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มล. ปรับ pH ด้วย 1 M HCl ในปริมาตรดังนี้

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 แล้วนำไปนั่งฆ่าเชื้อ

6. Tracking dye

เตรียมจากการนำ 1 M Tris-HCl, pH 7.6 ปริมาตร 5 มล. 0.5 M EDTA pH 8.0 ปริมาตร 10 มล. ผง bromophenol blue 0.5 กรัม และซูโครส 40 กรัม มาผสมในน้ำกลั่นปริมาตร 40 มล. ใช้ magnetic stirrer ในการหมุนเพื่อช่วยละลาย แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มล. จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของสารแต่ละตัวดังนี้ Tris-HCl 50 mM (pH 7.6), EDTA 50 mM, bromophenol blue 0.5 เปอร์เซ็นต์ และซูโครส 40 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก 3

การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

1. เตรียมถาดสำหรับเทเจลในแนวราบและหวีให้เรียบร้อย
2. ชั่งผงอะกาโรส 2.0 กรัม มาเติมด้วย TBE buffer 100 มล. ในกรณีที่ต้องการเตรียมเจล 2.0 เปอร์เซ็นต์
3. หลอมอะกาโรสเจลโดยอุ่นให้ร้อนหรือใช้ไมโครเวฟให้ผงอะกาโรสละลายจนหมด
4. ตั้งหึ่งไว้ให้เย็นลงจนพอที่จะสามารถสัมผัสได้แล้วเทลงในถาดที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ให้เจลหนาประมาณ 0.5 มม. เสียบหวีลงในเจลเพื่อให้เกิดร่องสำหรับหยอดสารละลาย ตั้งหึ่งไว้ให้เจลแข็งตัว
5. เมื่อเจลแข็งตัวให้ค่อยๆ ดึงหวีออก นำเจลใส่ลงเครื่องสำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เท TBE buffer ให้ท่วมเจล โดยให้สูงกว่าผิวเจลประมาณ 2-3 มม.
6. ผสมสารละลายดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading buffer 1 ไมโครลิตร แล้วหยอดลงในช่องในแผ่นเจล ให้ช่องที่ 1 เป็นช่องสำหรับการหยอด marker สำหรับเปรียบเทียบ
7. ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส แล้วเปิดกระแสไฟฟ้า 60 วัตต์
8. เมื่อดีเอ็นเอเคลื่อนที่ไปพอประมาณ ให้ปิดเครื่อง
9. นำเจลไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต ถ่ายภาพ และทำการบันทึกลงแผ่นดิสก์

ภาคผนวก 4

การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

การแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีโพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสทำได้โดยนำผลิตภัณฑ์ซีอาร์ที่ได้จากการทำ RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 6 ชนิด คือ *EcoRI*, *DdeI*, *HaeIII*, *HindIII*, *HinfI* และ *Sau3AI* มาแล้ว มาเติม AFLP loading buffer (98% formaldehyde, 10mM EDTA, 0.1% bromphenol blue, 0.1% xylene cyanol) 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 3 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันทีพร้อมสำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยทำตามขั้นตอนดังนี้

1. การเตรียมกระจกสำหรับเทเจล

1.1 นำแผ่นกระจกสำหรับเตรียมเจลมาล้างให้สะอาด แล้วเช็ดด้วยเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ให้สะอาดทั้ง 2 แผ่น

1.2 เช็ดกระจกแผ่นหลังด้วย blind silane (blind silane 1 ไมโครลิตร, glacial acetic 2.5 ไมโครลิตร และเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร) เพื่อให้เจลเกาะติดกระจก

1.3 กระจกแผ่นหน้าที่มีลักษณะเป็นหุกระต่าย เช็ดให้ทั่ว ปล่อยให้แห้งประมาณ 5-10 นาที

1.4 นำกระจกทั้ง 2 แผ่นมาประกอบเข้าชุด โดยวาง spacer ไว้ทั้งสองข้าง เพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสอง โดยหันด้านที่ทา blind silane และ repel silane เข้าหากัน ใช้คลิปหนีบยึดให้คงที่ สำหรับกระจกแผ่นขนาด 15×17 ซม. ให้ใช้เทปกาวติดกระจก 3 ด้านเพื่อไม่ให้เจลรั่วซึมออกมา ก่อนใช้คลิปหนีบอีกครั้งหนึ่ง ถ้าเป็นกระจกขนาด 20×40 ซม. ไม่ต้องติดเทป spacer และจะใช้ขนาด 0.35-0.4 มม.

2. การเตรียมโพลีอะครีลาไมด์เจล

ใช้เจลเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ (acrylamide : bisacrylamide = 19:1, 7.5 M urea) โดยมีส่วนผสมดังนี้

สารที่ใช้	ปริมาณ
30% acrylamide (19:1)	3.0 มิลลิลิตร
5X TBE	3.0 มิลลิลิตร
ยูเรีย	6.75 กรัม
น้ำกลั่น	3.75 มิลลิลิตร
10% APS	150 ไมโครลิตร
TEMED	7.5 ไมโครลิตร

TBE = 89 mM Tris-borate, 2.5 mM EDTA

APS = ammonium persulfate

TEMED = N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine

เพื่อการศึกษานี้ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผสมอะคลีลาไมด์ บัฟเฟอร์ TBE น้ำ และยูเรียในบีกเกอร์หรือขวดรูปชมพู่ เขย่าเบาๆในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิประมาณ 50 °C โดยทำให้ยูเรียละลายจนหมด รอจนอุณหภูมิลดลงประมาณเท่าอุณหภูมิห้องจึงเติม 10% APS และ TEMED เขย่าให้ผลเป็นเนื้อเดียวกันอย่างรวดเร็ว ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ เทเจลใส่ลงในช่องระหว่างกระจกจนเต็มแล้วจึงใส่หัวลงไปด้านบน ถ้าเป็นหัวแบบเป็นช่อง (well type) ให้ใส่หัวลงไปตามปกติ ถ้าเป็นการเตรียมกระจกแผ่นขนาด 20 × 40 เซนติเมตร ให้วางกระจกราบแนวระดับ ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 2 ชั่วโมง ถ้าจะปล่อยให้ข้ามคืนควรใช้แผ่นใสห่ออาหารปิดด้านบนและล่างของเจลไว้เพื่อให้มีความชื้น

3. การทำอิเล็กโทรโฟริซิส

3.1 เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้ว ใช้น้ำล้างกระจกด้านบนออกให้สะอาด ดึงหัวออก ถ้าติดเทปไว้ตอนเตรียมเจลให้แกะเทปออก และประกอบเข้ากับชุดอิเล็กโทรโฟริซิส เติมบัฟเฟอร์ TBE ลงในช่องด้านบนและด้านล่าง ระวังอย่าให้มีฟองอากาศอยู่ใต้กระจก

3.2 ต่อสายไฟเข้ากับเครื่อง ทำ pre-run 20-30 นาที เจลขนาด 15 × 17 เซนติเมตรให้ใช้ความต่างศักย์คงที่ 200 โวลต์ ส่วนเจลขนาด 20 × 40 เซนติเมตรให้ใช้ความต่างศักย์คงที่ 1,500-2,000 โวลต์ หรือใช้กำลังไฟฟ้าคงที่ 35-40 วัตต์

3.3 ปิดเครื่อง ใช้เข็มฉีดยาดูดบัฟเฟอร์มาล้างผิวหน้าของเจล ถ้าเป็นหัวแบบพันฉลามให้ใส่หัวด้านที่เป็นฟันลงไปให้สัมผัสกับผิวหน้าเจลเพียงเล็กน้อย และใช้เข็มฉีดยาดูดบัฟเฟอร์ล้างยูเรียที่อยู่ในช่องหัวแต่ละช่องให้หมด

3.4 หยอดตัวอย่างดีเอ็นเอ 3-5 ไมโครลิตรลงในช่องแต่ละช่อง

3.5 เปิดเครื่องโดยใช้ความต่างศักย์เท่าเดิมเป็นเวลา 2-3 ชั่วโมงจนกว่าสี xylene cyanol (สีที่อยู่ด้านบน) จะเคลื่อนที่ลงมาประมาณ 2 ใน 3 ส่วนของเจล

3.6 ปิดเครื่อง ดูดบัฟเฟอร์จากช่องด้านบนออก นำกระจกออกจากเครื่อง แยกกระจกทั้ง 2 แผ่น

ออกจากกัน เจลจะติดอยู่กับกระจกแผ่นหลังที่เป็นสีเหลี่ยมตรง นำเจลไปย้อมสีหรือถ่ายดีเอ็นเอลงสู่แผ่นฟิลเตอร์ต่อไป

4. การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยวิธีปลอตรังสี ทำโดยย้อมเจลด้วยซิติเวอร์ไนเตรท ตั้งขึ้นตอนต่อไป

1. นำแผ่นกระจกที่มีเจลติดอยู่มาล้างในน้ำกลั่นนาน 3-5 นาที เขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่า
2. แช่แผ่นเจลในสารละลาย CTAB ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (หรือใช้น้ำกลั่นก็ได้) นาน 30 นาที เขย่าตลอดเวลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. นำแผ่นเจลใส่ในสารละลายแอมโมเนียความเข้มข้น 0.3% นาน 15 นาที โดยเขย่าตลอดเวลา
4. นำแผ่นเจลมาข้อมในสารละลายซิลเวอร์ที่เตรียมใหม่ เป็นเวลา 20 นาที (ดูวิธีเตรียมสารละลายซิลเวอร์ตอนท้ายของวิธีนี้) เขย่าอย่างสม่ำเสมอ
5. นำแผ่นเจลออกมาจุ่มลงในน้ำกลั่นอย่างรวดเร็ว ไม่เกิน 5 วินาที เพราะถ้าล้างนานซิลเวอร์จะหลุดหมด ต้องข้อมใหม่
6. ย้ายแผ่นเจลมาใส่ในสารละลาย developer ที่เตรียมใหม่ๆ และแช่เย็นที่อุณหภูมิ 10°C เขย่าอย่างสม่ำเสมอ 5-25 นาที หรือจนกว่าจะเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน (developer = 2% sodium carbonate, 0.02% formaldehyde)
7. นำแผ่นเจลมาจุ่มน้ำอย่างรวดเร็ว
8. หยุดปฏิกิริยาโดยนำแผ่นเจลมาใส่ในสารละลายกลีเซอรอล 3 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 นาที แล้วทิ้งให้แห้งในอากาศ

วิธีเตรียมสารละลายซิลเวอร์ในเตรท 1 ลิตร

ชั่งซิลเวอร์ในเตรท 1.6 กรัม เติมน้ำ 994 มล. และโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 M 4 มล. คนให้ละลายจะได้สารละลายปูนสีน้ำตาล ค่อยๆ เติม liquid ammonia เข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ 2-2.4 มล. โดยค่อยๆ เติมทีละหยด จนสารละลายใสจึงใส่เพิ่มอีก 2 หยด

ภาคผนวก 5 การศึกษารูปแบบไอโซไซม์

การทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

1. การเตรียม extraction buffer

Tris-HCl 0.2 M, pH 8.2

Stock solution

A : 0.2M Solution of Tris (hydroxymethyl) aminomethane 2.4228 กรัม/100 มล.

B : 0.2 M HCl 1.66 กรัม/100 มล.

วิธีการเตรียม

นำ stock A 50 มล. ผสมกับ stock B 21.9 มล. เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 200 มล.

ปรับพีเอชด้วย NaOH ให้ได้ 8.2 บรรจุในขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียม electrode buffer

Tris-glycine, pH 8.5 ($\times 10$)

Tris (hydroxymethyl) aminomethane 6.0 กรัม/100 มล.

glycine 28.8 กรัม/100 มล.

H₂O adjust 1,000 มล.

3. การเตรียมส่วนประกอบของเจล

Stock A : acrylamide stock

acrylamide 29.2 กรัม

N',N'-methylene- bis acrylamide 0.8 กรัม

H₂O adjust 100 มล.

Keep in dark condition at 4 °C

Stock B : 1.5 tris-HCl, pH 8.8

Tris base 36.3 กรัม

1 M HCl 48 กรัม

adjust to pH 8.8 with HCl

H₂O adjust 100 มล.

Keep in dark condition at 4 °C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Stock C : 0.5 tris-HCl, pH 6.8

Tris base	6.0	กรัม
H ₂ O	60	มล.
adjust to pH 8.8 with HCl		
H ₂ O adjust	100	มล.

Keep in dark condition at 4 ° C

Stock D : 10% ammonium persulfate (fresh prepare)

(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	0.1	กรัม
H ₂ O	1	มล.

Keep in dark condition at 4 ° C

ตารางภาคผนวกที่ 1 อัตราส่วนที่ใช้ในการเตรียมเจล

Stock Solution	Running gel (7.5% gel)	Stracking gel (4.0% gel)
Stock A (ml)	2.5	1.3
Stock B (ml)	2.5	-
Stock C (ml)	-	2.5
Stock D (ml)	70	100
H ₂ O	4.85	6.1
TEMED (μl)	5.0	12.5
	10	10

4. การเตรียมลีส้อยอมไนซิม

4.1 Esterase

ละลาย fastblue RR salt 0.15 มล. ด้วย 0.1 phosphate buffer pH 6.0 ปริมาตร 10 มล. แล้วเติม 1% α-naphthyl acetate ใน absolute alcohol 3 มล. ย้อมเจลในที่มืด 30 นาที

การเตรียม 0.1 M phosphate buffer pH 6.0

Stock A : monosodium phosphate (NaH₂PO₄·3H₂O) 13.9 กรัม/1000 มล.

Stock B : disodium phosphate (NaH₂PO₄) 53.65 กรัม/1000 มล.

นำ stock A 87.7 มล. ผสมกับ stock B 12.3 มล. เติมน้ำกลั่นพร้อมปรับพีเอชให้ได้ 6.0 ที่ ปริมาตร 200 มล.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 Malate dehydrogenase

ประกอบด้วย

Tris-A buffer	35	มล.
Malic acid 2 M (pH 7.0)	5	มล.
MgCl ₂	0.3	มล.
NAD (1% ใน H ₂ O)	2	มล.

ก่อนใช้เติม

NBT (1% ใน H ₂ O)	1	มล.
PMS (1% ใน H ₂ O)	0.5	มล.
MTT (1% ใน H ₂ O)	1	มล.

บ่มเจลในที่มีดจนกระทั่งเกิดแถบสีน้ำเงิน (ประมาณ 30-60 นาที)

การเตรียม 2 M Malic acid (pH 7.0)

Malic acid	536.4	กรัม
NaOH	320	กรัม

ในการเตรียมจะเกิดปฏิกิริยาที่อันตราย ควรวางอุปกรณ์แก้วบนน้ำแข็ง แล้วค่อยๆ เติม NaOH

4.3 Alcohol dehydrogenase

Tris-A buffer	40	มล.
0.5 MgCl ₂	0.2	มล.
ethanol (1% ใน H ₂ O)	3	มล.
ก่อนใช้เติม		
NBT (1% ใน H ₂ O)	1	มล.
PMS (1% ใน H ₂ O)	0.3	มล.
MTT (1% ใน H ₂ O)	0.5	มล.

บ่มเจลในที่มีดจนกระทั่งเกิดแถบสีน้ำเงิน (ประมาณ 30-60 นาที)