รายงานการวิจัย

การศึกษาความหลากหลายของดีเอ็นเอของเห็ดตีนแรด ด้วยเทคนิค RAPD-PCR

Sdudies on DNA Polymorphism of the Mushroom *Tricholoma crassum* by RAPD-PCR Technique.

รองศาสตราจารย์ มาลินี ตันติยาภรณ์

RCN
QK
629
.T73
2497ก
เลขหมู่.....
83844
เลขทะเบียน.....
วัน,เดือน,ปี 19 ก.ย. 2551

ได้รับทุนอุดหนุนงานวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้

ประจำปี 2549

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

b 11986232
i

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

RESEARCH REPORT

Sdudies on DNA Polymorphism of the Mushroom *Tricholoma crassum* by RAPD-PCR Technique.

Assoc. Prof. Malinee Tantiyaporn

This resaech has been supported by the

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

For the budget year 2006

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ ประจำปี 2549 ในกลุ่มวิชาการการวิจัยประยุกต์ สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา

ขอขอบคุณ นางสาวเชาวนี มีหวัง นายภควุฒิ สีม่วงคำ และ นางสาววันพร คันธวิวรณ์ นักศึกษาของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่ช่วยทำงานปฏิบัติการนี้

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัยตลอดระยะเวลาการวิจัย

รศ. มาลินี ตันติยาภรณ์

มิถุนายน 2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ การศึกษาความหลากหลายของดีเอ็นเอของเห็ดตีนแรด ด้วยเทคนิค RAPD-PCR
ชื่อผู้วิจัย รศ. มาลินี ตันติยาภรณ์
นางสาวเชาวนี มีหวัง นายภควุฒิ สีม่วงคำ และ นางสาววันพร คันธวิวรณ์

บทคัดย่อ

ในการศึกษาหาความหลากหลายของดีเอ็นเอของเห็ดตีนแรดใน 4 จังหวัด คือ จังหวัดกรุงเทพฯ(ศูนย์เพาะเห็ดบ้านอรัญญิก) จังหวัดขอนแก่น จังหวัดมหาสารคาม และจังหวัดปทุมธานี ได้ทำการเพาะเลี้ยงเส้นใยในอาหารเหลว PDYB ในสภาวะที่เหมาะสมที่ 25 องศาเซลเซียส พีเอช 6 แล้วนำตัวอย่างเห็ดตีนแรดทั้งห้มดทุกจังหวัด มาวิเคราะห์ความหลากหลายของดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค RAPD-PCR นำผลที่ได้จาก RAPD-PCR มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนตัวกลางอะกาโรสเจล จากการทดลองพบว่าไพรเมอร์ OPA01 ไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเห็ดตีนแรดได้ทุกตัวอย่าง ขณะที่ไพรเมอร์ OPA02 สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในตัวอย่างเห็ดตีนแรดของจังหวัดขอนแก่น จังหวัดมหาสารคามและจังหวัดประทุมธานี ไพรเมอร์ OPA03 และ OPA04 เท่านั้นที่เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ในทุกตัวอย่างเห็ดตีนแรด และผลจากการทำ RAPD-PCR ทำให้ทราบว่าตัวอย่างเห็ดตีนแรดจากกรุงเทพฯ มีลักษณะทางพันธุกรรมที่แตกต่างกว่าตัวอย่างเห็ดตีนแรดใน 3 จังหวัด คือ จังหวัดขอนแก่น จังหวัดมหาสารคามและจังหวัดปทุมธานี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title Sdudies on DNA Polymorphism of the Mushroom *Tricholoma crassum* by RAPD-PCR Technique.

Researcher Assoc.Prof. Malinee Tantiyaporn , Miss Chowwanee Meewang
Mr. Phakhawoot Seemungkhom Miss Wonphorn Kandhavivorn

ABSTRACT

The four samples of *Tricholoma crassum* from Bangkok(Arunyig center), Khonkaen, Mahasarakham and Prathumthani were cultured on PDYB medium. The conditions for the mycelium growth on PDYB medium were pH 6.0 and 25°C. All DNA samples were analyzed by RAPD-PCR and then the RAPD-PCR products were determined by agarose gel electrophoresis. All *T. crassum* DNA samples were not amplified by primer OPA01 where as the *T. crassum* DNA samples from Khonkaen, Mahasarakham and Prathumthani were amplified by using primer OPA02. All DNA samples were amplified by using primer OPA03 and OPA04. In addition, by RAPD-PCR it was shown that the DNA isolated from *T. crassum* obtained from Bangkok showed the higher genetic variation than those obtained from Khonkaen, Mahasarakham and Prathumthani.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	**ก**
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	**ข**
กิตติกรรมประกาศ	**ค**
สารบัญ	**ง**
สารบัญตาราง	**ฉ**
สารบัญรูป	**ช**
บทที่ 1 บทนำ	**1**
1.1 ความเป็นมาของโครงงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของโครงงานวิจัย	2
1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีดำเนินงาน	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	**4**
2.1 ลักษณะทางชีววิทยาของเห็ดตีนแรด	4
2.2 หลักการการสกัดดีเอ็นเอ	6
2.3 เทคนิค RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase chain reaction)	7
2.4 หลักการของอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส	11
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	17
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	**20**
3.1 ขั้นตอนการดำเนินงาน	20
3.2 แหล่งที่มาของเส้นใยเห็ดตีนแรดที่ใช้ในการทดลอง	21
3.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	21
3.4 วิธีการทดลอง	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลองและการอภิปรายผล	**26**
4.1 การสกัดดีเอ็นเอ	26
4.2 ความหลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอหลังจากการทำRAPD-PCR	27
4.3 การวิเคราะห์ผล RAPD-PCR	30
บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ	**34**
เอกสารอ้างอิง	**35**
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	37
ภาคผนวก ข	38
ภาคผนวก ค	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	แสดงลำดับเบสและน้ำหนักโมเลกุลของไพรเมอร์ที่ใช้	10
2.2	แสดงปัญหาที่อาจเกิดขึ้นในขณะทำRAPD-PCR	12
2.3	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของอะกาโรสเจลกับขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิด (สุรินทร์, 2543)	15
2.4	แสดงส่วนประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้	16
4.1	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างไพรเมอร์ และผลที่ได้จากการทำ RAPD-PCR ในเห็ดตีน แรดจังหวัดต่างๆ	31
4.2	แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD – PCR โดยใช้ไพรเมอร์ OPA02 - OPA04 ในการวิเคราะห์ผล โดยให้สัญลักษณ์ + แทนการพบแถบดีเอ็นเอ และสัญลักษณ์ – แทนการไม่พบแถบดีเอ็นเอ	33
ค	ลำดับเบสไพรเมอร์ที่นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเห็ดตีนแรด	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	แสดงการเกิดปฏิกิริยาและรูปแบบที่ได้จากการทำ RAPD-PCR	9
4.1	แสดงแถบ genomic DNA ของเส้นใยเห็ดตีนแรดจังหวัดต่าง ๆ ดังนี้	26
4.2	แสดงแถบดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มปริมาณแบบสุ่มของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ โดยใช้ไพรเมอร์ OPA01	27
4.3	แสดงแถบดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มปริมาณแบบสุ่มของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ โดยใช้ไพรเมอร์OPA02	28
4.4	แสดงแถบดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มปริมาณแบบสุ่มของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ โดยใช้ไพรเมอร์ OPA03	29
4.5	แสดงแถบดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มปริมาณแบบสุ่มของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ โดยใช้ไพรเมอร์ OPA04	30
4.6	แสดงรูปแบบที่ได้จากการทำ RAPD-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ OPA02-OPA04 ในตัวอย่างเห็ดตีนแรดจังจังหวัดต่างๆ	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาของโครงงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของโครงงานวิจัย	2
1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีดำเนินงาน	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	4
2.1 ลักษณะทางชีววิทยาของเห็ดตีนแรด	4
2.2 หลักการการสกัดดีเอ็นเอ	6
2.3 เทคนิค RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase chain reaction)	7
2.4 หลักการของอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส	11
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	17
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	20
3.1 ขั้นตอนการดำเนินงาน	20
3.2 แหล่งที่มาของเส้นใยเห็ดตีนแรดที่ใช้ในการทดลอง	21
3.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	21
3.4 วิธีการทดลอง	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลองและการอภิปรายผล	**26**
4.1 การสกัดดีเอ็นเอ	26
4.2 ความหลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอหลังจากการทำRAPD-PCR	27
4.3 การวิเคราะห์ผล RAPD-PCR	30
บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ	**34**
เอกสารอ้างอิง	**35**
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	37
ภาคผนวก ข	38
ภาคผนวก ค	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	แสดงลำดับเบสและน้ำหนักโมเลกุลของไพรเมอร์ที่ใช้	10
2.2	แสดงปัญหาที่อาจเกิดขึ้นในขณะทำRAPD-PCR	12
2.3	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของอะกาโรสเจลกับขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิด (สุรินทร์, 2543)	15
2.4	แสดงส่วนประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้	16
4.1	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างไพรเมอร์ และผลที่ได้จากการทำ RAPD-PCR ในเห็ดตีน แรดจังหวัดต่างๆ	31
4.2	แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD – PCR โดยใช้ไพรเมอร์ OPA02 - OPA04 ในการวิเคราะห์ผล โดยให้สัญลักษณ์ + แทนการพบแถบดีเอ็นเอ และสัญลักษณ์ – แทนการไม่พบแถบดีเอ็นเอ	33
ค	ลำดับเบสไพรเมอร์ที่นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเห็ดตีนแรด	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	แสดงการเกิดปฏิกิริยาและรูปแบบที่ได้จากการทำ RAPD-PCR	9
4.1	แสดงแถบ genomic DNA ของเส้นใยเห็ดตีนแรดจังหวัดต่าง ๆ ดังนี้	26
4.2	แสดงแถบดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มปริมาณแบบสุ่มของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ โดยใช้ไพรเมอร์ OPA01	27
4.3	แสดงแถบดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มปริมาณแบบสุ่มของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ โดยใช้ไพรเมอร์OPA02	28
4.4	แสดงแถบดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มปริมาณแบบสุ่มของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ โดยใช้ไพรเมอร์ OPA03	29
4.5	แสดงแถบดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มปริมาณแบบสุ่มของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ โดยใช้ไพรเมอร์ OPA04	30
4.6	แสดงรูปแบบที่ได้จากการทำ RAPD-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ OPA02-OPA04 ในตัวอย่างเห็ดตีนแรดจังจังหวัดต่างๆ	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานวิจัย

เห็ดตีนแรดมีลักษณะดอกขนาดใหญ่สีขาวหรือสีขาวปนเทาเป็นเห็ดรับประทานได้ มีคุณค่าทางโภชนาการสูง คุณค่าทางโภชนาการของเห็ดตีนแรดประกอบไปด้วยโปรตีน 18.58 กรัม ไขมัน 0.287 กรัม คาร์โบไฮเดรต 10.02 กรัม แคลเซียม 2.71 กรัม เหล็ก 3.35 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักเห็ด 100 กรัม (กรมส่งเสริมการเกษตร. 2538) รสชาติดี มีสารช่วยป้องกันโรคมะเร็ง (ศิริวรรณ สุทธิจิตต์และไมตรีสุทธิจิต. 2538) สามารถเก็บได้นาน ในรูปเห็ดสามารถเก็บไว้ในตู้เย็นนาน 1 สัปดาห์โดยไม่เน่าเสีย เนื่องจากมีคุณสมบัติไม่ย่อยสลายตัวเอง (ดีพร้อมไชยวงศ์เกียรติ. 2529) ในรูปของเห็ดแห้งยังคงมีรสชาติและคุณภาพที่เปลี่ยนแปลงไปไม่มากนัก (ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์และกิตติพงษ์ ศิริวานิชกุล. 2538) เห็ดตีนแรดสามารถเจริญเติบโตได้ดีทุกภูมิภาคของประเทศไทย ถ้าเปรียบเทียบรสชาติกับเห็ดที่ขึ้นตามธรรมชาติแล้วจะเป็นรองเฉพาะเห็ดโคน คุณภาพจะใกล้เคียงกับเห็ดเผาะ เห็ดมันปูและเห็ดขาไก่ เมื่อนำมาประกอบอาหารมีกลิ่นหอม รสหวาน เนื้อกรุบกรอบไม่เหนียว ในประเทศไทยมีชื่อเรียกแตกต่างกันออกไปในแต่ละท้องถิ่น โดยภาคเหนือจะเรียกว่า"เห็ดจั่น" ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเรียกว่า"เห็ดตีนแรด" ส่วนภาคกลางเรียกว่า"เห็ดตับเต่าขาว"(ปัญญาและกิตติพงษ์. 2538) และมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Tricholoma crassum* เป็นเห็ดในวงศ์ Tricholomataceae เช่นเดียวกับเห็ดนางรมและเห็ดเป๋าฮื้อ จากคุณสมบัติที่ดีหลายประการเห็ดตีนแรดจึงเป็นเห็ดที่น่าสนใจและนำมาพัฒนาเป็นเห็ดเศรษฐกิจที่สำคัญในอนาคตได้

ในปัจจุบันเห็ดตีนแรดเริ่มเป็นที่ต้องการของตลาด ซึ่งโดยปกติธรรมชาติของเห็ดตีนแรดจะออกดอกในช่วงฤดูฝนเท่านั้น แต่เนื่องจากเทคโนโลยีมีความเจริญก้าวหน้ามากยิ่งขึ้น จึงสามารถนำเชื้อเห็ดมาเพาะเป็นการค้าได้ตลอดทั้งปี มีฟาร์มหลายแห่งที่ทำการเพาะเห็ดชนิดนี้ โดยผลิตก้อนเชื้อและดอกเห็ดจำหน่าย เคยทดลองส่งออกไปฮ่องกงได้รับความนิยมมากและได้รับการเสนอราคาที่สูง (เกษม สร้อยทอง. 2529) จากการรวมกลุ่มกันของเกษตรกรจังหวัดสุพรรณบุรีในต้นปี 2002 เพื่อหารายได้เสริมโดยเฉพาะเห็ดตีนแรดร่วมกับการปลูกผักกินใบเพื่อลดต้นทุนการผลิตและไม่ต้องใช้สารเคมี (ชาญยุทธ์ ภานุทัต และคณะ. 2543) ทำให้เห็ดตีนแรดเป็นที่รู้จักกันมากขึ้นซึ่งราคาเห็ดประมาณ 50 บาทต่อกิโลกรัม แต่เนื่องจากขนาดของเห็ดมีขนาดใหญ่มาก ทำให้ผู้บริโภคที่ไม่รู้จักเห็ดชนิดนี้มาก่อนไม่กล้ารับประทาน ประกอบกับมีข้อมูลในเรื่องการผลิตและการปรับปรุงพันธุ์ไม่มากพอ รวมถึงขาดการประชาสัมพันธ์ที่ดี จึงทำให้ตลาดผู้บริโภครู้จักเห็ดชนิดนี้ไม่เท่ากับเห็ดฟาง เห็ดนางฟ้า เห็ดหอม เห็ดขอนขาว เห็ดหลินจือ และเห็ดชนิดอื่นๆในตลาดภายในประเทศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการปรับปรุงสายพันธุ์เห็ด ลักษณะที่ดีของสายพันธุ์ที่ต้องการจะมี 4 ประการหลัก ได้แก่ ผลผลิตดอกที่สูงเมื่อใช้วัสดุเพาะที่เหมือนกันและเท่ากัน การเจริญของเส้นใยเติบโตได้เร็วและ

ปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปในขณะที่เพาะอยู่ การออกดอกเร็วและพร้อมกันเพื่อลดค่าใช้จ่ายในการดูแลและให้ผลตอบแทนที่ดีขึ้น ประการสุดท้ายคือ สัณฐานวิทยา โดยเห็ดมีรูปร่าง ขนาด สี และรสชาติที่ตรงกับความนิยมของผู้บริโภค ลักษณะเหล่านี้จะเป็นลักษณะเฉพาะที่แตกต่างไปตามชนิดของเห็ด

ในประเทศไทย การจัดจำแนกเห็ดส่วนใหญ่นั้นยังไม่เป็นมาตรฐานเดียวกันเพราะยังเป็นการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาจึงมีความแตกต่างกันออกไป ทำให้ไม่ชัดเจน เพราะเหตุนี้ จึงได้มีการนำเอาเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์มาศึกษาความหลากหลายของลักษณะทางพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอ เพื่อใช้ในการจัดจำแนกร่วมกับการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา เทคนิคที่นำมาใช้และนิยมได้แก่ AFLP(Amplified fragment Length Polymorphism), RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA) เทคนิคอื่นๆ ได้แก่ isoenzyme electrophoresis, RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism) (มาลินีละคณะ.2546)

ในงานวิจัยนี้ได้นำเทคนิคของ APD-PCR ซึ่งเป็นเทคนิควิเคราะห์ความหลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวในการทำPCR ไพรเมอร์ที่ใช้คือ OPA01-OPA04 (Maki และคณะ. 2001) ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ใช้ในการขยายบริเวณดีเอ็นเอแบบสุ่ม และเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่ยังไม่เคยใช้ในการศึกษาเห็ดตีนแรดมาก่อน ซึ่งคาดว่าน่าจะมีความจำเพาะในการขยายยีนในบริเวณที่เราต้องการมากกว่าเนื่องจากมีการใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวในการขยายยีนบริเวณนั้น ดังนั้นการใช้เทคนิคนี้จึงสามารถนำมาช่วยในการศึกษาความหลากหลายของดีเอ็นเอ ร่วมกับเทคนิคอื่นๆได้

1.2 วัตถุประสงค์

ศึกษาความหลากหลายของดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคRAPD-PCR โดยใช้ไพรเมอ ร์OPA01-OPA04

1.3 ขอบเขตของโครงงานวิจัย

ศึกษาลักษณะความผันแปรของลักษณะทางพันธุกรรมในเห็ดตีนแรดที่เก็บรวบรวมจากจังหวัดต่างๆ ด้วยเทคนิค RAPD-PCR บนตัวกลางเจลอะกาโรส

1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน

1.4.1 **การเลี้ยงเส้นใยบนอาหาร** เพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดตีนแรดในอาหาร PDA 7 วัน ที่ 30 องศาเซลเซียส และถ่ายเส้นใยมาเลี้ยงในอาหารเหลว PDYB ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4.2 **การสกัดดีเอ็นเอ**

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยวิธีของ Cenis ในปี 1992 เก็บสารละลายที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้งาน ตรวจสอบคุณภาพและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร จากนั้นนำมาตรวจสอบบนตัวกลางอะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 7 ด้วยเจลสตาร์เพื่อเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอกับ marker ขนาด 100 เบส(ดัดแปลงจากCenis, 1992)

1.4.3 **ขั้นตอน** RAPD-PCR reaction (Maki, 2001) นำดีเอ็นเอ ตัวอย่างมาทำปฏิกิริยาใน PCR mixture ทำปฏิกิริยาในเครื่องเขย่าเพิ่มขยายปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ 4 ชนิด คือ OPA01, OPA02, OPA03และOPA04 การเพิ่มขยายยีนด้วยเทคนิค PCR 35 รอบ ทุกการทดลองจะต้องมีตัวควบคุมที่ไม่ใส่ดีเอ็นเอตัวอย่างทุกครั้งเสมอ (Negative control) นำผลจากการทำ RAPD-PCR ตรวจสอบบนตัวกลางอะกาโรสความเข้มข้นร้อยละ1.2 ด้วยเจลสตาร์ พิจารณ์แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏใต้แสงอัลตราไวโอเลตและบันทึกภาพ

1.4.4 **การวิเคราะห์ผล** นำข้อมูลของ RAPD-PCR ทั้งหมดแปลงเป็นข้อมูล 0 และ 1 (0 แทนไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอและ 1 แทนปรากฏแถบดีเอ็นเอ)

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถนำเทคนิค RAPD-PCR มาใช้ประโยชน์ในการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของเห็ดตีนที่มีลักษณะพันธุกรรมใกล้เคียงกัน

2. ความหลากหลายของลักษณะทางพันธุกรรมในเห็ดตีนแรดที่ได้จากเทคนิค RAPD-PCR ในการจัดจำแนกกลุ่มเห็ดตีนแรดที่เก็บรวบรวมจากหลายๆแห่ง เพื่อประโยชน์ในการคัดเลือกและผสมพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 ลักษณะทางชีววิทยาของเห็ดตีนแรด

การจัดจำแนกเห็ดตีนแรด (Taxonomy)

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Tricholoma crassum* (Berk)Sacc.

ชื่อสามัญ : เห็ดตันแรดขาว เห็ดจั่น เห็ดตับเต่าขาว

Class : Basidiomycetes

Subclass : Holobasidiomycetidae

Order : Agaricales

Family : Teicholomataceae

Genus : *Tricholoma*

Species : *crassum*

2.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เห็ดในสกุล *Tricholoma* อยู่ในเขตอบอุ่นเป็นส่วนใหญ่ มีเพียง 2-3 ชนิดเท่านั้นที่อยู่ในเขตร้อนและมีหลายชนิดที่นำมารับประทานได้ เช่น เขตยุโรปได้แก่ *T. albobrunneum* และ *T. Flavovirens* อเมริกาใต้ ได้แก่ *T. Mutsukake* (วสันต์ เพชรรัตน์. 2522) ญี่ปุ่นและฮ่องกง ได้แก่ *T. mutsukake* และ *T. mongolicum* ส่วนในประเทศไทย ได้แก่ *T. cussum* (ปัญญา โพธิ์รัตน์ และ กิตติพงษ์ ศิริวานิชกูล. 2538) เห็ดตีนแรดเป็นเห็ดที่มีขนาดใหญ่ เจริญได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทยและในแต่ละภาคก็มีชื่อเรียกแตกต่างกันออกไป เช่น ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเรียกว่าเห็ดตีนแรด ภาคกลางเรียกเห็ดตับเต่าขาวหรือเห็ดยักษ์ ภาคเหนือเรียกว่าเห็ดจั่น ภาคใต้เรียกเห็ดหัวสุม (ชาญยุทธ์ ภานุทัตและคณะ. 2543) นอกจากนั้นยังพบว่ามีการเจริญเติบโตทางธรรมชาติสามารถนำมาเพาะเลี้ยงได้แต่มีขั้นตอนยุ่งยากกว่าเห็ดทั่วไป

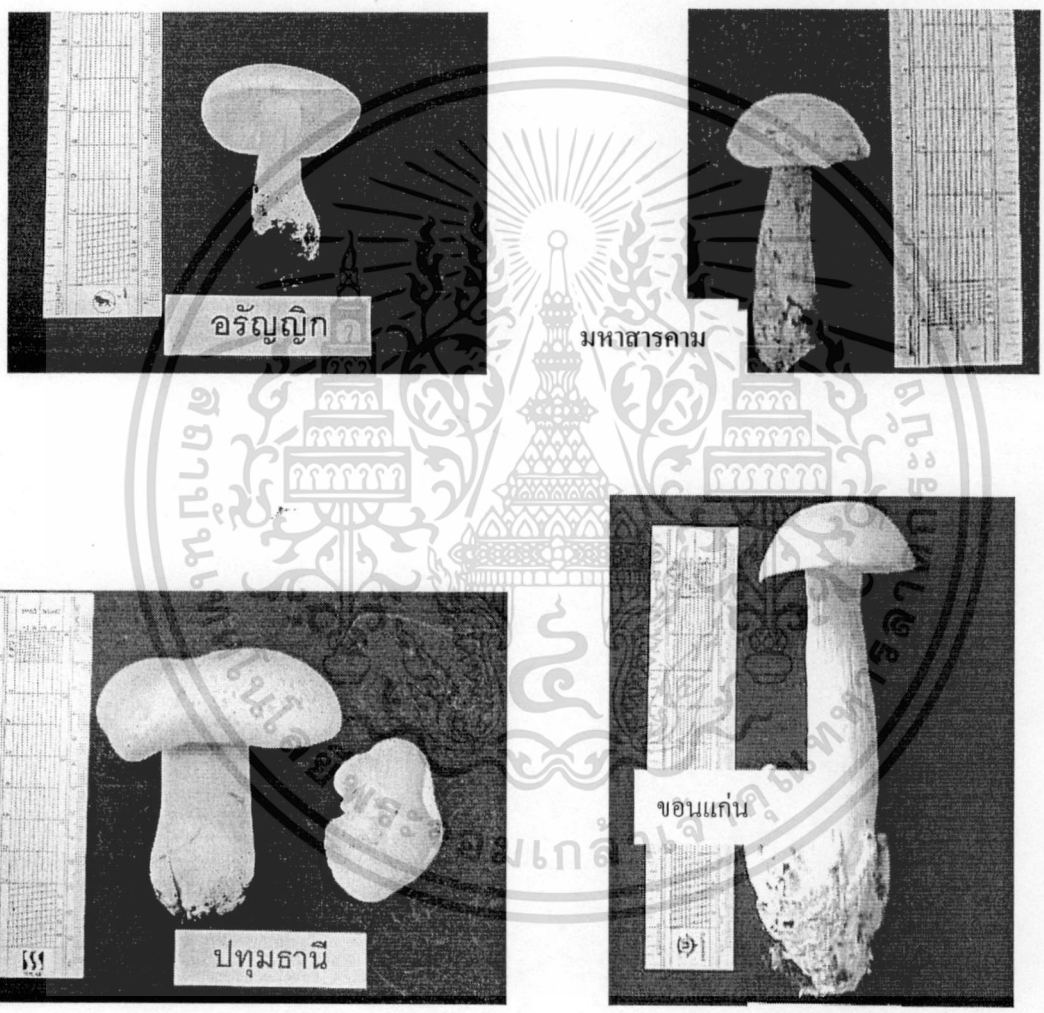
หมวกดอก (Cap) เมื่อเป็นดอกอ่อนขอบม้วนลงเป็นรูปทรงกลมจากนั้นค่อยเจริญแผ่ขยายออก เมื่อเจริญเต็มที่จะมีขนาดตั้งแต่ 3.1-12.5 เซนติเมตร ผิวหมวกด้านบนเรียบ มีสีขาวหรือสีนวล เมื่อแก่อาจเปลี่ยนเป็นสีครีมอ่อน

ครีบดอก (gills) ขึ้นอยู่กับขนาดของหมวกดอก จำนวนครีบถ้านับจากขอบดอกประมาณ 20-25 ครีบต่อความยาวของดอก 1 เซนติเมตร ครีบดอกจะเรียงกันเป็นรัศมีรอบก้านดอก ครีบดอกจะเปราะและขาดง่าย ครีบดอกจะเป็นอิสระจากก้านดอก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก้านดอก (stalk) มีสีขาว ปลายด้านบนอยู่กึ่งกลางของหมวกดอก ตรงหรือโค้งเล็กน้อย มีความยาวตั้งแต่ 7-27 เซนติเมตร ที่โคนก้านจะใหญ่กว่าส่วนที่อยู่ติดกับหมวกดอกเล็กน้อย เมื่อดอกแก่ขึ้น ที่โคนก้านดอกจะเปลี่ยนเป็นสีเนื้อหรือสีชมพูอ่อน เนื้อเยื่อที่โคนก้านดอกจะมีลักษณะสานกันโปร่งๆ ส่วนเนื้อเยื่อตรงกลางของก้านดอกจะมีลักษณะเป็นเส้นและมีรูเล็กๆคล้ายเห็ดฟาง

สปอร์(spore) เมื่อเห็ดตีนแรดเจริญเต็มที่จะสร้างสปอร์ที่บริเวณครีบดอก สปอร์มีสีขาว มีลักษณะเป็นรูปไข่ ขนาด 5-5.6 x 6.5-7.6 ไมโครเมตร (ปัญญา โพธิ์สุติรัตน์.2538)



2.1.3 **ลักษณะการเจริญเติบโต** เห็ดตีนแรดจัดเป็นเห็ดที่เจริญได้ดีบนพื้นดินที่มีอินทรียวัตถุหรือทิ้งส่วนรากเอาไว้ในดินเมื่อตอไม้เริ่มผุ เห็ดตีนแรดก็เจริญตามรากไม้หรือพื้นดินที่มีอินทรีย์วัตถุหลังจากนั้นเมื่อความชื้นและสภาวะเหมาะสมเห็ดตีนแรดจะเจริญและสร้างดอกเห็ดโผล่ขึ้นมาพ้นพื้นดินเป็นกลุ่มๆ สำหรับการเจริญของเส้นใย จากการศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดตีนแรดในสภาพแวดล้อมต่างๆ โดยนุสรา เพิงใหญ่ (2547) สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยและดอกเห็ดตีนแรดคือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3.1 **อุณหภูมิ** (Temperature) เส้นใยเห็ดตีนแรดจะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส รองลงมาเป็นอุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ส่วนที่ระดับ 20 และ 40 องศาเซลเซียส เส้นใยเจริญได้น้อยมาก

2.1.3.2 **ชนิดของอาหารวุ้น** เมื่อทดลองเลี้ยงในอาหารวุ้นสูตรต่างๆ พบว่าเส้นใยเจริญได้ดีและหนาแน่นมากในอาหาร PDA

2.1.3.3 **พีเอช** (pH) เส้นใยของเห็ดตีนแรดสามารถเจริญในช่วงพีเอช 4-8 แต่ พีเอชที่เส้นใยเจริญได้เร็วที่สุดคือ พีเอช 6 รองลงมาเป็น พีเอช 5 และพีเอช 7

2.1.3.4 **จุลินทรีย์ชนิดอื่น** พบว่าเชื้อยีสต์หลายชนิดมีอิทธิพลต่อการงอกของสปอร์ของเห็ดตีนแรดบนอาหารวุ้น ซึ่งสปอร์ของเห็ดตีนแรดไม่สามารถงอกได้ถ้าหากไม่มีโคโลนีของยีสต์เจริญร่วมอยู่ด้วย มียีสต์หลายชนิดที่กระตุ้นให้สปอร์ของเห็ดตีนแรดงอก ได้แก่ *Endomycopsis sp.* , *Hasenula sp.* , *Kluveromycopsis sp.* และ *Saccharomysis cerevisiae* โดยเชื้อ *S. cerevisiae* จะกระตุ้นการงอกของสปอร์ได้ดีที่สุด โดยงอกได้ประมาณร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส(ชาญยุทธ์ ภานุทัต และคณะ. 2543)

จากการศึกษาการผลิตก้อนเชื้อเห็ดตีนแรดของกรมวิชาการเกษตร (2543) พบว่าอุณหภูมิความชื้นสัมพัทธ์และแสงที่เหมาะสมมีผลอย่างมากต่อการเจริญของเส้นใยและระยะการเกิดดอกซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดดอกเป็น 28-32 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 75-90 เปอร์เซ็นต์ และแสงที่มีความเข้มข้นสูง ใช้เวลาในการบ่มเชื้อประมาณ 50-60 วัน ก่อนนำก้อนเชื้อมาเพาะให้เกิดดอก ปล่อยให้พักตัวประมาณ 7-10 วัน จะทำให้ก้อนเห็ดเจริญได้ดี

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

ในการสกัดดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด เช่นในรา แบคทีเรีย ยีตส์ เป็นต้น จะมีวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับความเหมาะสมกับตัวอย่างที่ต้องการศึกษา เช่นตัวอย่างที่มีผนังเซลล์หนาจะต้องมีการทำให้ผนังเซลล์แตกโดยวิธีการต่างๆดังนี้

1. วิธีนำเซลล์ตัวอย่างหมุนเหวี่ยงโดยใส่ glass bead ลงในบัฟเฟอร์
2. วิธีบดเซลล์ด้วยไนโตรเจนเหลวโดยใช้โกร่ง
3. วิธีบดเซลล์ด้วย microscrope slide (Weir and Blackwell. 2001)
4. วิธีย่อยผนังเซลล์ด้วยเอนไซม์ zymolase และ glusalase โดยปกติเอนไซม์ zymolase จะย่อยผนังเซลล์ได้ดีกว่า glusalase
5. วิธีการ sonication นิยมนำมาใช้เพราะจะทำให้สายดีเอ็นเอฉีกขาดได้

นอกจากนี้ถ้าตัวอย่างมีดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะใช้วิธี autolysis ใน saline EDTA, 2-mercaptoethanol และ sodium laurly sulfate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภายหลังจากที่เซลล์แตกสามารถแยกดีเอ็นเอและทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยวิธีการต่างๆดังนี้

1. นำเซลล์มาแขวนลอยในสารละลายที่มีส่วนผสมของ Sodium perchlolate และ sarcosate ความเข้มข้นร้อยละ 1 จากนั้นสกัดด้วย chloroform-isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 24 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ภายหลังจาการบ่มด้วยอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมจะทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง เติมเอทานอลที่เย็นจัดแล้วปั่นเหวี่ยงซ้ำจะได้ตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นกำจัดโปรตีนและอาร์เอ็นเอด้วยเอนไซม์ pronase และ Rnase

2. เติม CTAB extraction buffer บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปล่อยให้เย็นแล้วเติม $CHCl_3$: IAA ในอัตราส่วน 24 : 1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตรเท่ากันนำไปปั่นเหวี่ยงแล้วนำส่วนของเหลวมาเติม isopropanol จะได้ตะกอนดีเอ็นเอนำมาล้างด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 ที่เย็นจัด ปล่อยให้แห้งแล้วเติม TE buffer (Saghai และคณะ. 1984)

3. เติม sodium acetate ความเข้มข้น 3 โมลาร์ นำไปปั่นเหวี่ยง แยกส่วนใสเติม isopropanol ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งจะได้ตะกอนดีเอ็นเอ นำมาล้างด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 ซึ่งเย็นจัด ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer (Cenis. 1992)

ภายหลังจากที่กล่าวมา อาจจะทำการตรวจความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอโดยการหาอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร ถ้าได้ค่าระหว่าง 1.65 ถึง 1.85 แสดงว่าได้ดีเอ็นเอสายคู่ที่บริสุทธิ์ ถ้าค่าน้อยกว่า 1.65 แสดงว่ามีโปรตีนปนเปื้อนหรือฟีนอลที่ใช้ในการสกัดปนอยู่ สำหรับดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์ควรจะมีอาร์เอ็นเอปนเปื้อนมีค่าประมาณ 2

2.3 เทคนิคRAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase chain reaction)

2.3.1 หลักการและเทคนิค RAPD-PCR (สุรินทร์. 2543)

เทคนิค RAPD-PCR เป็นเทคนิคที่เพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอที่ไม่ทราบลำดับเบสที่บริเวณใดๆ โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) เพียงชนิดเดียว ขนาดสั้นๆประมาณ 8-10 นิวคลีโอไทด์ (Oligonucleotide primer) ไพรเมอร์นี้จะจับกับดีเอ็นเอบริเวณต่างๆกันแบบสุ่ม ถ้าไพรเมอร์จับดีเอ็นเอบริเวณใกล้ๆกันในทิศทางเข้าหากันแล้วเกิดปฏิกิริยาในการทำ PCR ก็จะได้ผลผลิตออกมา แต่ถ้าไพรเมอร์จับกันในลักษณะที่อยู่ห่างไกลกัน หรือ ในทิศทางออกจากกันก็จะไม่ได้ผลผลิตออกมา การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายช่วงสั้นๆแบบปฏิกิริยาลูกโซ่โดยอาศัยเอนไซม์ DNA Polymerase ที่ทนความร้อนทำให้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นจำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานต่างๆเช่น การวินิจฉัยโรคหรือการศึกษาความรู้พื้นฐานต่างๆ

ปัจจัยสำคัญในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ มีดังนี้

1. Template เป็นดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการเพิ่มปริมาณช่วงดีเอ็นเอที่พร้อมจะทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะต้องแยกจากดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. Primer เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ซึ่งมีเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณทั้งด้านปลาย 5' และ 3' ทำหน้าที่เป็นแม่แบบของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่

3. เอมไซม์ DNA โพลิเมอเรส เป็นเอนไซม์ทนความร้อนสูงใช้เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยา ปัจจุบันนิยมใช้ *Taq* DNA polymerase สามารถทนความร้อนในช่วงที่แยกดีเอ็นเอจากสายคู่เป็นสายเดี่ยว โดยที่ไม่ต้องเติมเอนไซม์ทุกรอบทำให้เกิดความสะดวก และประหยัดเวลา

4. ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไทรฟอสเฟต ซึ่งมีอยู่ 4 ชนิด คือ dATP, dCTP, dGTP, dTTP ทำหน้าที่เป็นวัตถุดิบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอชนิดต่างๆ

5. ปัจจัยอื่นๆ ได้แก่ น้ำ เกลือชนิดต่างๆ และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

ขั้นตอนการทำ PCR ในแต่ละรอบของปฏิกิริยาประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้

1. Denaturation เป็นการแยกดีเอ็นเอสายคู่เป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเอสายเดี่ยวทั้งสองสายที่แยกได้จะถูกใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อไป

2. Primer annealing ขั้นตอนนี้จะเป็นการลดอุณหภูมิลงมาที่ช่วง 40-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไพรเมอร์เข้าจับคู่อย่างจำเพาะที่ด้านปลาย 3' ของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณทั้งสองสาย

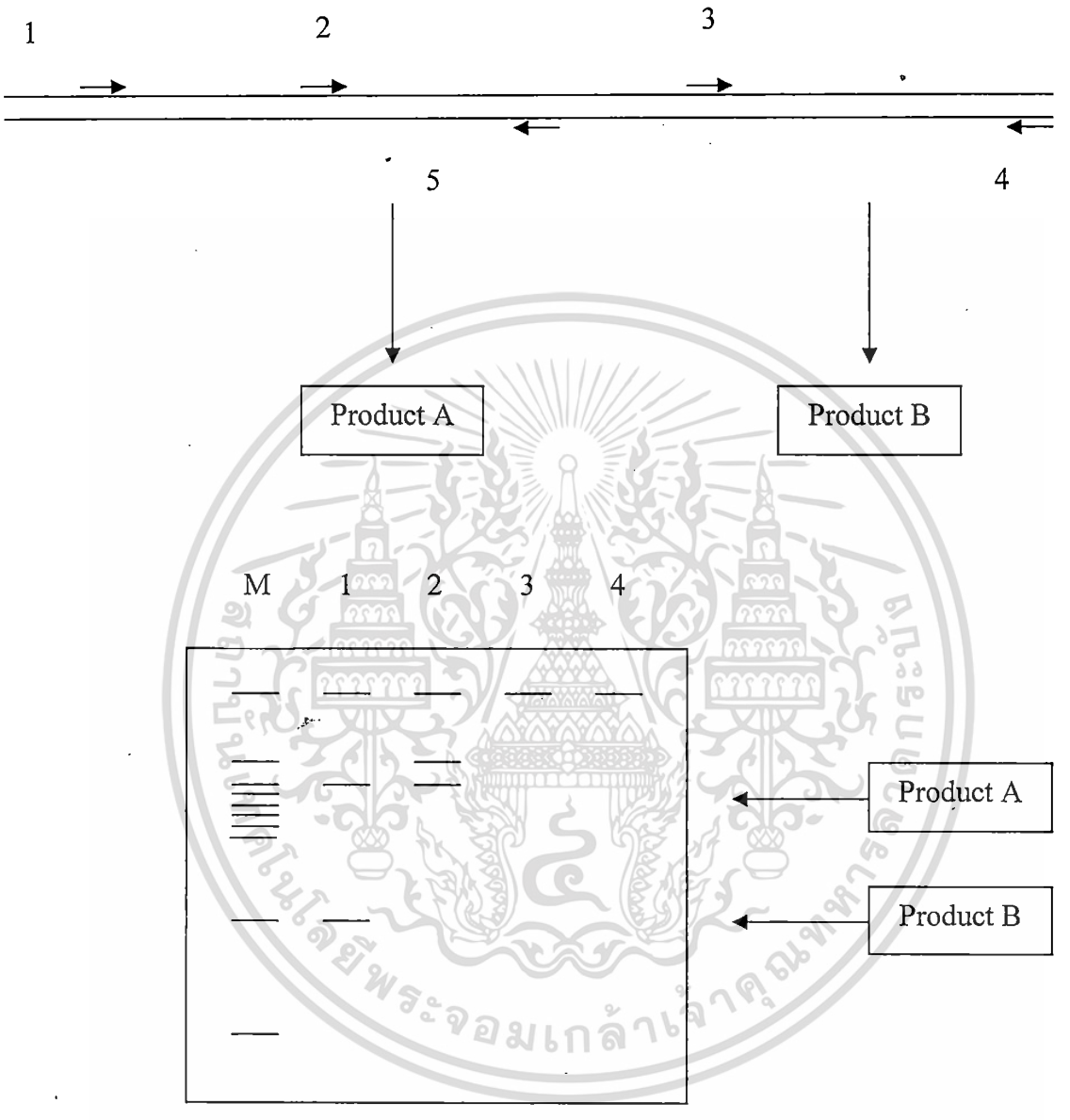
3. Primer extension ขั้นตอนนี้จะสังเคราะห์สายดีเอ็นเอใหม่ให้ยาวขึ้น โดยมีการเชื่อมต่อของ dNTP ที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่มีทิศทางจาก 5' ไป 3' สายดีเอ็นเอใหม่ที่สังเคราะห์ต่อจากไพรเมอร์จะมีลำดับเบสที่จับคู่จำเพาะกับดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยามักอยู่ในช่วง 70-75 องศาเซลเซียส

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นทั้ง 3 ขั้นตอน นับเป็น 1 รอบ ดีเอ็นเอสายใหม่ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณนับเป็นผลผลิตของปฏิกิริยา PCR (PCR product) ซึ่งผลที่ได้มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากเดิมสองสายเป็นสี่สาย ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมากรอบขึ้น อัตราการเพิ่มปริมาณจะเป็นทวีคูณ คือ 2^n โดยที่ n เท่ากับจำนวนรอบของการสังเคราะห์

การใช้เทคนิค PCR มีทั้งข้อดีและข้อจำกัด ข้อดีที่นิยมใช้เนื่องจากดีเอ็นเอเป้าหมายที่นำมาศึกษาไม่ต้องใช้ปริมาณมาก การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสามารถทำได้จำนวนมากในเวลาที่จำกัด ปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มนี้มีขนาดเบสได้ตั้งแต่ 50 คู่เบส - 2000 คู่เบส สำหรับข้อจำกัดที่ใช้เทคนิค PCR นั้นได้แก่ การพิจารณาหาไพร์เมอร์ที่เหมาะสมและทราบลำดับเบสของยีนที่ต้องการศึกษาด้วย การปนเปื้อนในระหว่างขั้นตอนเตรียมดีเอ็นเอจากการถ่ายหลอด จากการดูดสารละลายโดยการปิเปต จะมีผลต่อการใช้เทคนิค PCR ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลผลิตที่ได้มาเมื่อแยกขนาดโดยอิเล็กโตรโฟลิซิส และย้อมด้วยเอทีเดียมโปรไมด์จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ ที่เหมือนและแตกต่างกัน ข้อมูลเหล่านี้จะนำมาวิเคราะห์เพื่อดูความสัมพันธ์ที่จะนำมาใช้ในการจัดจำแนกกลุ่มเห็ดต่อไป



รูปที่ 2.1 แสดงการเกิดปฏิกิริยาและรูปแบบที่ได้จากการทำ RAPD-PCR

2.3.2 **ข้อดีของเทคนิค** RAPD-PCR (Maki. 2001)

1. ปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้น้อย(ปริมาณ 5-50 นาโนกรัม)
2. ไพรเมอร์ที่ใช้มีลำดับเบสไม่ยาวมากนัก
3. การดำเนินงานสามารถทำได้รวดเร็ว และง่ายต่อการวิเคราะห์ผล
4. ค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานไม่สูงมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การเข้าจับแบบสุ่มของไพรเมอร์นั้น ทำให้ไพรเมอร์สามารถจับได้ทั้งสายดีเอ็นเอ

6. ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้มีความหลากหลาย

2.3.3 **ข้อเสียของเทคนิค** RAPD-PCR

1. ดีเอ็นเอที่ใช้ต้องมีความบริสุทธิ์สูง และมีขนาดของน้ำหนักโมเลกุลสูง

2. ในการทำแต่ละครั้งต้องระวังการปนเปื้อนของดีเอ็นเออื่น

3. สภาวะที่ใช้มีความผันแปรได้ง่าย

4. ไม่สามารถบอกตำแหน่งของอัลลีลได้

2.3.4 **ไพรเมอร์**(Primer)

การเลือกใช้ไพรเมอร์มีความสำคัญในเทคนิค RAPD-PCR เนื่องจากใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่เราจะนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างของสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตที่เราต้องการจะเปรียบเทียบ ซึ่งอาจมีการออกแบบไพรเมอร์ เพื่อหาลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับยีนที่เราสนใจ การออกแบบไพรเมอร์ อาจใช้คอมพิวเตอร์ช่วยจากเว็บไซด์ของ National Center for Biotechnology information ซึ่งสามารถพบข้อมูลของเรียงลำดับของกรดอะมิโน และนำลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่ได้มาจัดเรียง (alignment) ให้เหมาะสมโดยใช้เว็บไซด์ของ toulouse (http:www.toulouse.inra.fr/multalin.html) จะได้ไพรเมอร์ทั้งด้านปลาย 3' และปลาย 5' โดยมีลำดับเบสขนาดความยาวพอเหมาะสำหรับการทำ PCR ไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในการทดลองนี้คือ OPA01-04 ซึ่งไพรเมอร์ชนิดนี้ได้มีผู้ทดลองนำมาใช้กับเห็ดชนิดอื่นๆ เช่น *Lentinula edodes*, *Agaricus bisprous*

ตารางที่ 2.1 แสดงลำดับเบสและน้ำหนักโมเลกุลของไพรเมอร์ที่ใช้

ไพรเมอร์	ลำดับเบส (5'-3')	น้ำหนักโมเลกุล
OPA01	CAGGCCCTTC	2955
OPA02	TGCCGAGCTG	3035
OPA03	AGTCAGCCAC	2988
OPA04	AATCGGGCTG	3059

(ที่มา : Maki. 2001)

2.3.5 **ปัญหาที่อาจเกิดขึ้นในขณะทำ**RAPD-PCR มีดังนี้

1. ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่หลากหลายเกินไปนั้นสามารถเปลี่ยนแปลงจำนวนของแถบดีเอ็นเอที่จะเกิดขึ้นได้ ควรใช้ความเข้มข้นดีเอ็นเอประมาณ 20-50 นาโนกรัมต่อหนึ่งปฏิกิริยา ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะคงที่และน่าเชื่อถือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. บริษัทที่จัดจำหน่ายเอ็นไซม์ *Taq* polymerase จะเป็นผู้จัดชุด ของบัฟเฟอร์ ในชุดนี้อาจจะมี Mg^{2+} ผสมอยู่กับบัฟเฟอร์หรือไม่ก็ได้ (แยกหลอดออกมาต่างหาก) ซึ่ง Mg^{2+} นี้สำคัญในการเกิดปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ *Taq* polymerase

3. Taq polymerase มาจากหลายแหล่งที่แตกต่างกันและการเกิดปฏิกิริยาย่อมแตกต่างกันออกไปด้วยการคำนวณปริมาณสาร จึงต้องกำหนดความเข้มข้นให้ถูกต้อง

4. ในการกำหนดรอบของการเกิดปฏิกิริยา อุณหภูมิและเวลานั้นสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามความเหมาะสมขึ้นอยู่กับความสามารถของเครื่องและความหนาของหลอดที่ใช้ทำปฏิกิริยา

การวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค RAPD-PCR แล้วผลที่เกิดขึ้นไม่ถูกต้องนั้นน่าจะเกิดขึ้นจาก DNA Template, primers, Taq polymeraseหรือสภาวะที่ใช้ จึงควรทำซ้ำในสภาวะเดิมเพื่อให้แน่ใจว่าใส่สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาครบ และควรทำตัวควบคุมทั้ง Positive control และ Negative control การทำ Positive control นั้นเพื่อใช้เป็นตัวบ่งบอกว่าสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาทุกตัวใส่ครบและสามารถทำงานได้ โดยจะแสดงแถบที่ถูกต้องออกมา Negative control จะใส่สารในการทำปฏิกิริยาทุกอย่างเช่นเดียวกับหลอดอื่นๆแต่จะไม่ใส่ดีเอ็นเอที่เป็นตัวควบคุมเช่น อาจเป็น DNA Template หรือ primers ก็ได้ขึ้นอยู่กับผู้ทดลอง ใช้ในการบ่งบอกว่าถ้าไม่แสดงแถบใดๆ คือ สารที่เราใช้ในการทำปฏิกิริยาไม่มีการปนเปื้อนจากดีเอ็นเออื่นๆภายนอก สาเหตุของปัญหาที่มักจะเกิดขึ้น และทางแก้ไขจะแสดงผลสรุปดังตารางที่ 2.2

2.4 หลักการของอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส

อิเล็กโทรโฟรีซีสเป็นวิธีการที่ใช้แยกโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิก ซึ่งอยู่ในสนามไฟฟ้าออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของสารนั้นๆ ในสนามไฟฟ้า ซึ่งเป็นผลจากความแตกต่างของชนิดและปริมาณของประจุ ขนาด และรูปร่างของโมเลกุลของสารที่ต้องการจะแยกนั้น การแยกชีวโมเลกุลในสนามไฟฟ้าโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสมักจะทำในตัวกลาง (medium) โดยการใส่สารที่ต้องการแยกลงในตัวกลาง แล้งจึงปล่อยกระแสไฟฟ้าให้ผ่านตัวกลางนั้น ดังนั้นจึงมีอิเล็กโทรโฟรีซีสหลายชนิด ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของตัวกลาง เช่น โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (polyacrylamide gel electrophoresis) เมื่อใช้ตัวกลางเป็นโพลีอะคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) สตาร์เจลเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส (starch gel electrophoresis) เมื่อใช้ตัวกลางเป็นสตาร์เจล (starch gel) เป็นต้น ส่วนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสก็คืออิเล็กโทรโฟรีซีสที่ทำในตัวกลางที่เป็นอะกาโรสเจลนั่นเอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 แสดงปัญหาที่อาจเกิดขึ้นในขณะทำRAPD-PCR

ปัญหา	สาเหตุ	วิธีแก้ไข
ไม่มีผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น	ขาดสารเคมีบางชนิด(อาจใส่ไม่ครบ)	จดบันทึกขณะทำการทดลองว่าใส่สารครบหรือไม่ ควรทำสารผสม(mastermix) เพื่อลดขั้นตอนการดูด
	วัตถุดิบ, primer ที่ใช้เสื่อมคุณภาพลง	ใช้วัตถุดิบใหม่ ใช้ไพรเมอร์ตัวอื่น หรือเพิ่มความเข้มข้นของไพรเมอร์
	คุณภาพของ template หรือ template อาจน้อยเกินไป โดยเจือจาง หรือมีสิ่งเจือปน(เช่น Rnase โปรตีน) เนื่องจากเก็บไว้ในน้ำยาที่เจือจาง	ทำการตรวจสอบดีเอ็นเอก่อนนำมาใช้ในการทำปฏิกิริยาโดยใช้อิเล็กโทรโฟลิซิส และเตรียมดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้นมากขึ้นหรือทำการสกัดดีเอ็นเอใหม่
	จำนวนรอบในการเกิดปฏิกิริยาไม่มากพอ	เพิ่มจำนวนรอบในการทำปฏิกิริยา
	เครื่องที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา (Thermal cycler)ทำงานผิดพลาด	ใช้ตัววัดอุณหภูมิ (Thermocoupler) วัดอุณหภูมิของหลอดทดลอง
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ไม่ดี แถบไม่ชัด	ความเข้มข้นของส่วนประกอบพวกบัฟเฟอร์ ไพรเมอร์ Taq polymerase ดีเอ็นเอ	ปรับเปลี่ยนสภาวะการทำปฏิกิริยา ตรวจการทำงานของเอนไซม์ หรือเปลี่ยนไพรเมอร์ใหม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 (ต่อ) แสดงปัญหาที่อาจเกิดขึ้นในขณะทำRAPD-PCR

ปัญหา	สาเหตุ	วิธีแก้ไข
ใช้อิเล็กโทรโฟลิซิสแยกผลิตภัณฑ์ได้ไม่ถูกต้อง	ความเข้มข้นของอะการ์โรสเจลไม่ถูกต้อง	ใช้อะการ์โรสเข้มข้นสูงแยกผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดเล็ก เช่นใช้ความเข้มข้นร้อยละ 2
ผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่บริสุทธิ์	ใช้เวลาในช่วง extension นานเกินไป จำนวนรอบมากเกินไป อุณหภูมิน้อยเกินไป (จะไม่จำเพาะกับดีเอ็นเอ) ใช้ดีเอ็นเอมากเกินไป	ลดจำนวนรอบลง ลดเวลาลงทีละ 1 นาที ลดความเข้มข้นของดีเอ็นเอ และตรวจดูว่าอุณหภูมิที่ใช้เหมาะสมหรือไม่ อาจเพิ่มทีละ 1 องศาเซลเซียส
แถบที่แสดงนั้นอยู่ชิดกันมาก	ผลิตภัณฑ์ที่ได้อาจเป็นไพรเมอร์ ที่ใช้ทำปฏิกิริยา	เปลี่ยนไพรเมอร์
แถบที่แสดงนั้นไม่สามารถนำไปใช้ได้	มีดีเอ็นเอน้อยหรือมากเกินไป	ใช้ดีเอ็นเอเข้มข้นประมาณ20-50 นาโนกรัม ถ้าดีเอ็นเอน้อยเกินไปทำให้ไพรเมอร์ค้นหาบริเวณที่ถูกต้องไม่ได้(หาไม่เจอ) ดีเอ็นเอมากเกินไปเพิ่มจำนวนผิดบริเวณ

ที่มา: Miehelmore .1991

ในการแยกดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส จะทำในบัฟเฟอร์ซึ่งมีพีเอชประมาณ 8 ซึ่งที่พีเอชนี้ดีเอ็นเอจะมีประจุลบ เนื่องจากการแตกตัวของหมู่ฟอสเฟต อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้าจะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ดังต่อไปนี้

2.4.1 **ขนาดและโครงรูป** (conformation) **ของดีเอ็นเอ** เมื่อพิจารณาจากลักษณะโครงสร้างทางเคมีของดีเอ็นเอ จะเห็นได้ชัดเจนว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ ถึงแม้จะมีจำนวนประจุลบสูงเมื่อเทียบกับดีเอ็นเอขนาดเล็ก (จำนวนหมู่ฟอสเฟตมากกว่า) แต่อัตราส่วนของประจุลบต่อมวล (mass) ของดีเอ็นเอไม่ว่าโมเลกุลใหญ่หรือเล็กจะเท่ากัน ดังนั้นอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้าจึงเป็นผลจากขนาดของดีเอ็นเอโดยตรง ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก แต่ทั้งนี้หมายถึงการเปรียบเทียบในขณะที่ดีเอ็นเอนั้นอยู่ในโครงรูปแบบเดียวกัน ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากันแต่โครงรูปต่างกัน จะมีผลทำให้การเคลื่อนที่ต่างกันไปด้วย ตัวอย่างที่เห็นได้ชัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้แก่ โครงสร้างของพลาสมิดชนิดหนึ่งๆอยู่ในรูปที่เรียกว่าซุปเปอร์คอยล์ (supercoil form) จะเคลื่อนที่ในตัวกลางได้เร็วกว่าเมื่ออยู่ในรูปปลายเปิด (linear form) และในรูปรีแลกซ์ (relaxed form) ตามลำดับ

2.4.2 **ความเข้มข้นของอะกาโรส** (Agarose concentration) ขณะอิเล็กโทรโฟรีซิสดีเอ็นเอจะต้องเคลื่อนที่ผ่านรูพรุน (pore) ภายในเจล ถ้ารูพรุนมีขนาดใหญ่อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอก็จะสูง ขนาดของรูพรุน (pore size) ภายในเจลจะเปลี่ยนแปลงไปตามความเข้มข้นของอะกาโรสที่ใช้เตรียมเจล กล่าวคือ เมื่อใช้อะกาโรสความเข้มข้นสูงๆ ขนาดรูพรุนก็จะเล็กกว่าเมื่อใช้อะกาโรสความเข้มข้นต่ำๆ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าอัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจะขึ้นกับความเข้มข้นของอะกาโรส การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสจะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของอะกาโรสเจล นั้นดังสมการ

$$\log\mu = \log\mu_0 - K_rC$$

เมื่อ μ = ระยะทางของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจล

μ_0 = ระยะทางของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในสภาวะที่ไม่มีอะกาโรสเจล

C = ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล

K = สัมประสิทธิ์ความหน่วง (retardation coefficient)

โดยปกติค่าสัมประสิทธิ์ความหน่วง (K_r) เป็นค่าคงที่ขึ้นกับขนาดและโครงรูปของดีเอ็นเอที่เคลื่อนที่ในอะกาโรสเจลนั้น ถ้ากำหนดให้ดีเอ็นเอปลายเปิดรูปร่างเป็นแท่งกลมยาว ค่าสัมประสิทธิ์ความหน่วงจะขึ้นกับขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอนั้น ดังนั้นที่ความเข้มข้นหนึ่งๆของอะกาโรสเจล ค่า log ของขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอจะมีความสัมพันธ์ในลักษณะผกผันกลับการเคลื่อนที่ ดังนั้นในการแยกดีเอ็นเอขนาดต่างๆจะต้องเลือกความเข้มข้นของอะกาโรสให้เหมาะสม

ตารางที่ 2.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของอะกาโรสเจลกับขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิด

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

ที่มา : สุรินทร์. 2543

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.3 **ความต่างศักย์ไฟฟ้า** โดยปกติแล้วอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสจะทำโดยใช้ความต่างศักย์อยู่ในช่วง 0.5- 5 โวลต์/เซนติเมตร แต่ค่าความต่างศักย์ที่นิยมใช้มักจะมีค่าต่ำๆ (ประมาณ 1โวลต์/เซนติเมตร) ทั้งนี้เพราะที่ความต่างศักย์ต่ำๆ อัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอปลายเปิดจะเป็นสัดส่วนกันความต่างศักย์ แต่ถ้าใช้ความต่างศักย์สูงขึ้นการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอปลายเปิดโมเลกุลใหญ่จะเพิ่มขึ้นมากกว่าพวกที่มีขนาดโมเลกุลเล็กมาก เป็นเหตุให้เมื่อใช้ความต่างศักย์สูงๆช่วงขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิดที่แยกได้จะแคบลง สำหรับดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่เฉพาะดีเอ็นเอที่ใหญ่กว่า 70 กิโลเบส การที่จะทำให้แยกจากกันได้ดีจะต้องใช้ความต่างศักย์ต่ำๆ (0.5โวลต์ต่อเซนติเมตร)

เมื่อใช้ความต่างศักย์ต่ำๆ(1โวลต์ต่อเซนติเมตร)เวลาสำหรับการแยกจะค่อนข้างยาว (มากกว่า 10 ชั่วโมง) ฉะนั้นจะเกิดการแพร่ของแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กได้มากทำให้แถบดีเอ็นเอที่แยกได้ไม่คม หรือในกรณีที่มีขนาดโมเลกุลไม่ต่างกันมากจะไม่สามารถแยกออกจากกันได้เลย ดังนั้นสำหรับดีเอ็นเอที่มีขนาดค่อนข้างเล็ก (ต่ำกว่า 2 กิโลเบส) จึงมักจะทำอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้ความต่างศักย์สูงๆเพื่อลดการแพร่ของแถบดีเอ็นเอลง

อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสมักจะทำในแนวราบ โดยที่อะกาโรสเจลจะจมอยู่ใต้บัฟเฟอร์ประมาณไม่เกิน 3 มิลลิเมตร ด้วยเหตุที่ความต้านทานไฟฟ้าในอะกาโรสเจล และในบัฟเฟอร์ใกล้เคียงกันมาก ฉะนั้นกระแสไฟฟ้าส่วนใหญ่ที่ใช้สำหรับการอิเล็กโทรโฟรีซิสจะเคลื่อนผ่านแผ่นอะกาโรสเจล โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสมักจะนิยมทำที่อุณหภูมิห้อง ทั้งนี้เพราะอัตราเร็วสัมพัทธ์ของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอปลายเปิดขนาดต่างๆ จะไม่เปลี่ยนแปลงในช่วง 4-30 องศาเซลเซียส

แต่กรณีที่ใช้ความเข้มข้นของอะกาโรสเจลต่ำกว่าร้อยละ 0.5 มักจะทำอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ 4 องศาเซลเซียส ทั้งนี้เพราะเมื่อความเข้มข้นของอะกาโรสต่ำเจลจะอยู่ในสภาพค่อนข้างนิ่ม ในที่เย็นจะช่วยให้เจลอยู่คงรูปมากขึ้น

2.4.4 **ชนิดของบัฟเฟอร์** บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในการทำอิเล็กโตรโฟลิซิส แสดงดังตารางที่ 2.4 ในที่นี้จะกล่าวถึงวิธีการทดลองที่ใช้ TBE buffer ซึ่งสามารถทำอิเล็กโตรโฟลิซิสได้ที่ความต่างศักดิ์ไฟฟ้าสูง (50 – 100 โวลต์) ในระยะเวลาสั้น แต่การใช้ความต่างศักย์ที่สูงขึ้นจะลดประสิทธิ์ภาพการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็ก ความต่างศักย์ไฟฟ้าสูงจะมีผลให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ในเจลได้เร็วขึ้น แต่อาจมีผลให้เกิดแถบ (band) ดีเอ็นเอเป็นรูปตัวยู นอกจากนี้ยังจะทำให้ความร้อนเกิดขึ้นในระบบ ในกรณีที่ความร้อนสูงอาจทำให้เจลละลายได้ มีผลให้ช่องว่างภายในเจลเปลี่ยนแปลงไป ปกติแล้วจะไม่ใช้ความต่างศักดิ์สูงเกิน 125 โวลต์ในเจลขนาดเล็ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 แสดงส่วนประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้

บัฟเฟอร์	สารละลายเข้มข้นต่อลิตร (Stock solution)	องค์ประกอบของสารละลายเข้มข้น
Tris-acetate (TAE)	40 mM Tris-acetate 2 mM EDTA	50X: 242 g Tris-base 57.1 ml. glacial acetic acid 200 ml. 0.5 M EDTA(pH 8.0)
Tris-phosphate (TPE)	89 mM Tris-phosphate 2 mM EDTA	10X: 108 g Tris-base 15.5 ml of 86% phosphoric acid (1.679 mg/ml)40 ml.0.5 M EDTA (pH8.0)
Tris-borate (TBE)	89 mM Tris-borate 89 mM Boric acid 2 mM EDTA	5X: 54 g Tris-base 27.5 g. boric acid 20 ml 0.5 M EDTA(pH8.0)

ที่มา : สุรินทร์. 2543

2.4.5 **การติดตามการเคลื่อนที่ของโมเลกุล** DNA ดีเอ็นเอไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ในขณะทำอิเล็กโทรโฟรีซีสนั้นจึงต้องใช้สารสำหรับบอกถึงการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเออย่างคร่าวๆ โดยจะมีการผสมตัวอย่างของ ดีเอ็นเอกับสารละลายสีย้อมสำหรับการหยอดดีเอ็นเอที่เรียกว่าโหลดดิงได(loading dye) ลงในช่องเจลในสารละลายสีย้อมนี้จะมีองค์ประกอบของ Ficoll 400 ซึ่งมีผลให้สารละลายดีเอ็นเอ มีน้ำหนักและจมอยู่ในช่องเจล ไม่ฟุ้งกระจายในบัฟเฟอร์ก่อนการให้กระแสไฟฟ้า โมเลกุลที่ให้สีในสารละลายสีย้อมนี้จะมีองค์ประกอบของ Ficoll 400 ซึ่งมีผลให้สารละลายดีเอ็นเอมีน้ำหนักและจมอยู่ในช่องเจลไม่ฟุ้งกระจายในบัฟเฟอร์ก่อนการให้กระแสไฟฟ้า โมเลกุลที่ให้สีในสารละลายสีย้อมซึ่งเรียกว่า แทรกกิงได(tracking dye) จะใช้ติดตามการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ ได้แก่ โบรโมฟีนอลบลู (bromophenol blue) มีสีม่วงจะเคลื่อนที่ในเจลความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ได้อัตราเร็วใกล้เคียงกับชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 300 คู่เบส ส่วนไซลีนไซยานอล(Xylene cyanol) จะมีสีฟ้ามีขนาดใหญ่กว่าจะเคลื่อนที่ได้ในอัตราเร็วใกล้เคียงกับดีเอ็นเอขนาด 900 คู่เบส ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซีสโดยทั่วไปพลาสมิดดีเอ็นเอจะแยกจากกันได้ดี เมื่อโบรโมฟีนอลบูลเคลื่อนที่ห่างจากจุดเริ่มต้นประมาณ 40-70 เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2.4.6 **การย้อมดีเอ็นเอ** ชิ้นส่วนดีเอ็นเอภายในเจลซึ่งไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าจะต้องย้อมด้วยสีย้อมฟลูออเรสเซนต์(fluorescent dye) ส่วนใหญ่จะใช้เอธิเดียมโบรไมด์(ethidium bromide) โดยสารประกอบดีเอ็นเอ และเอทธิเดียมโบรไมด์จะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 302 และ 306 นาโนเมตร การดูดกลืนคลื่นแสงนี้ส่งผลให้เกิดการแตกตัวของพลังงานและปลดปล่อยแสงสีส้มที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า(Lepecy และ Paoletli1967)เอธิเดียมโบรไมด์นั้นสามารถนำมาย้อมดีเอ็นเอได้อย่างรวดเร็วและให้ผลที่ดี แต่สารที่เป็นสารที่อาจก่อให้เกิดมะเร็งได้โดยเฉพาะถ้าหายใจสูดเข้าปอดโดยตรง โดยทั่วไปจึงนิยมซื้อในรูปของสารละลายเข้มข้น (10 มิลลิกรัม) เมื่อต้องการให้งานจะเจือจางลงเหลือความเข้มข้นประมาณ 0.5-1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใช้เวลาในการย้อมเจลที่มีดีเอ็นเอประมาณ 5-10 นาที ตามด้วยล้างเจล ประมาณ 10 นาทีในน้ำเปล่า ในปัจจุบันการพัฒนาสีย้อมดีเอ็นเอที่มีความปลอดภัยสูงและขายเป็นการค้าให้เลือกใช้หลายชนิด เช่น สตาร์เจล(star gel) แต่ราคาอาจจะสูงกว่าเอธิเดียมโบรไมด์

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พรทิพย์ ภูมิแกคำ (2546) ได้ศึกษาเกี่ยวกับอุณหภูมิ ชนิดของอาหาร ระยะเวลาที่มีการเจริญสูงสุดของเส้นใยที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดตีนแรด พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเห็ดแต่ละจังหวัดมีการเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อาหารเหลวที่เหมาะสมต่อเห็ดตีนแรดจังหวัดต่างๆเจริญได้ดีที่สุดในอาหาร PDYB และระยะเวลาที่มีการเจริญสูงสุดคือ 21 วัน

วสันต์ เพชรรัตน์ (2522) ศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดตีนแรด พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 องศาเซลเซียส และสูตรอาหารวุ้นที่เหมาะสมต่อการเจริญคืออาหาร PDA

Georgios I (2001) ทำการจำแนกสายพันธ์ของ *Pleurotus* 46 สายพันธุ์ออกจาก *Eryagium* spp. ด้วยเทคนิค RAPD PCR โดยใช้ไพรเมอร์ OPB 5 ชนิด มาจำแนกความแตกต่างออกได้เป็น 5 กลุ่ม

Maki et al. (2001) ได้ทำการวิเคราะห์ความหลากหลายของเห็ดหอม (*Lentinula edodes*) ด้วยเส้นใยโดยใช้เทคนิค RAPD molecular marker และไพรเมอร์OPA01-OPA20 ในการวิเคราะห์ พบว่า มี 17 ไพรเมอร์ที่สามารถใช้ในการจัดจำแนกสายพันธุ์เห็ดหอมได้ออกเป็น 2 กลุ่ม

Moore AJ, Challen MP, Warner PJ, Elliott TJ. ได้ใช้เทคนิค RAPD-PCR medkiแยกสายพันธุ์ของ *A. bisporus* 26 สายพันธุ์และอีก 24 สายพันธุ์ของเห็ดชนิดอื่นๆ เพื่อใช้บอกถึงความสัมพันธุ์ต่างๆ โดยใช้ไพรเมอร์ 20 ชนิด สามารถจักจำแนกออกมาโดยการเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ธรรมชาติ 2 ชนิด ของ *A. bisporus* คือเห็ดสีน้ำตาลและสีขาวกับสายพันธุ์ผสมโดยใช้เห็ดลูกผสม 15 ชนิด พบว่า มีความแตกต่างกันมากกว่า 28%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

83844

Roy and Samajpati (1981) ค้นพบเห็ดตีนแรดที่เบงกอลตะวันตกของประเทศอินเดีย เป็นครั้งแรก พบว่า มีลักษณะของหมวกดอกมีสีขาวเมื่อโตเต็มที่จะเปลี่ยนเป็นสีครีม สปอร์มีรูปร่างรี ลายสปอร์พิมพ์มีสีขาว

Sing S.K,; Upadhyay R.C.; KamalS.; Tiwari M. (2004) ได้ทำการเก็บรักษาเส้นใยของ *Agaricus bisporus, A. bitorquis, Pleurotus flabellatus, P. sajor-caju, P. ostreatus, P. sapidus, Auricularia polytricha, Lentinula edodes, Morchella esculenta* และ *Volvariella volvacea* โดยใช้ไนโตรเจนเหลวและ 15% กลีเซอลอล ในระยะเวลาต่างกันคือ 6 ,42 เดือน แล้วนำมาเปรียบเทียบความผันแปรทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคRAPD-PCR แล้วพบว่า ไม่พบความแตกต่างของจำนวนแถบดีเอ็นเอในระดับจำเพาะของทั้ง 2 วิธี การเก็บรักษาด้วยวิธีนี้จึงสามารถนำมาใช้ได้

Siu-Wai Chiu, Ai-Man Ma, Fang-can Lin and David moore(1996) ใช้เทคนิค RPAD-PCR ร่วมกับ AP-PCR และ rDNA-RFLPs มาจัดจำแนกเห็ดหอม (shitake) 19 สายพันธุ์โดยใช้เส้นใยและไพรเมอร์OPA04, OPB07, OPC02 ผลที่ได้คือ shitake นั้นมีความคล้ายคลึงกับ *Agaricus bisporus* และ *Volvariella volvacea* แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบสายพันธุ์ที่เก็บมาจากธรรมชาติในระบบนิเวศเดียวกับแต่ต่างพื้นที่กันก็จะพบความหลากหลาย ข้อสำคัญคือการเก็บรักษาสายพันธุ์ของ shitake ในธรรมชาติ เพื่ออนุรักษ์ความหลากหลายเอาไว้ใช้ประโยชน์ในการค้าต่อไป

Nelson Barros Colauto et.al (2002) ได้ทำการศึกษาหาความหลากหลายของลักษณะทางพันธุกรรมในเห็ด *Agaricus blazei* 5 สายพันธุ์โดยวิธี RAPD ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้จะใช้ *Agaricus blazei* (ABL) 5 ตัวอย่าง(isolate) ดังนี้ ABL 97/11, ABL 99/25, ABL 99/26, ABL 99/28, ABL 99/29 โดยใช้ 20 ไพรเมอร์ ซึ่งผลที่ได้มีเพียง 8 ไพรเมอร์เท่านั้นที่แสดงให้เห็นแถบที่มีความแตกต่างกัน ซึ่งมีแถบที่มีความแตกต่างกันทั้งหมด 69 แถบที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ผล และมี 3 ไพรเมอร์ไม่สามารถทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ และมี 9 ไพรเมอร์ที่ให้แถบออกมาเหมือนกัน ผลที่ได้จึงบอกได้ว่า ABL 97/11, ABL 99/25 และ ABL 99/29 ไม่มีความแตกต่างกันซึ่งเป็นการชี้ให้เห็นว่าอาจจะมีต้นกำเนิดที่เหมือนกัน (อาจจะมาญี่ปุ่น) ในขณะที่ ABL 99/26 และ ABL 99/28 แสดงให้เห็นความแตกต่างระหว่างกันเมื่อนำมาเทียบกับ 3 isolate ข้างต้นอาจจะมาจากแหล่งกำเนิดต่างกัน ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่ทั้ง 2 isolate อาจเกิดการ recombination หรือ mutation ดังนั้นการวิเคราะห์ด้วยวิธี RAPD สามารถพิสูจน์ให้เห็นถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ และวิธี RAPD นี้ เป็นเทคนิคที่มีราคาถูก

Yasuhiro ITO and Sonoe O. YANAGI (1998) ใช้วิธี RAPD-PCR ในการจัดจำแนกสายพันธุ์ของเห็ดในclass Basidiomycetae โดยใช้เส้นใยของเห็ดสายพันธุ์ *Coprinus 7* สปีชีส์ และ *Tricholoma* 5 สปีชีส์ (*T. mutsutake, T. caligatum, T. magniveTare, T. fluvocusTanium, T. bakamaTsuTake*) โดยใช้ไพรเมอร์ 10 ชนิด พบว่ารูปแบบที่ได้จากการทำ RAPD ในเห็ด *T. mutsutake* มีรูปแบบที่มีความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คล้ายคลึงกันซึ่งคิดออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ระหว่าง *T. mutsutake* กับ *T. caligatum* ได้ 52% กับ *T. magniveTare, T. fluvocusTanium, T. bakamaTsuTake* ได้ 41.8, 38.7, 24.6 ตามลำดับ

Yinfang Zhang, Francis I. Molina (1995) นำไพรเมอร์ขนาด 10 เบส มาใช้ในการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค RAPD-PCR ในเห็ด shitake 15 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ 7 ชนิด ได้ผลออกมา 12-19 แถบ ขนาดประมาณ 0.34 - 2.52 kb. พบว่า 13 สายพันธุ์จาก 15 สายพันธุ์ มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอเดียวกัน การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในเห็ดชนิดต่างๆและใช้ร่วมกับโปรแกรมวิเคราะห์สายพันธุ์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ขั้นตอนในการดำเนินงาน

3.1.1 อุปกรณ์ดำเนินงานในการเพาะเลี้ยงเส้นใย

- ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar air flow)
- ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 ml
- เข็มเขี่ยเชื้อ
- จานเลี้ยงเชื้อ

3.1.2 อุปกรณ์ในการสกัดดีเอ็นเอ

- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
- โกร่ง
- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
- กรวยกรอง
- กระดาษกรอง
- micropipette
- micropipette tip
- microfuge tube

3.1.3 อุปกรณ์ในการทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ (PCR)

- PCR-200 Peltier Thermal Cicler
- Microfuge tube

3.1.4 อุปกรณ์ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส (electrophoresis)

- ชุดอิเล็กโตรโฟรีซีส
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า
-เครื่องฉายแสงยูวี

3.2 แหล่งที่มาของเส้นใยเห็ดตีนแรดที่ใช้ในการทดลอง

1.	จังหวัดปทุมธานี	1	ตัวอย่าง
2.	จังหวัดกรุงเทพฯ(ศูนย์เพาะเห็ดอรัญญิก)	1	ตัวอย่าง
3.	จังหวัดมหาสารคาม	1	ตัวอย่าง
4.	จังหวัดขอนแก่น	1	ตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.3.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

1. TE buffer

Tris-HCl	pH8.0	10	มิลลิโมลาร์
EDTA	pH8.0	1	มิลลิโมลาร์

2. Extraction buffer

Tris-HCl	pH8.5	200	มิลลิโมลาร์
NaCl		250	มิลลิโมลาร์
EDTA		25	มิลลิโมลาร์
SDS 0.5%		25	มิลลิโมลาร์

3. 3M aosium acetate pH5.2
4. isopropanol
5. liquid nitrogen
6. ethanol 70%

3.3.2 สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา RAPD - PCR

1. PCR reaction mixture ประกอบด้วย

Taq polymerase	0.5	ไมโครลิตร
$MgCl_2$	3	ไมโครลิตร
DNTPs อย่างละ	2	ไมโครลิตร
Primer 1	2	ไมโครลิตร

2. ดีเอ็นเอ(template) 1 ไมโครลิตร
3. 10xBuffer 5 ไมโครลิตร
4. H_2O 37.5 ไมโครลิตร

3.3.3 สารเคมีที่ใช้ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซีส (electrophoresis)

1. TBE(Tris-borate)

Trisborate	89	มิลลิโมลาร์
Boric acid	89	มิลลิโมลาร์
EDTA pH8.0	2	มิลลิโมลาร์

2. Bromophenol blue
3. Agarose(Agar)powder
4. Marker 100 bp ladder

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเลี้ยงเส้นใยเห็ดตีนแรดเพื่อสกัดดีเอ็นเอ (นุสรา เพิงใหญ่. 2547)

3.4.1.1 นำเส้นใยจากหัวเชื้อเห็ดตีนแรดที่เลี้ยงเอาไว้ในข้าวฟ่างมาถ่ายเชื้อลงในหลอดทดลองที่มีอาหารพีดีเอ (slant of PDA) แล้วนำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน

3.4.1.2 นำหัวเชื้อที่อยู่ในหลอดทดลองนั้นมาถ่ายลงในจานอาหารพีดีเอ (plate of PDA) แล้วนำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน

3.4.1.3 เมื่อได้เส้นใยที่อยู่ในจานอาหารแข็งแล้ว นำเส้นใยนี้มาถ่ายลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลว (flask of PDYB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยใช้cock borer (หรือหลอดกาแฟทนร้อน) แล้วค่อยๆใช้เข็มเขี่ยวางชิ้นอาหารที่มีเส้นใยลงในขวดรูปชมพู่เบาๆ(อย่าให้ชิ้นอาหารนี้จม เพราะถ้าจมลงในอาหารเหลวแล้ว เส้นใยนี้จะไม่เจริญ) จากนั้นนำไปบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 21 วัน(3 สัปดาห์) เขย่าวันละ 2 ครั้ง

3.4.2 การสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยเห็ดตีนแรด (ดัดแปลงจาก Cenis. 1992)
นำเส้นใยที่เลี้ยงในอาหารเหลวมาสกัดดีเอ็นเอ

3.4.2.1 กรองเส้นใยของเห็ดโดยใช้กระดาษกรอง Whatman No.1 ล้างเส้นใยด้วยน้ำกลั่นหลายๆครั้งๆ แล้วนำเส้นใยใส่หลอดไมโครเซนติฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ประมาณ 0.1-0.3

3.4.2.2 ล้างเส้นใยด้วย TE Buffer แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วนความเร็งรอบ 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4.2.3 รินสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง นำเส้นใยใสโกร่งที่เย็นจัด เติมไนโตรเจนเหลวให้ท่วมแล้วบดเส้นใยอย่างรวดเร็วจนมีลักษณะคล้ายผงแป้ง(ถ้าไนโตรเจนเหลวหมดให้เติมใหม่) จากนั้นก็ถ่ายลงในหลอดไมโครเซนติฟิวส์หลอดใหม่

3.4.2.4 เติม Extraction buffer 300 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติม Sodium acetate 150 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.4.2.5 หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.4.2.6 ดูดสารละลายส่วนใสที่อยู่ด้านบนมาใส่หลอดไมโครเซนติฟิวส์หลอดใหม่ผสมไอโซโปรพานอล (Isopropanol) ลงในหลอดปริมาตรที่เท่ากันเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เขย่าเบาๆให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 5 นาที

3.4.2.7 นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.2.8 รินส่วนใสทิ้งเหลือดีเอ็นเอก้นหลอด เติม RNase 100 ไมโครลิตร บ่ม 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.4.2.9 นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

3.4.2.10 เติม extraction buffer 300 ไมโครลิตร และ 3M โซเดียมอะซิเตต 150 ไมโครลิตร เขย่า (vortex) บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

3.4.2.11 ดูดสารละลายส่วนใสมาใส่หลอดไมโครเซนติฟิวส์หลอดใหม่ผสมไอโซโปรพานอล (Isopropanol) ในปริมาตรที่เท่ากัน เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเออีกครั้ง เขย่า บ่มข้ามคืน

3.4.2.12 นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

3.4.2.13 รินส่วนใสทิ้ง เหลือตะกอนดีเอ็นเอก้นหลอด ล้างดีเอ็นเอด้วยเอธานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (ดูดส่วนใสเท่าใดเติมเอธานอลเท่านั้นเพื่อล้างดีเอ็นเอ) ทิ้งไว้ 3-5 นาที

3.4.2.14 คว่ำหลอดบนกระดาษทิชชู่ ทิ้งไว้ให้แห้ง

3.4.2.15 ละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer 50 ไมโครลิตร (ถ้ามีดดีเอ็นเอไม่มากให้เติม 20-50 ไมโครลิตร)

3.4.2.16 เก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4.3 การศึกษาความแตกต่างกันของเห็ดตีนแรดในแต่ละจังหวัดโดยใช้เทคนิค RAPD-PCR (ดัดแปลงจาก Maki. 2001)

3.4.3.1 การทำRAPD-PCRจะต้องเตรียมสารละลายผสม (master mix) ซึ่งประกอบด้วย น้ำกลั่น, 10X buffer, $MgCl_2$, dNTPs, Templates, *Taq* นำมาผสมกันตามลำดับและปริมาตรต่อหนึ่งปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

1. Distillation deioning water	37.5	ไมโครลิตร
2. 10X buffer	5	ไมโครลิตร
3. $MgCl_2$	3	ไมโครลิตร
4. dNTPs	1	ไมโครลิตร
5. Template	1	ไมโครลิตร
6. *Tag*	0.5	ไมโครลิตร

ไพรเมอร์ที่ใช้มี 4 ชนิดคือ OPA01-04 จึงทำสารละลายผสมสำหรับทำ 5 ปฏิกิริยา แบ่งสารละลายผสมนี้ใส่หลอดพีซีอาร์ปริมาตร 48 ไมโครลิตร จากนั้นใส่ไพรเมอร์ 4 ชนิดปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในหลอด แล้วเขย่า(vortex) นำไปเข้าเครื่องทำพีซีอาร์ แล้วตั้งค่าในการทำปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Initiation denaturation	94°ซ	5	นาที
Denaturation	94°ซ	1	นาที
Annealing	72°ซ	30	วินาที
Extension	72°ซ	2	นาที
Final extension	72°ซ	5	นาที

ทำปฏิกิริยา 45 รอบ

3.4.4 การตรวจสอบดีเอ็นเอ

3.4.4.1 ตรวจสอบผลที่ได้โดยทำอิเล็กโตรโฟลิซิส และใช้สตาร์เจล

3.4.4.2 เตรียมเจลอะการ์โรส 1 เปอร์เซนต์ในTE Buffer แล้วใส่สตาร์เจล 1 ไมโครลิตรต่อเจลอะการ์โรส 20 ไมโครลิตร ใช้กระแสไฟฟ้าต่ำ เป็นเวลาประมาณหนึ่งถึงหนึ่งชั่วโมงครึ่ง นำเจลไปดูผลโดยใช้แสง UV เพื่อตรวจสอบ โดยวางสตาร์เจลบนแหล่งกำเนิดแสงที่ให้แสงอัลตร้าไวโอเลตความยาวคลื่นปานกลาง (260-360 นาโนเมตร) ควรหลีเลี่ยงหลอดไฟที่ให้ความยาวคลื่นสั้น เนื่องจากจะเป็นอันตรายต่อผู้ใช้และทำลายดีเอ็นเอ ส่วนความยาวคลื่นแสง (black light) นั้นจะปลอดภัยแต่จะให้ความเข้มแสงต่ำ แสงอัลตร้าไวโอเลตนั้นสามารถทำลายเรตินาของดวงตาได้ ไม่ควรดูด้วยตาเปล่า

3.4.5 การถ่ายภาพเจล

ถ้าใช้กล้อง Polaroid จะต้องมี close-up diopter lens จะถ่ายได้ทั้งแสงอัลตร้าไวโอเลตและแสงธรรมดาในการถ่ายภาพด้วยแสงยูวี จะใช้ Polaroid type 667 high-speed film(b&w) ถ้าใช้กล้องธรรมดาจะต้องใช้ตัวกรอง 2 ชนิดคือ

- 23 A orange วางที่ใกล้กล้อง เพื่อเป็นการเพิ่มความแตกต่างสำหรับการย้อมด้วยเมธิลีนบลู
- 2B UV-blocking liter(clear) ใกล้วัตถุ

ในปัจจุบันมีการพัฒนาเครื่องถ่ายภาพเจลเฉพาะซึ่งสามารถทำงานได้สะดวก

3.4.6 การวิเคราะห์ผล RAPD-PCR (Pauloและคณะ. 1999)

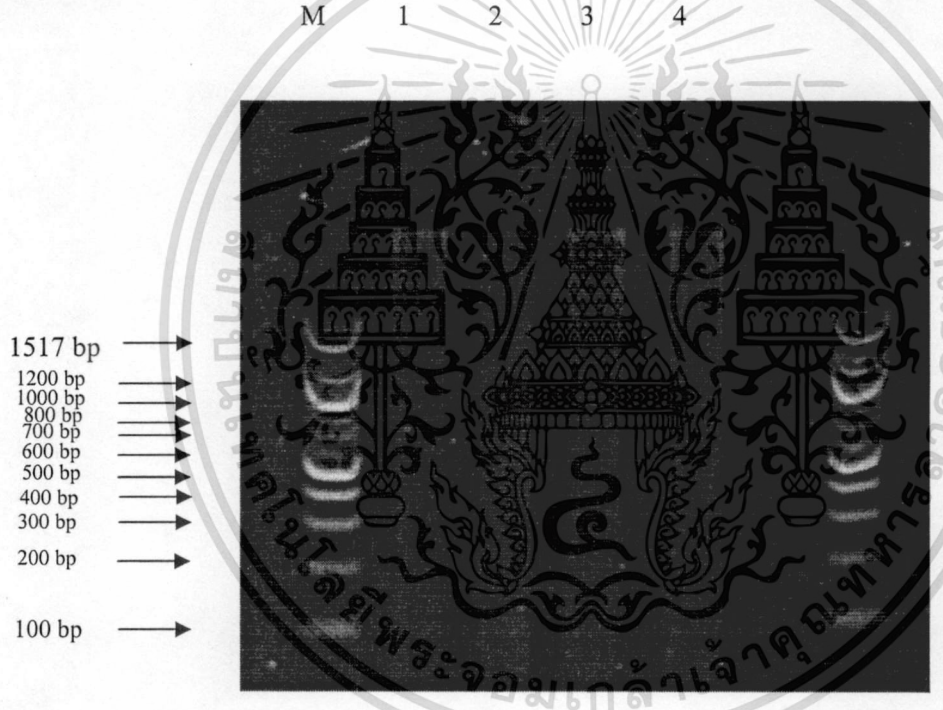
นำผลของความหลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD-PCR โดยบันทึกข้อมูลเป็น + และ – โดย + หมายถึง พบแถบของดีเอ็นเอ - หมายถึง ไม่พบแถบดีเอ็นเอ นำข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์ผลหาร้อยละของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ เพื่อดูความหลากหลายของดีเอ็นเอของเห็ดตีนแรดทั้ง 4 จังหวัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากเห็ดตีนแรด

จากการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีที่พัฒนาจาก Cenis ในปี 1992 จากเห็ดตีนแรดทั้ง 4 ตัวอย่างคือจังหวัดกรุงเทพฯ(ศูนย์เพาะเห็ดบ้านอรัญญิก) จังหวัดขอนแก่น จังหวัดมหาสารคาม และจังหวัดปทุมธานี ผลปรากฏว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความเข้มข้น เท่ากับ 350 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ดังรูปที่ 4.1)



รูปที่ 4.1 แสดงแถบ genomic DNA ของเห็ดตีนแรดจังหวัดต่าง ๆ โดยในเลน M คือแถบของ marker 100 เบส และเลนที่ 1, 2, 3 และ 4 คือแถบของจีโนมิคดีเอ็นเอจากจังหวัดกรุงเทพฯ(ศูนย์เห็ดบ้านอรัญญิก) จังหวัดขอนแก่น จังหวัดมหาสารคาม และจังหวัดปทุมธานี ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ความหลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากการทำ RAPD-PCR

4.2.1 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD-PCR โดยไพรเมอร์ OPA01

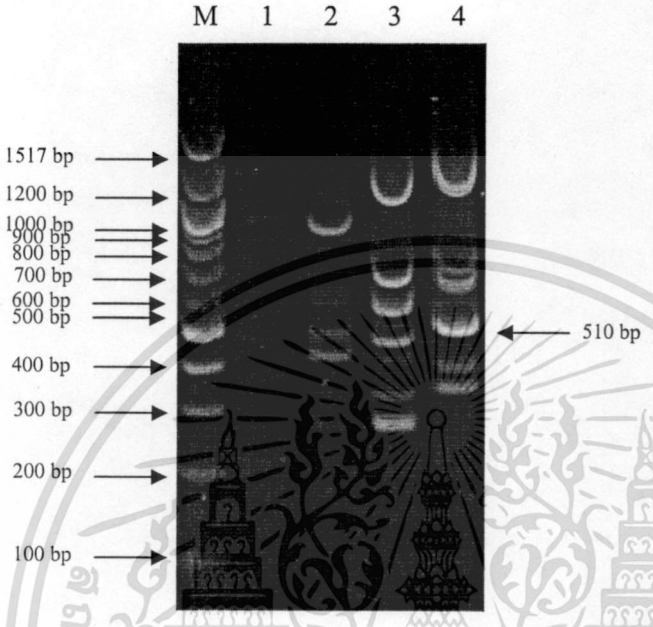
จากการใช้ไพรเมอร์ OPA01 ไม่พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (ดังรูปที่ 4.2) ซึ่งทำทราบว่าไพร์เมอร์ชนิดนี้ไม่สามารถทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (amplification) ในตัวอย่างเห็ดตีนแรดทุกจังหวัด

รูปที่ 4.2 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มปริมาณแบบสุ่มของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆโดยใช้ ไพรเมอร์ OPA01 ซึ่งเลน M คือแถบของ marker 100 เบส และเลนที่ 1, 2, 3 และ 4 คือแถบของจีโนมิคดีเอ็นเอจากจังหวัดกรุงเทพฯ(ศูนย์เพาะเห็ดบ้านอรัญญิก) จังหวัดขอนแก่น จังหวัดมหาสารคาม และจังหวัดปทุมธานี ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD-PCR โดยไพรเมอร์ OPA02

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ OPA02 มีจำนวนแถบที่ปรากฏทั้งหมด 15 แถบและพบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 510 คู่เบส มีขนาดเท่ากัน ในเลนที่ 2 กับ 4 (ดังรูปที่ 4.3)

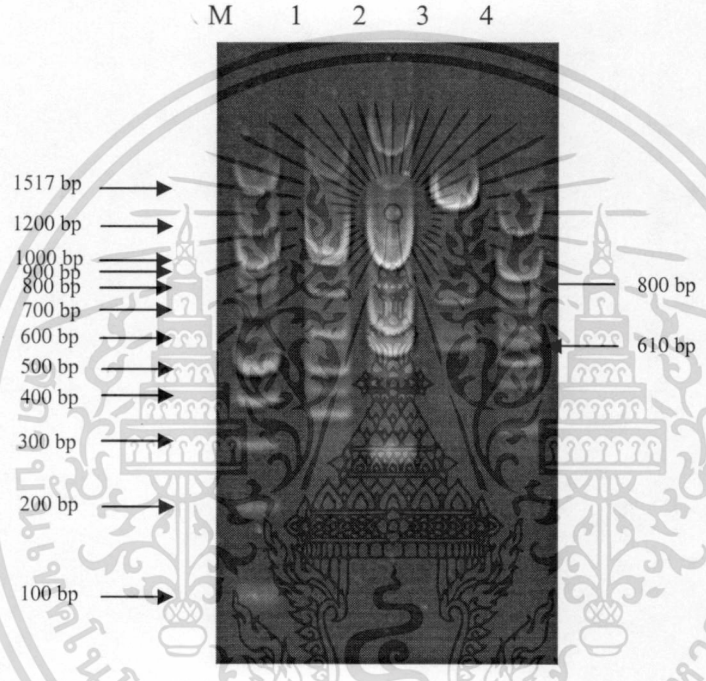


รูปที่ 4.3 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มปริมาณแบบสุ่มของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ โดยใช้ไพรเมอร์ OPA02 ซึ่งเลน M คือแถบของ marker 100 เบสและเลนที่ 1, 2, 3 และ 4 คือแถบของจีโนมิคดีเอ็นเอจากจังหวัดกรุงเทพฯ(ศูนย์เพาะเห็ดบ้านอรัญญิก) จังหวัดขอนแก่น จังหวัดมหาสารคาม และจังหวัดปทุมธานี ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD-PCR โดยไพรเมอร์ OPA03

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ OPA03 พบว่ามีแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่ปรากฏขึ้นหลังจากการทำ RAPD-PCR 25 แถบ และพบว่ามีขนาดดีเอ็นเอที่เท่ากัน ดังนี้ ที่ขนาด 800 คู่เบส ในเลนที่ 1, 2 และ 4 ที่ขนาด 610 คู่เบส ในเลนที่ 1 และ 2 (ดังรูปที่4.4)

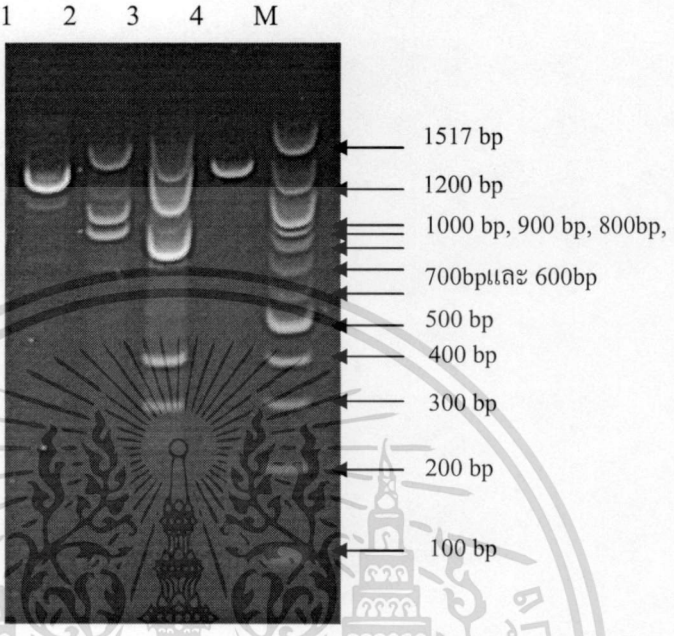


รูปที่ 4.4 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มปริมาณแบบสุ่มของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ โดยใช้ ไพรเมอร์ ซึ่งเลน M คือแถบของ marker 100 เบสและเลนที่ 1, 2, 3 และ 4 คือแถบของจีโนมิคดีเอ็นเอจากจังหวัดกรุงเทพฯ(ศูนย์เพาะเห็ดบ้านอรัญญิก) จังหวัดขอนแก่น จังหวัดมหาสารคาม และจังหวัดปทุมธานี ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.4 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD-PCR โดยไพรเมอร์ OPA04

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ OPA04 พบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดเท่ากับ 9 แถบ (ดังรูปที่ 4.5)



รูปที่ 4.5 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มปริมาณแบบสุ่มของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆโดยใช้ไพรเมอร์ OPA04 ซึ่งเลน M คือแถบของ marker 100 เบสและเลนที่ 1, 2, 3 และ 4 คือแถบของจีโนมิคดีเอ็นเอจากจังหวัดกรุงเทพฯ(ศูนย์เพาะเห็ดบ้านอรัญญิก) จังหวัดขอนแก่น จังหวัดมหาสารคาม และจังหวัดปทุมธานี ตามลำดับ

4.3 การวิเคราะห์ผล RAPD-PCR

การวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมของเห็ดตีนแรดทั้ง 4 ตัวอย่างจากเทคนิค RAPD โดยนำแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 49 แถบ ซึ่งกำหนดสัญลักษณ์ + แทนการเกิดแถบดีเอ็นเอและสัญลักษณ์ - แทนการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ นำมาใช้การวิเคราะห์ผลเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ พิจารณาความแตกต่างหรือความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรม ผลจากแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ 4 ชนิด พบว่า ไพรเมอร์ OPA01 ไม่สามารถทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (amplification) ได้หลังจากการทำ RAPD – PCR ในตัวอย่างเห็ดตีนแรดทุกจังหวัด ในขณะที่ในการศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมในเห็ดหอมของ Maki และคณะ (2001) ได้ทำการทดลองโดยใช้ไพรเมอร์ OPA01-OPA20 พบว่า ไพรเมอร์ OPA01 สามารถที่จะทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ และพบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA02, OPA03และOPA04 แถบดีเอ็นเอที่ได้มีความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอแตกต่างกันออกไป ผลที่ได้แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรม เช่นเดียวกันกับในการศึกษาหาความผันแปรลักษณะทาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธุกรรมในเห็ดหอม *Lentinula edodes* ของ Yingfang Zhang และคณะ (1995)โดยใช้ไพรเมอร์ 7 ชนิด ซึ่งหนึ่งในนี้มีไพรเมอร์ OPA02 และ OPA04 ที่ใช้เหมือนกับการทดลองนี้พบว่าสามารถให้รูปแบบที่ได้จากการทำ RAPD-PCR ที่มีความแตกต่างกัน ดังนั้นแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่ปรากฏหลังจากการทำ RAPD-PCR 57 แถบ จึงนำมาวิเคราะห์หาความคล้ายคลึงกันจากเปอร์เซ็นต์การเกิดแถบโดยใช้วิธีการของ Paulo และคณะ(1999) พบว่า เมื่อนำแถบทั้งหมด 57 แถบที่ปรากฏในเห็ดตีนแรดในทั้ง 4 จังหวัด คือ จังหวัดกรุงเทพฯ(ศูนย์เพาะเห็ดอรัญญิก) จังหวัดขอนแก่น จังหวัดมหาสารคาม และจังหวัดปทุมธานี ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA02, OPA03และOPA04 วิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันพบว่าจังหวัดกรุงเทพฯ(ศูนย์เพาะเห็ดอรัญญิก) มีเปอร์เซ็นต์ 14.28 เปอร์เซ็นต์ ขอนแก่นมี 24.48 เปอร์เซ็นต์ มหาสารคามมี 28.57 เปอร์เซ็นต์ และปทุมธานีมี 32.65 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าตัวอย่างเห็ดตีนแรดจากจังหวัดขอนแก่น มหาสารคาม และปทุมธานี มีความคล้ายคลึงกันมากกว่าในตัวอย่างเห็ดตีนแรดจากศูนย์เพาะเห็ดอรัญญิก เมื่อดูจากเปอร์เซ็นต์ของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ (แสดงดังรูปที่ 4.5 และตารางที่ 4.6)

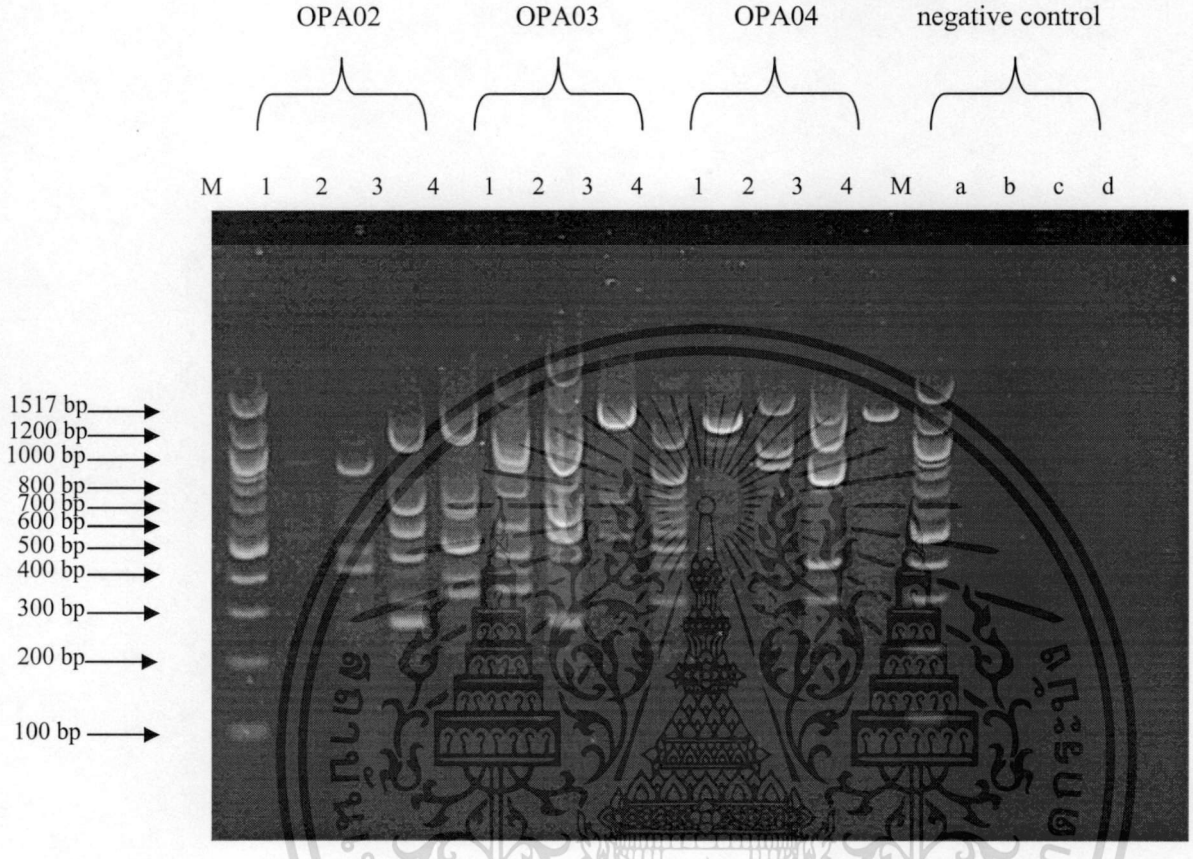
ตารางที่ 4.1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างไพรเมอร์ และผลที่ได้จากการทำ RAPD-PCR ในเห็ดตีนแรดจังหวัดต่างๆ

ไพรเมอร์	ลำดับเบส	ความสามารถในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเห็ดตีนแรด
OPA01	5' CAGGCCCTTC 3'	X
OPA02	5' TGCCGAGCTG 3'	+
OPA03	5' AGTCAGCCAC 3'	+
OPA04	5' AATCGGGCTG 3'	+

เมื่อ : + คือ สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

X คือ ไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 แสดงรูปแบบที่ได้จากการทำ RAPD-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ OPA02, OPA03และOPA04 ในตัวอย่างเห็ดตีนแรดจังหวัดต่างๆ ซึ่งเลน M คือแถบของ marker 100 เบส และเลนที่ 1, 2, 3 และ 4 คือแถบของจีโนมิคดีเอ็นเอจากจังหวัดกรุงเทพฯ(ศูนย์เพาะเห็ดบ้านอรัญญิก) จังหวัดขอนแก่น จังหวัดมหาสารคาม และจังหวัดปทุมธานี ตามลำดับ negative control แทนด้วย a b c d คือไพรเมอร์ OPA01, OPA02, OPA03และOPA04 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD – PCR โดยใช้ไพรเมอร์ OPA02 - OPA04 ในการวิเคราะห์ผล โดยให้สัญลักษณ์ + แทนการพบแถบดีเอ็นเอ และ สัญลักษณ์ – แทนการไม่พบแถบดีเอ็นเอ

ตัวอย่างเห็ดตีนแรด	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA 02													
	1210	1200	1010	710	700	690	590	510	490	440	400	380	340	280
อรัญญิก	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ขอนแก่น	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
มหาสารคาม	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+
ปทุมธานี	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-

ตัวอย่างเห็ดตีนแรด	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA03																				
	1517	1230	1200	1010	990	900	800	710	700	690	610	600	590	560	550	500	490	480	420	390	320	280
อรัญญิก	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
ขอนแก่น	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
มหาสารคาม	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ปทุมธานี	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-

ตัวอย่างเห็ดตีนแรด	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA04									ร้อยละของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ
	1517	1290	1230	1200	1090	1010	900	500	380	
อรัญญิก	-	-	+	-	-	-	-	-	-	14.28
ขอนแก่น	-	-	-	-	+	+	-	-	-	24.48
มหาสารคาม	-	+	-	+	-	-	+	+	+	28.57
ปทุมธานี	+	-	-	-	-	-	-	-	-	32.65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า บริการ หรือการแสวงหากำไร ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาแถบทั้งหมด 57 แถบที่ปรากฏของเห็ดตีนแรดใน 4 จังหวัดคือ จังหวัดปทุมธานี จังหวัดนครปฐม จังหวัดขอนแก่น จังหวัดมหาสารคามและ **ตารางที่ 4.2** แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD – PCR โดยใช้ไพรเมอร์ OPA02 - OPA04 ในการวิเคราะห์ผล โดยให้สัญลักษณ์ + แทนการพบแถบดีเอ็นเอ และ สัญลักษณ์ – แทนการไม่พบแถบดีเอ็นเอ เมื่อนำมาเปรียบเทียบกันตามวิธีการของ Paulo J. Elisario (1999) พบว่าเห็ดตีนแรด 3 จังหวัด คือ จังหวัดปทุมธานี จังหวัดขอนแก่น จังหวัดมหาสารคาม มีความคล้ายคลึงกันของแถบมากกว่าเห็ดตีนแรดของจังหวัดกรุงเทพฯ (ศูนย์เพาะเห็ดบ้านอรัญญิก) อาจเป็นไปได้ว่า เห็ดตีนแรดจากจังหวัดกรุงเทพฯ (ศูนย์เพาะเห็ดบ้านอรัญญิก)นั้นอาจเกิดการแปรผันทางพันธุกรรมไปจากเดิม เนื่องจากเป็นเห็ดที่เลี้ยงโดยมนุษย์ภายในโรงเพาะเห็ดมาแล้วหลายรุ่น อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมมากกว่าเห็ดที่เลี้ยงตามธรรมชาติ เนื่องจากเกิดการผสมพันธุ์ขึ้นมาใหม่เพื่อใช้ในทางการค้ากันระหว่างเห็ดต่างชนิด และมีสายพันธุ์ใกล้เคียงกันที่เลี้ยงมาด้วยกันภายในโรงเพาะเห็ดเดียวกันก็เป็นได้ ในการศึกษาเพิ่มเติมควรนำเส้นใยเห็ดตีนแรดจากทุกจังหวัดมาเพาะเลี้ยงเพื่อทำการเปิดดอกเห็ด และทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลักษณะดอกเห็ดในแต่ละจังหวัดควบคู่ไปด้วย เพื่อให้ได้ข้อมูลมาวิเคราะห์ในการยืนยันผลการทดลอง

ไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในการทดลองนี้คือ ไพรเมอร์ชนิด OPA 01, OPA02, OPA03 และ OPA04 ที่สามารถขยายปริมาณดีเอ็นเอของเห็ดตีนแรดได้ แสดงว่าไพรเมอร์ OPA นี้สามารถนำมาใช้กับเห็ดตีนแรดได้

ข้อเสนอแนะจาการทดลองนี้คือ เพิ่มจำนวนตัวอย่างเห็ดตีนแรดที่ใช้ในการทดลองควรมีหลายกลุ่มจากพื้นที่ต่างๆกันมากกว่านี้ และจำนวนชนิดไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในการทดลองควรเพิ่มมากขึ้น เช่นไพรเมอร์ OPA05 - 20, OPB, OPL และไพรเมอร์อื่นๆที่เคยได้มีผู้ทดลองนำมาใช้ทดลองกับเห็ดราชนิดต่างตัวอย่างที่เคยมีผู้ทดลองนำมาใช้คือ ไพรเมอร์ OPB01, OPB08 ถูกนำมาใช้กับ *Penicillium commune* (Flemming Lund, Anni Bech Nielsen, Pernille Skouboe. 2002) และการศึกษาหาความหลากหลายของลักษณะทางพันธุกรรมในเห็ด *Pleurotus eryngii* ของ Georgios I (2001) โดยใช้ไพรเมอร์ OPB01-OPB20 พบว่ามีไพรเมอร์ OPB01, OPB02, OPB10, OPB14 และ OPB18 เท่านั้นที่สามารถทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ซึ่งให้รูปแบบที่ได้จากการทำ RAPD-PCR ที่แตกต่างกัน เพื่อจะได้นำมาทำการจัดจำแนก แล้วแยกกลุ่มเพื่อทำการปรับปรุงพันธุ์ให้มีสายพันธุ์ที่ดียิ่งขึ้น

เทคนิคการวิเคราะห์ RAPD-PCR ที่ใช้ในการทดลองหาความแตกต่างของสายพันธุ์เห็ดตีนแรดนี้ควรนำมาใช้ร่วมกับเทคนิคอื่น เช่น เทคนิคไอโซไซม์ และเทคนิค RFLP-PCR เพื่อนำมายืนยันผลที่ได้ต่อไปให้มีความชัดเจนและมีความถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ชาญยุทธ์ ภานุทัต นงนุช แตงทรัพย์ และสวัสดิ์ เชียงแข็ง. 2543. การศึกษาการเพาะเลี้ยงเห็ดตีนแรดร่วมกับการปลูกผัก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ. 2529. การเพาะเห็ดบางชนิดในประเทศไทย. กรุงเทพฯ : อักษรสยามการพิมพ์.

ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์ และกิติพงษ์ ศิริราชกุล. 2528. เทคโนโลยีการเพาะเห็ด. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วสันณ์ เพชรรัตน์. 2522. "I.การศึกษาสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและการเพาะเลี้ยงเห็ดตีนแรดII ลักษณะการสืบพันธ์ทางเพศของเห็ดตีนแรด.วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุรินทร์ ปียะโชคณากุล. 2543. พันธุวิศวกรรม ปฏิบัติการเบื้องต้น. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิริวรรณ สุทธิจิตต์ และไมตรี สุทธิจิตต์. 2545. "เห็ดสมุนไพร : จากอดีต สู่ปัจจุบันและอนาคต." เห็ดไทย. 1-11.

ณัฐภรณ์ เวียนงาม. 2546. ความผันแปรทางพันธุกรรมของกลุ่มเห็ดตีนแรดในบางพื้นที่ของประเทศไทยด้วยเทคนิคPCR-RFLP. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

นุสรา เพิงใหญ่. 2547. ระบบการผสมพันธุ์และอินคอมแพททิบิลิทีอัลลีนของเห็ดตีนแรด. วิทยานิพนธ์ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พรทิพย์ ภูมิแกดำ. 2546. การศึกษาความผันแปรของลักษณะพันธุกรรมของเห็ดตีนแรดด้วยเทคนิคไอโซไซม์. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

Ayago Tanaka, Kazuhiro Miyazaki, Haruki Murakami and Susumu Shiraishi. 2004. "Sequence characterized amplified region markers tightly linked to the mating factors of *Lentinula edodes*." Genome. 47(1) : 156-162

Cenis, J.L. 1992. "Rapid extraction of Fungal for Amplification." Nucl. Acids. Res. 20 : 23 – 28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Flemming Lund, Anni Bech Neilsen and Pernille Skouboe. 2002. "Distribution of *Penicillium commune* isolates in cheese dairies mapped using secondary metabolite profiles, morphotypes, RAPD and RFLP fingerprinting." Food Microbiology. 20(2003): 725-734.

Maki. 2001. Analyses of genetic variability in lentinula edodes through mycelia responses to different abiotic conditions and RAPD molecular markers. : 1517-8382

Nelson Barros Coluato, Eutstaquio souza Dias, Marcos AparecidoGimenes and Augusto Ferreira da Eira. 2002. "Genetic Characterization of isolates of the Basidiomycete *Agaricus blazei* by RAPD." Departmento de Biologia : Universidade Federal de Lavras.

Saghai – Maroof, M.A. **et. al.** 1989. Fungal DNA Isolation. MSU – DOE plant Research Laboratory Press, Michigan.

Siu-Wai Chiu, Ai-Manma, Fang-Can Lin and David Moore. 1996. "Genetic homogeneity of cultivated strains of Shitake(Lentinula edodes) used in China as revealed by the polymerase chain reaction." Mycological Research. 100(11) : 1393-1399.

Weir, A. and Blackwell, M. 2001. "Molecular data support the Laboulbenials as a separate class of Ascomycota, Laboulbeniomycetes. Mycological research.105 (10) : 1182 – 1190.

Yasuhiro ITO and Sonoe O. YANAGI. 1999. "Descrimination of the Basidiomycete Species and strains by Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD) Analysis." Biological Function Division. National Food Research Institute. Japan. 305-8642.

Yinfang Zhang and Francis I. Nolina. 1995. "Strain typing of *Lentinula edodes* by Random Amplified Polymorphic DNA assay." FEMS Micribiology Letters. 131(1995) : 17-20.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเส้นใยเห็ด

1. PDA (potato dextrose agar)

PDB	24	กรัมต่อลิตร
Agar	16	กรัมต่อลิตร

2. PDYB (potato dextrose yeast broth)

PDB	24	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	5	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

3M Sodium acetate

ชั่ง Sodium acetate 3 H_2O 408.1 กรัม ละลายในน้ำ 750 มิลลิลิตร เติม gacial acetic acid จนกระทั่งได้ pH 5.2 ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร และนึ่งฆ่าเชื้อโดยการ autoclave

1M Tris-HCl

ละลาย Tris base 121.1 กรัม ในน้ำ 800 มิลลิลิตร ปรับ pH โดยใช้กรด HCl เข้มข้นจนกระทั่งได้ pH 7-8 แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร และนึ่งฆ่าเชื้อโดยการ autoclave

TE buffer

นำ 1M Tris-HCl ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับ EDTA pH 8.0 ปริมาตร 0.2มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

0.5 M EDTA

disodium ethyenedianinetetraacetate 2 H_2O 186.1 กรัม ในน้ำ 800 มิลลิลิตร ใช้ magnetic stirrer หมุนช่วยละลายปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย NaOH ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร และนึ่งฆ่าเชื้อโดยการ autoclave

Extraction buffer

นำ 1M Tris-HCl ปรมาตร 20 มิลลิลิตร 1mM EDTA 5 มิลลิลิตร pH 8.0 5 M NaCl 5 มิลลิลิตร และ 0.5% SDS 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร

5 M NaCl

ละลาย sodiumchloride 292.2 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร และนึ่งฆ่าเชื้อโดยการ autoclave

5 X TBE

ละลาย Tris base 54 กรัม boric acid 27.5 กรัม และ 0.5 mM EDTA 20 มิลลิลิตร pH 8.0 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตารางภาคผนวก ค ลำดับเบสไพรเมอร์ที่นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเห็ดตีนแรด

ชนิดไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
OPA01	5' CAGGCCCTTC 3'
OPA02	5' TGCCGAGCTG 3'
OPA03	5' AGTCAGCCAC 3'
OPA04	5' AATCGGGCTG 3'

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้