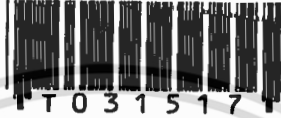


การใช้เทคนิคโปรโตพลาสต์และการศึกษาความแตกต่างของไอโซไซม์

จากเส้นใยโมนอคาร์รียอนของเห็ดตีนแรด

PROTOPLASTING TECHNIQUES AND STUDIES ON ISOZYME
VARIATIONS IN MONOKARYONTIC MYCELIA OF
TRICHOLOMA CRASSUM (BERK.) SACC.



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2541

ISBN 974-622-264-3

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**PROTOPLASTING TECHNIQUES AND STUDIES ON ISOZYME
VARIATIONS IN MONOKARYONTIC MYCELIA OF
TRICHOLOMA CRASSUM (BERK.) SACC.**



**THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

1998

ISBN 974-622-264-3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การใช้เทคนิคโปรโตพลาสต์และการศึกษาความแตกต่างของไอโซไซม์จากเส้นใยโมโนคาร์บอนของเห็ดตีนแรด
นักศึกษา	นางสาวสุภาภรณ์ จาริวัฒน์
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ผศ. มាលินี ดันตยาภรณ์
ระดับการศึกษา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ.	2541

บทคัดย่อ

ในการแยกโปรโตพลาสต์จากเส้นใยของเห็ดตีนแรดโดยใช้ไลซิงเอนไซม์ (lysing enzyme), เซลลูเลส (cellulase) และไคตินเนส (chitinase) พบว่าปริมาณของโปรโตพลาสต์ที่ได้นั้นขึ้นอยู่กับอายุของเส้นใย, บัฟเฟอร์, pH และปริมาณของเอนไซม์ เมื่อเพาะเลี้ยงเส้นใยในอาหารเหลว PDB ที่มี pH 5.5 นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 4 วัน จะได้เส้นใยที่เหมาะสมแก่การทำโปรโตพลาสต์ หลังจากนั้นนำเส้นใยมา 750 มิลลิกรัม บ่มกับเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ โดยใช้ส่วนผสมของเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ 4.5 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยไลซิงเอนไซม์ 2 มิลลิกรัม, เซลลูเลส 1 มิลลิกรัม และไคตินเนส 0.2 มิลลิกรัม ใช้ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที ระยะเวลาบ่ม 3.5 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิห้อง จะได้จำนวนโปรโตพลาสต์ 8.22×10^6 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร สภาวะของสารละลายประกอบด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.01 M pH 6 ที่มี 0.6 M KCl เป็น stabilizer และ 0.1 M 2-mercaptoethanol ที่ช่วยให้การทำงานของเอนไซม์ดียิ่งขึ้น โปรโตพลาสต์ที่เจริญเติบโตสามารถสร้างผนังเซลล์ใหม่เท่ากับ 13.77 เปอร์เซ็นต์ เส้นใยโมโนคาร์บอนเจริญช้ากว่าเส้นใยไคคาร์บอน ภายหลังจากการคัดแยกเส้นใยโมโนคาร์บอนออกจากไคคาร์บอนและนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว พบว่าการเจริญหยุดชะงักลง ซึ่งเป็นผลให้ไม่สามารถนำเส้นใยมาศึกษาเกี่ยวกับไอโซไซม์ได้

จากการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ esterase, lactate dehydrogenase, leucine aminopeptidase และ malate dehydrogenase ของเส้นใยโมโนคาร์บอนที่ได้จากสปอร์เดี่ยวทดแทนเส้นใยโมโนคาร์บอนที่ได้จากโปรโตพลาสต์ ใน 100 ตัวอย่าง พบว่ามีลักษณะแถบเอนไซม์ที่แตกต่างกัน 59 แบบ ซึ่งสามารถนำมาจัดกลุ่มของเส้นใยที่มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างกันได้ 10 กลุ่ม

Thesis Title	Protoplasting Techniques and Studies on Isozyme Variations in Monokaryontic Mycelia of <i>Tricholoma crassum</i> (Berk.) Sacc.
Student	Miss Supaporn Jariyuwat
Thesis Adviser	Associate Professor Malinee Tantiyaporn
Level of Study	Master of Science Program in Biotechnology
Department	Applied Biology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
Year	1998

ABSTRACT

The formation and regeneration of protoplasts released from mycelia of *Tricholoma crassum* using lysing enzyme, cellulase and chitinase were studied. The numbers of protoplast released were related to mycelial age, buffer, pH and dose of enzyme. To achieve a better yield, actively growing mycelium on PDB medium, pH 5.5 at 200 rpm for 4 days was used. The greatest numbers of protoplast were obtained when 750 mg of mycelium was incubated for 3.5 hours at room temperature using lytic enzyme prepared by 4.5 ml of 2 mg lysing enzyme, 1 mg cellulase and 0.2 mg chitinase in 0.1 M 2-mercaptoethanol and 0.6 M KCl. Protoplasts released were about 8.22×10^6 p/ml. The regeneration frequency of protoplasts on solid media was 13.77%. In regenerated colonies, the monokaryons grew slower than the dikaryons and the growth stopped after seven days of incubate. Ones protoplasted monokaryon could not used for the study of isozyme variations.

Electrophoretic variation of the enzyme esterase, lactate dehydrogenase, leucine aminopeptidase and malate dehydrogenase has been studied in the monosporous mycelium. One hundred samples studies showed 59 distinct electrophoretic types which could be grouped in ten different genetics groups.

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีเพราะได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ. มานินี ตันติยาภรณ์ ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาซึ่งได้ให้คำปรึกษาและแนะนำผู้วิจัยตลอดมา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์จากท่าน และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. วราภรณ์ กิจวิริยะ รศ. ดร. พรรณี ฐิตาภิขิต และ ดร. อุ๋นเรื่อน ศิริวานิชกุล ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าให้คำปรึกษา ชี้แนะแนวทางรวมทั้งให้ข้อคิดเห็น และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ศูนย์รวมเห็ดบ้านอรุณฤกษ์ ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์หมอบดกเห็ดตีนแรดเพื่อใช้ในการวิจัย คุณประภัสสรณ์ โชคสวนทรัพย์ ที่ได้ให้คำแนะนำและแนวทางในการทำงานวิจัย เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการและเจ้าหน้าที่ห้องธุรการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย สำหรับความอนุเคราะห์ด้านทุนวิจัย รวมทั้งท่านผู้มีอุปการะคุณที่มีจากกล่าวนามได้ครบถ้วน ณ ที่นี้ ที่ได้ช่วยเหลือเป็นกำลังใจ กำลังความคิดตลอดจนให้ความร่วมมือในเรื่องต่าง ๆ เป็นอย่างดี และที่ละเลยมิได้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดาที่ได้สนับสนุนการศึกษา เป็นห่วง และให้กำลังใจตลอดมา

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ บิดา มารดาและผู้มีพระคุณทุกท่าน

สุภาภรณ์ จาริยุวัฒน์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญภาพ	VII
บทที่	
1. บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการศึกษา	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
ขั้นตอนดำเนินงาน	4
2. การตรวจเอกสาร	5
ลักษณะของहे็ดดินแรด	5
การเตรียมโปรโตพลาสติก	11
อิเล็กทรอนิกส์	20
3. ขั้นตอนการดำเนินงาน	28
เครื่องมือและอุปกรณ์	28
วิธีดำเนินการวิจัย	30
- การเตรียมโปรโตพลาสติก	30
- การเพาะเลี้ยงเส้นใยโมโนคาร์บอนจากสปอร์เดี่ยว	33
- การศึกษาไอโซไซม์ของเส้นใยโมโนคาร์บอนจากสปอร์เดี่ยว (SM)	34
4. ผลการทดลอง	39
5. บทสรุปและวิจารณ์	61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
บรรณานุกรม	65
ภาคผนวก	70
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	71
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมโปรโตพลาสต์	73
ภาคผนวก ค การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาไอโซไซม์	75
ภาคผนวก ง การนับโปรโตพลาสต์ด้วย haemocytometer	81
ภาคผนวก จ แสดง electrophoretic type จากเส้นใยสปอร์เดี่ยวของเห็ดดินเรด 100 ตัวอย่าง	83
ประวัติผู้เขียน	87

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ผลการวัดน้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดตีนแรด เมื่อเลี้ยงเส้นใยในอาหารเหลว PDB ที่ระดับ pH 5-7.5	39
2. แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่ได้ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร ($\times 10^4$) ในช่วงระยะเวลา 1-5 ชั่วโมง เมื่อใช้ lytic enzyme ที่มีส่วนผสมของ lysing enzyme และ cellulase ในปริมาณ 1, 2 และ 3 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร	40
3. แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่ได้ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร ($\times 10^6$) ในช่วงระยะเวลา 1-5 ชั่วโมง เมื่อใช้ lytic enzyme ที่มีส่วนผสมของ lysing enzyme 2 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร, cellulase 1 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร และ chitinase ในปริมาณ 0.1-0.5 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร	41
4. ผลของสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ระดับ pH ต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเตรียมโปรโตพลาสต์ของเส้นใยเห็ดที่มีอายุ 4 วัน โดยใช้ปริมาณเส้นใย 750 มิลลิกรัม และใช้ lysing enzyme, cellulase และ chitinase ในอัตราส่วน 2:1:0.2 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร	42
5. ผลการสร้างผนังเซลล์ใหม่ของโปรโตพลาสต์เมื่อเลี้ยงในอาหาร regenerating medium ที่มีการเติมวุ้น 3 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เทคนิคการเททับด้วยอาหารที่มีการเติมวุ้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ระยะเวลา 2 วัน	43
6. ผลการสร้างผนังเซลล์ใหม่ของโปรโตพลาสต์เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว regenerating medium โดยใช้ระยะเวลา 2 วัน	44
7. แสดงลักษณะแถบเอนไซม์ (ETs) 59 แบบ ในเส้นใยที่ได้จากสปอร์เดี่ยวของเห็ดตีนแรด	52
8. แสดงการแบ่งกลุ่มของเส้นใยที่มีลักษณะแถบเอนไซม์ใกล้เคียงกัน	55
9. แสดง electrophoretic type จากเส้นใยสปอร์เดี่ยวของเห็ดตีนแรด 100 ตัวอย่าง	83

สารบัญญภาพ

หน้า

1. กลุ่มดอกเห็ดดินแรด	6
2. สปอร์ของเห็ดดินแรด เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า	7
3. เส้นใยเห็ดดินแรด เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า	7
4. แสดงแรงกระทำต่าง ๆ ที่มีต่อโมเลกุลที่มีประจุในสนามไฟฟ้า	21
5. แสดงผลของ pH ที่มีต่อการแสดงประจุของหมู่อะมิโนและคาร์บอกซิลของไกลซีน	23
6. อิเล็กโตรโฟรีซิสแบบต่าง ๆ	26
7. โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเส้นใยเห็ดดินแรด เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า	41
8. โปรโตพลาสต์ที่กำลังออกเป็นเส้นใย เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า	43
9. เปรียบเทียบลักษณะการเจริญเติบโตของเส้นใยที่ได้จากโปรโตพลาสต์ชนิด ไมโนคาร์ร็อน (PM) และชนิด ไดคาร์ร็อน (PD) เมื่อเลี้ยงเส้นใยเป็นระยะเวลา 7 วัน	45
10. เมซิติโอสปอร์ที่กำลังออกเป็นเส้นใย เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า	46
11. แถบที่ได้จากการย้อมสีของเอนไซม์ esterase ของเส้นใยที่ได้จากสปอร์เดี่ยว no. 31-45	47
12. แถบที่ได้จากการย้อมสีของเอนไซม์ lactate dehydrogenase ของเส้นใยที่ได้จากสปอร์เดี่ยว no. 1-15	48
13. แถบที่ได้จากการย้อมสีของเอนไซม์ leucine aminopeptidase ของเส้นใยที่ได้จากสปอร์เดี่ยว no. 16-30 และ 46-60	49
14. แถบที่ได้จากการย้อมสีของเอนไซม์ malate dehydrogenase ของเส้นใยที่ได้จากสปอร์เดี่ยว no. 31-45 และ 61-75	50
15. แสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างลักษณะแถบเอนไซม์ทีละคู่ทั้งหมด 1,711 คู่ จากลักษณะแถบเอนไซม์ 59 แบบ	60

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เห็ดดินเรดเป็นเห็ดรับประทานได้ มีดอกขนาดใหญ่ สีขาว มีคุณสมบัติไม่ย่อยตัวเอง (autolysis) คุณภาพของเห็ดเป็นรองเฉพาะเห็ดโคน เมื่อนำเห็ดชนิดนี้มาประกอบอาหาร จะมีรสหวาน กลิ่นหอม เนื้อกรุบ รสอร่อย ในรูปเห็ดสดสามารถเก็บได้ในตู้เย็นนาน 1 สัปดาห์ เมื่อทำเป็นเห็ดแห้ง คุณภาพและรสชาติเปลี่ยนแปลงน้อยมาก คุณสมบัตินี้ดีเหล่านี้ทำให้เห็ดดินเรดเป็นเห็ดที่น่าสนใจ และน่าจะเป็นเห็ดเศรษฐกิจในอนาคต ถ้าได้รับการส่งเสริมและการประชาสัมพันธ์ที่ดี

การคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์เห็ดดินเรด โดยใช้เทคนิคสมัยใหม่เข้ามาร่วมประยุกต์ใช้กับวิธีการทางธรรมชาตินี้ยังไม่มีผู้ใดจัดทำ ส่วนใหญ่มักจะนำเห็ดมาเพาะให้ได้เส้นใยและขยายพันธุ์เส้นใยใส่ถุงเพื่อให้เกิดดอกเห็ด ปัญหาหลายประการที่เกิดขึ้นจากการขยายเส้นใยหลาย ๆ ครั้ง ทำให้เส้นใยเห็ดอ่อนแอ ส่งผลให้ผลผลิตลดลง การคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพจะต้องศึกษาคุณสมบัติทางพันธุกรรม ลักษณะการผสมพันธุ์และสภาวะแวดล้อมอื่น ๆ ที่เหมาะสมควบคู่กันไป

การผลิตดอกเห็ดเกิดขึ้นได้เฉพาะการผสมพันธุ์ทางเพศเท่านั้น เส้นใยของเห็ดที่มียีนคู่ผสมพันธุ์ (mating type) ที่แตกต่างกันจึงจะสามารถผสมพันธุ์กันได้ดอกเห็ด ในการผสมพันธุ์จะต้องนำเส้นใยชนิดโมโนคารีออนซึ่งคัดเลือกจากสปอร์เดี่ยวหรือการใช้เทคนิคโปรโตพลาสต์มาทำการผสมพันธุ์ทีละคู่ จากนั้นพิจารณาการเกิด clamp connection ในแต่ละคู่ คู่ผสมใดที่เกิด clamp connection จะเป็นคู่ผสมที่ให้ดอกเห็ดหรือผสมกันได้ (compatibility) และคู่ผสมพันธุ์ใดที่ไม่เกิด clamp connection จะผสมพันธุ์ไม่ได้ (incompatibility) และไม่เกิดดอกเห็ด ข้อมูลของคู่ผสมเหล่านี้จะถูกนำมาวิเคราะห์ลักษณะการผสมพันธุ์ว่าเป็นแบบโฮโมทัลลิก (homothallic) หรือเฮเทอโรทัลลิก (heterothallic)

จากความสำคัญของเห็ดดินเรดจะพบว่าถ้าสามารถแยกเส้นใยบริสุทธิ์ชนิดโมโนคารีออนแล้วนำเส้นใยเหล่านี้มาศึกษาวิเคราะห์คุณสมบัติของเส้นใยในด้านการเจริญ ความแข็งแรง ความคงทนต่อสภาพแวดล้อมที่แปรเปลี่ยนและศึกษาหาวิธีในไทป์ของคู่ผสมพันธุ์ของเห็ดได้แล้วจะพบว่าเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เส้นใยชนิดโมโนคาร์บอนที่มีคุณสมบัติที่ดีจะสามารถถูกนำมาขยายพันธุ์ และเก็บเส้นใยใน โนโตรเจนเหลวได้นาน ๆ เมื่อต้องการผลิตก็สามารถนำเส้นใยที่ศึกษานี้มาทำการผลิตดอกเห็ดต่อไป ซึ่งขั้นตอนและวิธีเหล่านี้จะรักษาคุณภาพและผลผลิตได้สม่ำเสมอและใช้ได้ผลดีในเชิงพาณิชย์

ด้วยความสำคัญของการศึกษาเส้นใยชนิดโมโนคาร์บอนนี้เอง จึงได้นำเทคนิคการทำ โพรโตพลาสติกมาร่วมประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต ซึ่งมีผลดีคือสามารถนำเส้นใยมา แยกโปรโตพลาสติกได้ทันที ส่วนวิธีการอื่น ๆ เช่นการเพาะเลี้ยงเส้นใยจากสปอร์เดี่ยวจะต้องรอเก็บ สปอร์ซึ่งจะใช้ระยะเวลาที่ยาวนานกว่า การใช้เทคนิคไอโซไซม์วิเคราะห์รูปแบบหลายชนิดบน ตัวกลางค้ำจุน จะช่วยคัดแยกเส้นใยที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมเก็บไว้ศึกษาคุณสมบัติ อื่น ๆ ต่อไป ด้วยเทคนิคต่าง ๆ เหล่านี้จะเป็นแนวทางช่วยส่งเสริมการผลิตเส้นใยเห็ดและผลิตเห็ด ในโรงเรือนที่จะกระทำได้ดีตลอดปีเช่นเดียวกับที่มีการศึกษาในด้านการผลิตเห็ดฟาง เห็ดหอม เห็ดหลินจือ และเห็ดที่นิยมรับประทานหลายชนิด

อิเล็กโตรฟอริซิสเป็นวิธีการหนึ่งที่น่ามาใช้ศึกษาการหาน้ำหนักโมเลกุลและชนิดของ โปรตีนและกรดนิวคลีอิก สามารถแยกชนิดของโปรตีนและขนาดออกจากกันในสนามไฟฟ้าโดย อาศัยความแตกต่างของชนิด ปริมาณของประจุ ขนาดและรูปร่างของโปรตีน เทคนิคอิเล็กโตร- ฟอริซิสจะมีตัวกลางรองรับโปรตีนและกรดนิวคลีอิกที่ผ่านไปในสนามไฟฟ้า ตัวกลางที่ใช้ได้แก่ starch gel, agarose gel และ polyacrylamide gel (วัฒนาลัย และสรวง, 2536)

โปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโนต่อกันเป็นสายเปปไทด์ หลายสายของเปปไทด์ประกอบ เป็นโครงสร้างโปรตีนที่ซับซ้อนขึ้น เช่น secondary structure, tertiary structure และ quaternary structure กรดอะมิโนในโปรตีนชนิดหนึ่ง ๆ จะถูกควบคุมโดยรหัสพันธุกรรมของยีนสำหรับเฉพาะ กรดอะมิโนชนิดนั้น ๆ การสังเคราะห์โปรตีนที่เกิดขึ้นอยู่ในความควบคุมของยีนและการแสดงออก ของยีนในรูปผลิตผลของโปรตีน (Pasteur และคณะ, 1988)

โปรตีนหลายชนิดมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงจับสเตรท (substrate) ให้เป็นผลิตผล (product) ในปฏิกิริยาอาจมีโคแฟกเตอร์ (co-factor) ที่เหมาะสมและ สามารถเชื่อมต่อกับสารที่ให้สี เกิดปฏิกิริยาได้แถบสี (banding) แถบสีปรากฏให้เห็นได้จากการใช้ แสงอุลตราไวโอเลตตรวจสอบหรือให้ปรากฏชัดเจนบนตัวกลางค้ำจุน ด้วยหลักการและคุณสมบัติ ของโปรตีนข้างต้น จึงสามารถศึกษายีนในรูปของยีนโอบีที่ควบคุมชนิดต่าง ๆ ของโปรตีนได้

ไอโซไซม์อิเล็กโตรฟอริซิส (isozyme electrophoresis) เป็นวิธีการหนึ่งที่จะแสดงข้อมูลและ วิเคราะห์ข้อมูลเกี่ยวกับการแสดงออกของยีนในรูปการสังเคราะห์โปรตีนโดยเกิดแถบสีบนตัวกลาง ค้ำจุน แถบสีที่ปรากฏจะมีแบบแผนเฉพาะ ซึ่งสามารถบ่งให้ทราบว่ายีนที่ควบคุมการสังเคราะห์

โปรตีนมีเพียง 1 ยีน หรือหลายยีน ยีนไทป์ที่ปรากฏประกอบด้วยอัลลีลชนิดใดและเป็นแบบโฮโมไซกัส (homozygous) หรือเฮเทอโรไซกัส (heterozygous)

เมื่อทำอิเล็กโตรโฟรีซิสของเอนไซม์ esterase, lactate dehydrogenase, leucine aminopeptidase และ malate dehydrogenase ของเส้นใยจะปรากฏแถบสีบนตัวกลางค้ำจุนในรูปแบบต่าง ๆ กัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะพันธุกรรมภายในเส้นใยนั้น ๆ และการเคลื่อนที่ของโปรตีนบนเจลที่แตกต่างกัน เป็นผลจากน้ำหนักโมเลกุล ขนาด และประจุที่แตกต่างกัน

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. ศึกษาวิธีการเตรียมโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดตีนแรด
2. ศึกษาสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมโปรโตพลาสต์ เช่น อายุเส้นใย น้ำหนักแห้ง ระดับความเป็นกรดค่าของสารละลาย ความเข้มข้นของเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ และระยะเวลาในการย่อยผนังเซลล์
3. ศึกษาการสร้างผนังเซลล์ใหม่ของโปรโตพลาสต์ และคัดแยกเฉพาะเส้นใยชนิดโมโนคารีออน (protoplasted monokaryon หรือ PM)
4. ศึกษาการเพาะเลี้ยงเส้นใยชนิดโมโนคารีออนจากการคัดแยกสปอร์เดี่ยว (sporulated monokaryon หรือ SM)
5. ศึกษาเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสชนิด agarose gel electrophoresis
6. ศึกษาความแตกต่างแปรผันของ isozyme pattern ของเอนไซม์ชนิดต่างๆ คือ esterase, lactate dehydrogenase, leucine aminopeptidase และ malate dehydrogenase จากเส้นใยโมโนคารีออน
7. วิเคราะห์ลักษณะพันธุกรรมจากแบบแผนของไอโซไซม์เพื่อคัดเส้นใยที่มีลักษณะพันธุกรรมแตกต่างกันเก็บไว้สำหรับศึกษาในคู่ผสมพันธุ์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. การศึกษาวิธีการเตรียมโปรโตพลาสต์ และการสร้างผนังเซลล์ใหม่เป็นวิธีการที่รวดเร็ว และจะเป็นประโยชน์ในการขยายพันธุ์เส้นใยโมโนคารีออน ไดคารีออน จากเห็ดชนิดต่าง ๆ ที่เก็บจากธรรมชาติ เพื่อคัดเลือกพันธุ์และนำไปประยุกต์ใช้ในการผสมพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์เห็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การคัดเลือกและเพาะเลี้ยงเส้นใยชนิดโมโนคาร์บอนจากการใช้เทคนิคโปรโตพลาสต์ และจากสปอร์เดี่ยว สามารถนำเส้นใยไปศึกษาคุณสมบัติในด้านต่าง ๆ เช่น รูปร่าง ลักษณะ อัตราการเจริญ ความแข็งแรงของเส้นใย และคุณสมบัติทางชีวเคมี เก็บไว้เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ สำหรับการศึกษาดูสอบยีนโอโตปีของยีนคู่ผสมพันธุ์ (mating type) เพื่อประโยชน์ในการผสมพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์
3. เพื่อแสดงว่าหลักการของอิเล็กโตรโฟรีซิสชนิด agarose gel สามารถใช้เป็นเทคนิคในการวิเคราะห์คุณสมบัติทางชีวเคมีของสารภายในเส้นใยเห็ด
4. รูปแบบของไอโซไซม์ esterase, lactate dehydrogenase, leucine aminopeptidase และ malate dehydrogenase ที่ปรากฏบนอะกาโรสเจลจากการใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสของเส้นใยโมโนคาร์บอนที่คัดแยกมานั้น สามารถนำมาแสดงความแตกต่างของลักษณะพันธุกรรมในการสังเคราะห์โปรตีน เพื่อใช้ประโยชน์ในการคัดแยกกลุ่มของเส้นใยออกจากกัน

ขั้นตอนดำเนินงาน

1. ศึกษาการเพาะเลี้ยงเส้นใยจากสปอร์เดี่ยวและจากเนื้อเยื่อคอกเห็ดดินแร็ด เพื่อให้ได้เส้นใยสำหรับการทำโปรโตพลาสต์
2. ศึกษาถึงเทคนิคการเตรียมโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ด และชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายผนังเซลล์ รวมทั้งสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมในการเตรียมโปรโตพลาสต์
3. ศึกษาถึงวิธีที่ทำให้เกิดการสร้างผนังเซลล์ใหม่ของโปรโตพลาสต์
4. การขยายพันธุ์เส้นใยบนอาหารเหลวและอาหารแข็ง
5. เตรียมเส้นใยสำหรับการศึกษาด้านอิเล็กโตรโฟรีซิส
6. เตรียมสารละลาย และปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมสำหรับเส้นใยเห็ดดินแร็ดเพื่อสามารถวิเคราะห์คุณสมบัติทางชีวเคมีบนตัวกลางจำฐานชนิด agarose gel
7. ศึกษาความแตกต่างของ isozyme pattern ของเอนไซม์ esterase, lactate dehydrogenase, leucine aminopeptidase และ malate dehydrogenase
8. คัดแยกสายพันธุ์ของเส้นใยเห็ดชนิดที่มี isozyme pattern แตกต่างกันเก็บไว้เป็นสายพันธุ์สำหรับการศึกษาด้านพันธุศาสตร์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ลักษณะของเห็ดตีนแรด

เห็ดที่ทำการศึกษาคือเห็ดตีนแรด มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Tricholoma crassum* (Berk.) Sacc. ชื่อสามัญคือ เห็ดตีนแรด, เห็ดจั่น และเห็ดดับเต่าขาว อยู่ใน Class Basidiomycetes, Subclass Holobasidiomycetidae, Order Agaricales, Family Tricholomataceae, Genus *Tricholoma*, Species *crassum* เห็ดสกุล *Tricholoma* เกือบทั้งหมดพบในเขตอบอุ่น มีเพียง 2-3 สปีชีส์เท่านั้นที่พบในเขตร้อน

เห็ดตีนแรดจัดเป็นเห็ดที่มีขนาดใหญ่ สามารถเจริญเติบโตได้ดีทั่วทุกภูมิภาคของประเทศ ไทย เห็ดชนิดนี้สามารถนำมารับประทานเป็นอาหารได้ หมวกดอกมีขนาดใหญ่ เมื่อกางออกเต็มที่จะมีลักษณะคล้ายร่ม ผิวของหมวกดอกเรียบ ก้านดอกมีขนาดใหญ่ (ภาพที่ 1) เห็ดชนิดนี้มีรสชาติ คลิ้นหอม เนื้อเหนียว คุณภาพของเห็ดตีนแรดจะเป็นรองเฉพาะเห็ดโคนเท่านั้น เห็ดตีนแรดจัดเป็นเห็ดที่เจริญเติบโตได้ดีบนพื้นดินที่มีใบไม้สุุพังทับถมอยู่และในพื้นที่ที่ดินมีการระบายน้ำดี บริเวณทุ่งหญ้าหรือป่าโปร่ง โดยเฉพาะในพื้นที่ที่มีต้นไม้ใหญ่ ๆ ถูกโค่นและทิ้งส่วนของรากไว้ในดิน เมื่อต้นไม้เริ่มผุเห็ดตีนแรดก็จะเจริญเติบโตตามรากไม้หรือตามพื้นดินที่มีอินทรีย์วัตถุ หลังจากที่ถูกโค่นและมีสภาพความชื้นที่เหมาะสม เห็ดตีนแรดก็จะเจริญและสร้างดอกเห็ด โผล่พ้นพื้นดินขึ้นมาเป็นกลุ่ม ๆ บางครั้งมีความสูงถึง 2 ฟุต (ปัญญา, 2532) เห็ดชนิดนี้มองดูผิวเผินคล้ายเห็ดดับเต่าดำ ข้อแตกต่างที่ทำให้จัดไว้คนละวงศ์ คือ ตรีบหมวกของเห็ดดับเต่าดำมีรูขนาดเส็กคล้ายรวงผึ้งสีเหลือง แต่ในเห็ดดับเต่าขาวไม่มีรู (อนงค์, 2530)

ลักษณะของดอกเห็ดประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังนี้ คือ หมวกดอกของเห็ดตีนแรดในขณะที่ยังไม่บานเต็มที่ มีลักษณะเป็นรูปครึ่งวงกลมคว่ำ (convex) ขอบหมวกม้วนเข้าด้านในจากนั้นจะค่อย ๆ เจริญแผ่ขยายออก หมวกดอกเมื่อแผ่ขยายออกและเจริญเติบโตเต็มที่จะมีขนาดตั้งแต่ 3.1-12.5 เซ็นติเมตร ผิวหมวกด้านบนเรียบ สีขาว แต่เมื่อแก่จัดอาจเปลี่ยนเป็นสีครีมอ่อน หมวกดอกมีความหนา 1-3 เซ็นติเมตร เนื้อของหมวกดอกด้านในมีสีขาว ตรีบดอกของเห็ดตีนแรดมีจำนวนมากน้อยขึ้นอยู่กับขนาดของหมวกดอก จำนวนตรีบดอกด้านบนที่ขอบจะมีประมาณ 20-25 ตรีบต่อความยาว 1 เซ็นติเมตร ตรีบดอกจะเรียงกันเป็นรัศมีรอบก้านดอก ตรีบดอกของเห็ดตีนแรดจะเปราะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยญาติเห็นาใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 1



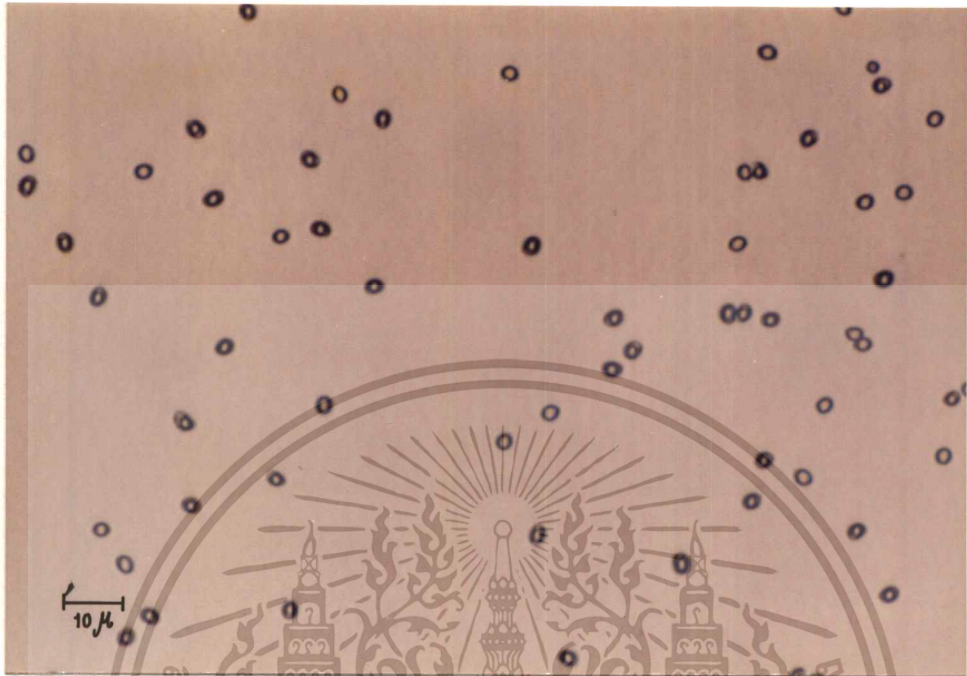
กลุ่มดอกเห็ดตีนแรด

และขาดง่าย ส่วนใหญ่ครีบดอกเป็นอิสระจากก้านดอก ก้านดอกของเห็ดตีนแรดมีสีขาว ปลายก้านด้านบนติดอยู่ที่ตรงกึ่งกลางของหมวกดอก ก้านดอกจะตรงหรือโค้งเล็กน้อยมีความยาวตั้งแต่ 7-24 เซ็นติเมตร ดอกเห็ดที่มีหมวกดอกใหญ่จะมีก้านดอกยาว ที่โคนก้านดอกจะใหญ่กว่าส่วนที่อยู่ติดกับหมวกดอกเล็กน้อย เมื่อดอกเห็ดแก่เนื้อเยื่อที่โคนก้านดอกจะเปลี่ยนเป็นสีเนื้อหรือสีชมพูอ่อน และเนื้อเยื่อที่โคนก้านดอกจะมีลักษณะยึดหยุ่นและसानกันโปร่ง ๆ ไม่เหนียวเหมือนกับเห็ดชนิดอื่น ที่บริเวณตรงกลางของก้านดอกเนื้อเยื่อจะมีลักษณะเป็นเส้นและมีรูเล็ก ๆ คล้ายเห็ดฟาง เห็ดตีนแรดเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่จะมีการสร้างสปอร์ที่บริเวณครีบดอก สปอร์มีสีขาว มีรูปร่างเป็นรูปไข่ ขนาด 5-6.5 x 6.5-7.5 ไมโครเมตร (ปัญญา, 2532) ดังแสดงในภาพที่ 2 เส้นใยเมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ เส้นใยสี ไม่มีสี เป็นท่อยาวแตกกิ่งก้าน ภายในมี septum กั้นเป็นระยะ ทำให้เส้นใยแบ่งออกเป็น hyphal segment (ภาพที่ 3) ที่บริเวณ septum มีการสร้าง clamp connection

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดตีนแรดในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ พบว่าเส้นใยเห็ดเจริญเติบโตได้ดีที่สุดบนอาหารวุ้น PDA ระดับ pH ที่เส้นใยเจริญได้เร็วที่สุดที่ pH 6 และเส้นใยเห็ดตีนแรดเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (วสันต์, 2522)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 2



สปอร์ของเห็ดตีนแรด เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

ภาพที่ 3



เส้นใยเห็ดตีนแรด เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะการสืบพันธุ์ทางเพศเป็นแบบ heterothallic โดยมียีนที่ควบคุมการผสมพันธุ์เป็น tetrapolar (วสันต์, 2522) ยีนที่ควบคุมการผสมพันธุ์มีอยู่ 2 ชุดคือ A และ B ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคนละแท่ง เบซิดิโอสปอร์จึงมี mating type ต่างกันได้ 4 แบบ คือ A_1B_1 , A_1B_2 , A_2B_1 และ A_2B_2 การผสมพันธุ์จะเกิดเป็นดอกเห็ดได้เฉพาะคู่ผสมพันธุ์ $A_1B_1 \times A_2B_2$ และ $A_1B_2 \times A_2B_1$ คู่ผสมพันธุ์อื่น ๆ เช่น $A_1B_1 \times A_2B_1$, $A_1B_1 \times A_1B_2$, $A_2B_2 \times A_2B_1$ และ $A_2B_2 \times A_1B_2$ ได้เฉพาะเส้นใยเกิดขึ้นเท่านั้น

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเห็ดตีนแรด

ถ้าภาและคณะ (2514) ได้รายงานการทดลองเพาะเห็ดตีนแรดเป็นผลสำเร็จเป็นครั้งแรก โดยใช้ปุ๋ยหมัก และวิธีการปิดผิวหน้า (casing) ด้วยดินร่วนปนทรายผสมกับถ่านไม้ จากการทดลองปรากฏว่าสามารถเพาะปลูกเห็ดตีนแรดได้บนวัสดุเพาะปลูกหลายชนิด ได้แก่ เปลือกถั่วลิสง ขี้เลื่อยหมักกับมูลม้า ขี้เลื่อยผสมกับเมล็ดข้าวโพดป่นหรือเมล็ดข้าวฟ่างป่น ส่วนบนขี้เลื่อยหมักกับมูลไก่ การเจริญของเห็ดมีน้อยมาก

พันธุ์ทวีและคณะ (2517) เพาะเห็ดตีนแรดโดยใช้ฟางสับเป็นฟ่อน ๆ แห่น้ำให้ชุ่ม นำไปรองพื้นกะบะที่ใช้เพาะ จากการศึกษาต่อมาพันธุ์ทวี (2518-2519) รายงานว่าเห็ดตีนแรดสามารถเจริญได้ดีในปุ๋ยหมักที่ประกอบด้วยเปลือกเมล็ดนุ่นผสมกับขังข้าวโพดป่น

พันธุ์ทวีและคณะ (2518-2519) สามารถเพาะเห็ดตีนแรดโดยไม่ต้องใช้วิธีการปิดผิวหน้าด้วยดิน โดยปุ๋ยหมักที่ใช้ประกอบด้วยฟางสับและขังข้าวโพดป่น

ตีพร้อม (2519, 2520) ทดลองเพาะเห็ดตีนแรดโดยใช้ถุงพลาสติกเป็นผลสำเร็จ และพบว่าเห็ดตีนแรดสามารถเจริญได้ดีในวัสดุเพาะปลูกหลายชนิด คือ ฟางสับผสมกับขังข้าวโพดป่น ขังข้าวโพดป่นล้วน ใส่นุ่นล้วน ฟางสับล้วน ฟางสับกับขี้ม้าหรือปุ๋ยเคมี และถ้าเติมรำละเอียด 3 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก เห็ดตีนแรดจะเจริญได้ดีขึ้น

สุกชัย (2520-2521) รายงานว่าเห็ดตีนแรดเจริญได้ดีบนขี้เถ้าล้วน ฟางสับผสมกับขี้เลื่อยไม้เนื้ออ่อนและรำ

ในการทำหัวเชื้อเห็ด (spawn) เพื่อใช้ในการเพาะปลูกนั้น ฌรงค์ (2501) รายงานว่าเส้นใยของเห็ดตีนแรดเจริญได้ดีบนเมล็ดบัวหมักกับมูลม้า หรือมูลม้าหมักกับขี้เลื่อยไม้ยาง ส่วนถ้าภาและคณะ (2514, 2516) รายงานว่าถ้าใช้ขี้เลื่อยหมักกับมูลวัว เชื้อราเจริญได้ช้ากว่าปุ๋ยหมักที่ประกอบด้วยเมล็ดบัวหมักกับมูลม้า หรือขี้เลื่อยหมักกับมูลม้าสด และถ้าใช้ขี้เลื่อยอย่างเดียวเชื้อเห็ดจะเจริญได้น้อยมาก

พันธุ์ทวีและคณะ (2516) ทำห้วเชื้อเห็ดดินแระด โดยใช้ฟางปนผสมกับซังข้าวโพดปนและกากเมล็ดฝ้ายในอัตราส่วนเท่ากัน ผสมกับเมล็ดข้าวโพดปน, ดินเลน, ดินร่วน หมักกับน้ำปัสสาวะ นอกจากนี้พันธุ์ทวีและคณะ (2518-2519) ทดลองทำห้วเชื้อเห็ดดินแระดในอาหาร 38 สูตร พบว่าเชื้อเห็ดเจริญได้ดีในอาหารที่ประกอบด้วยกากเมล็ดฝ้าย หมักกับเชื้อแบคทีเรียปมถั่ว จากนั้นนำมาผสมกับรำ และเมล็ดข้าวโพดปน

วสันต์และวิจัย (2530 a) ได้ทดลองเพาะเห็ดดินแระดในถุงพลาสติกทนร้อน โดยใช้วัสดุเพาะปลูกธรรมชาติ 8 ส่วนผสม ซึ่งมีซังข้าวโพดปนเป็นหลัก เห็ดดินแระดสามารถเจริญและให้ผลผลิตดอกเห็ดสูงสุด เมื่อใช้ส่วนผสมซึ่งประกอบด้วยซังข้าวโพดปน, ขี้เลื่อย และเมล็ดข้าวโพดปน การปิดผิวหน้าก้อนเชื้อ (casing) ด้วยดินร่วนทำให้เห็ดดินแระดออกดอกได้รวดเร็ว และให้ผลผลิตดอกเห็ดสูงกว่าเมื่อไม่มีการปิดผิวหน้าก้อนเชื้อ ดินร่วนที่ pH 8.4 และ 8.9 จัดเป็นวัสดุปิดหน้าก้อนเชื้อที่ให้ผลดีที่สุด

การเพาะก้อนเชื้อเห็ดดินแระดสามารถกระทำได้โดยขยายพันธุ์เส้นใยจากเนื้อเยื่อดอกเห็ดที่มีลักษณะของดอกดี ขนาดใหญ่ หรือเพาะจากสปอร์ของดอกเห็ด มีหลายบริษัทในประเทศไทยที่ผลิตก้อนเชื้อเห็ดดินแระดโดยวิธีนี้ และจำหน่ายออกทั้งในรูปก้อนเชื้อเห็ดและดอกเห็ด (ปัญญา, 2532) เส้นใยของเห็ดดินแระดสามารถขึ้นได้กับอาหารแข็งหลายชนิดบนจานเลี้ยงเชื้อ เช่น PDA, malt extract agar, Crapeks's solution agar, glucose peptone agar และ water agar (วสันต์, 2522)

Fries (1954) ได้ทดสอบการงอก basidiospore ของเห็ด *Tricholoma* พบว่าเมื่อผสม basidiospore กับ malt extract agar (MA) แล้วบ่มด้วยยีสต์ "Hefe X" (yeast "X" unidentified) สปอร์สามารถงอกได้ นอกจากยีสต์ "Hefe X" แล้วยังพบด้วยว่ายีสต์ *Torulopsis sanguinea* (Schimon) Cif. & Red. สามารถกระตุ้นการงอกของ basidiospore ได้เช่นเดียวกับยีสต์ "Hefe X"

วสันต์และวิจัย (2530 b) รายงานว่า basidiospore ของเห็ดดินแระดสามารถงอกได้บนอาหาร PDA และ MA เมื่อมีเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เจริญร่วมอยู่ด้วย เปอร์เซ็นต์การงอกบนอาหาร PDA จะสูงกว่าอาหาร MA ในที่ที่มีอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอกสูงถึง 24.27 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังกการบ่มเชื้อเป็นเวลา 3 วัน

ในการเพาะเลี้ยงเส้นใยของเห็ดดินแระด นอกเหนือจากการเพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อเห็ดแล้ว อีกวิธีหนึ่งที่สามารถกระทำได้ก็คือการเพาะเลี้ยงจากสปอร์ของเห็ดโดยตรง เส้นใยที่เตรียมได้จากสปอร์เดี่ยวนี้ เรียกว่า homokaryon isolate (วสันต์และวิจัย, 2530 b)

ในการทดลองผสมพันธุ์ระหว่างเชื้อเห็ดดินแระด 12 homokaryotic isolates ปรากฏว่าเห็ดดินแระดมีลักษณะการผสมพันธุ์แบบ heterothallic โดยมียีนที่ควบคุมการผสมพันธุ์เป็น tetrapolar และมี 2 คู่ คือ ยีน A และยีน B ซึ่งอยู่ต่างโครโมโซมกัน และจากการวิเคราะห์หา mating type เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเชื้อเห็ดทั้ง 12 isolates นี้ ปรากฏว่าได้พวกที่มี mating type A_1B_1 , A_2B_2 , A_1B_2 และ A_2B_1 อย่างละ 2, 1, 3 และ 6 isolates ตามลำดับ (วสันต์และวิชัย, 2530 c) สำหรับคู่ผสมที่ไม่ให้ดอกเห็ด และจะพบลักษณะการเจริญของเส้นใยที่พบกันเป็นแบบ barrage และ flat (Papazian, 1950) ลักษณะการเจริญของเส้นใยที่นำมาแยกความแตกต่างของยีนคู่ผสมนี้ ได้นำมาใช้กำหนดยีนคู่ผสมพันธุ์ของเห็ดชนิดต่าง ๆ (Eugenio and Anderson, 1968 ; Raxon and Jong, 1977 ; Wang and Anderson, 1972) คู่ผสมพันธุ์ที่ให้ลักษณะการเจริญของเส้นใยเป็นแบบ flat พบว่าบริเวณที่เส้นใยพบกันจะมีการเจริญของเส้นใยแผ่ไปตามปกติ แต่มี aerial hyphae น้อย ยีนโคโนไทป์ของคู่ผสมเป็นแบบ $A_1B_2 \times A_1B_1$ และ $A_2B_2 \times A_2B_1$ สำหรับคู่ผสมแบบ barrage จะพบลักษณะเป็นร่องระหว่างเส้นใยคู่ผสม ยีนโคโนไทป์คู่ผสมเป็นแบบ $A_1B_2 \times A_2B_2$ และ $A_1B_1 \times A_2B_1$ การผสมพันธุ์ของเห็ดที่เกิดขึ้น แสดงให้ทราบว่ายีน B ควบคุมการเคลื่อนที่ของนิวเคลียส และยีน A ควบคุมการจับคู่ของนิวเคลียสและการสร้าง clamp connection (Chang and You, 1971 ; Raper, 1960)

พันธุ์ทวี (2518-2519) ทดลองเลี้ยงเห็ดดินแรดบนอาหารรุ้นพบว่าเส้นใยของเห็ดดินแรดสามารถเจริญได้ดีบนอาหารที่ประกอบด้วย wort agar, มันฝรั่ง, ยีสต์สกัด, น้ำตาลกลูโคส และรุ้น การเตรียมโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ดดินแรดพบว่าเอนไซม์ที่ย่อยผนังเซลล์ประกอบด้วย ส่วนผสมของ novozyme 234 และ cellulase สภาวะของสารละลายประกอบด้วย 0.6 M KCl เป็น stabilizer และ 0.1 M ของ 2-mercaptoethanol ซึ่งช่วยให้เอนไซม์ทำงานดียิ่งขึ้น (มาลินีและคณะ, 2536)

แสงมณีและคณะ ได้เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และผลผลิตของเชื้อเห็ดดินแรดจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย ได้แก่ สายพันธุ์จากจังหวัดขอนแก่น, สายพันธุ์จากอำเภอบางเขน กทม. 2 สายพันธุ์, สายพันธุ์จากเชียงใหม่ 2 สายพันธุ์, สายพันธุ์จากชยันนาท และสายพันธุ์จากสกลนคร 2 สายพันธุ์ พบว่าแต่ละสายพันธุ์ให้ดอกเห็ดที่มีขนาดหมวกไม่แตกต่างกันมากนัก แต่สายพันธุ์ขอนแก่นและสายพันธุ์ชยันนาทให้ดอกเห็ดที่มีก้านสั้น นอกจากนี้การเกิดดอกของสายพันธุ์ขอนแก่นและเชียงใหม่ทั้ง 2 สายพันธุ์ ส่วนใหญ่เกิดรวมกันเป็นกลุ่มใหญ่ ส่วนผลผลิตสายพันธุ์บางเขน #2 และสายพันธุ์ชยันนาทให้น้ำหนักผลผลิตสูงที่สุด และการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตพบว่า สายพันธุ์ขอนแก่นเจริญเติบโตได้ดีที่สุดอุณหภูมิ 36.0 องศาเซลเซียส, สายพันธุ์บางเขน #1 ที่อุณหภูมิ 34.5 องศาเซลเซียส และสายพันธุ์บางเขน #2 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

การเตรียมโปรโตพลาสต์ (protoplast preparation)

คำว่า โปรโตพลาสต์ ใช้มาตั้งแต่ ค.ศ.1953 เพื่อเรียกโครงสร้างของแบคทีเรียที่เหลือ หลังจากลอกหรือละลายเอาผนังเซลล์ออก ปัจจุบันหมายความรวมถึงเซลล์พืช ยีสต์ รา หรือแบคทีเรียด้วย ซึ่งโครงสร้างที่เหลือหรือเซลล์เปลือยนี้บอบบางมาก แฉก และสลายตัวได้ง่าย ทั้งยังไวต่อการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมติกภายนอกอีกด้วย

โครงสร้างที่ได้จากการลอกผนังเซลล์ออก แบ่งได้ 2 ประเภท คือ

1. สเฟียร์โพลาสต์ (sphaeroplast) คือโปรโตพลาสต์ที่ยังคงมีส่วนของผนังเซลล์ติดอยู่ (นงพงา, 2530) มีความคงตัวอยู่บ้าง

2. โปรโตพลาสต์ (protoplast) คือโปรโตพลาสต์ที่สมบูรณ์ ไม่มีส่วนของผนังเซลล์หลงเหลืออยู่เลย มีเพียงเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) หรือเซลล์เมมเบรน (cell membrane) ห่อหุ้ม cytoplasm อยู่เท่านั้น (ประสาทร, 2526) ปกติโปรโตพลาสต์จะมีกิจกรรมการสังเคราะห์สารต่าง ๆ น้อยกว่าเซลล์ปกติที่มีผนังเซลล์ถึง 2 เท่า (Hutchinson และ Hartwell, 1967)

การแยกความแตกต่างระหว่างโครงสร้างทั้งสองประเภทโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดานั้นทำได้ยาก ดังนั้นในการเรียกโครงสร้างที่ลอกผนังเซลล์ออกจึงมีผู้ใช้ทั้งคำว่า สเฟียร์โพลาสต์และโปรโตพลาสต์ (Villanueva และ Garcia, 1971)

การเตรียมโปรโตพลาสต์จากรา

อาจเตรียมได้จากส่วนของสปอร์หรือเส้นใย กลุ่มของ hyphal filaments ประกอบกันเป็น mycelium ส่วนของ primary branches งามมาจากสปอร์หรือ initial inoculum แล้วแผ่ขยายขอบเขตออกปกคลุมอาหาร เส้นใยของเห็ดมีผนังกัน แต่ละเซลล์ที่แยกออกยังคงเป็นส่วนสำคัญของการเจริญ ถ้าเส้นใยเกิดการหักขาด แต่ละชิ้นของเส้นใยสามารถปรับสภาพเป็นโคโลนีเจริญต่อไปได้

การเลี้ยงโคโลนีของราให้เจริญเติบโตภายใต้สภาวะที่เหมาะสมในห้องปฏิบัติการมีปัญหาที่เกิดขึ้นคือ ความไม่เป็นธรรมชาติ แต่การเจริญของเส้นใยในธรรมชาติก็มีข้อจำกัดทางกายภาพ เช่น การแข่งขันกันเจริญของจุลินทรีย์อื่น ๆ

วิธีเตรียม โปรโตพลาสต์ แบ่งเป็น 2 วิธีใหญ่ ๆ คือ

1. วิธีไม่ใช่เอนไซม์ หรือวิธีกล (non-enzymatic or mechanical method)

วิธีนี้นับเป็นวิธีการแรกที่มนุษย์พยายามแยกเอาโปรโตพลาสต์ออกมาจากเนื้อเยื่อของพืช (ประสาทร, 2526) แต่ต่อมาวิธีนี้ไม่เป็นที่นิยมใช้ เนื่องจากเซลล์ถูกทำลายได้ง่าย ได้ปริมาณโปรโตพลาสต์น้อย ควบคุมได้ยาก ไม่รู้จุดยติที่เหมาะสม อีกทั้งโปรโตพลาสต์ที่ได้มักไม่สมบูรณ์ มีอัตราการอยู่รอดต่ำ และการใช้จะต้องมีความจำเพาะเจาะจง (Peberdy, 1975)

วิธีที่ใช้ได้แก่ การเขย่าเซลล์กับลูกแก้ว (glass bead) ให้เกิดแรงกระแทก, การใช้เสียงที่มีความถี่สูง (ultrasonic vibration), การใช้ blender หรือ homogenize นอกจากนี้ยังมีการใช้สารเคมี เช่น 2-deoxyglucose และ $MgSO_4$ ซึ่งจะมีผลต่อเมตาบอลิซึมของขบวนการที่เกี่ยวข้องกับการสร้างผนังเซลล์ และอาจมีผลต่อเมตาบอลิซึมอื่น ๆ ของเซลล์ด้วย (Foury และ Goffeau, 1973)

2. วิธีใช้เอนไซม์ (enzymatic method)

โดยใช้ lytic enzyme ย่อยสลายองค์ประกอบของผนังเซลล์ วิธีนี้ได้รับการพัฒนามาตั้งแต่ ค.ศ.1960 โดย Cocking และเป็นวิธีการที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน เนื่องจากความสะดวกประหยัดเวลาและสามารถแยกโปรโตพลาสต์ที่สมบูรณ์ได้ปริมาณมากไม่จำกัด (ประสาทร, 2526)

โครงสร้างและองค์ประกอบของผนังเซลล์รา

ผนังเซลล์เป็นส่วนสำคัญในเชื้อราเป็นตัวกำหนดลักษณะรูปร่างเซลล์เป็นผิวสัมผัสอยู่ระหว่างโปรโตพลาสต์กับสิ่งแวดล้อม ช่วยป้องกันเซลล์จาก osmotic lysis และบางที่อาจป้องกันเซลล์จากสารต่าง ๆ ที่เกิดจากจุลินทรีย์อื่น ๆ ในขณะที่เดียวกันผนังเซลล์ต้องยอมให้สารอาหาร ก๊าซ และแม้แต่เอนไซม์ผ่านเข้าสู่เซลล์ได้

ผนังเซลล์ประกอบด้วย polysaccharide ที่มีความสัมพันธ์กันระหว่างโปรตีน ไขมัน และสารอนินทรีย์ polysaccharide เกิดขึ้นได้ 2 ลักษณะ คือ

1. microfibrils
2. matrix หรือ amorphous

microfibrils เป็นโครงสร้างหลักของผนังเซลล์ ประกอบด้วยสาย polysaccharide สานกันอย่างแข็งแรง ทำให้ผนังเซลล์มีความคงตัว

matrix เป็นโครงสร้างตาข่ายที่สร้างขึ้น ปรากฏเป็นโครงสร้างผลึก ลักษณะเป็นเม็ด

โครงสร้างผนังเซลล์ร่าก่อดัวแบบอริฐนาบปุน มี microfibril เป็นแท่งล้อมรอบอย่างติดแน่น โดย matrix ประกอบด้วยชั้นต่าง ๆ ขององค์ประกอบทางเคมี ซึ่งแยกชั้นหรือซ้อนกันอยู่ขยายไปตามยาวจนครอบคลุม ยกเว้นส่วนยอดของเส้นใยจะบางที่สุด เพราะมีเพียงชั้นผนังที่เป็นหลักหุ้มอยู่เท่านั้น

microfibrils ประกอบด้วย chitin cellulose หรือ non-cellulosic glucan

- chitin เป็นโพลิเมอร์ที่ไม่มีสาขาของ β -1,4-linked-N-acetylglucosamine เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของผนังเซลล์รา เป็นตัวแบ่งแยกเชื้อราจากพืชชั้นสูง พบได้ในเชื้อราส่วนใหญ่พวก Ascomycetes, Basidiomycetes, Deuteromycetes และ Chytridiomycetes

- cellulose เป็นโพลิเมอร์ที่ไม่มีสาขาของ β -1,4-linked glucose พบในเชื้อรา Acrasiales, Oomycetes, Hyphochytridiomycetes และในอีกบางสกุลของ Ascomycetes, cellulose ที่พบในกลุ่มนี้แตกต่างจากที่พบในผนังเซลล์พืชสีเขียว คือมีโครงสร้างผลึกน้อยกว่า เมื่อทำการตรวจสอบด้วยรังสีเอ็กซ์

- non-cellulosic glucan เกิดขึ้นใน microfibrils และ matrix ในหลาย ๆ กลุ่มของเชื้อรา glucan ประกอบด้วยหน่วยของ glucose ที่หลากหลายโดยไม่คำนึงถึงชนิดและการมีสาขา เนื่องจากส่วนประกอบโครงสร้างที่ซับซ้อนของ glucan ทำให้ไม่สามารถรู้โครงสร้างได้สมบูรณ์ แต่มีเชื้อราบางชนิดที่ microfibril ประกอบด้วยส่วนของ polysaccharide เชื่อมกับโปรตีน

คาร์โบไฮเดรตที่อยู่ในรูป matrix สามารถเปลี่ยนรูปได้ polysaccharide ที่เป็นหลักใน matrix อยู่ในรูป chitin, cellulose โพลิเมอร์ของ galactosamine และ noncellulosic glucans หลาย ๆ ชนิด รวมทั้ง glycogen (โพลิเมอร์ของ α -1,4-linked glucose), mannans (โพลิเมอร์ของ mannose), chitosan (โพลิเมอร์ของ glucosamine) และ galactans (โพลิเมอร์ของ galactose) รวมถึงส่วนประกอบย่อยพวก xylose, rhamnose, fucose และ uronic acids การจัดเรียงตัวและโครงสร้างของ monosaccharide ในโพลิเมอร์ที่เป็นผนังเซลล์ยังไม่เป็นที่เข้าใจ

การพบ microfibrils และ matrix polysaccharides ในกลุ่มของเชื้อราใช้เป็นพื้นฐานในการจำแนกเชื้อรา ประกอบกับรูปร่างลักษณะของเซลล์ นอกจากนี้ส่วนประกอบเล็ก ๆ ที่รวมกันอยู่ก็มีส่วนเกี่ยวกับความคงรูปของเซลล์ และยังมีผลในการควบคุมรูปแบบของผนังเซลล์ให้แตกต่างกันด้วย เมื่อรามีการเจริญไม่ว่าจะเป็นเส้นใยหรือยีสต์ (คือเกิดมีการเปลี่ยนโครงสร้าง) หรือแม้แต่สภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนไปจะมีผลโดยตรงต่อองค์ประกอบของผนังเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในส่วนของผนังเซลล์ที่เป็น matrix มีโปรตีนอยู่ไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ โปรตีนนี้มีหน้าที่เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างและเอนไซม์ numerous enzyme อยู่ที่ผนังเซลล์อาจสำคัญสำหรับการ hydrolysing แหล่งอาหารในสภาพแวดล้อมให้กลายเป็นสารเล็ก ๆ ที่สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ ไขมันใน matrix มีไม่เกิน 8 เปอร์เซ็นต์ เป็นไขมันที่มีความอึดตัวมาก

ผนังเซลล์ประกอบด้วยสารอนินทรีย์อีกหลายชนิด อย่างหนึ่งคือ เถ้า (ash) ซึ่งเกิดขึ้นหลังจากมีการเผาไหม้เซลล์อย่างสมบูรณ์ ส่วนประกอบในเถ้ามีฟอสฟอรัส phosphated sugars และ phospholipids มีแคลเซียมและแมกนีเซียมบ้างเล็กน้อย

glucans เป็นส่วนประกอบส่วนใหญ่ในโครงสร้างของผนังสปอร์ chitosan เป็นโครงสร้างสำคัญในเซลล์ยีสต์และในการสร้างเส้นใยของรา โปรตีนและ melanin pigments พบมากในผนังเซลล์ของสปอร์ และใน vegetative cells แต่ในสปอร์มีปริมาณ phosphate ต่ำมาก

การจำแนกเชื้อราเป็นกลุ่ม ๆ นอกจากจะใช้องค์ประกอบของผนังเซลล์เป็นข้อพิจารณา ยังมีความแตกต่างขององค์ประกอบที่เปลี่ยนแปลงไปตามวงจรชีวิตอีกด้วย

การใช้เอนไซม์ในการเตรียมโปรโตพลาสต์

ในเชื้อแต่ละชนิดองค์ประกอบของผนังเซลล์ทั้งชนิดและปริมาณจะแตกต่างกันไป ดังนั้นในการเลือกใช้เอนไซม์จึงต้องพิจารณาให้เหมาะสมกับเชื้อชนิดนั้น ๆ ซึ่งบางครั้งการใช้เอนไซม์เพียงชนิดเดียว ไม่สามารถที่จะทำให้ได้โปรโตพลาสต์ที่สมบูรณ์ อาจต้องใช้เอนไซม์หลายชนิดร่วมกัน หากเป็นดังนี้ต้องคำนึงถึงชนิด ปริมาณการใช้ และสัดส่วนที่เหมาะสมในการผสมเอนไซม์

มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ของยีสต์และราได้ เรียกเอนไซม์นี้ว่าเอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์ (microbial enzymes) ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ เช่น *Bacillus circulans*, *Micromonospora AS*, *Streptomyces sp.*, *Arthrobacter luteus*, *Trichoderma viridae* และ *Trichoderma harzianum* เป็นต้น (นางพงา, 2530)

ปัจจัยที่มีผลต่อการเตรียมโปรโตพลาสต์โดยใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์

การที่จะเปลี่ยนเส้นใยเป็น โปรโตพลาสต์ได้หรือไม่นั้น นอกจากจะขึ้นอยู่กับชนิดของ เอนไซม์ที่เลือกใช้แล้ว ยังต้องคำนึงถึงปัจจัยอื่น ๆ เช่น

1. **สายพันธุ์** องค์ประกอบของผนังเซลล์จะเปลี่ยนไปในแต่ละสายพันธุ์ ทำให้ผนังเซลล์ มีความแข็งแรงไม่เท่ากัน การที่จะเปลี่ยนเซลล์ของราให้เป็น โปรโตพลาสต์จึงต้องเลือกใช้เอนไซม์ ที่เหมาะกับสายพันธุ์นั้น ๆ ให้สามารถทำลายผนังเซลล์ได้

2. **อายุของเชื้อ** ควรใช้เชื้อที่ทำการต่อไวยังไม่เกิน 24 ชั่วโมง คือควรจะใช้เซลล์อ่อน อายุยังน้อย การเกาะตัวกันของเซลล์และความหนาของผนังเซลล์ยังไม่มากนัก

3. **สภาวะที่ใช้เลี้ยงเชื้อ** เช่น องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเซลล์บางพันธุ์ เช่น ในยีสต์บางชนิด ถ้ามีการเติมส่วนประกอบของกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ เช่น L-methionine, L-homocysteine ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะทำให้เซลล์ไวต่อการถูกย่อยผนังเซลล์ ด้วย lytic enzyme มากกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารธรรมดา ซึ่งบทบาทของกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์ เป็นองค์ประกอบนี้ยังไม่เป็นที่เข้าใจ แต่เชื่อว่าในสภาพที่มีสารนี้อยู่ เซลล์ยีสต์จะนำ ATP มาใช้ในการสังเคราะห์ S-adenosylmethionine ทำให้ขาด ATP ที่ใช้สำหรับการสร้างผนังเซลล์ เกิดมีการเปลี่ยนแปลงที่ผนังเซลล์ ทำให้ผนังเซลล์ไวต่อการย่อยของ lytic enzyme (Svihla และคณะ, 1961)

4. **สารรีดิวซ์** เพื่อทำ pretreatment เชื้อบางสายพันธุ์มีความต้องการกระบวนการ pretreatment ช่วยในการทำงานของ lytic enzyme (Torres-Bauza และ Riggsby, 1980)

การใช้สารจำพวก thiol compound เพื่อ treat เซลล์ที่ต้องการเตรียมโปรโตพลาสต์จะทำให้ เกิดโปรโตพลาสต์ง่ายขึ้น โดย thiol compound จะไปลด disulfide bond ของโปรตีนในผนังเซลล์ ทำให้โมเลกุลเปิดออก สะดวกต่อการผ่านเข้าไปทำงานของ lytic enzyme (Davies และ Elvin, 1964; Anderson และ Millbank, 1966)

ในยีสต์ *Candida* พบว่าการทำ pretreatment ช่วยให้การสร้างโปรโตพลาสต์มีประสิทธิภาพ ดีขึ้น โดยเฉพาะการสร้างโปรโตพลาสต์จากเซลล์ในระยะ stationary phase นอกจากนี้ยังพบว่า โปรโตพลาสต์ที่ได้มีอัตราการรอดมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (Torres-Bauza และ Riggsby, 1980)

สารที่ใช้ในขั้นตอน pretreatment มีหลายชนิด ได้แก่ citrate, EDTA หรือ ethylene diamine tetra acetate, protease และสารที่ใช้กันมาก ก็พวก thiol compound เช่น sodium เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

sulphite (Na_2SO_3), sodium thioglycolate (cysteine), L-cysteine, L-methionine, dithiothreitol (DTT), glutathione, 2,3-dimercaptopropanol, 2-mercaptoethanol และ 2-mercaptoethylamine (L-homocysteine) เป็นต้น (Torres-Bauza และ Riggsby, 1980) thiol compound ที่นิยมใช้กันคือ 2-mercaptoethanol และ dithiothreitol (Bastide และคณะ, 1979 ; Peterson และคณะ, 1976)

การใช้ dithiothreitol (DTT) ร่วมในการสร้างโปรโตพลาสต์ของยีสต์จะได้ผลดีเมื่อบ่มเซลล์ยีสต์ในช่วง stationary phase ส่วน 2-mercaptoethanol จะได้ดีเมื่อเซลล์ยีสต์อยู่ในช่วง log phase (Sommer และ Lewis, 1971) จะเห็นได้ว่าช่วงเวลาที่เหมาะสมในการใช้สาร pretreatment แต่ละชนิดอาจแตกต่างกัน

5. osmotic stabilizer (protoplast buffer) โปรโตพลาสต์จะมีลักษณะกลม เมื่ออยู่ใน isotonic solution หรือ hypertonic solution และมีความเปราะบางต่อแรงดันออสโมติก (osmotically fragile) จากลักษณะดังกล่าวทำให้ต้องเก็บรักษาโปรโตพลาสต์ในสารละลายที่เป็น isotonic solution หรือ hypertonic solution (Chung และคณะ, 1984) สารละลายนี้ทำหน้าที่ปรับแรงดันออสโมติกภายนอกให้เท่ากับหรือมากกว่าภายในโปรโตพลาสต์ สารละลายนี้มีชื่อเรียกว่า osmotic stabilizer หรือ protoplast buffer

สารละลายที่อาจใช้เป็น osmotic stabilizer ได้แก่

5.1 สารละลายของเกลืออนินทรีย์ เช่น KCl, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, MgSO_4 , MgCl_2 , NH_4Cl และ NaCl (Torres-Bauza และ Riggsby, 1980 ; de Vries และ Wessels, 1972)

5.2 สารละลายของน้ำตาล เช่น กลูโคส ซูโครส มอลโตส และซอร์บิต (Ferenczy และคณะ, 1975)

5.3 สารละลายของน้ำตาลแอลกอฮอล์ เช่น sorbitol (Mishio, 1981 ; Stewart และ Russell, 1984) และ mannitol (Delgado และคณะ, 1979)

คุณสมบัติอื่น ๆ ของ osmotic stabilizer คือไม่มีพิษต่อโปรโตพลาสต์ ทั้งไม่ทำลายหรือส่งเสริมกิจกรรมของ lytic enzyme และ osmotic stabilizer ที่ดีควรเหนี่ยวนำการทำงานของ lytic enzyme ได้ เช่น KCl มีผลเหนี่ยวนำการทำงานของเอนไซม์ zymolase ได้ดีกว่าเกลืออนินทรีย์ชนิดอื่น (Kitamura และ Yamamoto, 1981)

ความเข้มข้นของ osmotic stabilizer มีผลต่อการเตรียมโปรโตพลาสต์ ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อเชื้อแต่ละชนิดอาจแตกต่างกัน Sipiczlui และคณะ (1985) ศึกษาผลของความเข้มข้นของ osmotic stabilizer ที่มีต่อการเตรียมโปรโตพลาสต์จาก *Schizosaccharomyces pombe* โดยใช้ sorbitol ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.8 0.9 1.0 1.1 และ 1.2 โมลต่อลิตร จากการทดลองเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่าถ้าความเข้มข้นต่ำกว่า 1.0 โมลต่อลิตร โปรโตพลาสต์จะเริ่มแตก แต่ถ้าความเข้มข้นสูงกว่า 1.0 โมลต่อลิตร จะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ Novozyme 234 ลดลง ได้โปรโตพลาสต์ช้า

การสร้างผนังเซลล์ใหม่และการเจริญเป็นโคโลนี (protoplast regeneration and reversion)

โปรโตพลาสต์ที่เจริญเติบโตจะมีการสร้างผนังเซลล์ใหม่เพื่อเจริญเป็นเส้นใยใหม่อีกครั้ง การที่จะต้องทำให้เป็นเส้นใยก็เพราะว่าเส้นใยสามารถนำมาขยายพันธุ์และเก็บรักษาไว้ได้ แต่ในรูปของโปรโตพลาสต์ไม่อาจทำได้ การเจริญเติบโตของโปรโตพลาสต์ในระยะแรก ๆ จะเห็นเป็นโคโลนี เส้นใยที่เจริญจะมีเส้นใยชนิดโมโนคาร์บอนและไดคาร์บอน โคโลนีของเส้นใยทั้งสองจะแตกต่างกันอย่างชัดเจนในด้านอัตราการเจริญเติบโตและขนาดของโคโลนี (Yinjie และคณะ, 1991) ลักษณะเหล่านี้จะช่วยแยกเส้นใยโมโนคาร์บอนมาศึกษาคุณสมบัติได้ง่าย

ประสิทธิภาพในการสร้างผนังเซลล์ใหม่และเจริญต่อไปเป็นโคโลนีของโปรโตพลาสต์จะแสดงในรูปของค่า regeneration frequency หรือ reversion frequency (Seki และ Limtong, 1983) คำนวณได้จาก

$$\text{regeneration frequency} = \frac{\text{จำนวนของโปรโตพลาสต์ที่เจริญเป็นเส้นใยเมื่อเลี้ยงบน regeneration medium}}{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด}}$$

ประวัติการศึกษาโปรโตพลาสต์

ปี ค.ศ.1971 Villanueva และ Gracia Acha พบว่าโปรโตพลาสต์ของเห็ดมีหลายขนาดแตกต่างกัน และคาดว่าโปรโตพลาสต์ขนาดใหญ่เกิดจากการรวมตัวกันของโปรโตพลาสต์ขนาดเล็ก

ปี ค.ศ.1972 De Vries และ Wessel รายงานเป็นครั้งแรกถึงการสกัดโปรโตพลาสต์จาก *Schizophyllum commune* และรายงานว่าการใช้ MgSO_4 และ KCl ร่วมกันเป็น stabilizer สำหรับโปรโตพลาสต์ของ *S. commune* จะมีผลทำให้ได้โปรโตพลาสต์ในปริมาณสูงกว่าเมื่อใช้ sorbitol หรือ mannitol เป็น stabilizer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปี ค.ศ.1981 Hopwood รายงานว่าการลอกผนังเซลล์ออกสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการส่งถ่ายสารพันธุกรรมระหว่างการรวมเซลล์เข้าด้วยกัน หรือการเปลี่ยนรูปของ extracellular DNA ในปีเดียวกัน Hamlyn และคณะ พบวิธีการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ในโปรโตพลาสต์ของ *Volvariella volvacea* (เห็ดฟาง) ซึ่งมีรายงานยืนยันในปี ค.ศ.1986 จากการศึกษาของ Mukherjee และ Sengupta

ปี ค.ศ.1982 Nohmi และ Ichishima ล้มเหลวในการค้นหาวีธีโดยตรงเพื่อให้เกิดการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ในโปรโตพลาสต์ของ *Aspergillus niger* เมื่ออยู่ในอาหารเหลว จึงคาดว่าสถานะของแข็งจำเป็นต่อการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่สำหรับ *A. niger* ในปีเดียวกัน Abe และคณะ พบวิธีการทำให้เกิดการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ในโปรโตพลาสต์ของ *Tricholoma matsutake* ในปีเดียวกันมีรายงานของ Masami และคณะ เกี่ยวกับความสำเร็จในการทดลองใช้เทคนิคการรวมโปรโตพลาสต์ใน *Tricholoma matsutake* โดยเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย กลูโคส, ยีสต์สกัด และ bacto-soytone osmotic stabilizer ใช้ 0.05 M maleic acid-NaOH buffer pH 5.6 ผสมกับ 0.6 M $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ เป็นตัวทำละลายเอนไซม์ เอนไซม์ที่ใช้เป็นเอนไซม์ผสมระหว่าง cellulase, zymolase และ β -glucuronidase ทำการกรองด้วย 3G3 sinter filter glass เพื่อให้ได้สารละลายโปรโตพลาสต์ ปรับ osmotic pressure ด้วย 0.7 M NaCl ปั่นเหวี่ยงแยกโปรโตพลาสต์มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่เติม 0.6 M mannitol แล้วปรับ pH เป็น 5.0 ได้ผล regeneration frequency ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์

ปี ค.ศ.1984 ในรายงานของ Stewart และ Russell กล่าวถึง Rost และ Venner ที่เสนอว่าความเป็นไปได้ของเชื้อในการกลายเป็นโปรโตพลาสต์ มีตั้งแต่ 1-100 เปอร์เซ็นต์ โดยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ที่นำมาศึกษาและไม่ได้เกี่ยวข้องกับจำนวนชุดของโครโมโซม

ค.ศ.1985 Yanaki และคณะ รายงานว่าการใช้การผสมของเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ให้ประสิทธิภาพในการสกัดโปรโตพลาสต์จาก *Coprinus macrohizus* และการเลือก stabilizer สำหรับโปรโตพลาสต์ที่แยกได้นั้น ไม่ว่าจะใช้ NaCl หรือ KCl ก็ไม่ได้ให้ผลแตกต่างกัน ในปีเดียวกัน Mukherjee และคณะ พบวิธีการสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่ในโปรโตพลาสต์ของ *Coprinus cineris* และ *Coprinus pelnucidus* ในปีเดียวกัน Hong และ Yeup ได้ทดลองแยกโปรโตพลาสต์จากสปอร์และเส้นใยของเห็ดหอม โดยใช้เส้นใยที่มีอายุ 3 วัน นำไปบ่มกับเอนไซม์ cellulase และ β -glucuronidase นาน 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำโปรโตพลาสต์ที่ได้มาเลี้ยงลงในอาหารแข็ง พบว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกจากสปอร์มีความสามารถในการสร้างผนังเซลล์ใหม่สูงกว่าโปรโตพลาสต์ที่แยกจากเส้นใยประมาณ 10 เท่า และพบว่าการใช้ $MgSO_4$ 0.6 M ใน Na-maleate buffer 0.02 M ที่ pH 5 เป็น stabilier ที่ดีที่สุดต่อการเกิดโปรโตพลาสต์ ในปีเดียวกัน Morinaga เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยญาติให้มาเผยแพร่ขึ้นต้นการคำ
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และคณะ ได้ทดลองแยกโปรโตพลาสต์จากเส้นใยของ *Coprinus pellucidus* ที่มีอายุ 4 วัน โดยนำไปบ่มกับเอนไซม์ chitinase, cellulase, zymolyase และ β -glucuronidase นาน 3 ชั่วโมง ได้โปรโตพลาสต์ประมาณ 59.5×10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และโปรโตพลาสต์ที่ได้สามารถสร้างผนังเซลล์ใหม่ได้บนอาหาร potato sucrose agar

ปี ค.ศ.1986 Mukherhee และ Sengupta ได้ศึกษาการแยกโปรโตพลาสต์จากเส้นใยของเห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*) โดยใช้ Novozym 234 ใน 0.01 M phosphate buffer (pH 6.0) ที่มี 0.6 M NaCl เป็นสารละลายเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ (lytic enzyme) หลังจากนั้นนำโปรโตพลาสต์ที่ได้มาทำให้เกิดการสร้างผนังเซลล์ใหม่ พบว่าโปรโตพลาสต์มีการงอกเป็นเส้นใยได้ไม่ดีในอาหารเหลว แต่มีการงอกได้ดีในอาหารแข็งที่มีวุ้นอยู่ 2 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เทคนิคการเททับด้วย soft agar พบว่าโปรโตพลาสต์มีการงอกเป็นเส้นใย 50-55 เปอร์เซ็นต์

ปี ค.ศ. 1990 Eguchi และคณะ ได้ศึกษาการแยกโปรโตพลาสต์จากเส้นใยเห็ด 4 ชนิด โดยนำเส้นใยที่มีอายุน้อยไปบ่มกับเอนไซม์ novozyme-234, zymolyase-2OT และ chitinase เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำโปรโตพลาสต์ที่ได้ไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง agarose และในอาหารเหลว SMY เพื่อให้เกิดการสร้างผนังเซลล์ใหม่ พบว่ามีการสร้างผนังเซลล์ใหม่ของ *Pleurotus ostreatus* 2.3 %, *Lentinus edodes* 0.7 %, *Agrocybe cylindracea* 0.9 % และ *agaricus bisporus* 0.2 % ซึ่งเส้นใยที่ได้จากการสร้างผนังเซลล์ใหม่จะพบทั้ง monokaryon และ dikaryon ในอัตราส่วน 1:2.8, 1:1.7 และ 1:2.3 ใน 3 สปีชีส์แรกตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างผนังเซลล์ใหม่จะอยู่ที่อุณหภูมิค่า

ในปี ค.ศ.1992 Yang และคณะ ได้ศึกษาการแยกโปรโตพลาสต์จาก *Aspergillus niger* โดยใช้ส่วนผสมของเอนไซม์ snail digestase และ cellulase พบว่าในระยะเวลา 3 ชั่วโมงแรกที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะให้จำนวนโปรโตพลาสต์มากกว่าที่อุณหภูมิ 32 หรือ 27 องศาเซลเซียส และพบว่าการสร้างผนังเซลล์ใหม่ของโปรโตพลาสต์จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเลี้ยงในอาหาร malt based medium มากกว่าการเลี้ยงในอาหาร yeast based medium และ NaCl 0.8 โมล/ลิตร เป็น osmotic stabilizer ที่ดีที่สุดซึ่งให้อัตราการสร้างผนังเซลล์ใหม่ 50 เปอร์เซ็นต์ ในปีเดียวกัน Ventura และคณะ ได้ศึกษาการแยกโปรโตพลาสต์จากเส้นใยของ *Trichophyton mentagrophytes* โดยใช้เอนไซม์ novozyme 234 และพบว่า 0.7 M KCl ใน phosphate buffer 50 mM pH 5.8 เป็น osmotic stabilizer ที่ดี หลังจากนั้นทำการแยกโปรโตพลาสต์ให้บริสุทธิ์โดยการปั่นและกรอง

ในปี ค.ศ.1993 Revathi และ Lalithakumari ได้ศึกษาการแยกโปรโตพลาสต์และการสร้างผนังเซลล์ใหม่ของ *Venturia inaequalis* โดยใช้ส่วนผสมของเอนไซม์ pectinase เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[polygalacturonase], cellulase, beta-glucuronidase, chitinase และ Novozyme 234 จาก *Trichoderma harzianum* เป็นเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ สภาพที่ใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์จะขึ้นอยู่กับอายุของเส้นใย, ส่วนผสมของเอนไซม์ และชนิดของ osmotic stabilizer และได้มีการศึกษาสภาพที่ใช้ในการสร้างผนังเซลล์ใหม่ของโปรโตพลาสต์ พบว่าโปรโตพลาสต์มีอัตราการสร้างผนังเซลล์ใหม่สูงถึง 53 เปอร์เซ็นต์

อิเล็กโทรฟอรีซิส

หลักการและเทคนิคทางอิเล็กโทรฟอรีซิส

วิธีการแยกสารชีวโมเลกุลโดยทั่ว ๆ ไปมักอาศัยความแตกต่างของขนาด ประจุ และคุณสมบัติจำเพาะทางชีวภาพหรือทางเคมีของสารนั้น อิเล็กโทรฟอรีซิสเป็นเทคนิคหนึ่งที่มีประโยชน์และใช้กันแพร่หลายในหมู่นักวิจัยด้านชีวเคมี ในที่นี้จะขอกล่าวถึงหลักการพื้นฐานทั่ว ๆ ไปของอิเล็กโทรฟอรีซิส ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์และใช้มากในการวิเคราะห์โปรตีนและไอโซไซม์

อิเล็กโทรฟอรีซิสเป็นวิธีการทางชีวเคมีที่แยกสารออกจากกันในสนามไฟฟ้า โดยอาศัยความแตกต่างของชนิดและปริมาณของประจุ ในบางกรณีก็รวมทั้งขนาดและรูปร่างของสารตัวอย่างที่ต้องการแยกด้วย นอกจากนี้ยังมีปัจจัยร่วมอื่น ๆ ที่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ (migrating rate) ของสารในการทำอิเล็กโทรฟอรีซิสอีกหลายประการ

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำอิเล็กโทรฟอรีซิส

1. คุณสมบัติของสารตัวอย่าง

1.1 ชนิดและปริมาณของประจุ ชนิดของประจุของโมเลกุลจะเป็นตัวกำหนดทิศทางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้า เช่น โมเลกุลที่มีประจุบวกจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วลบและในทางตรงกันข้ามโมเลกุลที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวกของสนามไฟฟ้า นอกจากนี้ปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในงานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่อนำไปเผยแพร่จะถือว่าผิดกฎหมาย

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของประจุจะมีผลต่ออัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้าด้วยกล่าวคือ โมเลกุลที่มีประจุมาก เช่น -3 จะเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวกได้เร็วกว่าโมเลกุลที่มีประจุ -1 เป็นต้น ชนิดและปริมาณประจุของสารนี้มีความสัมพันธ์โดยตรงกับภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของบัฟเฟอร์ของสารตัวอย่างนั้น ดังจะได้กล่าวต่อไปในหัวข้อที่ 3

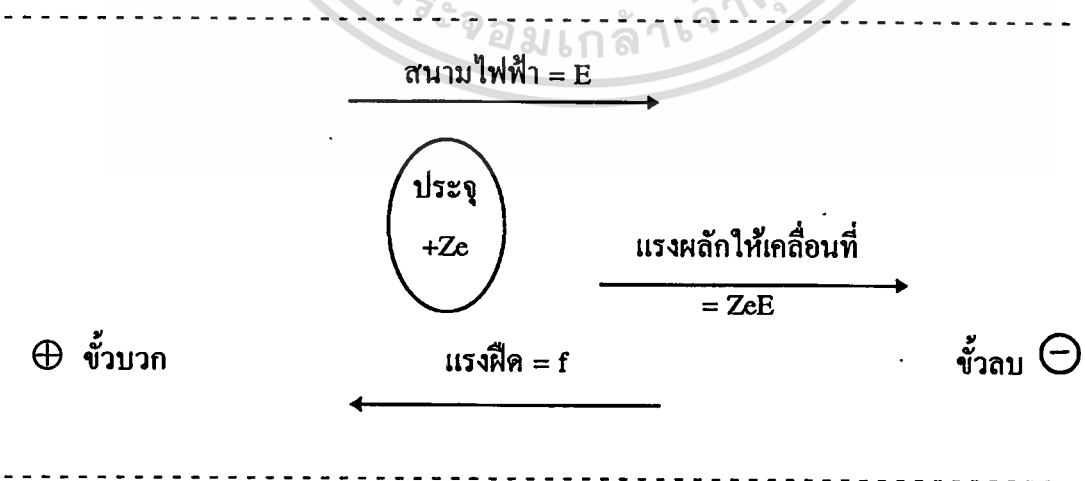
1.2 ขนาดของโมเลกุล โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่จะมีแรงเสียดทาน (friction) และ electrostatic force ซึ่งเกิดกับตัวกลางแวดล้อม (surrounding medium) สูงกว่าโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก ดังนั้นอัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่จึงช้ากว่าโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก

1.3 รูปร่างของโมเลกุล โมเลกุลที่มีรูปร่างต่างกันจะเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วที่ต่างกัน โมเลกุลที่มีรูปร่างทรงกลม (spherical หรือ globular shape) จะเคลื่อนที่ได้ดีกว่าโมเลกุลที่มีรูปร่างขารหรือ fibrous shape ทั้งนี้เนื่องจากแรงเสียดทานและ electrostatic force ที่เกิดกับสารที่มีรูปร่างไม่เหมือนกันจะต่างกันนั่นเอง

2. สนามไฟฟ้า

อัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้าเป็นสัดส่วนโดยตรงกับกระแสไฟฟ้า ความต่างศักย์และระยะเวลาในการทำอิเล็กโทรฟอรีซิส แต่แปรผกผันกับความต้านทานไฟฟ้า (ภาพที่ 4)

ภาพที่ 4



แสดงแรงกระทำต่าง ๆ ที่มีต่อโมเลกุลที่มีประจุในสนามไฟฟ้า

- เมื่อ Z = จำนวนประจุบนโมเลกุล
 e = หน่วยอิเล็กตรอนสถิตในหนึ่งหน่วยประจุ
 E = ความแรงของสนามไฟฟ้า (โวลต์/เซ็นติเมตร)
 f = สัมประสิทธิ์ของความผิด (ขึ้นกับขนาดและรูปร่างของโมเลกุลรวมทั้งชนิดของตัวกลางค้ำจุน)
 v = ความเร็วของโมเลกุลที่เคลื่อนที่ไปด้วยความสม่ำเสมอ (เซ็นติเมตร/วินาที)

จากภาพที่ 4 จะเห็นว่าที่ความเร็วปลาย

$$\text{แรงที่เกิดจากสนามไฟฟ้า} = \text{แรงผิด}$$

$$ZeE = fv$$

$$v/E = Ze/f$$

$$\text{อัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลต่อหน่วยสนามไฟฟ้า} = Ze/f$$

(Electrophoretic Mobility)

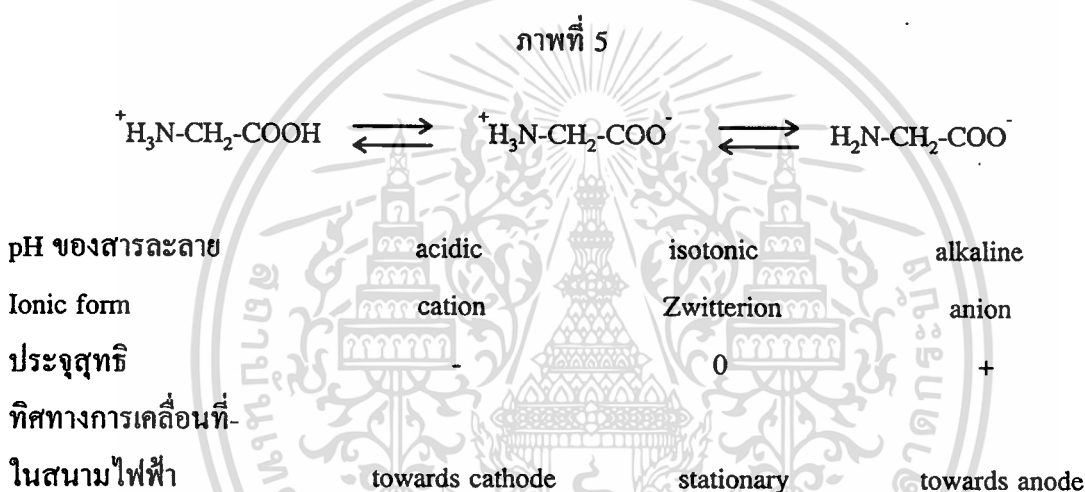
ถึงแม้อัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้าจะขึ้นอยู่กับความแรงของสนามไฟฟ้าที่ใช้ แต่การใช้กำลังไฟฟ้าที่สูงเกินไปในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส จะทำให้เกิดผลเสียได้หลายประการ คือ ทำให้เกิดการระเหยของสารละลายและทำให้เกิดความร้อนสูงในระหว่างทำอิเล็กโตรโฟรีซิส ซึ่งทำให้เกิด diffusion ของโมเลกุลและผลของการแยกสารจะไม่ดีเท่าที่ควร โดยเฉพาะในกรณีที่ทำอิเล็กโตรโฟรีซิสของสารที่เสียสภาพธรรมชาติ (denaturation) ได้ง่ายเมื่อถูกความร้อน เช่น เอนไซม์ ก็อาจทำให้เอนไซม์นั้นเสียสภาพและหมดประสิทธิภาพในการทำงาน (enzyme activity) ได้ ในทางตรงกันข้ามหากใช้กำลังไฟฟ้าที่ต่ำเกินไป ถึงแม้จะช่วยลดปัญหาความร้อนที่เกิดขึ้น แต่ผลของการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสจะไม่ดี เนื่องจากต้องใช้เวลาในการทำงานขึ้น ซึ่งเป็นการเพิ่มอัตราการเกิด diffusion ของสารเช่นกัน ดังนั้นเพื่อให้ได้ผลที่ดีจึงควรเลือกใช้กระแสหรือความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมด้วย

3. บัฟเฟอร์

บัฟเฟอร์นอกจากทำหน้าที่รักษาภาวะความเป็นกรด-ด่างของตัวกลางค้ำจุน (support medium) และเป็นตัวทำละลายของสารตัวอย่างแล้ว บัฟเฟอร์ยังเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้าอีกด้วย โดยขึ้นอยู่กับปัจจัยเหล่านี้คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1 ความเป็นกรด-ด่างของบัฟเฟอร์ เนื่องจากชีวโมเลกุลโดยทั่วไปไม่ว่าจะเป็นโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิกมักมีหมู่ที่แสดงประจุบวกและลบอยู่ในโมเลกุล ซึ่งมีค่าการแตกตัว (dissociation constant, pK) ต่าง ๆ กัน การแตกตัวของหมู่ประจุเหล่านี้ขึ้นอยู่กับ pH ของสารละลายนั้น เช่น ไกลซีน มีหมู่อะมิโน (NH_3^+) และคาร์บอกซิล (COOH) ซึ่งมีค่าการแตกตัวที่ 9.6 และ 2.34 ตามลำดับ จากภาพที่ 5 จะเห็นได้ว่าประจุสุทธิของไกลซีนจะเปลี่ยนไปเมื่ออยู่ในบัฟเฟอร์ที่มี pH ต่าง ๆ กัน ดังนั้น pH ของบัฟเฟอร์จึงมีบทบาทสำคัญในการกำหนดชนิดและปริมาณของประจุของสาร



แสดงผลของ pH ที่มีต่อการแสดงประจุของหมู่อะมิโนและคาร์บอกซิลของไกลซีน

3.2 Ionic strength ของบัฟเฟอร์ การเคลื่อนที่ของสารที่มีประจุในสนามไฟฟ้าแปรผกผันกับรากที่สองของ ionic strength นั่นคือสารชนิดเดียวกันจะเคลื่อนที่ในบัฟเฟอร์ที่มี ionic strength ต่ำได้ดีกว่าในบัฟเฟอร์ที่มี ionic strength สูง แต่ในขณะเดียวกันการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในบัฟเฟอร์ที่มี ionic strength สูงจะได้แถบ (band) ของการแยกคมชัดกว่าเมื่อใช้บัฟเฟอร์ที่มี ionic strength ต่ำ

Ionic strength ของบัฟเฟอร์นอกจากมีความสำคัญดังกล่าวแล้วยังเกี่ยวข้องกับความร้อนที่เกิดขึ้นในระหว่างทำอิเล็กโทรโฟรีซิสด้วย คือ ถึงแม้การใช้บัฟเฟอร์ที่มี ionic strength สูงจะทำให้ได้การแยกตัวของสารที่คมชัดก็ตาม แต่ก็ทำให้เกิดความร้อนสูง ซึ่งเป็นผลเสียต่อการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส เนื่องจากความร้อนที่เพิ่มสูงขึ้นนี้จะเพิ่มการ diffusion และอัตราการเคลื่อนที่ของไอออนประมาณ 2.4 เปอร์เซ็นต์ ต่ออุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น 1 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ความร้อนที่เกิดขึ้นยังไปลดความหนืดของตัวกลาง ทำให้ความต้านทานไฟฟ้าลดลง ซึ่งเป็นผลให้กระแสไฟฟ้าเพิ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใดเห็นประโยชน์จะเอามาใช้ในการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขึ้น ($V=IR$, เมื่อใช้ constant voltage) และทำให้เกิดความร้อนเพิ่มขึ้นต่อเนื่องกันไปอีก ดังนั้นเพื่อที่จะให้ได้ผลดีควรคำนึงถึง ionic strength ของบัฟเฟอร์ที่ใช้ด้วย โดยปกติจะใช้บัฟเฟอร์ที่มี ionic strength ระหว่าง 0.05-0.10 โมล/ลิตร

4. ตัวกลางค้ำจุน

การเลือกใช้ตัวกลางค้ำจุนให้เหมาะสมกับสารตัวอย่างที่ต้องการแยกโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส มีผลต่อการแยกของสาร เพราะตัวกลางค้ำจุนบางชนิดอาจทำให้เกิดการดูดซับ (adsorption) ระหว่างสารตัวอย่างกับตัวกลางค้ำจุนหรืออาจมีการแลกเปลี่ยนประจุของสารตัวอย่างกับตัวกลางค้ำจุนได้ รวมทั้งความไม่เป็นเนื้อเดียวกัน (inhomogeneities) ของตัวค้ำจุน สิ่งเหล่านี้มีผลต่อการแยกของสารโดยวิธีนี้ทั้งสิ้น โดยเฉพาะการเกิด electroendosmosis ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นจากประจุของตัวค้ำจุนเอง

จะเห็นว่าตัวกลางค้ำจุนมีบทบาทสำคัญต่อการแยกสารโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสไม่ยิ่งหย่อนไปกว่าปัจจัยอื่น ๆ ที่ได้กล่าวมาแล้ว ตัวกลางค้ำจุนที่ดีควรมีลักษณะทั่วไปดังนี้

- ไม่ไวในการทำปฏิกิริยา
- ยอมให้สารตัวอย่างผ่าน ได้อย่างรวดเร็ว
- สามารถแยกสารตัวอย่างได้ชัดเจน
- สามารถถูกแยกเป็นส่วน ๆ ได้ง่าย

อุปกรณ์ทั่วไปในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

1. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply)

เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าที่ใช้ในอิเล็กโตรโฟรีซิสเป็นชนิดกระแสตรง (direct current, D.C.) ซึ่งมีทั้งแบบ low voltage (100-500 volt) และ high voltage (500-10,000 volt) ปัจจุบันเราสามารถผลิตเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าได้เองในประเทศไทยและราคาไม่แพงนัก

2. กล่องใส่บัฟเฟอร์และขั้วไฟฟ้า (chamber and electrode)

ไม่ว่าจะเป็นอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบใดก็ตาม กล่องใส่บัฟเฟอร์จะมีอยู่ 2 ส่วน คือ ส่วนหนึ่งสำหรับขั้วไฟฟ้าบวก (cathode) และอีกส่วนสำหรับขั้วไฟฟ้าลบ (anode) กล่องใส่บัฟเฟอร์มีลักษณะแตกต่างกันแล้วแต่ชนิดของอิเล็กโตรโฟรีซิส มีทั้งชนิดในแนวราบ แนวตั้งแบบหลอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(cylindrical rods) หรือเป็นแผ่น (slab) ดังแสดงในภาพที่ 7 ซึ่งแต่ละแบบจะมีทั้งข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกัน

ขั้นตอนการศึกษาไอโซไซม์อิเล็กโตรโฟรีซิส ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

1. การสกัดสารตัวอย่าง (extraction)

การสกัดสารตัวอย่างในรูปของโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิกนั้น ในโปรตีนจะมีคุณสมบัติที่สลายได้ง่ายด้วยความร้อนจึงต้องระมัดระวังในเรื่องอุณหภูมิ สำหรับกรดนิวคลีอิกจะไม่มีปัญหาในเรื่องนี้ ข้อดีของโปรตีนในเรื่องการปนเปื้อนสารอื่น ๆ และมีผลต่อการศึกษาไม่เป็นปัญหาเท่ากรดนิวคลีอิก ฉะนั้นการสกัดสารโปรตีนจากเซลล์ เนื้อเยื่อ และการเก็บรักษาจะกระทำในที่อุณหภูมิต่ำ โปรตีนที่นำมาใช้ตรวจสอบแถบสีบนตัวกลางมักเป็นโปรตีนที่ละลายอยู่ในไซโทพลาสซึม มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ใน glycolytic pathway และ citric acid cycle เช่น lactate dehydrogenase, malic enzyme และ esterase เอนไซม์เหล่านี้สกัดได้ง่าย เมื่อทำให้เซลล์สิ่งมีชีวิตแตก (lysis)

2. การแยกสาร (separation)

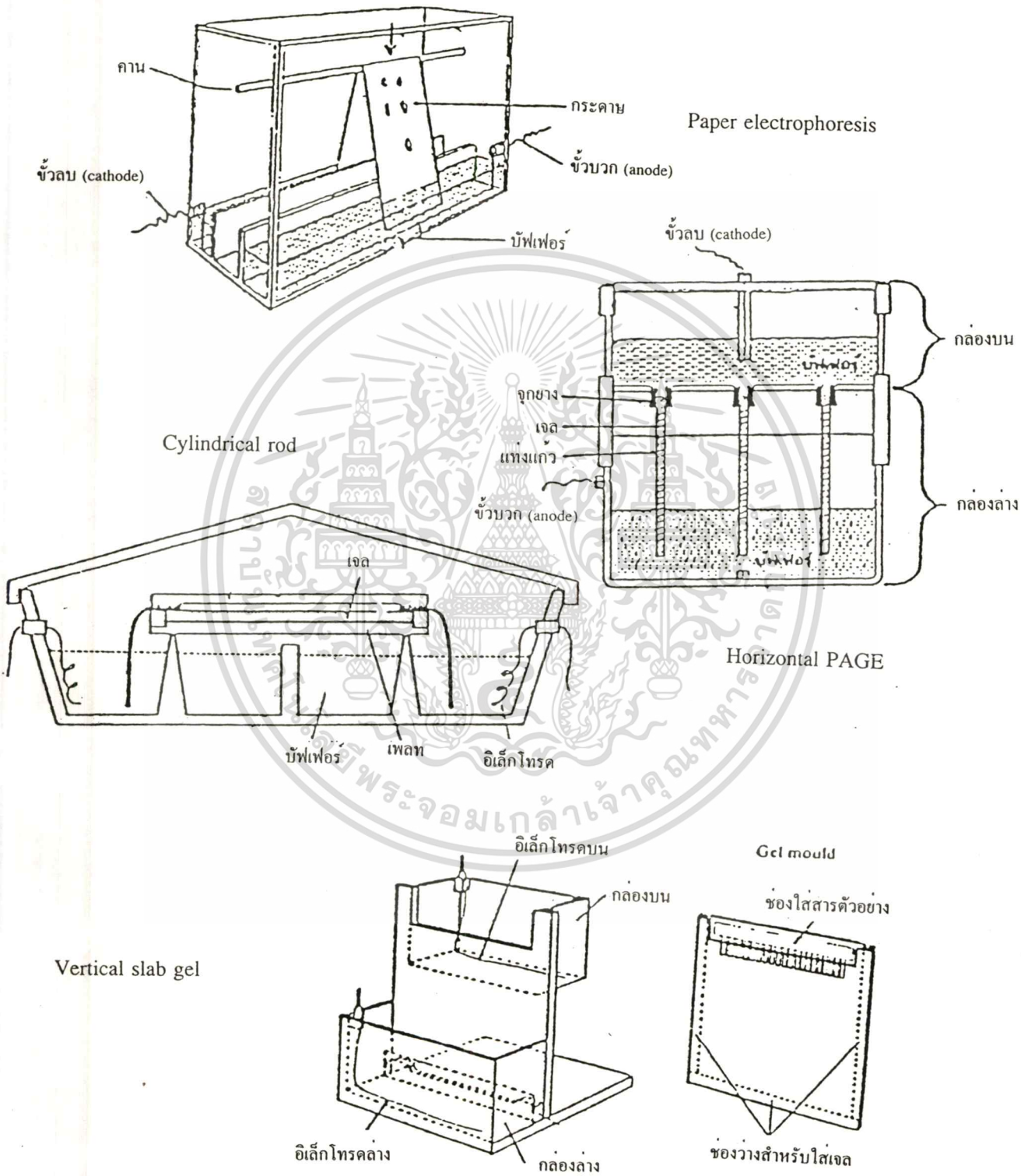
เนื่องจากโปรตีนและกรดนิวคลีอิกต่างก็มีประจุ การแยกชนิดของสารทั้งสองโดยใช้อิเล็กโตรโฟรีซิสจะแยกโปรตีนชนิดต่าง ๆ ที่มีประจุ ขนาด รูปร่าง น้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันเคลื่อนที่ออกจากกันในสนามไฟฟ้า การแยกชนิดของโปรตีนปรากฏให้เห็นแถบสีบนตัวกลางค้ำจุน การเลือกใช้ชนิดต่าง ๆ ของตัวกลางค้ำจุน จะต้องศึกษาคุณสมบัติ ลักษณะ ปริมาณ และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมในการทำงานด้วย

3. การย้อมสี (staining)

โปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ สามารถเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนซับสเตรทให้เป็นผลิตภัณฑ์และเกิดปฏิกิริยาเชื่อมต่อกับสีย้อมที่เลือกใช้ปรากฏเป็นแถบสีบนเจล ขั้นตอนนี้เป็นข้อมูลและนำมาวิเคราะห์ฮินและอีโนไทป์ที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนชนิดนั้น

สีที่ใช้ย้อมสารหลังจากทำอิเล็กโตรโฟรีซิสมีหลายชนิด ตั้งแต่สีธรรมดาไปจนถึงสีที่มีความจำเพาะกับสารชนิดใดชนิดหนึ่งโดยเฉพาะ แต่การศึกษาไอโซไซม์ การติดตามเอนไซม์ที่ต้องการศึกษาทำได้โดยใช้ activity stain ซึ่งมีความจำเพาะเฉพาะกับเอนไซม์ที่ต้องการศึกษาเท่านั้น

ภาพที่ 6



อิเล็กโทรฟอรีซิสแบบต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์

แถบสีที่ปรากฏบนอะกาโรสเจลจะมีรูปแบบ (pattern) แตกต่างกัน ความแตกต่างเกิดขึ้นเป็นผลผลิตของการทำงานของยีนในการควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนชนิดต่าง ๆ ฉะนั้นรูปแบบไอโซไซม์ที่ปรากฏเป็นแถบสีบนเจลนี้จึงเป็นเครื่องหมายพันธุกรรม (genetic marker) ที่สามารถนำมาบ่งชี้ความผันแปรทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นในประชากร

โปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโน กรดอะมิโนมีประจุแตกต่างกัน ฉะนั้นประจุรวมของโปรตีนจะแตกต่างกันไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนที่มีประจุแตกต่างในสายโปรตีน ประจุบนโมเลกุลของโปรตีนจะมีผลทำให้มีการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าให้นำไปยังขั้วตรงข้าม อัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลมีระยะทางที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น ประจุ ขนาดและรูปร่างของโปรตีน ด้วยคุณสมบัติของโปรตีนข้างต้น จะทำให้การเคลื่อนที่ของโปรตีนในสนามไฟฟ้าที่มีตัวกลางหรือตัวค้ำจุนเป็นอะกาโรสเจลมึแบบแผนแตกต่างกันด้วย

เนื่องจากการทดลองนี้ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาไอโซไซม์เป็นเส้นใยของเห็ดดินแรดที่ได้จากสปอร์เดี่ยวซึ่งมีนิวเคลียสเป็นแฮพลอยด์ (n) ดังนั้นการวิเคราะห์ลักษณะแถบเอนไซม์ (electrophoretic types หรือ ETs) จะแสดงในรูปของระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบเอนไซม์ที่ปรากฏเปรียบเทียบกับสิมาตรฐานหรือค่า Rf. (Caugant และคณะ, 1981 ; Baptist และคณะ, 1969) โดยจะเรียงลำดับค่า Rf. จากมากไปหาน้อยหรือจากน้อยไปหามากก็ได้ และแทนค่า Rf. ด้วยการจัดลำดับหมายเลขหรือตัวอักษร แถบเอนไซม์ที่ระดับต่าง ๆ (electromorphs) ที่ปรากฏบนเจลสามารถนำมาจัดกลุ่มตามลักษณะความเหมือนกันของแถบเอนไซม์ โดยพิจารณาจากความเหมือนของแถบเอนไซม์ EST เป็นหลัก หลังจากนั้นจะมีการแบ่งเป็นกลุ่มย่อยตามลักษณะความเหมือนของแถบเอนไซม์ LDH เป็นลำดับถัดมา เนื่องจากแถบเอนไซม์ของ EST จะมีระดับของแถบเอนไซม์เพียง 4 ระดับ ทำให้มีจำนวนตัวอย่างในแต่ละระดับมากกว่าเอนไซม์ชนิดอื่น ส่วนตัวอย่างที่ปรากฏแถบเอนไซม์ที่มีลักษณะเป็นแถบเดี่ยวและ 2 แถบปนกัน จะพิจารณาแบ่งกลุ่มจากแถบเอนไซม์ที่มี 2 แถบเป็นหลัก หลังจากนั้นจะมีการแบ่งเป็นกลุ่มย่อยโดยพิจารณาจากความเหมือนของแถบเอนไซม์ EST, LDH, LAP และ MDH ตามลำดับ

ประโยชน์ของอิเล็กโทรฟอริซิส

1. ใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบสารตัวอย่างว่าเหมือนกันหรือต่างกัน
2. ใช้พิสูจน์ความบริสุทธิ์ของโปรตีนในระหว่างการ purification
3. ใช้หาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน
4. ใช้ศึกษาหน่วยย่อยที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีน เช่น subunit ของเอนไซม์
5. ใช้ศึกษาไอโซไซม์

บทที่ 3

ขั้นตอนการดำเนินงาน

เครื่องมือและอุปกรณ์

จุลินทรีย์

Tricholoma crassum

Saccharomyces cerevisiae

วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ

- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
- ตู้บ่มเชื้อ
- แผ่นกรอง cellulose acetate
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ
- electrophoresis
- haemocytometer
- micropipette
- millipore
- shaker
- sinter glass filter
- เครื่องแก้วต่าง ๆ

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมโปรโตพลาสต์

- Cellulase
- Chitinase
- Disodium hydrogen phosphate anhydrous (Na_2HPO_4)
- Lysing enzyme
- 2-Mercaptoethanol
- Potassium chloride (KCl)
- Sodium dihydrogen phosphate dihydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

2. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาไอโซไซม์

- Acetone
- Agarose
- Boric acid
- Bromophenol blue
- Citrate
- Disodium hydrogen phosphate anhydrous (Na_2HPO_4)
- Ethanol
- Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)
- Fast black K salt
- Fast blue RR salt
- Hydrochloric acid (concentrated)
- L-leucyl- β -naphthylamide
- Lithium hydroxide
- Lithium D,L-lactate
- Malic acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Malic anhydride
- Magnesium chloride hexahydrate ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
- β -Nicotinamide adenine dinucleotide (β -NAD)
- α -Naphthyl propionate
- β -Naphthyl propionate
- Nitro blue tetrazolium
- Phenazine methosulphate
- Sodium dihydrogen phosphate dihydrate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- Sodium hydroxide (NaOH)
- Sucrose
- Tetrazolium MTT
- Tris base

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมโปรโตพลาสต์

1.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเห็ดให้ได้เส้นใยสำหรับการเตรียมโปรโตพลาสต์ วิธีการ

1. ใช้มือทั้งสองข้างฉีกดอกเห็ดออกเป็นสองส่วน ใช้เข็มเขี่ยเชื้อจิกเนื้อเยื่อดอกเห็ดที่อยู่ภายใน ให้เนื้อเยื่อเห็ดติดมาเป็นชิ้นเล็ก ๆ ที่ปลายเข็ม
2. หยิบขวดอาหารรุ้นและดึงจุกสำล่ออก จากนั้นจึงลนไฟฆ่าเชื้อที่ปากขวด นำเนื้อเยื่อเห็ดที่อยู่ปลายเข็มเขี่ยเชื้อไปวางตรงกลางอาหารรุ้น ลนไฟปากขวดอีกครั้ง แล้วจึงปิดจุกสำลี
3. นำขวดอาหารรุ้นที่มีเนื้อเยื่อเห็ดไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2-3 วัน จะมีเส้นใยเห็ดงอกออกมาจากเนื้อเยื่อ

1.2 การเตรียมเส้นใยเห็ดเพื่อใช้ในการแยกโปรโตพลาสต์

วิธีการ

1. เลี้ยงเส้นใยเห็ดให้เจริญบนอาหาร PDA ในจานเพาะเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
2. ใช้เข็มเย็บเชื้อเย็บเส้นใยเห็ดจากบริเวณขอบของโคโลนีในจานเพาะเชื้อจำนวน 4-5 ชิ้น ถ่ายลงในขวดอาหาร PDB ที่มี pH 5.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในขวดรูปชมพู่ความจุ 125 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-4 วัน เส้นใยเจริญมีลักษณะคล้ายลูกบอล
3. ถ่ายเส้นใยที่มีลักษณะคล้ายลูกบอลลงในอาหาร PDB ขวดใหม่ ที่มี pH 5.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ยีเส้นใย 1 ลูกต่ออาหาร PDB 1 ขวด นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3-4 วัน จะพบเพลเลท (pellet) เล็ก ๆ เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มิลลิเมตร จำนวนมากมาย

1.3 การศึกษาหา optimum pH ของอาหาร และน้ำหนักแห้งของเซลล์

วิธีการ

1. นำเชื้อที่เป็นเพลเลทเล็ก ๆ อายุประมาณ 3-4 วัน มากรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 โดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ
2. ชั่งน้ำหนักเซลล์ให้ได้ 20 มิลลิกรัม ลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ PDB ซึ่งปรับ pH ของอาหารเป็น 5, 5.5, 6, 6.5, 7 และ 7.5 ตามลำดับ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ
3. นำขวดอาหารไปเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน ทำการกรองเซลล์จากแต่ละขวดด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1
4. ถ่ายเซลล์ลงกระทงอลูมิเนียมฟอยล์ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วนำกระทงไปไว้ในเดซิเคเตอร์ รอนจนเย็น นำไปชั่งน้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่งละเอียด
5. คำนวณหาน้ำหนักแห้ง โดยใช้สูตร

สูตรการหาน้ำหนักแห้ง

น้ำหนักแห้งของเซลล์ = น้ำหนักของกระทงและเซลล์ที่อบแห้ง - น้ำหนักกระทง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 การเตรียมโปรโตพลาสต์โดยใช้เอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์

วิธีการ

1. นำเส้นใยเห็ดที่ทำการเลี้ยงในอาหารเหลว PDB ที่มีอายุ 3-4 วัน มากรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1
2. เตรียมสารละลาย lytic enzyme ในสภาพสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ใส่ในขวดรูปชมพู่ความจุ 125 มิลลิลิตร ดูรายละเอียดในภาคผนวก ข.
3. นำเส้นใยเห็ดที่มีน้ำหนัก 750 มิลลิกรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีสารละลายเอนไซม์นำไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง
4. นำสารละลายที่ได้ไปกรองผ่าน sinter glass filter เพื่อทำการแยกเศษเส้นใยที่เหลือออกจากโปรโตพลาสต์
5. นำสารละลายของโปรโตพลาสต์ที่ได้ไปปั่นด้วยความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อให้โปรโตพลาสต์ตกตะกอน เหนือใสส่วนบนทิ้ง
6. ใช้ micropipette ดูดโปรโตพลาสต์แล้วนำมาละลายในสารละลาย osmotic stabilizer

1.5 การศึกษาชนิดของบัฟเฟอร์ที่ระดับ pH ต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเตรียมโปรโตพลาสต์ โดยใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ เมื่อใช้เส้นใยที่มีอายุ 4 วัน

วิธีการ

1. นำเชื้อที่เป็นเพลเลทเล็ก ๆ ที่เลี้ยงในอาหารเหลว PDB, pH 5.5 เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อายุประมาณ 4 วัน มากรองให้ได้น้ำหนักเซลล์ 750 มิลลิกรัม
2. เตรียมสารละลาย lytic enzyme ใส่ในขวดรูปชมพู่ โดยใช้บัฟเฟอร์ที่ต่างกัน คือ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.01 โมลาร์ กับโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.01 โมลาร์ และเปรียบเทียบ pH 4 ค่า คือ 5, 6, 7 และ 8
3. นำเพลเลทที่ชั่งน้ำหนักแล้ว ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีสารละลายเอนไซม์อยู่ นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 50 รอบต่อนาที นาน 3.5 ชั่วโมง ตรวจสอบการเกิดโปรโตพลาสต์

1.6 การสร้างผนังเซลล์ใหม่ของโปรโตพลาสต์

วิธีการ

1. นำสารละลายโปรโตพลาสต์มาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลว regeneration medium (ดูวิธีการเตรียมในภาคผนวก ก.) 25 มิลลิลิตร หรือนำสารละลายโปรโตพลาสต์มา spread ลงบนอาหาร regenerating medium ในจานเลี้ยงเชื้อ ที่มีการเติมวุ้น 3 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เทคนิคการเททับด้วยอาหารชนิดเดียวกันที่มีการเติมวุ้น 0.5 เปอร์เซ็นต์
2. ตรวจสอบการสร้างผนังเซลล์ใหม่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และคำนวณหาค่า regeneration frequency โดยคำนวณจากสูตร

$$\text{regeneration frequency} = \frac{\text{จำนวนของโปรโตพลาสต์ที่เจริญเป็นเส้นใย}}{\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ทั้งหมด}}$$

3. ตัดเส้นใยที่ได้จากโปรโตพลาสต์แต่ละเซลล์ มาเลี้ยงบนอาหาร PDA

1.7 การคัดแยกเส้นใยโมโนคาร์ร็อนจากโปรโตพลาสต์

วิธีการ

นำเส้นใยที่ได้จากโปรโตพลาสต์มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สังเกตการเจริญเติบโตของเส้นใย เพื่อคัดแยกเส้นใยโมโนคาร์ร็อนและไดคาร์ร็อน

2. การเพาะเลี้ยงเส้นใยโมโนคาร์ร็อนจากสปอร์เดี่ยว

วิธีการ

1. ตัดหมวกเห็ดออกเป็นชิ้นให้มีขนาด 1x1 นิ้ว ใช้สก็อตเทปยึดติดผิวบนหมวกเห็ดกับฝาจานแก้ว จากนั้นนำไปครอบบนบีกเกอร์ ตั้งทิ้งไว้ที่ลมสงบ เพื่อให้สปอร์ดตกลงบนบีกเกอร์ที่รองรับ เบซิดิโอสปอร์จะถูกปล่อยจากเบซิดิเยมลงสู่ตัวจาน
2. นำสปอร์ที่ได้ไปผสมกับน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปรับให้มีความเข้มข้นของสารละลายสปอร์ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยนับสปอร์ด้วย haemocytometer ดูรายละเอียดในภาคผนวก ง.
3. inoculate สารละลายเบซิดิโอสปอร์ลงบนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยวิธี spread plate นำไปบ่มไว้ให้เบซิดิโอสปอร์งอกที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน
4. ใช้เข็มเขี่ยตัดปลายเส้นใยที่เจริญจากแต่ละเบซิดิโอสปอร์พร้อมทั้งชิ้นวุ้นอาหาร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แยกไปเลี้ยงบนอาหาร PDA slant ในหลอดทดลอง ซึ่งแต่ละหลอดที่แยกได้นี้คือเส้นใยที่แยกจากสปอร์เดี่ยว แต่ละเซลล์ในเส้นใยมีนิวเคลียสที่มีฮีโนไทป์แบบเดี่ยว เรียกเส้นใยชนิดนี้ว่า โมโนคาร์ร็อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การศึกษาไอโซไซม์ของเส้นใยโมนาคารีออนจากสปอร์เดี่ยว (SM)

3.1 การเตรียมเส้นใยเห็ดเพื่อใช้ในการศึกษาไอโซไซม์

วิธีการ

1. เลี้ยงเส้นใยเห็ดให้เจริญบนอาหาร PDA ในจานเพาะเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
2. ใช้เข็มเย็บเชื้อเย็บเส้นใยเห็ดจากบริเวณขอบของโคโลนีในจานเพาะเชื้อ โดยให้ติดอาหารวุ้น PDA ถ่ายลงในขวดอาหาร PDB ที่มี pH 5.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในขวดรูปชมพู่ ความจุ 125 มิลลิลิตร โดยให้เส้นใยลอยอยู่บนอาหารเหลว
3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เส้นใยจะเจริญแผ่บนอาหารเหลว

3.2 การสกัดเอนไซม์จากเส้นใยเห็ด

วิธีการ

1. นำเส้นใยเห็ดจากข้อ 3.1 มาซบให้แห้งโดยใช้กระดาษกรอง ชั่งเส้นใยให้ได้น้ำหนักสด 750 มิลลิกรัม นำมาใส่ในครกบดซึ่งมีน้ำและ silicon dioxide (ทราย) ในปริมาณเล็กน้อย
2. บดเส้นใยให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน
3. นำสารละลายไปปั่นให้เส้นใยตกตะกอนโดยใช้ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที
4. เก็บส่วนที่เป็นสารละลายไว้ทำการทดลองต่อไป

หมายเหตุ ข้อ 2-4 ควรทำที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส

3.3 การเตรียมสารตัวอย่าง

วิธีการ

นำส่วนที่เป็นสารละลายในข้อ 3.2 มาผสมกับ tracking dye (ดูวิธีการเตรียมในภาคผนวก ค) ในอัตราส่วน 5:1

3.4 การเตรียม 1.5 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล

วิธีการ

1. ชั่งผงอะกาโรส 0.15 กรัม ใส่ในสารละลายบัฟเฟอร์ (gel buffer) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปต้มในอ่างน้ำจนเดือดหรือละลายหมด (ไม่ควรต้มสารละลายอะกาโรสบนเตาโดยตรง เพราะจะไหม้หรือเดือดล้นภาชนะได้ง่าย)
2. ตั้งทิ้งไว้ให้สารละลายอะกาโรสเย็นลงจนมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จึงนำไปเทในเจลแอมเบอร์ ซึ่งมีหวี (comb) ตามขนาดที่ต้องการวางเรียบร้อยแล้ว โดยเทอะกาโรสให้มีความสูงประมาณ 3-5 มิลลิเมตร
3. ทิ้งเจลให้แข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง อย่างน้อยประมาณ 30 นาที
4. ค่อย ๆ ถอดหวีที่วางทำเป็นช่องสำหรับใส่สารตัวอย่างออก
5. เติมสารละลายบัฟเฟอร์ (tray buffer) ให้ท่วมแผ่นเจลประมาณ 5 มิลลิเมตร

หมายเหตุ การเตรียม gel buffer และ tray buffer เพื่อย้อมสีของเอนไซม์แต่ละชนิด ให้ดูรายละเอียดในภาคผนวก ค

3.5 การใส่สารตัวอย่างลงบนแผ่นเจล

วิธีการ

ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงในช่องใส่สารตัวอย่าง

3.6 การ running อิเล็กโตรฟอริซิส

วิธีการ

เปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าโดยตั้งค่ากระแสไฟฟ้าที่ 40 มิลลิแอมแปร์ ใช้ระยะเวลาในการแยกสาร 2 ชั่วโมง และควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 4 องศาเซลเซียส

3.7 การย้อมสี (Pasteur และคณะ, 1988)

3.7.1 Esterase

นำแผ่นอะกาโรสเจลที่ทำการแยกเอนไซม์ด้วยกระแสไฟฟ้าแล้ว แห้งลงในสารละลายที่ใช้ในการย้อมเอนไซม์ Esterase (ดูวิธีการเตรียมในภาคผนวก ค) สังเกตแถบสีที่เกิดขึ้น

บนเจลคังสมการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

EST

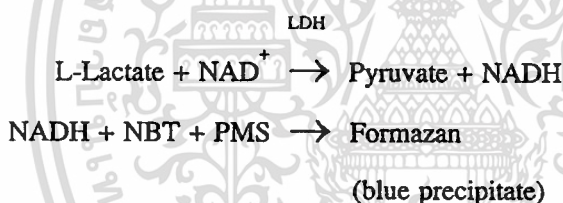
$$\alpha\text{- or } \beta\text{-Naphthyl ester} \rightarrow \alpha\text{- or } \beta\text{-Naphthol} + \text{salt}$$

$$\alpha\text{- or } \beta\text{-Naphthol} + \text{Fast blue RR salt} \rightarrow \text{violet-black precipitate}$$

จากสมการเอนไซม์ Esterase ที่มีอยู่ในสารตัวอย่างทำปฏิกิริยากับ α - หรือ β -Naphthyl ester ในสีย้อม จะได้ α - หรือ β -Naphthol กับเกลือ จากนั้น α - หรือ β -Naphthol ทำปฏิกิริยากับ Fast blue RR salt ในสีย้อม จะได้ตะกอนสีม่วงดำเกิดขึ้นบนแผ่นเจล

3.7.2 Lactate dehydrogenase

นำแผ่นอะกาโรสเจลที่ทำการแยกเอนไซม์ด้วยกระแสไฟฟ้าแล้ว แห้งลงในสารละลายที่ใช้ในการย้อมเอนไซม์ Lactate dehydrogenase (วิธีการเตรียมในภาคผนวก ค) สังเกตแถบสีที่เกิดขึ้นบนเจลดังสมการ



จากสมการเอนไซม์ Lactate dehydrogenase ที่มีอยู่ในสารตัวอย่างทำปฏิกิริยากับ L-Lactate และ NAD^+ ในสีย้อม จะได้ Pyruvate กับ NADH จากนั้น NADH ทำปฏิกิริยากับ NBT และ PMS ในสีย้อม จะได้ตะกอนสีน้ำเงินของ Formazan เกิดขึ้นบนแผ่นเจล

3.7.3 Leucine aminopeptidase

นำแผ่นอะกาโรสเจลที่ทำการแยกเอนไซม์ด้วยกระแสไฟฟ้าแล้ว แห้งลงในสารละลายที่ใช้ในการย้อมเอนไซม์ Leucine aminopeptidase (วิธีการเตรียมในภาคผนวก ค) สังเกตแถบสีที่เกิดขึ้นบนเจลดังสมการ

LAP

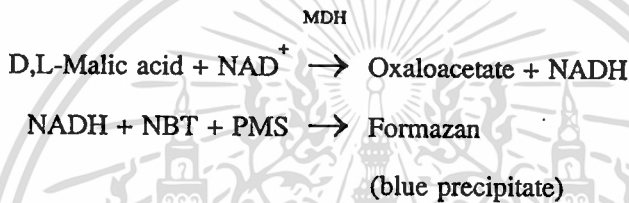
$$\text{L-Leucyl-naphthylamide} \rightarrow \text{L-Leucine} + \text{Naphthol}$$

$$\text{Naphthol} + \text{Fast black K salt} \rightarrow \text{violet precipitate}$$

จากสมการเอนไซม์ Leucine aminopeptidase ที่มีอยู่ในสารตัวอย่างทำปฏิกิริยากับ L-Leucyl-naphthylamide ในสีย้อม จะได้ L-Leucine กับ Naphthol จากนั้น Naphthol ทำปฏิกิริยากับ Fast black K salt ในสีย้อม จะได้ตะกอนสีม่วงเกิดขึ้นบนแผ่นเจล

3.7.4 Malate dehydrogenase

นำแผ่นอะกาโรสเจลที่ทำการแยกเอนไซม์ด้วยกระแสไฟฟ้าแล้ว แช่องในสารละลายที่ใช้ในการย้อมเอนไซม์ Malate dehydrogenase (คู่มือการเตรียมในภาคผนวก ค) สังเกตแถบสีที่เกิดขึ้นบนเจลดังสมการ



จากสมการเอนไซม์ Malate dehydrogenase ที่มีอยู่ในสารตัวอย่างทำปฏิกิริยากับ D,L-Malic acid และ NAD^+ ในสีย้อม จะได้ Oxaloacetate กับ NADH จากนั้น NADH ทำปฏิกิริยากับ NBT และ PMS ในสีย้อม จะได้ตะกอนสีน้ำเงินของ Formazan เกิดขึ้นบนแผ่นเจล

3.8 การหยุดปฏิกิริยาบนแผ่นเจล

วิธีการ

1. ล้างเจลด้วยน้ำไหล และล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง
2. นำเจลไปแช่ในเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ ค้างคืน

3.9 การวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์

วัดระยะทางที่แถบสีของเอนไซม์เคลื่อนที่เทียบกับระยะทางที่สีมาตรฐาน (bromophenol blue) เคลื่อนที่ แล้วนำมาคำนวณค่า Rf

$$Rf = \frac{\text{ระยะทางที่แถบสีของเอนไซม์เคลื่อนที่ (เซ็นติเมตร)}}{\text{ระยะทางที่สีมาตรฐานเคลื่อนที่ (เซ็นติเมตร)}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารเพื่อเปรียบเทียบค่า Rf ที่ได้ เพื่อจำแนกลักษณะความแตกต่างของเอนไซม์แต่ละรูปแบบขึ้นด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.10 การวิเคราะห์ลักษณะแถบเอนไซม์ (electrophoretic types หรือ ETs)

ระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบเอนไซม์ที่ปรากฏเปรียบเทียบกับสีมาตรฐานหรือค่า Rf. จะถูกนำมาใช้ในการจัดลำดับหมายเลข (Caugant และคณะ, 1981) หรือใช้อักษรแทนหมายเลข (Baptist และคณะ, 1969) แถบเอนไซม์ที่ระดับต่าง ๆ (electromorphs) ที่ปรากฏบนเจล สามารถนำมาจัดความแตกต่างของลักษณะแถบเอนไซม์จากจำนวนประชากรที่ตรวจสอบ

3.11 การคำนวณค่า matrix of similarity

ค่านี้จะแสดงการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลักษณะแถบเอนไซม์ที่เกิดขึ้นที่ละคู่ในประชากรทั้งหมดความีเปอร์เซ็นต์ที่เหมือนกันเท่าใด โดยคำนวณจากสูตร (Baptist และคณะ, 1969)

$$\% \text{ similarity (D)} = \frac{NS}{NS + ND} \times 100$$

โดย NS = จำนวนตัวอย่างที่มีระดับแถบเอนไซม์แบบเดียวกัน

ND = จำนวนตัวอย่างที่มีระดับแถบเอนไซม์ที่แตกต่างกัน

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาหา optimum pH ของอาหาร และน้ำหนักแห้งของเซลล์

เมื่อเลี้ยงเส้นใยเห็ดดินแรดในอาหารเหลว PDB ที่มี pH ตั้งแต่ 5-7.5 โดยนำเส้นใยไปเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 วัน ซึ่งจะได้เส้นใยที่มีลักษณะเป็นเพลเลทเล็ก ๆ จำนวนมากมาย หลังจากนั้นนำมาหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ จากผลการทดลองตารางที่ 1 พบว่าที่ระดับ pH ของอาหาร 5.5 จะได้น้ำหนักแห้งของเซลล์มีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.7349 กรัม และที่ pH 6 เป็นต้นไป น้ำหนักแห้งของเซลล์จะลดลงตามลำดับ

ตารางที่ 1

ผลการวัดน้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดดินแรด เมื่อเลี้ยงเส้นใยในอาหารเหลว PDB ที่ระดับ pH 5-7.5

pH	น้ำหนักกระทง (กรัม)	น้ำหนักแห้ง+น้ำหนัก กระทง (กรัม)	น้ำหนักแห้ง (กรัม)
5	0.5013	1.1055	0.6042
5.5	0.5189	1.2538	0.7349
6	0.4853	1.0089	0.5236
6.5	0.4595	0.8688	0.4093
7	0.5213	0.8065	0.2852
7.5	0.4665	0.7341	0.2676

4.2 ผลการศึกษาการเตรียมโปรโตพลาสต์โดยใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์

เมื่อนำเส้นใยเห็ดที่มีอายุ 4 วัน มาทำการเตรียมโปรโตพลาสต์ โดยใช้ปริมาณของ lytic enzyme ที่มีส่วนผสมของ lysing enzyme และ cellulase ในปริมาณ 1, 2 และ 3 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร นับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่ได้ทุก ๆ ชั่วโมง เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากผลการทดลอง ตารางที่ 2 พบว่าเมื่อใช้ปริมาณของ cellulase 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้ปริมาณของ lysing enzyme 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้ระยะเวลาในการแยกโปรโตพลาสต์ 3.5 ชั่วโมง จะได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุดคือ 1.2×10^7 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร

หลังจากนั้นทำการทดลองเดิม chitinase ในปริมาณ 0.1-0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ ปริมาณของ cellulase 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ lysing enzyme 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่ได้ทุก ๆ ชั่วโมง เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากผลการทดลองตารางที่ 3 พบว่าเมื่อใช้ปริมาณของ chitinase 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้เวลาในการแยกโปรโตพลาสต์ 3.5 ชั่วโมง จะได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุดคือ 8.22×10^6 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร ภาพที่ 7 แสดงลักษณะของโปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเส้นใยเห็ดตีนแรด ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ในช่วง 2.3-3.4 ไมโครเมตร

ตารางที่ 2

แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่ได้ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร ($\times 10^4$) ในช่วงระยะเวลา 1-5 ชั่วโมง เมื่อใช้ lytic enzyme ที่มีส่วนผสมของ lysing enzyme และ cellulase ในปริมาณ 1, 2 และ 3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

lysing enzyme cellulase	ชม.ที่	1					2					3							
		1	2	3	3.5	4	5	1	2	3	3.5	4	5	1	2	3	3.5	4	5
1		2	2.8	4.5	5	3	1	3	7.7	11	12	10	6	1	5	9	9	7	4
2		1	4	7	7	7.1	3.2	2	4	9	10	11	8	3	5.5	10	11	11	7
3		2	5	8	8	7	4	4	5	7	7.4	6	7	4	6	10	9.8	11	9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3

แสดงจำนวนโปรโตพลาสต์ที่ได้ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร ($\times 10^6$) ในช่วงระยะเวลา 1-5 ชั่วโมง
เมื่อใช้ lytic enzyme ที่มีส่วนผสมของ lysing enzyme 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, cellulase
1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ chitinase ในปริมาณ 0.1-0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ชั่วโมงที่ / chitinase (mg/ml)	1	2	3	3.5	4	5
0.1	1.12	1.98	3.05	3.56	3.12	2.50
0.2	2.03	4.20	8.11	8.22	8.01	6.35
0.3	2.05	2.21	3.92	4.01	3.88	2.75
0.4	0.66	1.23	1.95	1.80	1.87	1.12
0.5	0.27	0.55	1.44	1.30	1.39	0.56

ภาพที่ 7



โปรโตพลาสต์ที่แยกได้จากเส้นใยเห็ดดินแรด เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาชนิดของบัฟเฟอร์ที่ระดับ pH ต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเตรียมโปรโต- พลาสต์ โดยใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์

จากการทดลองเตรียมโปรโตพลาสต์โดยใช้เส้นใยเห็ดที่มีอายุประมาณ 4 วัน น้ำหนัก 750 มิลลิกรัม โดยใช้บัฟเฟอร์ที่ต่างกัน 2 ชนิดคือ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.01 โมลาร์ กับโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.01 โมลาร์ ที่ระดับ pH 4 ค่า คือ 5, 6, 7 และ 8 จากผลการทดลองตารางที่ 4 พบว่าเมื่อใช้โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.01 โมลาร์ ที่ระดับ pH 6 จะได้จำนวนโปรโตพลาสต์มากที่สุดคือ 7.56×10^6 โปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4

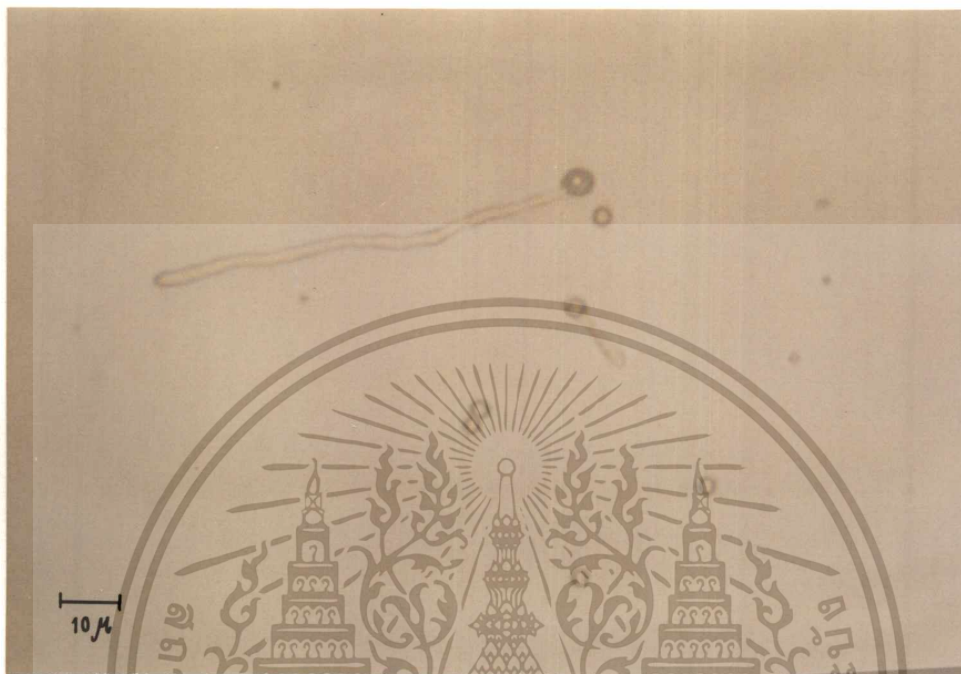
ผลของสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และ โปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ระดับ pH ต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเตรียมโปรโตพลาสต์ของเส้นใยเห็ดที่มีอายุ 4 วัน โดยใช้ปริมาณเส้นใย 750 มิลลิกรัม และใช้ lysing enzyme, cellulase และ chitinase ในอัตราส่วน 2:1:0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

pH	จำนวนโปรโตพลาสต์ต่อมิลลิลิตร	
	โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์	โปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์
5	9.98×10^5	6.85×10^5
6	7.56×10^6	2.11×10^6
7	7.73×10^5	4.12×10^5
8	0	0

4.4 ผลการสร้างผนังเซลล์ใหม่ของโปรโตพลาสต์

หลังจากการนำโปรโตพลาสต์ที่ได้มาเลี้ยงในอาหาร regenerating medium ในสภาพที่เป็นอาหารแข็งและอาหารเหลว พบว่าโปรโตพลาสต์มีการสร้างผนังเซลล์ใหม่และงอกเป็นเส้นใยในระยะเวลา 2 วัน ดังแสดงในภาพที่ 8 เมื่อทำการตรวจนับจำนวนโปรโตพลาสต์ที่มีการสร้างผนังเซลล์ใหม่ในสภาพที่เป็นอาหารแข็งที่มีวัน 3 เปอร์เซ็นต์ แล้วเททับด้วยอาหารที่มีวัน 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีค่า regeneration frequency 13.77 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 5 ส่วนในสภาพที่เป็นอาหารเหลวมีค่า regeneration frequency 4.38 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 6

ภาพที่ 8



โพรโพลาสต์ที่กำลังออกเป็นเส้นใย เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

ตารางที่ 5

ผลการสร้างผนังเซลล์ใหม่ของโพรโพลาสต์เมื่อเลี้ยงในอาหาร regenerating medium
ที่มีการเติมวุ้น 3 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เทคนิคการเททับด้วยอาหารที่มีการเติมวุ้น
0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ระยะเวลา 2 วัน

จำนวนโพรโพลาสต์ ที่เจริญต่อมิลลิเมตร	จำนวน โพรโพลาสต์ ทั้งหมดต่อมิลลิเมตร	เปอร์เซ็นต์การสร้าง ผนังเซลล์ใหม่	เปอร์เซ็นต์เฉลี่ย
1×10^4	1.9×10^5	5.26	13.77
2×10^4	1.8×10^5	11.11	
3×10^4	2.1×10^5	14.29	
4×10^4	2.2×10^5	18.18	
5×10^4	2.5×10^5	20.00	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

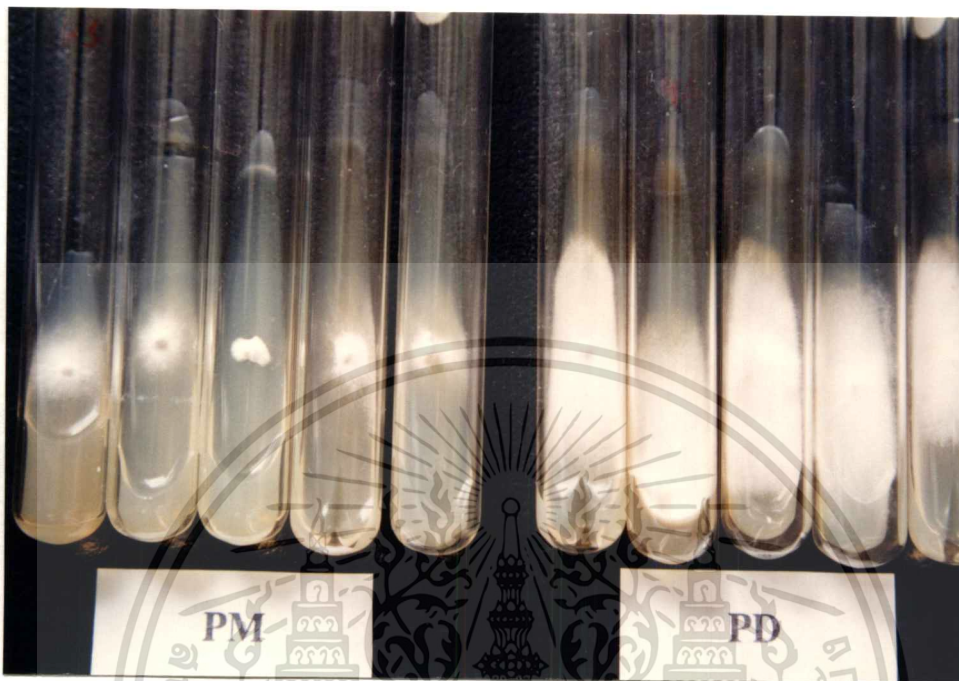
ตารางที่ 6
ผลการสร้างผนังเซลล์ใหม่ของโปรโตพลาสต์เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว regenerating medium
โดยใช้ระยะเวลา 2 วัน

จำนวนโปรโตพลาสต์ ที่เจริญต่อมิลลิลิตร	จำนวนโปรโตพลาสต์ ทั้งหมดต่อมิลลิลิตร	เปอร์เซ็นต์การสร้าง ผนังเซลล์ใหม่	เปอร์เซ็นต์เฉลี่ย
1×10^4	6.5×10^5	1.54	4.38
2×10^4	8.3×10^5	2.41	
2×10^4	6.9×10^5	2.90	
5×10^4	7.8×10^5	6.41	
7×10^4	8.1×10^5	8.64	

4.5 การคัดแยกเส้นใยโมโนคาร์ร็อนและไดคาร์ร็อนจากโปรโตพลาสต์

เส้นใยที่ได้จากโปรโตพลาสต์ทั้งหมดมี 120 ตัวอย่าง ในจำนวนนี้สามารถคัดแยกเส้นใยโมโนคาร์ร็อน ได้ 50 ตัวอย่าง และไดคาร์ร็อน 70 ตัวอย่าง โดยเส้นใยโมโนคาร์ร็อนจะมีลักษณะการเจริญช้ากว่าเส้นใยไดคาร์ร็อน ดังแสดงในภาพที่ 9

ภาพที่ 9

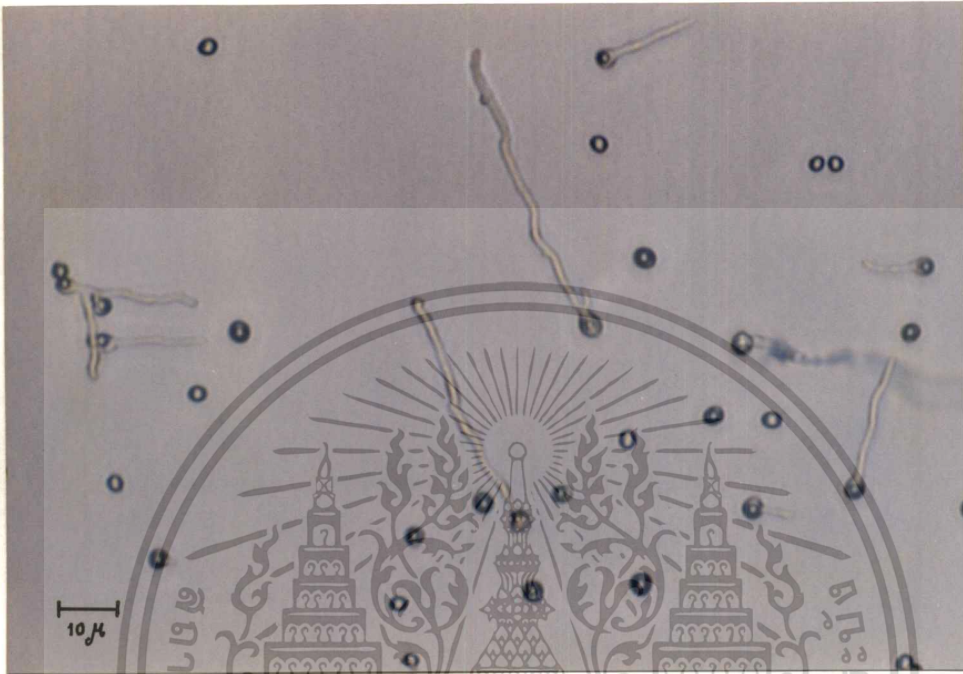


เปรียบเทียบลักษณะการเจริญเติบโตของเส้นใยที่ได้จากโปรโตพลาสต์ชนิดโมนอคาร์รียน (PM) และชนิดไดคาร์รียน (PD) เมื่อเลี้ยงเส้นใยเป็นระยะเวลา 7 วัน

4.6 ผลการเพาะเลี้ยงเส้นใยชนิดโมนอคาร์รียนจากสปอร์เดี่ยว

เมื่อนำเบซิดิโอสปอร์ของเห็ดตีนแรดมา inoculate ลงบนอาหาร PDA ในจานเลี้ยงเชื้อร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* นำไปบ่มให้เบซิดิโอสปอร์ออกที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน พบว่าเบซิดิโอสปอร์จะออกเป็นเส้นใย และมีเปอร์เซ็นต์การงอก 21.64 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 10 หลังจากนั้นใช้เข็มเขี่ยตัดเส้นใยที่เจริญจากแต่ละเบซิดิโอสปอร์พร้อมทั้งชิ้นอาหาร ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แยกไปเลี้ยงบนอาหาร PDA slant ในหลอดทดลอง ซึ่งจากการทดลองได้เส้นใยโมนอคาร์รียนจากสปอร์เดี่ยว (sporulated monokaryon หรือ SM) ทั้งหมด 10 ตัวอย่าง

ภาพที่ 10



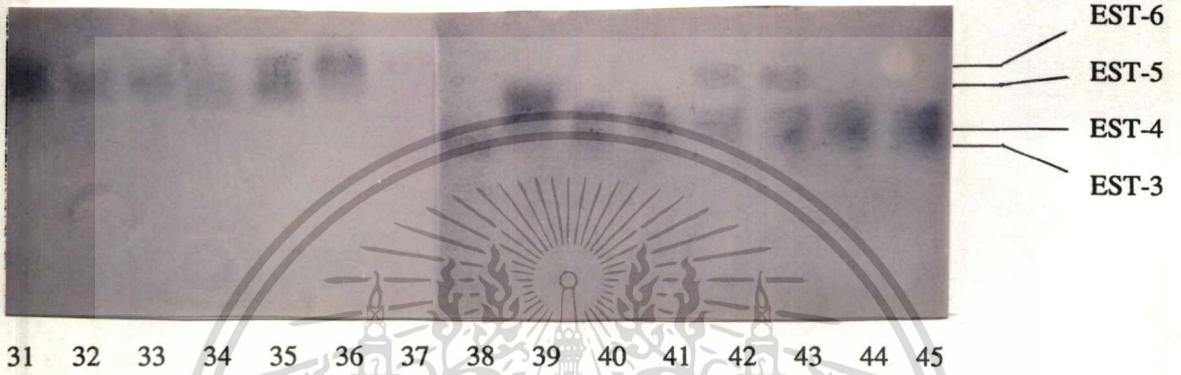
เบซิลิออสปอร์ที่กำลังงอกเป็นเส้นใย เมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

4.7 ผลการศึกษาไอโซไซม์อิเล็กโตรฟอริซิสจากเส้นใยโมนอคาร์ร็อนที่ได้จากสปอร์เดี่ยว

การศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของเส้นใยโมนอคาร์ร็อนที่ได้จากโปรโตพลาสต์และจากสปอร์เดี่ยวโดยวิธีไอโซไซม์อิเล็กโตรฟอริซิสจากเอนไซม์ 4 ชนิด คือ esterase, lactate dehydrogenase, leucine aminopeptidase และ malate dehydrogenase แต่เนื่องจากเส้นใยโมนอคาร์ร็อนที่ได้จากโปรโตพลาสต์เจริญเติบโตช้ามากและจะหยุดการเจริญเติบโตเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 7 วัน ทำให้ได้ปริมาณเส้นใยไม่เพียงพอในการศึกษาไอโซไซม์ ดังนั้นจึงได้นำเฉพาะเส้นใยโมนอคาร์ร็อนจากสปอร์เดี่ยวมาศึกษาเพียงชนิดเดียว โดยนำเส้นใยชนิดนี้ (sporulated monokaryon หรือ SM) ทั้งหมด 100 ตัวอย่าง มาเลี้ยงให้เจริญบนอาหารเหลว PDB ที่ pH 5.5 นำเส้นใย 750 มิลลิกรัม มาสกัดเอนไซม์และศึกษาไอโซไซม์บนตัวกลางค้ำจุณชนิด agarose gel โดยใช้เอนไซม์ 4 ชนิดข้างต้น ซึ่งผลการทดลองได้รูปแบบของไอโซไซม์ที่มีความแปรผันทางพันธุกรรมแตกต่างกันดังแสดงในภาพที่ 11-14

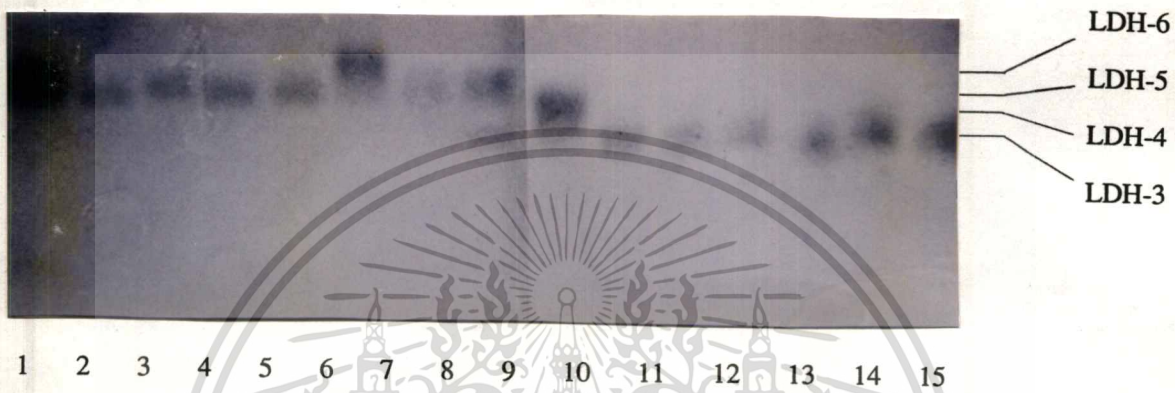
เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ไม่สามารถนำออกเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 11



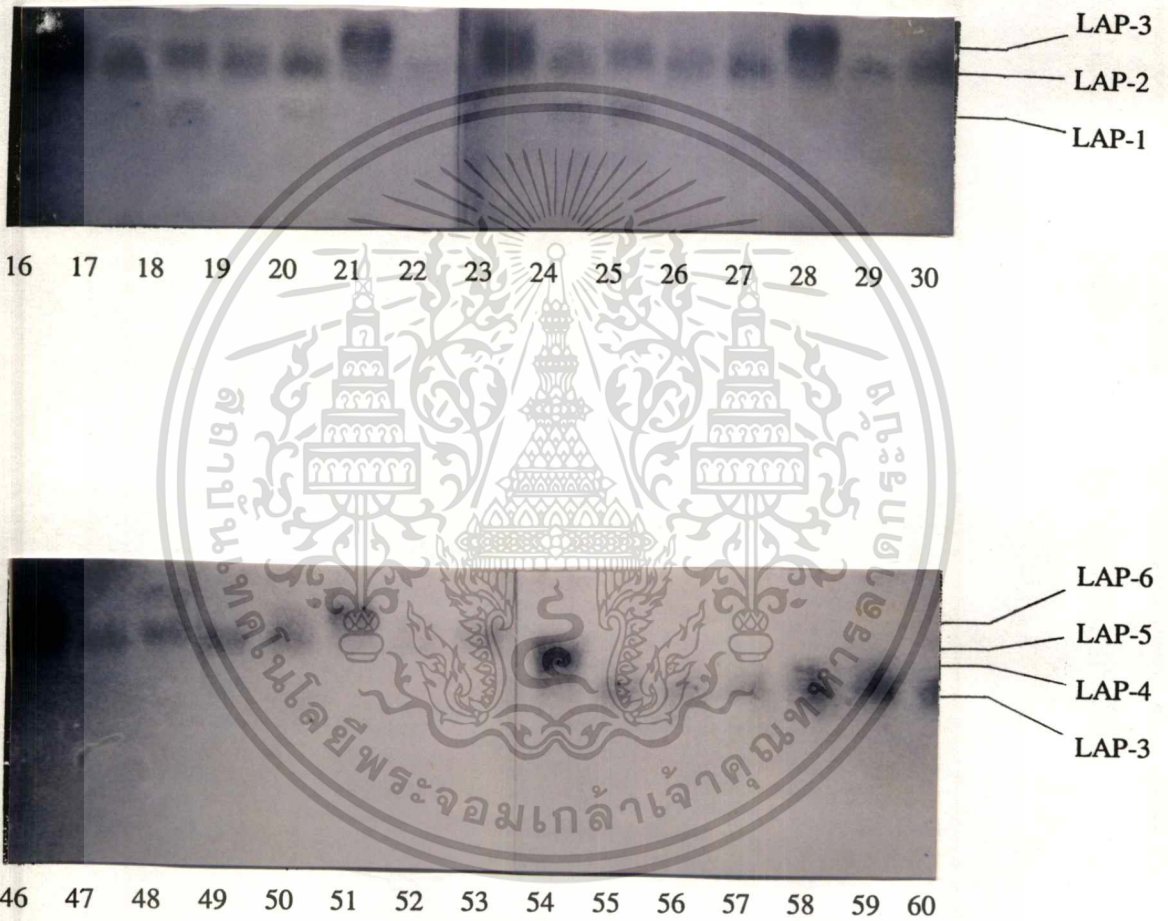
แถบที่ได้จากการย้อมสีของเอนไซม์ esterase
ของเส้นใยที่ได้จากสปอร์เดี่ยว no. 31-45

ภาพที่ 12



แถบที่ได้จากการย้อมสีของเอนไซม์ lactate dehydrogenase
ของเส้นใยที่ได้จากสปอร์เดี่ยว no. 1-15

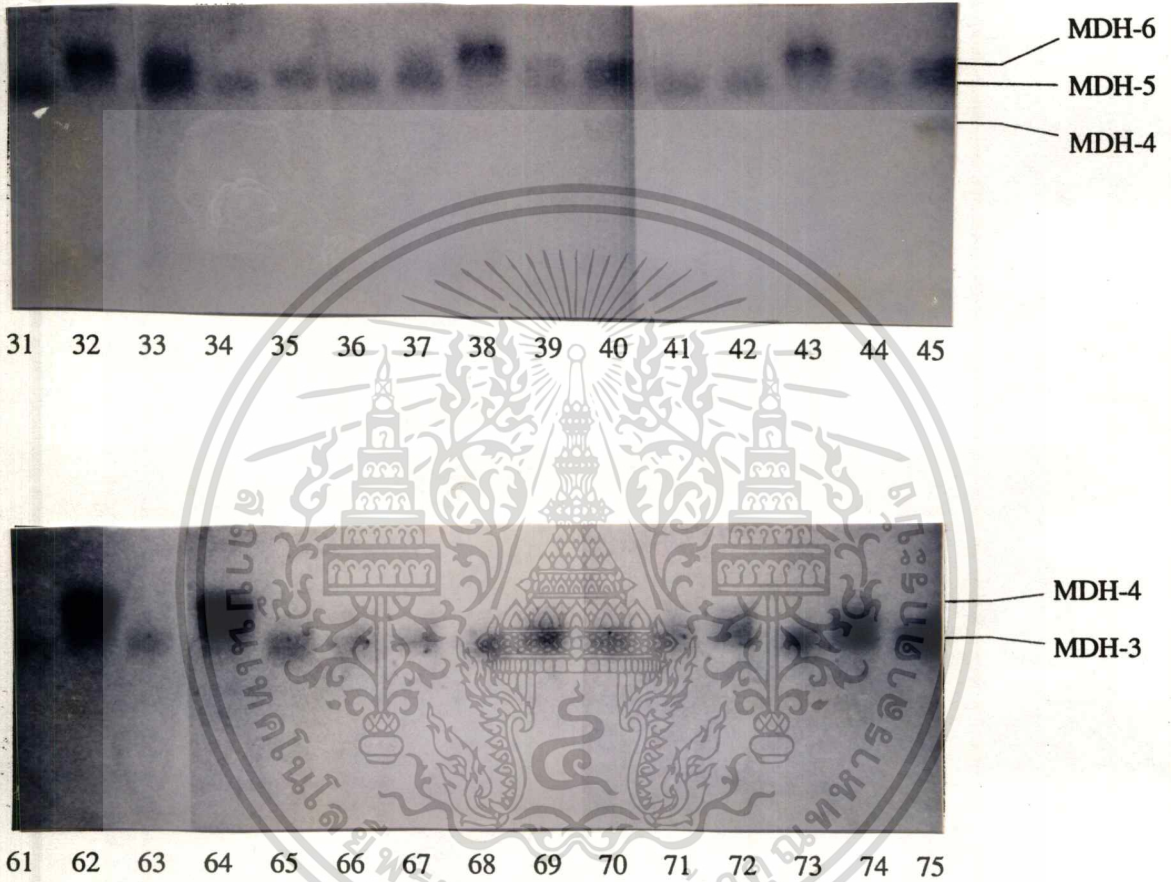
ภาพที่ 13



**แถบที่ได้จากการข้อมติของเอนไซม์ leucine aminopeptidase
ของเส้นใยที่ได้จากสปอร์เดี่ยว no. 16-30 และ 46-60**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 14



แถบที่ได้จากการย้อมสีของเอนไซม์ malate dehydrogenase
ของเส้นใยที่ได้จากสปอร์เดี่ยว no. 31-45 และ 61-75

จากการศึกษาแถบเอนไซม์ 4 ชนิด จากเส้นใยสปอร์เดี่ยวของเห็ดตีนแรด (*Tricholoma crassum*) ซึ่งอยู่ในสถานะแฮพลอยด์ (n) จำนวน 100 ตัวอย่าง ระยะทางของแถบเอนไซม์ที่เคลื่อนที่บนอะกาโรสเจล (Rf.) มี 6 ระดับ คือ 0.19, 0.26, 0.30, 0.34, 0.38 และ 0.41 ซึ่งแต่ละระดับของ Rf. ได้กำหนดตัวเลขตั้งแต่หมายเลข 1 ถึงหมายเลข 6 แทนระยะทางของ Rf. จากน้อยไปมาก (Selander และ Levin, 1980) หรือใช้อักษรแทนตัวเลข (Baptist และคณะ, 1969)

ระดับต่าง ๆ ของแถบเอนไซม์ที่แสดงเป็นตัวเลขหรืออิเล็กโตรมอร์ฟ (electromorphs) ที่ปรากฏบนเจลของเอนไซม์ EST, LDH, LAP และ MDH สามารถจัดลักษณะแถบของเอนไซม์ (electrophoretic types หรือ ETs) ที่แตกต่างกัน 59 แบบ จากเส้นใยสปอร์เดี่ยว 100 ตัวอย่าง (ตารางที่ 7)

4.8 ลักษณะแถบเอนไซม์ (ภาคผนวก จ)

4.8.1 แถบเอนไซม์ esterase (EST)

แถบเอนไซม์ไลคัส EST มีแถบเอนไซม์ 1 แถบ และ 2 แถบ แถบเอนไซม์ 1 แถบมี 52 ETs ซึ่งประกอบด้วยแถบเอนไซม์ในระดับ 3, 4, 5 และ 6 หรือ EST-3, EST-4, EST-5 และ EST-6 แถบเอนไซม์ 2 แถบมี 7 ETs จำนวน 4 ETs เป็นแบบ 3-6 (EST 3-6) และ 3 ETs เป็นแบบ 4-5 (EST 4-5)

4.8.2 แถบเอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH)

แถบเอนไซม์ไลคัส LDH มีแถบเอนไซม์ 1 แถบ และ 2 แถบ แถบเอนไซม์ 1 แถบมี 55 ETs ซึ่งประกอบด้วย LDH-3, LDH-4, LDH-5 และ LDH-6 แถบเอนไซม์ 2 แถบมี 3 ETs จำนวน 3 ETs เป็นแบบ LDH 3-5 และ 1 ETs เป็นแบบ LDH 3-6

4.8.3 แถบเอนไซม์ leucine aminopeptidase (LAP)

แถบเอนไซม์ไลคัส LAP มีแถบเอนไซม์ 1 แถบ และ 2 แถบ แถบเอนไซม์ 1 แถบมี 55 ETs ซึ่งประกอบด้วยแถบเอนไซม์ระดับต่าง ๆ คือ LAP-2, LAP-3, LAP-4, LAP-5 และ LAP-6 แถบเอนไซม์ 2 แถบมี 4 ETs จำนวน 3 ETs เป็นแบบ LAP 1-2 และ 1 ETs เป็นแบบ LAP 5-6

4.8.4 แถบเอนไซม์ malate dehydrogenase (MDH)

แถบเอนไซม์ไลคัส MDH มีแถบเอนไซม์ 1 แถบ และ 2 แถบ แถบเอนไซม์ 1 แถบมี 54 ETs ซึ่งประกอบด้วยแถบเอนไซม์ระดับต่าง ๆ คือ MDH-3, MDH-4, MDH-5 และ MDH-6 แถบเอนไซม์ 2 แถบมี 5 ETs จำนวน 2 ETs เป็นแบบ MDH 3-6 และ 1 ETs เป็นแบบ MDH 3-4 และ MDH 4-6

ตารางที่ 7

แสดงลักษณะแถบเอนไซม์ (ESTs) 59 แบบ ในเส้นใยที่ได้จากสปอร์เดี่ยวของเห็ดดินแรด

electrophoretic type	เส้นใยสปอร์เดี่ยว no.	จำนวนตัวอย่าง	EST	LDH	LAP	MDH
1	1,3,4,5	4	5	5	5	3
2	2	1	5	5	4	4
3	6	1	6	6	5	3
4	7	1	3	5	4	3
5	8	1	3	3,6	3	6
6	9	1	5	4	4	6
7	10	1	3	3	4	6
8	11-15,23	6	3	3	3	6
9	16	1	5	3	2	6
10	17	1	3	4	2	6
11	18	1	3	3	1,2	6
12	19	1	3	3	2	6
13	20,26,27	3	3	3	2	3,6
14	21,85,87,89,90	5	5	3	3	6
15	22,29,30	3	3	3	2	3
16	24	1	3	4	1,2	6
17	25	1	3	3	1,2	3
18	28,70,99,100	4	3	3	3	3
19	31,33,34	3	5	5	3	4
20	32	1	5	5	4	6
21	35,37	2	6	5	3	4
22	36	1	6	6	3	4
23	38	1	3	3,5	3	6
24	39	1	4	4	4	4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 (ต่อ)

electrophoretic type	เส้นใยสปอร์ เดี่ยว no.	จำนวน ตัวอย่าง	EST	LDH	LAP	MDH
25	40,41	2	4	3	5	4
26	42	1	4,5	3	4	5
27	43	1	4,5	3	6	6
28	44	1	4	3	3	6
29	45	1	4	3	5	4,6
30	46,47,52,91,92	5	3,6	5	5	4
31	48	1	3,6	5	5,6	6
32	49	1	3	5	5	3,4
33	50	1	4	5	5	6
34	51	1	3,6	6	6	4
35	53,95	2	3	5	5	4
36	54	1	3	5	4	6
37	55-57,59	4	3	5	3	4
38	58	1	4	6	3	4
39	60	1	3	3,5	3	4
40	61,63,68	3	3	3	5	3
41	62	1	5	4	5	4
42	64	1	3	3	5	4
43	65-67	3	3	3	6	3
44	69	1	4	4	4	3
45	71-75	5	3	3	4	3
46	76	1	6	5	3	6
47	77,79,83	3	5	5	3	6
48	78	1	4,5	5	3	6
49	80	1	5	3,5	3	6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 (ต่อ)

electrophoretic type	เส้นใยสปอร์ เดี่ยว no.	จำนวน ตัวอย่าง	EST	LDH	LAP	MDH
50	81	1	6	6	3	6
51	82	1	4	5	4	6
52	84	1	5	4	3	6
53	86	1	5	3	3	3,6
54	88	1	6	3	3	6
55	93	1	3,6	6	5	4
56	94	1	3	5	6	4
57	96	1	3	3	5	6
58	97	1	3	4	3	3
59	98	1	4	3	3	4
จำนวนอัลลีลต่อ โลคัส เฉลี่ย = 4.50			4	4	6	4

จากการเปรียบเทียบแถบแอนไซม์ 59 แบบ โดยใช้ข้อมูลจากตารางที่ 7 สามารถจัดกลุ่มของเส้นใยได้ทั้งหมด 10 กลุ่มใหญ่ และกลุ่มย่อยที่มี ETs ใกล้เคียงกันมากที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8
แสดงการแบ่งกลุ่มของเส้นใยที่มีลักษณะแถบเอนไซม์ใกล้เคียงกัน

กลุ่ม	กลุ่มย่อย	ETs no.	จำนวน ตัวอย่าง	รูปแบบ electrophoretic type				
				EST	LDH	LAP	MDH	
1	1A	1	4	5	5	5	3	
		2	1	5	5	4	4	
		19	3	5	5	3	4	
		20	1	5	5	4	6	
		47	3	5	5	3	6	
	1B	6	1	5	4	4	6	
		41	1	5	4	5	4	
		52	1	5	4	3	6	
	1C	9	1	5	3	2	6	
		14	5	5	3	3	6	
	2	2A	4	1	3	5	4	3
			35	2	3	5	5	4
			36	1	3	5	4	6
			37	4	3	5	3	4
			56	1	3	5	6	4
2B		10	1	3	4	2	6	
		58	1	3	4	3	4	
2C		7	1	3	3	4	6	
		8	6	3	3	3	6	
		12	1	3	3	2	6	
		15	3	3	3	2	3	
		18	4	3	3	3	3	
		40	3	3	3	5	3	
		42	1	3	3	5	4	
		43	3	3	3	6	3	
	45	5	3	3	4	3		
57	1	3	3	5	6			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 (ต่อ)

กลุ่ม	กลุ่มย่อย	ETs no.	จำนวน ตัวอย่าง	รูปแบบ electrophoretic type			
				EST	LDH	LAP	MDH
3	3A	25	2	4	3	5	4
		28	1	4	3	3	6
		59	1	4	3	3	4
	3B	33	1	4	5	5	6
		51	1	4	5	4	6
	3C	38	1	4	6	3	4
	3D	24	1	4	4	4	4
		44	1	4	4	4	3
4	4A	3	1	6	6	5	3
		22	1	6	6	3	4
		50	1	6	6	3	6
	4B	21	2	6	5	3	4
		46	1	6	5	3	6
	4C	54	1	6	3	3	6
5	5A	55	1	3,6	6	5	4
		34	1	3,6	6	6	4
	5B	31	1	3,6	5	5,6	6
		30	5	3,6	5	5	4
6	6A	26	1	4,5	3	4	5
		27	1	4,5	3	6	6
	6B	48	1	4,5	5	3	6
7	7A	23	1	3	3,5	3	6
		39	1	3	3,5	3	4
	7B	49	1	5	3,5	3	6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 (ต่อ)

กลุ่ม	กลุ่มย่อย	ETs no.	จำนวน ตัวอย่าง	รูปแบบ electrophoretic type			
				EST	LDH	LAP	MDH
8		16	1	3	4	1,2	6
		11	1	3	3	1,2	6
		17	1	3	3	1,2	3
9	9A	13	3	3	3	2	3,6
	9B	53	1	5	3	3	3,6
10	10A	5	1	3	3,6	3	6
	10B	29	1	4	3	5	4,6
	10C	32	1	3	5	5	3,4

จากตารางที่ 8 จะเห็นได้ว่าสามารถจัดกลุ่มของเส้นใยโมโนคาร์ร็อนที่มี electrophoretic types แตกต่างกัน 59 แบบ ได้ 10 กลุ่ม ในแต่ละกลุ่มจัดเป็นกลุ่มย่อยที่มีความคล้ายคลึงกันของแถบเอนไซม์ที่ปรากฏ โดยกลุ่มที่ 1-4 จะปรากฏแถบเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดเป็นแถบเดียวทั้งหมด และจะแบ่งกลุ่มตามลักษณะความเหมือนของแถบเอนไซม์ esterase เป็นหลัก หลังจากนั้นจะมีการแบ่งเป็นกลุ่มย่อยตามลักษณะความเหมือนของแถบเอนไซม์ lactate dehydrogenase เป็นลำดับถัดมา ส่วนแถบเอนไซม์ leucine aminopeptidase และ malate dehydrogenase จะมีความแตกต่างกันไป กลุ่มที่ 5-9 จะปรากฏแถบเอนไซม์ที่มีลักษณะเป็นแถบเดียวและ 2 แถบปนกัน โดยจะพิจารณาแบ่งกลุ่มจากแถบเอนไซม์ที่มี 2 แถบเป็นหลัก หลังจากนั้นจะมีการแบ่งเป็นกลุ่มย่อยโดยพิจารณาจากความเหมือนของแถบเอนไซม์ esterase, lactate dehydrogenase, leucine aminopeptidase และ malate dehydrogenase ตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่ 10 จะเป็นกลุ่มที่มีความแตกต่างกันของแถบเอนไซม์มากที่สุด ซึ่งจะแสดงรายละเอียดของการแบ่งกลุ่มได้ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์ร็อนทั้งหมด 21 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นกลุ่มย่อย 3 กลุ่ม ได้แก่ 1A, 1B และ 1C โดยกลุ่มย่อยทั้ง 3 มีแถบเอนไซม์ที่เหมือนกันคือ EST ที่ระดับ 5 กลุ่ม 1A ประกอบด้วย ETs no. 1, 2, 19, 20 และ 47 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์ร็อน 12 ตัวอย่าง มีแถบเอนไซม์ที่เหมือนกันคือ LDH ที่ระดับ 5 กลุ่ม 1B ประกอบด้วย ETs no. 6, 41 และ 52 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์ร็อน 3 ตัวอย่าง มีแถบเอนไซม์ที่เหมือนกันคือ LDH ที่ระดับ 4 ส่วนกลุ่ม 1C

ประกอบด้วย ETs no. 9 และ 14 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอน 6 ตัวอย่าง มีแถบเอนไซม์ที่เหมือนกันคือ LDH ที่ระดับ 3 และ MDH ที่ระดับ 6

- กลุ่มที่ 2 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอนทั้งหมด 39 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นกลุ่มย่อย 3 กลุ่ม ได้แก่ 2A, 2B และ 2C โดยกลุ่มย่อยทั้ง 3 มีแถบเอนไซม์ที่เหมือนกันคือ EST ที่ระดับ 3 กลุ่ม 2A ประกอบด้วย ETs no. 4, 35, 36, 37 และ 56 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอน 9 ตัวอย่าง มีแถบเอนไซม์ที่เหมือนกันคือ LDH ที่ระดับ 5 กลุ่ม 2B ประกอบด้วย ETs no. 10 และ 58 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอน 2 ตัวอย่าง มีแถบเอนไซม์ที่เหมือนกันคือ LDH ที่ระดับ 4 ส่วนกลุ่ม 2C ประกอบด้วย ETs no. 7, 8, 12, 15, 18, 40, 42, 43, 45 และ 57 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอน 28 ตัวอย่าง มีแถบเอนไซม์ที่เหมือนกันคือ LDH ที่ระดับ 3

- กลุ่มที่ 3 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอนทั้งหมด 9 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นกลุ่มย่อย 4 กลุ่ม ได้แก่ 3A, 3B, 3C และ 3D โดยกลุ่มย่อยทั้ง 4 มีแถบเอนไซม์ที่เหมือนกันคือ EST ที่ระดับ 4 กลุ่ม 3A ประกอบด้วย ETs no. 25, 28 และ 59 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอน 4 ตัวอย่าง มีแถบเอนไซม์ที่เหมือนกันคือ LDH ที่ระดับ 3 กลุ่ม 3B ประกอบด้วย ETs no. 33 และ 51 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอน 2 ตัวอย่าง มีแถบเอนไซม์ที่เหมือนกันคือ LDH ที่ระดับ 5 และ MDH ที่ระดับ 6 กลุ่ม 3C ประกอบด้วย ETs no. 38 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอน 1 ตัวอย่าง ส่วนกลุ่ม 3D ประกอบด้วย ETs no. 24 และ 44 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอน 2 ตัวอย่าง มีแถบเอนไซม์ที่เหมือนกันคือ LDH ที่ระดับ 4 และ LAP ที่ระดับ 4

- กลุ่มที่ 4 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอนทั้งหมด 7 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นกลุ่มย่อย 3 กลุ่ม ได้แก่ 4A, 4B และ 4C โดยกลุ่มย่อยทั้ง 3 มีแถบเอนไซม์ที่เหมือนกันคือ EST ที่ระดับ 6 กลุ่ม 4A ประกอบด้วย ETs no. 3, 22 และ 50 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอน 3 ตัวอย่าง มีแถบเอนไซม์ที่เหมือนกันคือ LDH ที่ระดับ 6 กลุ่ม 4B ประกอบด้วย ETs no. 21 และ 46 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอน 3 ตัวอย่าง มีแถบเอนไซม์ที่เหมือนกันคือ LDH ที่ระดับ 5 ส่วนกลุ่ม 4C ประกอบด้วย ETs no. 54 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอน 1 ตัวอย่าง

- กลุ่มที่ 5 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอนทั้งหมด 8 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นกลุ่มย่อย 2 กลุ่ม ได้แก่ 5A และ 5B โดยกลุ่มย่อยทั้ง 2 มีแถบเอนไซม์ที่เหมือนกันคือ EST ที่ระดับ 3-6 กลุ่ม 5A ประกอบด้วย ETs no. 55 และ 34 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอน 2 ตัวอย่าง มีแถบเอนไซม์ที่เหมือนกันคือ LDH ที่ระดับ 6 และ MDH ที่ระดับ 4 ส่วนกลุ่ม 5B ประกอบด้วย ETs no. 31 และ 30 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอน 6 ตัวอย่าง มีแถบเอนไซม์ที่เหมือนกันคือ LDH ที่ระดับ 5

- กลุ่มที่ 6 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอนทั้งหมด 3 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นกลุ่มย่อย 2 กลุ่ม ได้แก่ 6A และ 6B โดยกลุ่มย่อยทั้ง 2 มีแถบเอนไซม์ที่เหมือนกันคือ EST ที่ระดับ 4-5 กลุ่ม 6A

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้า เสนอข้อมูลให้มาเปิดเผยประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประกอบด้วย ETs no. 26 และ 27 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอน 2 ตัวอย่าง มีแถบเอนไซม์ที่เหมือนกันคือ LDH ที่ระดับ 3 ส่วนกลุ่ม 6B ประกอบด้วย ETs no. 48 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอน 1 ตัวอย่าง

- กลุ่มที่ 7 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอนทั้งหมด 3 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นกลุ่มย่อย 2 กลุ่ม ได้แก่ 7A และ 7B โดยกลุ่มย่อยทั้ง 2 มีแถบเอนไซม์ที่เหมือนกันคือ LDH ที่ระดับ 3-5 กลุ่ม 7A ประกอบด้วย ETs no. 23 และ 39 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอน 2 ตัวอย่าง มีแถบเอนไซม์ที่เหมือนกันคือ EST ที่ระดับ 3 และ LAP ที่ระดับ 3 ส่วนกลุ่ม 7B ประกอบด้วย ETs no. 49 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอน 1 ตัวอย่าง

- กลุ่มที่ 8 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอนทั้งหมด 3 ตัวอย่าง มีแถบเอนไซม์ที่เหมือนกันคือ LAP ที่ระดับ 1-2 และ EST ที่ระดับ 3 ประกอบด้วย ETs no. 16 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอน 1 ตัวอย่าง, ETs no. 11 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอน 1 ตัวอย่าง และ ETs no. 17 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอน 1 ตัวอย่าง

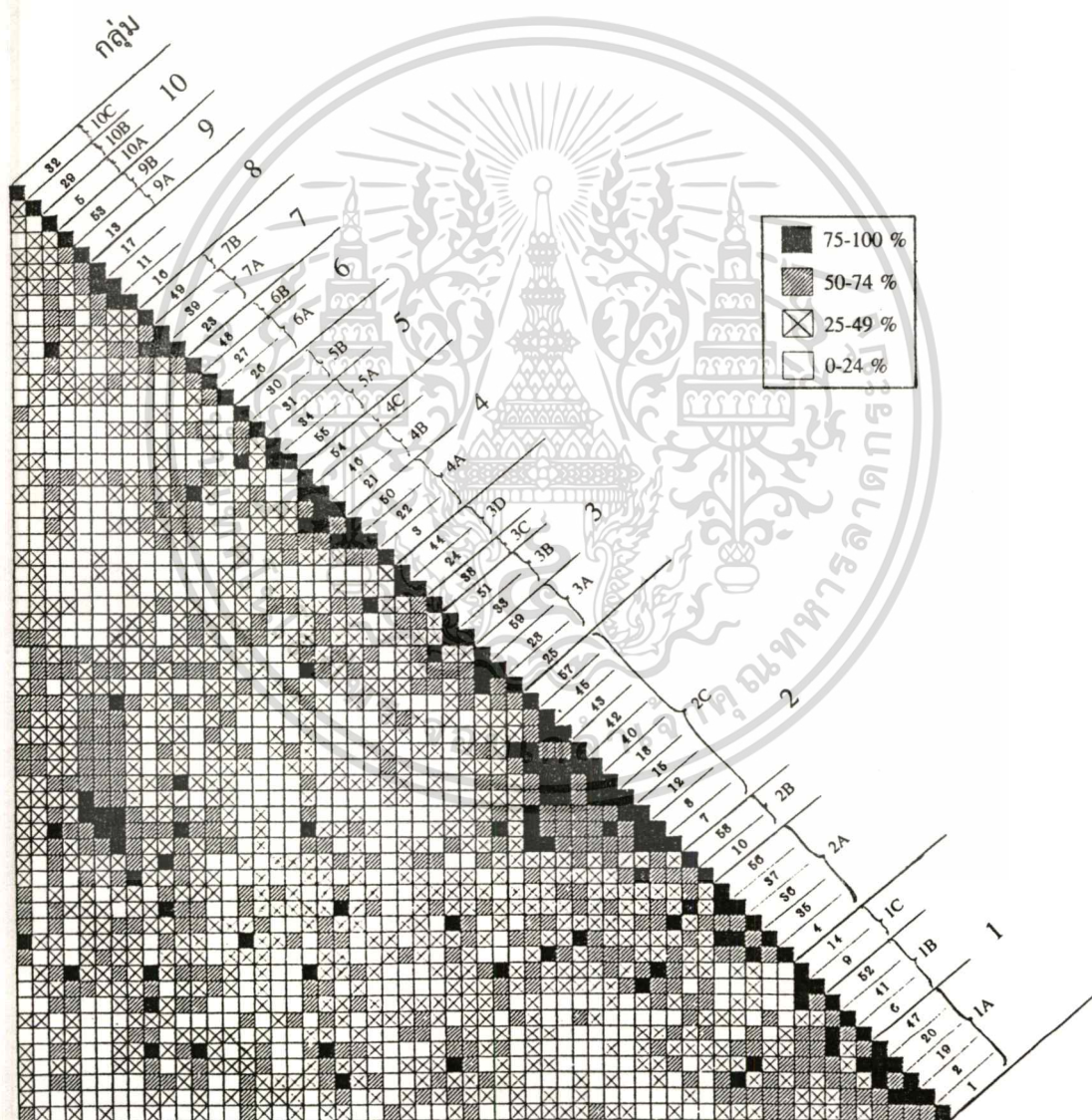
- กลุ่มที่ 9 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอนทั้งหมด 4 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นกลุ่มย่อย 2 กลุ่ม ได้แก่ 9A และ 9B โดยกลุ่มย่อยทั้ง 2 มีแถบเอนไซม์ที่เหมือนกันคือ MDH ที่ระดับ 3-6 กลุ่ม 9A ประกอบด้วย ETs no. 13 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอน 3 ตัวอย่าง ส่วนกลุ่ม 9B ประกอบด้วย ETs no. 53 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอน 1 ตัวอย่าง

- กลุ่มที่ 10 จะเป็นกลุ่มที่มีความแตกต่างกันของแถบเอนไซม์มากที่สุด แบ่งเป็น 3 กลุ่ม ซึ่งมีค่า electrophoretic types แตกต่างกันทั้งหมด ได้แก่กลุ่ม 10A, 10B และ 10C โดยกลุ่ม 10A ประกอบด้วย ETs no. 5 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอน 1 ตัวอย่าง ซึ่งมีแถบเอนไซม์ EST ที่ระดับ 3, LDH ที่ระดับ 3-6, LAP ที่ระดับ 3 และ MDH ที่ระดับ 6 กลุ่ม 10B ประกอบด้วย ETs no. 29 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอน 1 ตัวอย่าง ซึ่งมีแถบเอนไซม์ EST ที่ระดับ 4, LDH ที่ระดับ 3, LAP ที่ระดับ 5 และ MDH ที่ระดับ 4-6 ส่วนกลุ่ม 10C ประกอบด้วย ETs no. 32 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอน 1 ตัวอย่าง ซึ่งมีแถบเอนไซม์ EST ที่ระดับ 3, LDH ที่ระดับ 5, LAP ที่ระดับ 5 และ MDH ที่ระดับ 3-4

4.9 matrix of similarities of enzyme type in ETs

เปรียบเทียบลักษณะแถบเอนไซม์ 59 แบบทีละคู่ของเอนไซม์ 4 ชนิด โดยแบ่งตามกลุ่มที่มีลักษณะแถบเอนไซม์ที่ใกล้เคียงกัน (ใช้ข้อมูลจากตารางที่ 8) โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรม (similarity) ดังแสดงในภาพที่ 15

ภาพที่ 15



แสดงการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันระหว่างลักษณะแถบเอนไซม์ทีละคู่ทั้งหมด 1,711 คู่
จากลักษณะแถบเอนไซม์ 59 แบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่เป็นอาหารแข็งที่มีวัน 3 เปอร์เซ็นต์ แล้วเททับด้วยอาหารที่มีวัน 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่เท่ากับ 13.77 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในสถานะที่เป็นอาหารเหลวมีเปอร์เซ็นต์การสร้างผนังเซลล์ขึ้นใหม่เท่ากับ 4.38 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นคัดแยกเส้นใยโมโนคาร์บอนที่เจริญจากโปรโตพลาสต์เพื่อนำไปศึกษาไอโซไซม์

เมื่อศึกษาการเพาะเลี้ยงเส้นใยโมโนคาร์บอนจากสปอร์เดี่ยว พบว่าเบซิดิโอสปอร์ของเห็ดดินแรดสามารถงอกได้บนอาหาร PDA ที่มีเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เจริญร่วมอยู่ด้วย โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เท่ากับ 21.64 เปอร์เซ็นต์ และจากการทดลองของวสันต์และวิชัย (2530 b) พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์เท่ากับ 24.27 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นเปอร์เซ็นต์ที่สูงกว่าเพียงเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าสปอร์ที่เก็บมา ไม่ได้นำมาทำการทดลองโดยทันที ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การงอกของสปอร์ลดลง หลังจากนั้นทำการตัดเส้นใยที่เจริญจากสปอร์เดี่ยวมาแยกเลี้ยงในอาหาร PDA ก็จะได้เส้นใยชนิดโมโนคาร์บอน เพื่อศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นในเส้นใยโมโนคาร์บอนที่ได้จากโปรโตพลาสต์และที่ได้จากสปอร์เดี่ยวโดยเอนไซม์อเล็กโตรฟอริซิส เอนไซม์ 4 ชนิดที่ใช้ตรวจสอบคือเอนไซม์ esterase (EST), lactate dehydrogenase (LDH), leucine aminopeptidase (LAP) และ malate dehydrogenase (MDH) เส้นใยโมโนคาร์บอนที่เจริญจากโปรโตพลาสต์เจริญช้ามาก และหยุดการเจริญเติบโตเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 7 วัน ทำให้ได้ปริมาณเส้นใยไม่เพียงพอในการศึกษาไอโซไซม์ ดังนั้นการศึกษาเอนไซม์อเล็กโตรฟอริซิสจึงศึกษาจากเส้นใยโมโนคาร์บอนจากสปอร์เดี่ยวเพียงอย่างเดียว

จากการศึกษาแถบเอนไซม์ 4 ชนิดจากเส้นใยสปอร์เดี่ยวของเห็ดดินแรด *Tricholoma crassum* ที่เก็บตัวอย่างจากศูนย์เพาะเห็ดบ้านอรัญญิก พบว่าเส้นใยมีความหลากหลายทางพันธุกรรม สามารถจัดแบ่งลักษณะแถบเอนไซม์ (electrophoretic type หรือ ETs) ที่แตกต่างกัน 59 แบบ โดยที่เอนไซม์ EST ประกอบด้วยแถบเอนไซม์ที่ระดับ 3, 4, 5, 6, 3-6 และ 4-5 เอนไซม์ LDH ประกอบด้วยแถบเอนไซม์ที่ระดับ 3, 4, 5, 6, 3-5 และ 3-6 เอนไซม์ LAP ประกอบด้วยแถบเอนไซม์ที่ระดับ 2, 3, 4, 5, 6, 1-2 และ 5-6 เอนไซม์ MDH ประกอบด้วยแถบเอนไซม์ที่ระดับ 3, 4, 5, 6, 3-4, 3-6 และ 4-6 แถบเอนไซม์เหล่านี้แสดงถึงความผันแปรของอัลลีลที่เกี่ยวข้องในแต่ละแถบเอนไซม์ (allelic variation) ที่สำคัญคือมีรีคอมบิเนชันเกิดขึ้นระหว่างยีน (genetic recombination) ในโลกัสของเอนไซม์ 4 ชนิด ทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม (Milkman, 1973)

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของแถบเอนไซม์ที่ปรากฏในแนวเดียวกันที่ละคู่ทั้งหมด 1,711 คู่ ในประชากรทั้งหมด พบว่าอยู่ในช่วงตั้งแต่ 0-75 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงว่ามีความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่หรือใช้ในการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นในประชากร ความแปรผันทางพันธุกรรมของเส้นใยที่นำมาศึกษาเป็นผลมาจากการที่เกิดการผสมพันธุ์แบบใช้เพศมาก่อน ทำให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรม และเมื่อนำเส้นใยโมโนคาร์บอนที่มี electrophoretic types แตกต่างกัน 59 แบบมาจัดกลุ่ม สามารถจัดเป็นกลุ่มใหญ่ได้ทั้งหมด 10 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1-4 จะปรากฏแถบเอนไซม์เป็นแถบเดียวทั้งหมด และจะแบ่งกลุ่มตามลักษณะความเหมือนของแถบเอนไซม์ EST เป็นหลัก หลังจากนั้นจะมีการแบ่งเป็นกลุ่มย่อยตามลักษณะความเหมือนของแถบเอนไซม์ LDH เป็นลำดับถัดมา กลุ่มที่ 5-9 จะพิจารณาแบ่งกลุ่มจากแถบเอนไซม์ที่มี 2 แถบเป็นหลัก ส่วนกลุ่มที่ 10 จะเป็นกลุ่มที่มีความแตกต่างกันของแถบเอนไซม์มากที่สุด สามารถแบ่งได้ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอนทั้งหมด 21 ตัวอย่าง แบ่งเป็น 3 กลุ่มย่อย โดยกลุ่มย่อยทั้ง 3 มีแถบเอนไซม์ของ EST ที่ระดับ 5 เหมือนกันทั้งหมด
- กลุ่มที่ 2 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอนทั้งหมด 39 ตัวอย่าง แบ่งเป็น 3 กลุ่มย่อย โดยกลุ่มย่อยทั้ง 3 มีแถบเอนไซม์ของ EST ที่ระดับ 3 เหมือนกันทั้งหมด
- กลุ่มที่ 3 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอนทั้งหมด 9 ตัวอย่าง แบ่งเป็น 4 กลุ่มย่อย โดยกลุ่มย่อยทั้ง 4 มีแถบเอนไซม์ของ EST ที่ระดับ 4 เหมือนกันทั้งหมด
- กลุ่มที่ 4 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอนทั้งหมด 7 ตัวอย่าง แบ่งเป็น 3 กลุ่มย่อย โดยกลุ่มย่อยทั้ง 3 มีแถบเอนไซม์ของ EST ที่ระดับ 6 เหมือนกันทั้งหมด
- กลุ่มที่ 5 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอนทั้งหมด 8 ตัวอย่าง แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย โดยกลุ่มย่อยทั้ง 2 มีแถบเอนไซม์ของ EST ที่ระดับ 3-6 เหมือนกันทั้งหมด
- กลุ่มที่ 6 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอนทั้งหมด 3 ตัวอย่าง แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย โดยกลุ่มย่อยทั้ง 2 มีแถบเอนไซม์ของ EST ที่ระดับ 4-5 เหมือนกันทั้งหมด
- กลุ่มที่ 7 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอนทั้งหมด 3 ตัวอย่าง แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย โดยกลุ่มย่อยทั้ง 2 มีแถบเอนไซม์ของ LDH ที่ระดับ 3-5 เหมือนกันทั้งหมด
- กลุ่มที่ 8 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอนทั้งหมด 3 ตัวอย่าง มีแถบเอนไซม์ของ LAP ที่ระดับ 1-2 และแถบเอนไซม์ของ EST ที่ระดับ 3 เหมือนกันทั้งหมด
- กลุ่มที่ 9 มีจำนวนเส้นใยโมโนคาร์บอนทั้งหมด 4 ตัวอย่าง แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย โดยกลุ่มย่อยทั้ง 2 มีแถบเอนไซม์ของ MDH ที่ระดับ 3-6 เหมือนกันทั้งหมด
- กลุ่มที่ 10 จะเป็นกลุ่มที่มีความแตกต่างกันของแถบเอนไซม์มากที่สุด แบ่งเป็น 3 กลุ่มซึ่งมีค่า electrophoretic types แตกต่างกันทั้งหมด

ข้อเสนอแนะคือจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมโดยเพิ่มชนิดของเอนไซม์ให้มากขึ้น ตลอดจนกลุ่มตัวอย่างที่เก็บควรเก็บจากสถานที่อื่น ๆ หลาย ๆ แห่ง เพื่อให้ได้ข้อมูลที่นำมาวิเคราะห์ผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการแข่งขันเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ผู้ใดเห็นประโยชน์หรือประสงค์ในการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองเชื่อถือได้มากขึ้น ดังนั้นจึงควรที่จะทำการวิจัยเพิ่มเติมต่อไปอีก โดยศึกษาจากหัดดินเรดที่มีอยู่ในจังหวัดต่าง ๆ ที่มีสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการศึกษาค้นคว้าความแตกต่างทางพันธุกรรมของหัดชนิดนี้ และศึกษาตรวจสอบยีนไทป์ของยีนคู่ผสมพันธุ์ (mating type) เพื่อประโยชน์ในการผสมพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ต่อไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

ชมรมเห็ด มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, การเพาะเห็ดตีนแรด, เห็ดที่เพาะในถุงพลาสติก, 55-56, สำนักพิมพ์ฐานเกษตรกรรม, 2532.

ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ. 2519. การเพาะเห็ดตีนแรดในถุงพลาสติก. เห็ดวิทยา 1 : 22-25.

ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ. 2520. การเพาะเห็ดและเห็ดบางชนิดในประเทศไทย. อักษรสยาม การพิมพ์ กรุงเทพฯ.

ณรงค์ มินะนันท์. 2501. การศึกษาทดลองเพาะเลี้ยงเห็ดใหญ่ (*Tricholoma* sp.). วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี คณะกสิกรรมและสัตวบาล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

นงพงา คุณจักร, “การปรับปรุงความทนเค็มของยีสต์ที่ผลิตเอทานอล โดยใช้เทคนิคโปรโตพลาสต์ฟิวชัน”, วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2530.

ประสาทร สมิตะมาน, เอกสารประกอบการอบรมการเพาะเลี้ยงเนื้อเชื้อรันทู 1, 2526.

ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์, เทคโนโลยีการเพาะเห็ด, 1-450, 2532.

พันธุ์ทวี ภักดีดินแดน พิมพ์กานต์ นิมศิริ และพรณี พงษ์เขตคาม. 2516. การศึกษาและการเพาะเห็ดไตรโคโลมา. รายงานผลการค้นคว้าวิจัย ประจำปี 2516 กองวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

พันธุ์ทวี ภักดีดินแดน และคณะ. 2517. ศึกษาวิธีเพาะเห็ดตีนแรด. รายงานผลการค้นคว้าวิจัย ประจำปี 2517 กองวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

พันธุ์ทวี ภักดีดินแดน 2518-2519. การทดลองเพาะเห็ดตีนแรด (*Tricholoma* sp.). รายงานผลการค้นคว้าวิจัย ประจำปี 2518-2519 กองวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

พันธุ์ทวี ภักดีดินแดน 2518-2519. การศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับการเพาะเห็ดตีนแรด. วารสารเห็ดสยาม 2 : 34-43.

พันธุ์ทวี ภักดีดินแดน 2518-2519. การศึกษาวิจัยวิธีเพาะเห็ดตีนแรด. วารสารเห็ดสยาม 2 : 49-68.

มาลินี ดันดิยาภรณ์, สุจิตรา นิมจิตร, ลัญญา ธิติลักษณ์ และเอกรัตน์ ไชยฤทธิ์ 2536. การเตรียมโปรโตพลาสต์จากเส้นใยและการสร้างผนังเซลล์ใหม่ของเห็ดตีนแรด. วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง 1 : 15-21.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วสันต์ เพชรรัตน์, “ I การศึกษาสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และการเพาะเห็ดดิน ; II ลักษณะการสืบพันธุ์ทางเพศของเห็ดดินแรด”, วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2522.

วสันต์ เพชรรัตน์ และวิชัย รักวิทยาศาสตร์ 2530 a. การเพาะเห็ดดินแรด. วารสารโรคพืช 7 : 1-13.

วสันต์ เพชรรัตน์ และวิชัย รักวิทยาศาสตร์ 2530 b. การงอก basidiospore ของเห็ดดินแรด. วารสารโรคพืช 7 : 14-29.

วสันต์ เพชรรัตน์ และวิชัย รักวิทยาศาสตร์ 2530 c. ลักษณะการผสมพันธุ์ของเห็ดดินแรด. วารสารโรคพืช 7 : 30-43.

วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และสรวง อุคมวรภัณฑ์, บรรณาธิการ. หนังสือคู่มือปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ (สาขานานาชาติ : โรงพิมพ์สาธารณสุขมูลฐานอาเซียน, 2536), หน้า 4.1-4.29.

ศุภชัย สุนทรภา 2520-2521. เห็ดดินแรด. วารสารเห็ดสยาม 3 : 36-39.

สำเนา ภัทรเกษวิทย์ เสียงทอง นุตาลัย และศิริพงศ์ บุญหลง 2514. การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการเพาะเห็ดดินแรด. เกษตรสาร 4 : 219-223.

สำเนา ภัทรเกษวิทย์ เสียงทอง นุตาลัย และศิริพงศ์ บุญหลง 2516. การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการเพาะเห็ดดินแรด. วารสารเห็ดสยาม 1 : 35-38.

อนงค์ จันทศรีกุล, เห็ดเมืองไทย, ครั้งที่ 3, บริษัท สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช จำกัด, 2530.

Abe, M., H. Umetsu, T. Nakai and D. Sassage. 1982. Regeneration and fusion of mycelial protoplasts of *Tricholoma matsutake*. Agric. Biol. Chem. 46 : 1955-1957.

Anderson, F.B. and J.W. Millbank. 1966. Protoplast formation and yeast cell wall structure. Biochem. J. 99 : 682-687.

Báptist, J.N., C.R. Shaw and M. Mandel. 1969. Zone electrophoresis of enzymes in bacterial taxonomy. J. Bacteriol. 99 : 180-188.

Bástide, J.M., E.H. Hadibi and M. Bastide. 1979. Taxonomic significant of yeast sphearoplast release after enzymic treatment of intact cells. J. of Gen. Microbiol. 113 : 147-153.

Caugant, D.A., B.R. Levin and R.K. Selander. 1981. Genetic diversity and temporal variation in *E. coli* population of a human host. Genetics. 98 : 467-490.

Chang, S.T. and C.K. You. 1971. *Volvariella volvaceae* and its life history. Amer. J. Bot. 58 : 552-561.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Chung, H.K., W.T. Sue and K.I. Ku. 1984. Studies on improvement of brewing yeast by protoplast fusion. *J. Genet. Eng.* 1 (1) : 37-46.
- Davies, R. and P.A. Elvin. 1964. The effect of β -mercaptoethanol on release of invertase and formation of protoplasts of *Saccharomyces fragilis*. *Biochem. J.* 93 (3) : 8.
- Delgado, J.M., L.S. Herrera, C. Perez and R. Lopez. 1979. Optimization on the selection of auxotrophic mutants in *Candida utilis* by snail enzyme treatment. *Can. J. Microbiol.* 25 : 486-490.
- De Vries, O.M.H. and J.G.H. Wessels. 1972. Release of protoplasts from *Schizophyllum commune* by a lytic enzyme preparation from *Trichoderma viride*. *J. Gen. Microbiol.* 73 : 13-22.
- Eguchi, F., M. Tashiro, T. Suzuki and M. Higaki. 1990. Preparation and regeneration of protoplasts of edible mushrooms. *Journal of the Japan Wood Research Society.* 36 : 232-240.
- Eugenio, C.P. and N.A. Anderson. 1968. The genetics and cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Mycologia.* 60 : 627-634.
- Ferenczy, L., M. Sipiczki and M. Szegedi. 1975. Enrichment of fungal mutants by selective cell wall lysis. *Nature.* 2538 : 46-47.
- Foury, F. and A. Goffeau. 1973. Combination of 2-deoxyglucose and snail gut enzyme treatments for preparing spheroplasts of *Schizosaccharomyces pombe*. *J. of Gen. Microbiol.* 75 : 227-229.
- Fries, N. 1954. On spore germination of certain Gasteromycetes and mycorrhiza forming Hymenomycetes. *Review of Applied Mycology* 22 : 398.
- Hong, S.W. and Y. Yeup. 1985. Formation and regeneration of protoplasts in *Lentinus edodes*. *Mushroom Newsletter for the Tropics.* 5 : 4-10.
- Hutchinson, H.T. and L.H. Hartwell. 1967. Macromolecule synthesis in yeast spheroplast. *J. Bacteriol.* 94 : 1967-1705.
- Kitamura, K. and Y. Yamamoto. 1981. Lysis of yeast cells showing low susceptibility to zymolase. *Arg. Biol. Chem.* 45 (8) : 1761-1766.
- Mishio, T. 1981. Sporulation of products of protoplast fusion without regeneration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 182 : 1-6.

- Morinaga, T., M. Kikuchi and R. Nomi. 1985. Formation and regeneration of protoplasts in *Coprinus pellucidus* and *Coprinus cinereus*. *Agric. Biol. Chem.* 49 : 523-524.
- Mukherjee, M. and S. Sengupta. 1986. Mutagenesis of protoplasts and regeneration of mycelium in the mushroom *Volvariella volvacea*. *Appl. Environ. Microbiol.* 52 : 1412-1414.
- Papazian, R.P. 1950. Physiology of incompatibility factors in *Schizerythrum commune*. *Bot. Gaz.* 112 : 143-162.
- Pasteur, N., G. Pasteur, F. Bonhomme, L. Catalan and L. Britton-Davidian. Practical isozyme genetics. (English Edition Ellis Horwood Limited Publishers Chichester, 1988)
- Peberdy, J.F. 1975. Fungal protoplast : isolation, reversion and fusion. *Ann. Rev. of Microbiol.* 33 : 21-23.
- Peterson, E.M., R.J. Hawley and R.A. Calderone. 1976. An ultrastructural analysis of protoplast-sphereoplast induction in *Cryptococcus neoformans*. *Can. J. of Microbiol.* 22 : 1518-1521.
- Raper, J.R. 1960. The control of sex in fungi. *Amer. J. Bot.* 47 : 749-808.
- Raxon, J.E. and S.C. Jong. 1977. Sexuality of an edible mushroom of *Pleurotus sajor-caju*. *Mycologia.* 69 : 203-205.
- Revathi, R. and D. Lalithakumari. 1993. *Venturia inaequalis* : a novel method for protoplast isolation and regeneration. *Zeitschrift-fur-Pflanzenkrankheiten-und-Pflanzenschutz.* 100 : 211-219.
- Seki, T. and S. Limtong. Instruction on Yeast Genetics. เอกสารฝึกอบรมเรื่องเทคนิคและวิธีการวิจัยทางจุลชีววิทยา. ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม. 302. 1983.
- Sipiczki, M., W-D. Heyer and J. Kohli. 1985. Preparation and regeneration of protoplast and sphereoplast for fusion and transformation of *Scizosaccharomyces pombe*. *Curr. Microbiol.* 12 : 169-174.
- Sommer, A. and M. J. Lewis. 1971. Effect of dithiothreitol on yeast : sphereoplast formation and invertase release. *J. Gen. Microbiol.* 69 : 327-335.

- Stewart, G.G. and I. Russell. Protoplast formation and fusion. Yeast : Their identification preservation and use in biotechnology. Bangkok MIRCEN Thailand institute of scientific and technological research. Bangkok, Thailand. 3p. 1984.
- Svihla, G., F. Schlenk and J.L. Dainko. 1961. Sphearoplasts of the yeast *Candida utilis*. J. of Bacteriol. 82 : 808-814.
- Torres-Bauza, J.L. and W. Stuart Riggsby. 1980. Protoplast from yeast mycelial forms of *Candida albicans*. J. Gen. Microbiol. 119 : 341-349.
- Ventura, L., B. Perez, D. Ramon, C. Tortajada, R. Gonzalez and S. Ferrer. 1992. Factors affecting isolation and regeneration of protoplasts from *Trichophyton mentagrophytes*. Mycologia. 9 : 31-34.
- Villanueva, J.R., and I. Gracia Acha. 1971. Production and use of fungal protoplast, p. 666-718. In C. Booth (ed.), Methods in microbiology, vol. 4. Academic Press, Inc., New York.
- Wang, S.S. and N.A. Anderson. 1972. A genetic analysis of sporocarp production in *Pleurotus sapidus*. Mycologia. 64 : 521-528.
- Yanagi, S.O., M. Monma, T. Kawasumi, A. Hino, M. Kito and I. Takebe. 1985. Condition for isolation of and colony formation by mycelial protoplasts of *Coprinus macrorhizus*. Agric. Biol. Chem. 49 : 171-179.
- Yang, H.Y., Z.T. Wu, Z. Ye, J.F. Wang and L.N. Ji. 1992. A study of protoplast isolation from *Aspergillus niger* and their regeneration. Hereditas-Beijing. 14 : 31-34.
- Yinjie, P., W. Zhaoyue, W. Yueying and S.H. Li.Yi. 1991. Cultural and biochemical characteristics of monokaryotic mycelium of *Lentinus edodes*. Edible fungi research institute, Shanghai. Academy of agricultural science, Shanghai.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA (potato dextrose agar)

ละลายผงอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป PDA 36 กรัม เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

หรือสูตรอาหารวุ้น ประกอบด้วย

มันฝรั่ง	200	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	20	กรัม
วุ้นผง	15	กรัม
น้ำ	1,000	มิลลิลิตร

วิธีทำ

1. นำมันฝรั่งมาปอกเปลือก แล้วหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดเท่ากับลูกเต๋า หรือมีขนาด 1 x 1 x 1 ลูกบาศก์เซ็นติเมตร
2. นำมันฝรั่งมาต้มกับน้ำที่สะอาดปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ไฟอ่อน ๆ เพราะถ้าใช้ไฟแรงมันฝรั่งอาจจะเปื่อย ยุ่ย และละลายออกมาทำให้อาหารวุ้นมีลักษณะขุ่นขาว ซึ่งยากต่อการสังเกตการเดินของเส้นใยเห็ด การต้มมันฝรั่งควรใช้เวลานานประมาณ 15 นาที นับจากน้ำเดือด
3. กรองเอากากมันฝรั่งออกและให้คั้นน้ำที่สกัดจากมันฝรั่งต่อไป จากนั้นจึงเติมน้ำตาลลงไป คนจนกระทั่งน้ำตาลละลายหมด
4. ส่วนที่เป็นวุ้น นำมาผสมกับน้ำเย็นก่อน เพราะถ้าใส่ลงไปในขณะที่เป็นผงแล้วจะทำให้วุ้นจับกันเป็นก้อนได้ หลังจากที่น่าวุ้นผสมกับน้ำเย็นแล้ว จึงเทใส่ลงไปในส่วนผสมพร้อมกับคนอยู่ตลอดเวลาเพื่อป้องกันไม่ให้อาหารวุ้นไหม้บริเวณก้นหม้อ
5. เมื่ออาหารวุ้นละลายหมดแล้ว นำไปบรรจุลงในขวดใส่อาหาร หลังจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ PDB (potato dextrose broth)

ละลายผงอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป PDB 24 กรัม เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

หรือเตรียมเหมือนสูตรอาหารวุ้น PDA แต่ไม่เติมน้ำตาลลงไป

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ regeneration medium

น้ำตาลกลูโคส 5 กรัม

ยีสต์สกัด 5 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในสารละลาย osmotic stabilizer (ดูวิธีการเตรียมในภาคผนวก ข) ให้มีปริมาตรครบ 1000 มิลลิลิตร

หมายเหตุ การปรับค่า pH ให้ได้ตามต้องการ ทำได้โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือสารละลายไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 1 โมลต่อลิตร

สารละลายสำหรับปรับค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 โมลต่อลิตร

เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

สารละลายไฮโดรคลอริก 1 โมลต่อลิตร

เตรียมโดยใช้ Conc.HCl ปริมาตร 3.09 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการเตรียมโปรโตพลาสต์

1. สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.01 โมลาร์

เตรียมสารละลายไดโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.01 โมลต่อลิตร โดยชั่งน้ำหนักของ Na_2HPO_4 1.4196 กรัม แล้วใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดวัดปริมาตร จะได้เป็นสารละลาย ก. จากนั้นเตรียมสารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.01 โมลต่อลิตร โดยชั่งน้ำหนักของ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.5601 กรัม แล้วใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดวัดปริมาตร จะได้เป็นสารละลาย ข.

ผสมสารละลาย ก. และ ข. เข้าด้วยกัน ให้ได้ pH ตามต้องการ

2. สารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.01 โมลาร์

เตรียมสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.01 โมลต่อลิตร โดยชั่งน้ำหนักของ K_2HPO_4 1.7418 กรัม แล้วใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดวัดปริมาตร จะได้เป็นสารละลาย ก. จากนั้นเตรียมสารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.01 โมลต่อลิตร โดยชั่งน้ำหนักของ $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.5601 กรัม แล้วใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดวัดปริมาตร จะได้เป็นสารละลาย ข.

ผสมสารละลาย ก. และ ข. เข้าด้วยกัน ให้ได้ pH ตามต้องการ

3. สารละลาย 2-mercaptoethanol 0.1 โมลาร์

เตรียมจาก 2-mercaptoethanol 3.125 มิลลิลิตร ใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร

4. สารละลาย osmotic stabilizer

ชั่งโปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) 4.4736 กรัม ละลายในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.01 โมลาร์ (pH 6.0) ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. สารละลาย lytic enzyme

ซังโปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) 4.92096 กรัม ละลายในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.01 โมลาร์ (pH 6.0) ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้เป็นสารละลาย ก.

นำสารละลาย ก. มา 8.1 มิลลิลิตร เติม 2-mercaptoethanol 0.1 โมลาร์ 0.9 มิลลิลิตร ซังปริมาณของเอนไซม์ตามต้องการ



ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาไอโซไซม์

1. Tracking dye

Bromophenol blue	0.15	กรัม
Sucrose	48	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	100	มิลลิลิตร

2. การเตรียม Gel buffer และ Tray buffer สำหรับเอนไซม์แต่ละชนิด

2.1 Esterase

การเตรียม Tray buffer และ Gel buffer

Tris base	10.8	กรัม
Boric acid	5.5	กรัม
EDTA	0.93	กรัม

เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 8.3 โดยใช้ 1 โมลาร์

Boric acid หรือ 1 โมลาร์ Tris base

2.2 Lactate dehydrogenase และ Malate dehydrogenase

การเตรียม Tray buffer

Tris base	21.81	กรัม
Boric acid	6.18	กรัม
EDTA	1.17	กรัม

เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 8.7 โดยใช้ 1 โมลาร์

Boric acid หรือ 1 โมลาร์ Tris base

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียม Gel buffer

นำ Tray buffer มาผสมกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:3 ปรับ pH ให้เป็น 8.7 โดยใช้ 1 โมลาร์ Boric acid หรือ 1 โมลาร์ Tris base

2.3 Leucine aminopeptidase

การเตรียม Tray buffer

Lithium hydroxide	2.52	กรัม
Boric acid	18.55	กรัม

เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 8.1 โดยใช้ 1 โมลาร์ Boric acid หรือ 1 โมลาร์ Lithium hydroxide

การเตรียม Gel buffer

Tris base	3.63	กรัม
Citrate	0.96	กรัม
Tray buffer	10	มิลลิลิตร

เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 8.5 โดยใช้ 1 โมลาร์ Citrate หรือ 1 โมลาร์ Tris base

สารละลายสำหรับปรับค่า pH ของบัฟเฟอร์

สารละลาย Boric acid 1 โมลาร์

เตรียมโดยชั่ง Boric acid 6.18 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

สารละลาย Tris base 1 โมลาร์

เตรียมโดยชั่ง Tris base 12.11 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลาย Lithium hydroxide 1 โมลาร์

เตรียมโดยชั่ง Lithium hydroxide 4.20 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

สารละลาย Citrate 1 โมลาร์

เตรียมโดยชั่ง Citrate 19.21 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

3. การเตรียม Staining solution

3.1 Esterase

Phosphate-A buffer (pH 7)	50	มิลลิลิตร
α -Naphthyl propionate (1% in acetone)	1	มิลลิลิตร
β -Naphthyl propionate (1% in acetone)	1	มิลลิลิตร
Fast blue RR salt	20	มิลลิกรัม

นำแผ่นเจลมาแช่ลงในสารละลายนาน 10-15 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.2 Lactate dehydrogenase

Tris-A buffer	35	มิลลิลิตร
D,L-Lactic acid (0.5 M)	6	มิลลิลิตร
NAD (1% in H ₂ O)	1	มิลลิลิตร
ก่อนใช้เติม :		
NBT (1% in H ₂ O)	0.3	มิลลิลิตร
PMS (1% in H ₂ O)	0.5	มิลลิลิตร

แช่แผ่นเจลลงในสารละลาย บ่มไว้ในที่มีคจนกระทั่ง banding ปรากฏ

3.3 Leucine aminopeptidase

Tris malate buffer (0.2 M)	25	มิลลิลิตร
Fast black K salt (1% in H ₂ O)	1.25	มิลลิลิตร
L-Leucyl-β-naphthylamide 1 %	1	มิลลิลิตร

นำแผ่นเจลมาแช่ลงในสารละลายนาน 20-30 นาที ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.4 Malate dehydrogenase

Tris-A buffer	35	มิลลิลิตร
Malic acid 2 M (pH 7)	5	มิลลิลิตร
MgCl ₂ (0.5 M)	0.3	มิลลิลิตร
NAD (1% in H ₂ O)	2	มิลลิลิตร
ก่อนใช้เติม :		
NBT (1% in H ₂ O)	1	มิลลิลิตร
PMS (1% in H ₂ O)	0.5	มิลลิลิตร
MTT (1% in H ₂ O)	1	มิลลิลิตร

แช่แผ่นเจลลงในสารละลาย บ่มไว้ในที่มืดจนกระทั่ง banding ปรากฏ

การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการย้อมเอ็นไซม์

การเตรียม Phosphate-A buffer (pH 7)

NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	3.12	กรัม
Na ₂ HPO ₄ (anhydrous)	2.84	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	1,000	มิลลิลิตร

การเตรียม α-Naphthyl propionate 1 เปอร์เซ็นต์

α-Naphthyl propionate	0.2	กรัม
เติม acetone ให้มีปริมาตรครบ	20	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียม β -Naphthyl propionate 1 เปอร์เซ็นต์

β -Naphthyl propionate	0.2	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	20	มิลลิลิตร

การเตรียม Tris-A buffer

EDTA	0.4	กรัม
Tris base	24.2	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 8 โดยใช้ concentrated HCl ประมาณ 11 มิลลิลิตร		

การเตรียม D,L-lactic acid 0.5 โมลาร์

Lithium D,L-lactate	9.6	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	200	มิลลิลิตร

การเตรียม NAD 1 เปอร์เซ็นต์

β -NAD	1	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	100	มิลลิลิตร

การเตรียม NBT 1 เปอร์เซ็นต์

Nitro blue tetrazolium	1	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	100	มิลลิลิตร

การเตรียม PMS 1 เปอร์เซ็นต์

Phenazine methosulphate	1	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	100	มิลลิลิตร

การเตรียม Tris malate buffer 0.2 โมลาร์

Malic anhydride	19.612	กรัม
Tris base	24.22	กรัม
น้ำกลั่น	600	มิลลิลิตร
Sodium hydroxide 5 N	6	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	1,000	มิลลิลิตร

การเตรียม Fast black K salt 1 เปอร์เซ็นต์

Fast black K salt	250	มิลลิกรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	25	มิลลิลิตร

การเตรียม L-Leucyl- β -naphthylamide 1 เปอร์เซ็นต์

L-Leucyl- β -naphthylamide	500	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	25	มิลลิลิตร

การเตรียม Malic acid 2 โมลาร์ (pH 7)

Malic acid	53.64	กรัม
NaOH	32	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	100	มิลลิลิตร

การเตรียม MgCl₂ 0.5 โมลาร์

MgCl ₂ .6H ₂ O	10	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	100	มิลลิลิตร

การเตรียม MTT 1 เปอร์เซ็นต์

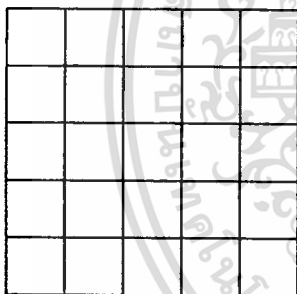
Tetrazolium MTT	1	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ	100	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ง

การนับโปรโตพลาสต์ด้วย haemocytometer

วิธีการ

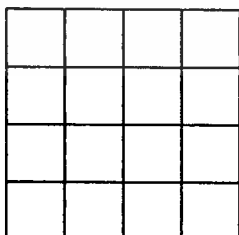
1. ปิเปิดสารละลายโปรโตพลาสต์โดยใช้ไมโครปิเปต นำมาหยดลงที่ขอบของ haemocytometer slide ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์
2. นับจำนวนโปรโตพลาสต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ แทนค่าลงในสูตร นำไปคำนวณซึ่งจะได้ค่าความเข้มข้นของโปรโตพลาสต์



เมื่อปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ จะมีความลึก 0.1 มม.

นับ 9 ช่องใหญ่ตามแนวเส้นทแยงมุม

จากทั้งหมด 25 ช่องใหญ่



ใน 1 ช่องใหญ่แบ่งเป็น 16 ช่องเล็ก

จะนับเฉพาะ โปรโตพลาสต์ที่อยู่ในช่องเล็กเท่านั้น

โปรโตพลาสต์ที่อยู่ตามแนวเส้น ไม่นับ

วิธีการคำนวณ

$$\text{ความลึก} = 0.1 \text{ มม.} = 10^{-2} \text{ ซม.}$$

$$\text{พื้นที่ต่อ 1 ช่อง} = \frac{1}{25} \times \frac{1}{100} = 4 \times 10^{-4} \text{ ตร.ซม.}$$

$$\text{พื้นที่ทั้งหมด 25 ช่อง} = 0.01 = 10^{-2} \text{ ตร.ซม.}$$

$$\begin{aligned} \text{ปริมาตรต่อ 1 ช่อง} &= \text{ความลึก} \times \text{พื้นที่ 1 ช่อง} \\ &= 4 \times 10^{-6} \text{ ลบ.ซม.} \end{aligned}$$

$$\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ที่นับได้ในทั้งหมด 9 ช่อง} = \sum X$$

$$\text{จำนวนเซลล์ต่อ 1 ช่องใหญ่} = \frac{\sum X (4 \times 10^{-6})}{9}$$

$$\text{ปริมาตร } 4 \text{ ลบ.ซม. มีโปรโตพลาสต์} = \frac{\sum X}{9} \times 10^6$$

$$\text{ปริมาตร } 1 \text{ ลบ.ซม. มีโปรโตพลาสต์} = \frac{\sum X (10^6)}{9 \times 4}$$

$$\text{จำนวนโปรโตพลาสต์ใน } 1 \text{ ซม}^3 \text{ ของสารละลายเริ่มต้น} = \frac{\sum X}{9} \times \frac{10^6}{4} \times \text{dilution factor}$$

เมื่อ X = จำนวนโปรโตพลาสต์ที่นับได้ในแต่ละช่องเล็ก

ตารางที่ 9 (ต่อ)

เส้นใยสปอร์เดี่ยว no.	EST	LDH	LAP	MDH
23	3	3	3	6
24	3	4	1,2	6
25	3	3	1,2	3
26	3	3	2	3,6
27	3	3	2	3,6
28	3	3	3	3
29	3	3	2	3
30	3	3	2	3
31	5	5	3	4
32	5	5	4	6
33	5	5	3	4
34	5	5	3	4
35	6	5	3	4
36	6	6	3	4
37	6	5	3	4
38	3	3,5	3	6
39	4	4	4	4
40	4	3	5	4
41	4	3	5	4
42	4,5	3	4	5
43	4,5	3	6	6
44	4	3	3	6
45	4	3	5	4,6
46	3,6	5	5	4
47	3,6	5	5	4
48	3,6	5	5,6	6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 (ต่อ)

เส้นใยสปอร์เดี่ยว no.	EST	LDH	LAP	MDH
49	3	5	5	3,4
50	4	5	5	6
51	3,6	6	6	4
52	3,6	5	5	4
53	3	5	5	4
54	3	5	4	6
55	3	5	3	4
56	3	5	3	4
57	3	5	3	4
58	4	6	3	4
59	3	5	3	4
60	3	3,5	3	4
61	3	3	5	3
62	5	4	5	4
63	3	3	5	3
64	3	3	5	4
65	3	3	6	3
66	3	3	6	3
67	3	3	6	3
68	3	3	5	3
69	4	4	4	3
70	3	3	3	3
71	3	3	4	3
72	3	3	4	3
73	3	3	4	3
74	3	3	4	3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 (ต่อ)

เส้นใยสปอร์เดี่ยว no.	EST	LDH	LAP	MDH
75	3	3	4	3
76	6	5	3	6
77	5	5	3	6
78	4,5	5	3	6
79	5	5	3	6
80	5	3,5	3	6
81	6	6	3	6
82	4	5	4	6
83	5	5	3	6
84	5	4	3	6
85	5	3	3	6
86	5	3	3	3,6
87	5	3	3	6
88	6	3	3	6
89	5	3	3	6
90	5	3	3	6
91	3,6	5	5	4
92	3,6	5	5	4
93	3,6	6	5	4
94	3	5	6	4
95	3	5	5	4
96	3	3	5	6
97	3	4	3	3
98	4	3	3	4
99	3	3	3	3
100	3	3	3	3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นางสาวสุภาภรณ์ จาริวัฒน์ เกิดวันที่ 2 มีนาคม 2515 ที่จังหวัดสงขลา สำเร็จการศึกษา วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ทั่วไป (เคมี-ชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ เมื่อปีการศึกษา 2536 และทำโครงการพิเศษวิทยาศาสตร์บัณฑิตในหัวข้อ “ปัจจัยที่มีผลต่อการหาแอกติวิตี้ของเอนไซม์โคติเนส โดยวิธีการวัดปริมาณ reducing end” จากนั้นเข้ารับราชการที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ สงขลา แล้วลาออกเพื่อเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

