สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของเห็ดสกุล *Pleurotus* โดยอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม

T035853

นายอิทธิชัย ชาติมาลา
นายอัศจรรย์ อาเมน
นายเชฏฐ รัตนาจารย์

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....35853.....
วัน, เดือน, ปี 27 มิ.ย. 2543

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2542

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The Study of Genetic Variation in *Pleurotus* spp. by Genetic Engineering Techniques

Mr.Ittichai Chatmala

Mr.Assajun Amen

Mr.Chate Ratanajaraya

Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for

The Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

1999

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของเห็ดสกุล *Pleurotus* โดยอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม

นักศึกษา

นายอิทธิชัย	ชาติมาลา	รหัสประจำตัว	39054370
นายอัศจรรย์	อาเมน	รหัสประจำตัว	39054368
นายเชฏฐ	รัตนาจารย์	รหัสประจำตัว	39054313

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ชูวงศ์ เอื้อสุขอารี

รศ.ดร.พรรณี จิตาภิชิต

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....

(รศ.ดร.พรรณี จิตาภิชิต) **หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์**

คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

.....

(ผศ.มาลินี ตันติยาภรณ์) **ประธานกรรมการ**

.....

(รศ.ดร.พรรณี จิตาภิชิต) **กรรมการ**

.....

(อาจารย์ชูวงศ์ เอื้อสุขอารี) **กรรมการ**

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของเห็ดสกุล *Pleurotus* โดยอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม			
นักศึกษา	นายอิทธิชัย	ชาติมาลา	รหัสประจำตัว	39054370
	นายอัศจรรย์	อาเมน	รหัสประจำตัว	39054368
	นายเชฏฐ	รัตนาจารย์	รหัสประจำตัว	39054313
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ชูวงศ์	เอื้อสุขอารี		
	รศ.ดร.พรรณี	ฐิตาภิชิต		
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์			
ปีการศึกษา	2542			

บทคัดย่อ

ในการศึกษาความผันแปรของสารพันธุกรรมของเห็ดในสกุล *Pleurotus* จำนวน 7 ชนิดได้ใช้บริเวณ ITS (Internal Transcribed Spacer) ในยีนไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอมาศึกษา เนื่องจากบริเวณดังกล่าวมีลำดับเบสที่แตกต่างกันไปในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด บริเวณ ITS ของเห็ดทั้ง 7 ที่ศึกษามีขนาดประมาณ 600 bp แต่หลังจากการใช้เทคนิค RFLP โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด คือ *Eco*RI, *Alu*I และ*Sau3*A มาใช้ตัดบริเวณ ITS ของเห็ดทั้ง 7 ชนิด พบว่าสามารถจำแนกรูปแบบของการตัดด้วยเอนไซม์ออกเป็น 4 รูปแบบคือ 1.)กลุ่มเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า และเห็ดนางฟ้าภูฐาน 2.)เห็ดเป๋าฮื้อ และเห็ดเป๋าฮื้อดำ 3.)เห็ดนางรมทอง และ 4.)เห็ดนางนวล ดังนั้นจึงคาดได้ว่า เห็ดในสกุล *Pleurotus* ทั้ง 7 ชนิดที่นำมาทดสอบสามารถถูกแบ่งเป็น 4 กลุ่มตามรูปแบบที่ได้จากการทดลอง RFLP ซึ่งความผันแปรของสารพันธุกรรมในบริเวณ ITS ของเห็ดทั้ง 7 ชนิดนั้นเป็นไปในแนวทางเดียวกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	The Study of Genetic Variation in *Pleurotus* spp. by Genetic Engineering Techniques		
Name	Mr.Ittichai	Chatmala	No.39054370
	Mr.Assajan	Amen	No.39054368
	Mr.Chate	Ratanajaraya	No.39054313
Special Project Advisor	Mr.Choowong	Auesukaree	
	Associate Professor Dr. Pannee	Dhitaphichit	
Department	Applied Biology		
Academic Year	1999		

Abstract

Internal Transcribed Spacer (ITS) regions in ribosomal RNA genes which have different DNA sequences in different organisms were used to detect genetic variation among 7 species of *Pleurotus* spp. ITS region of each specie was amplified by PCR techniques using ITS1 and ITS4 primers. All *Pleurotus* spp. tested produced the approximately 600 bp PCR product. PCR product of all samples were tested with techniques of restriction fragment length polymorphism (RFLP) using restriction enzymes *Eco*RI, *Alu*I and *Sau*3A. The banding patterns revealed four separate groups ; 1.)*Pleurotus butan*, *P. sajor-cajou*, *P. ostreatus* 2.)*P. cystidiosus* (Cream), *P. cystidiosus* (Black) 3.)*P. citrinopileatus* 4.)*P. flabellatus*. The different banding patterns suggest that the 7 species of *Pleurotus* spp. tested could be separated into four groups. This result showed that the genetic variation in ITS region of the 7 species of *Pleurotus* were in accordance with the morphological variation.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต เพื่อให้นักศึกษาได้เรียนรู้การแก้ปัญหาด้วยหลักการทางวิทยาศาสตร์ ได้รู้จักการแก้ปัญหาเฉพาะหน้าอย่างถูกวิธี รู้จักการติดต่อประสานงานกับหน่วยงานต่างๆทั้งในและนอกสถานศึกษา ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ชูวงศ์ เอื้อสุขอารี และรศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต ตลอดจนคณาจารย์ทุกๆท่าน รวมทั้งคุณพรทิพย์ พงศ์พรเชษฐา ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านคำแนะนำ แหล่งข้อมูล ตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษ และทั้งนี้ขอขอบคุณศูนย์รวมสวนเห็ดบ้านอรัญญิก และศูนย์รวมกล้าเชื้อเห็ดกรมวิชาการเกษตร ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านเชื้อเห็ด ตลอดจนข้อมูลต่างๆเป็นอย่างดี

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาที่กรุณาให้การสนับสนุน และเป็นกำลังใจในการทำโครงงานพิเศษตลอดมา ขอขอบคุณเพื่อนๆ และเจ้าหน้าที่ในภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำโครงงานพิเศษ ทำให้โครงงานพิเศษสำเร็จสมบูรณ์

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2542

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

บทคัดย่อ ..... ก
Abstract ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญรูปภาพ ..... จ
สารบัญตาราง ..... ฉ
บทที่ 1 บทนำ 1
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ 3
บทที่ 3 ขั้นตอนการดำเนินการ 22
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ 29
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 37
ภาคผนวก 39
เอกสารอ้างอิง 44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่ 1 DNA จากคลอโรพลาสต์ของพืช A,B และC เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดหนึ่ง 8
ภาพที่ 2 การตรวจหา RFLP จากผลผลิตของ PCR..... 9
ภาพที่ 3 โพลิมอร์ฟิซึมที่เกิดจากการตัดดีเอ็นเอ จากพืช V1 และ V2 ด้วยเอนไซม์ B ไม่ทำให้เกิดโพลิมอร์ฟิซึม 10
ภาพที่ 4 ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ 12
ภาพที่ 5 ลักษณะการเคลื่อนที่ของพลาสมิดที่มีโครงรูปแตกต่างกัน ในอะกาโรสเจล..... 13
ภาพที่ 6 กราฟ log แสดงขนาดของดีเอ็นเอ เทียบกับ ระยะทางที่เคลื่อนที่ 16
ภาพที่ 7 การเกิดปฏิกิริยาพอลีเมอร์ไรซ์เซชัน 17
ภาพที่ 8 ไพรเมอร์ ITS1 ที่เป็นคู่สมกับบริเวณปลาย 3′ ของ Nuclear Small rDNA ไพรเมอร์ ITS4 ที่เป็นคู่สมกับบริเวณปลาย 5′ ของ Nuclear Large rDNA และบริเวณ ITS ที่ประกอบไปด้วย ITS1, 5.8S rDNA และITS2 25
ภาพที่ 9 ขนาดของชิ้นส่วนDNA บริเวณ ITS ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR..... 30
ภาพที่ 10 ขนาดของชิ้นส่วน DNA บริเวณ ITS ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI..... 31
ภาพที่ 11 ขนาดของชิ้นส่วน DNA บริเวณ ITS ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *Alu*I 32
ภาพที่ 12 ขนาดของชิ้นส่วน DNA บริเวณ ITS ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *Sau*3A 33
ภาพที่ 13 ขนาดของชิ้นส่วน DNA บริเวณ ITS ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *Alu*I และ *Sau*3A 35
ภาพที่ 14 ขนาดของชิ้นส่วน DNA บริเวณ ITS ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ *Sau*3A.. 35
ภาพที่ 15 ขนาดของชิ้นส่วน DNA บริเวณ ITS ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ *Alu*I..... 36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 จำนวนรอบที่เหมาะสมกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย 6
ตารางที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล กับขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิด 15
ตารางที่ 3 ความเหมาะสมของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ กับเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของ Acrylamide ใน Polyacrylamide gel 19
ตารางที่ 4 เปรียบเทียบความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของเห็ดในสกุล *Plurotus* 7 ชนิด กับเห็ดสกุลอื่น ที่นำมาศึกษา 20
ตารางที่ 5 การเตรียม Polyacrylamide gel ที่ความเข้มข้นต่างๆ (เปอร์เซ็นต์) 27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญ และที่มาของโครงงานพิเศษ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตมาก เนื่องจากมีภูมิประเทศอยู่ในเขตร้อนชื้นจึงมีสิ่งมีชีวิตอยู่เป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะสิ่งมีชีวิตจำพวกเห็ดนั้นมีอยู่มากมายหลายชนิด แต่การจำแนกสายพันธุ์ของเห็ดนั้น ในประเทศไทยมีผู้ทำการศึกษาและวิจัยไม่มากนัก การจำแนกเห็ดส่วนใหญ่จะเน้นทางด้านสัณฐานวิทยา ซึ่งเป็นการดูจากลักษณะทั้งภายนอกและภายใน ตลอดจนการสังเกตจากปฏิกิริยาทางเคมีของเนื้อเยื่อเห็ดกับสารเคมีบางชนิด (Waling, 1973) นอกจากนั้นการจำแนกสายพันธุ์เห็ดยังอาศัยการอ้างอิงจากข้อมูลของผู้วิจัยในต่างประเทศ ซึ่งจะมีความแตกต่างกันไปในผู้จำแนกแต่ละคน และยังไม่เป็นมาตรฐานเดียวกัน จึงทำให้การจำแนกเห็ดบางชนิดมีความผิดพลาดและสับสนกันอยู่ ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีผู้สนใจที่นำวิธีทางอณูพันธุศาสตร์มาใช้ในการจำแนกเห็ด ซึ่งวิธีการนี้น่าจะให้ผลการจำแนกที่ถูกต้องแม่นยำว่าวิธีอื่นเพราะเป็นการตรวจสอบเปรียบเทียบสารพันธุกรรมโดยตรงว่ามีความเหมือนหรือแตกต่างกันหรือไม่อย่างไร ดังนั้นเราจึงได้ทำการศึกษาความแตกต่างของสารพันธุกรรมของเห็ดสกุล *Pleurotus* เนื่องจากเห็ดในกลุ่มนี้เป็นเห็ดที่นิยมนำมาบริโภค และที่ผ่านมายังไม่มีผู้ศึกษาตรวจสอบความแตกต่างของแต่ละสายพันธุ์ในระดับยีน เห็ดในสกุลนี้บางชนิดมีลักษณะคล้ายคลึงกัน แต่บางชนิดก็มีลักษณะแตกต่างกันมาก ในการทดลองนี้เราได้ใช้บริเวณ ITS (Internal Transcribed Spacer) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ เนื่องจากบริเวณ ITS ในไรโบโซมอลดีเอ็นเอนั้นเป็นบริเวณที่มีความผันแปรของลำดับเบสสูง โดยเพิ่มปริมาณไรโบโซมอลดีเอ็นเอในบริเวณ ITS โดยใช้เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) ผนวกกับการใช้เทคนิค RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) เพื่อศึกษาความแตกต่างของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งผลที่ได้น่าจะทำให้เราทราบถึงความแตกต่างคร่าวๆของสารพันธุกรรมในเห็ดสกุลนี้มากยิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อพิสูจน์ความผันแปรทางพันธุกรรมของเห็ดในสกุล *Pleurotus* ว่าสอดคล้องกับความผันแปรทางสัณฐานวิทยาหรือไม่
2. เพื่อเป็นแนวทางใหม่ในการศึกษาตรวจสอบและจำแนกสายพันธุ์เห็ด

ขอบเขต

ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของเห็ดในกลุ่มของสกุล *Pleurotus* โดยอาศัยความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ในช่วงไร โบโซมอลดีเอ็นเอเป็นเกณฑ์ในการตรวจสอบความแตกต่าง

ประโยชน์ที่ได้รับ

1. เป็นข้อมูลในการยืนยันความถูกต้องของการจำแนกเห็ดสกุล *Pleurotus*
2. ข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นการอ้างอิงในการจำแนกเห็ดกลุ่มของสกุล *Pleurotus* ได้
3. สามารถนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในการจำแนกเห็ดราชนิดอื่น หรือสิ่งมีชีวิตประเภทอื่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอช่วงสั้นๆแบบปฏิกิริยาลูกโซ่ โดยอาศัยเอนไซม์ DNA polymerase ที่ทนต่อความร้อน ทำให้ปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นเป็นล้านๆเท่า ในระยะเวลาอันสั้น โดยดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจำนวนนั้นจะอยู่ในสารละลายรวมกับดีเอ็นเออื่นหลายชนิด ซึ่งไม่จำเป็นต้องทำให้ชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวบริสุทธิ์ก่อน วิธีนี้ช่วยให้สามารถวิเคราะห์หรือคัดแยกชิ้นดีเอ็นเอที่สนใจโดยไม่ต้องนำไปขยายเพิ่มปริมาณในเซลล์หรือโคลนก่อน สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานต่างๆ เช่น การวินิจฉัยโรค หรือการศึกษาความรู้พื้นฐานต่างๆ

การทำ PCR จะต้องอาศัยส่วนประกอบที่สำคัญดังนี้

1. ดีเอ็นเอที่เราสนใจหรือดีเอ็นเอต้นแบบ ไม่จำเป็นต้องแยกออกมาจากดีเอ็นเอทั้งหมดที่สกัดได้ ซึ่งไม่จำเป็นต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด เพียงทราบลำดับนิวคลีโอไทด์เฉพาะส่วนปลายของนิวคลีโอไทด์ต้นแบบก็พอ เพื่อจะได้นำไปออกแบบไพรเมอร์ (primer)

2. ไพรเมอร์ เป็นโอลิโกนิวคลีโอไทด์ชิ้นเล็กๆที่สังเคราะห์ขึ้นโดยมีความยาวประมาณ 20 – 35 เบส โดยจะใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิด คือ มีเบสคู่สมกับส่วนปลาย 3′ กับเบสคู่สมกับส่วนปลาย 5′

3. เอนไซม์โพลิเมอร์เรส โดยจะใช้เอนไซม์โพลิเมอร์เรสที่ทนความร้อนสูง (thermostable DNA polymerase) ซึ่งสกัดได้จากแบคทีเรียทนร้อน (thermophilic bacteria) *Thermus aquaticus (Taq)* ที่แยกได้จากน้ำพุร้อน ได้แก่เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เนื่องจากเป็นดีเอ็นเอโพลิเมอร์เรสที่ทนความร้อนสูง โดยสามารถทนความร้อนในขณะแยกดีเอ็นเอเกลียวคู่ออกจากกันเป็นสายเดี่ยว(denaturation)ได้

4. นิวคลีโอไทด์ 4 ชนิด คือ dATP, dCTP, dGTP และdTTP ซึ่งใช้สร้างดีเอ็นเอสายใหม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ยังมีส่วนประกอบอื่นๆที่จำเป็นเพื่อใช้ในการปรับสภาวะให้เหมาะสมกับการสร้าง ดีเอ็นเอสายใหม่เช่น $MgCl_2$, KCl และbuffer

จากที่กล่าวข้างต้นว่า PCR เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบปฏิกิริยาลูกโซ่คือ จะใช้การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ 3 ระดับ ซึ่งจะทำให้สามารถขยายปริมาณดีเอ็นเอในอัตรา 2^n (n คือจำนวนรอบของปฏิกิริยาลูกโซ่) เมื่อปฏิกิริยามีประสิทธิภาพ 100 เปอร์เซ็นต์โดยอุณหภูมิทั้ง 3 ระดับ จะทำให้เกิดปฏิกิริยาการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ดังต่อไปนี้

1. Denature temperature ใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 90 – 95 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับชนิดของดีเอ็นเอ เป็นอุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกเป็นสายเดี่ยว
2. Annealing temperature ใช้อุณหภูมิต่ำประมาณ 50 – 60 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิแยกตัว (Td) ของไพรเมอร์ โดย Td ของไพรเมอร์อาจหาได้โดย $Td = 2^0 C(A+T) + 4^0C(C+G)$ อุณหภูมินี้จะทำให้เกิดการจับกันระหว่างสายไพรเมอร์กับดีเอ็นเอที่เป็นสายเดี่ยว
3. Extension temperature ใช้อุณหภูมิปานกลางประมาณ 70 – 75 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิซึ่ง *Taq* DNA polymerase จะสร้างพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ เพื่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ โดยการต่อปลายของไพรเมอร์

เมื่อปฏิกิริยาดำเนินไปจะมีดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น โดยดีเอ็นเอที่เพิ่มดังกล่าวจะทำหน้าที่เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ดังนั้นปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยมีการลดปริมาณของไพรเมอร์และสารตั้งต้นลง นั่นคืออัตราส่วนของดีเอ็นเอต้นแบบต่อไพรเมอร์จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนในที่สุดดีเอ็นเอต้นแบบเมื่อมีปริมาณมากย่อมจะจับคู่กันเองทำให้มีดีเอ็นเอต้นแบบจับคู่กับไพรเมอร์น้อยลง อันจะทำให้การเพิ่มมิได้เป็นไปตามอัตรา 2^n แต่จะมีอัตราลดน้อยลง จนในที่สุดก็จะไม่มีการเพิ่มเกิดขึ้นเรียกว่า เกิด plateau จะเห็นว่าการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR นั้นจะเพิ่มดีเอ็นเอได้ในขอบเขตจำกัด

การออกแบบ และการปรับหาสภาวะที่เหมาะสมของ PCR (Design and Optimization of PCR)

เทคนิคนี้ได้ถูกนำไปใช้ประโยชน์ในงานวิจัยอย่างกว้างขวางเป็นที่ยอมรับในบรรดาผู้นำเทคนิค PCR ไปประยุกต์ใช้ว่าไม่มีสูตรสำเร็จของวิธีทำใดที่นำไปใช้ได้ในทุกกรณี ฉะนั้นการนำเทคนิค PCR ไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยเรื่องใหม่แต่ละเรื่องนั้น จึงต้องทำการพัฒนาและปรับปรุงเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดเพื่อให้ปริมาณ PCR product เกิดขึ้นสูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. การคัดเลือกและการออกแบบไพรเมอร์ มีข้อแนะนำในการคัดเลือกหรือการออกแบบไพรเมอร์ที่สำคัญที่ควรพิจารณา ดังต่อไปนี้

1.1 ควรเลือก primers ที่มี random base distribution และมีปริมาณ GC ใกล้เคียงกับชิ้น ดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มขยาย ควรมีปริมาณ GC อยู่ระหว่าง 50 – 60 เปอร์เซ็นต์

1.2 หลีกเลี่ยงลำดับเบสที่มี secondary structure โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ปลาย 3′ ของไพรเมอร์

1.3 ตรวจสอบการเรียงลำดับเบสของแต่ละไพรเมอร์ไม่ให้มีความเป็นคู่สมกัน

1.4 ตามหลักเกณฑ์ควรกำหนดให้มีความยาวระหว่าง 18 – 28 นิวคลีโอไทด์และมีการเรียงลำดับเบสเป็นคู่สมกับปลาย 3′ ของดีเอ็นเอแม่แบบ

1.5 มี Tm (melting temperature) ของแต่ละไพรเมอร์ใกล้เคียงกันโดยอยู่ระหว่าง 55 – 80 องศาเซลเซียส

1.6 ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ไม่เหมาะสม และมีการสะสมของผลิตผลที่ไม่จำเพาะมากขึ้น ซึ่งอาจช่วยเพิ่มโอกาสการเกิด primer-dimer ซึ่งมีผลทำให้ผลิตผลที่ต้องการมีปริมาณลดลง

2. ความเข้มข้นของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase

เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ในการทำ PCR ถ้าใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์สูงเกินไปจะทำให้มีการสะสมผลิตผลที่เป็น nonspecific background เกิดขึ้นมาก แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่ำเกินไป จะทำให้ได้ผลิตผลที่ต้องการปริมาณน้อย เกณฑ์มาตรฐานกำหนดให้ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ประมาณ 1 – 2.5 units ต่อ sequence complexity เช่น genomic DNA ปรกติควรจะใช้เอนไซม์ 1 – 4 units ต่อ 100 μl

3. ความเข้มข้นของ Magnesium Ion

ผลของปฏิกิริยา PCR ขึ้นกับความเข้มข้นของ magnesium ion (Mg^{2+}) ถ้ามีความเข้มข้นในปฏิกิริยามากเกินไปจะทำให้มีการเพิ่มขยายผลิตผลที่ไม่จำเพาะเกิดสะสมมาก แต่ถ้ามีความเข้มข้นน้อยเกินไปจะลดปริมาณผลิตผลที่ต้องการ ทั้งนี้เนื่องจากความเข้มข้นของ Mg^{2+} มีผลต่อการเกิด primer annealing อุณหภูมิที่ทำให้การแยกออกจากกันของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ ความจำเพาะของผลิตผลจากแม่พิมพ์ การเกิด primer – dimer และความถูกต้องในการทำงานของเอนไซม์ โดยทั่วไปของปฏิกิริยา PCR ต้องการความเข้มข้นของ Mg^{2+} อยู่ระหว่าง 0.5 – 2.5 mM

4. ความเข้มข้นของ Deoxynucleotide triphosphates (dNTP)

dNTP ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR (dATP, dCTP, dGTP และdTTP) ปรกติมีความเข้มข้นของแต่ละชนิดอยู่ระหว่าง 50 – 200 μm โดยต้องปรับให้เป็นกลางที่ pH 7.0 และวัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง UV-spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร ควรจะเตรียมเป็น primary

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

stock solution ที่มีความเข้มข้น 10 mM แล้วเจือจางเป็น working stock solution ที่มีความเข้มข้น 1 mM

dNTPs ทั้ง 4 ชนิด ที่มีอยู่ในปฏิกิริยาควรจะมีความเข้มข้นของแต่ละชนิดสมดุลกันอย่างพอเหมาะ เพื่อให้ปฏิกิริยา PCR เกิดขึ้นอย่างจำเพาะ ได้ปริมาณผลิตผลสูง และลดความผิดพลาดในการเรียงต่อลำดับเบสคู่สม

5. ความสำคัญขององค์ประกอบอื่นๆในปฏิกิริยา PCR

บัฟเฟอร์สำหรับ PCR ควรใช้ 10 – 15 mM Tris-HCl pH 8.3 – 8.8 ที่ 20 องศาเซลเซียสแต่ pH ที่แท้จริงในสภาวะของ PCR เปลี่ยนแปลงจาก 20 mM Tris pH 8.3 ที่ 20 องศาเซลเซียส เป็น pH 6.8 – 7.8 ในส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR มี 50 mM KCl เพื่อเร่ง primer annealing กับ DNA แม่พิมพ์ ถ้ามีความเข้มข้นของ KCl หรือ NaCl สูงกว่า 50 mM จะยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase

การเติม dimethylsulfoxide (DMSO) ลงในส่วนผสมของปฏิกิริยามีประโยชน์สำหรับ PCR ที่ใช้เอนไซม์ Klenow fragment ของ *E.coli* DNA polymerase I แต่ 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) DMSO จะยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase จึงไม่ควรนำมาใช้

Gelatin และbovine serum albumin (BSA) และmomiomic detergents เช่น Tween 20 หรือ Laureth 12 (0.05 – 0.1 เปอร์เซ็นต์ v/v) ที่ใส่ในส่วนผสมของปฏิกิริยาจะช่วยรักษาความคงสภาพ (stabilization) ของเอนไซม์

6. จำนวนรอบของปฏิกิริยาลูกโซ่

จำนวนรอบที่พอเหมาะขึ้นกับความเข้มข้นเริ่มต้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย เมื่อปรับองค์ประกอบอื่นๆของ PCR ให้เหมาะสมแล้วความผิดพลาดที่พบบ่อยคือ ทำจำนวนรอบมากเกินไป ซึ่งเป็นผลที่เกิดการเพิ่มปริมาณ และความยุ่งยากของผลิตผลที่เป็น nonspecific background และถ้าทำจำนวนรอบน้อยเกินไปจะสังเคราะห์ผลิตผลได้น้อย

ตารางที่ 1 จำนวนรอบที่เหมาะสมกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย (วัชรี, 2536)

จำนวน target molecules	จำนวนรอบ
3.0×10^5	25 – 30
1.5×10^4	30 – 35
1.0×10^3	35 – 40
50	40 – 45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

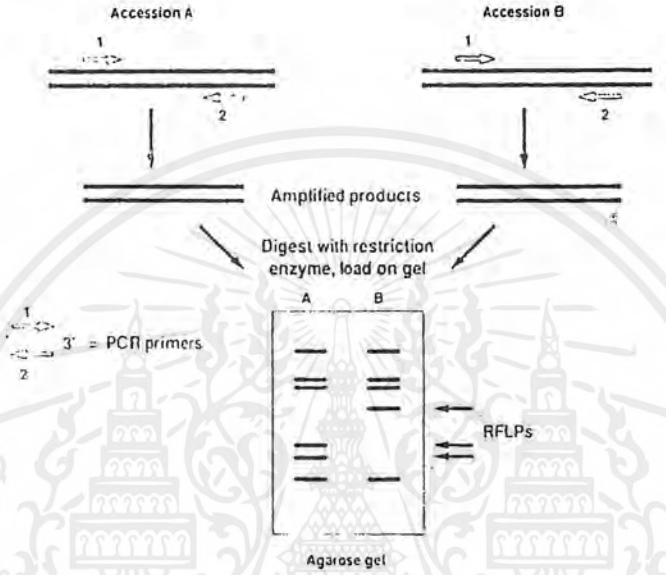
RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

RFLP หมายถึง ความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตเก็บอยู่ในนิวเคลียสและออร์แกเนลล์บางชนิด ได้แก่ คลอโรพลาสต์และไมโตคอนเดียในรูปของดีเอ็นเอ โมเลกุลของดีเอ็นเอที่อยู่ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตนี้ มีความสามารถที่จะจำลองตัวได้อย่างถูกต้องแม่นยำ เพื่อถ่ายทอดไปสู่เซลล์ลูกและคงลักษณะที่เหมือนเดิมตลอดไป แต่บางครั้งก็อาจมีการเปลี่ยนแปลงของเบสภายในดีเอ็นเอได้ เนื่องจากสิ่งแวดล้อมหรือข้อผิดพลาดของเซลล์เองหรือเหตุอื่น การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวไม่ได้มีเพียงการเปลี่ยนแปลงของเบสแต่ละตัวเท่านั้น อาจมีการเปลี่ยนแปลงถึงระดับโครโมโซม เช่น มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอหรือโครโมโซมหายไป (deletion) มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอบางส่วนเพิ่มขึ้นมา (duplication) มีการจัดเรียงตัวใหม่ของส่วนของดีเอ็นเอภายในโครโมโซม (chromosome rearrangement หรือ inversion) หรือมีการเปลี่ยนตำแหน่งของดีเอ็นเอบางส่วนภายในโครโมโซมหรือจากต่างโครโมโซม (transposition) การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้ทำให้เกิดความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด จนสามารถกล่าวได้ว่าไม่มีสิ่งมีชีวิตคู่ใดมีลำดับเบสของบดีเอ็นเอเหมือนกัน ยกเว้นฝาแฝดที่เกิดจากไข่ใบเดียวกัน (monozygotic twins) หรือพืชที่เกิดจากการสืบพันธุ์โดยไม่ใช้เพศ ความหลากหลายดังกล่าวนี้สามารถตรวจพบได้โดยหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ แล้วนำมาเปรียบเทียบกัน แต่เป็นวิธีที่ทำได้ยากและใช้เวลามาก วิธีที่ง่ายกว่า คือ นำดีเอ็นเอที่ต้องการหาความแตกต่างนั้นมาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิด แล้วเปรียบเทียบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกตัดโดยเอนไซม์นั้น

เอนไซม์ตัดจำเพาะเป็นเอนไซม์ที่แยกได้จากแบคทีเรีย และจะตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งที่มีการเรียงตัวของเบสแบบจำเพาะ เรียกว่าตำแหน่งจดจำ (Recognition site) ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์แต่ละชนิดประกอบด้วยเบส 4 ถึง 8 คู่เบส ดังนั้นเมื่อใช้เอนไซม์ชนิดหนึ่งตัดดีเอ็นเอเป้าหมายโมเลกุลหนึ่งจะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดและจำนวนคงที่เสมอ ถ้าดีเอ็นเอเป้าหมายมาจากแหล่งต่างกันและมีลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลงไป หรือมีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างแบบใดแบบหนึ่งดังที่กล่าวมาแล้ว เมื่อนำมาตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน จะได้ขนาด และจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างจากเดิมเรียกว่าเกิดโพลิมอร์ฟิซึมหรือมี RFLP เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ E ทำให้เกิดโพลิมอร์ฟิซึม ในภาพที่ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

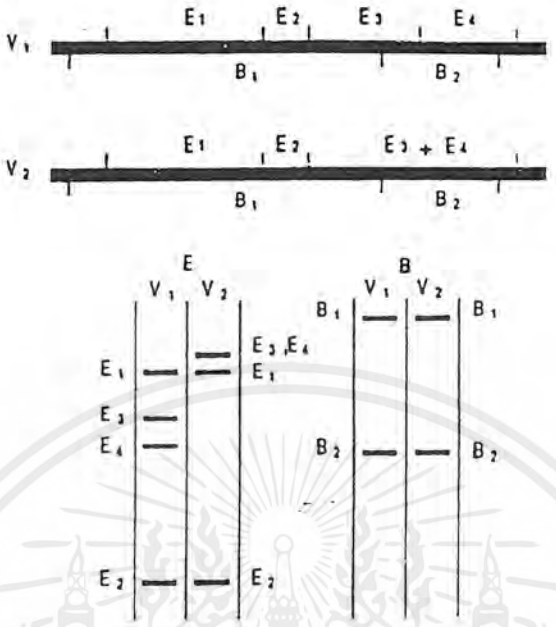
หมาย จะพบว่าผลผลิตของดีเอ็นเอที่ได้จากพืช 2 ตัวอย่างนั้นจะมีขนาดไม่เท่ากัน แต่ถ้าเป็นความแตกต่างของเบสภายใน ขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จะเท่ากันต้องมีวิธีตรวจสอบต่อไปอีก โดยนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิด ก่อนจะนำไปแยกโดยใช้อิเล็กโทรโฟรีซิส อาจจะพบ RFLP อาจจะพบ RFLP ได้ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 การตรวจหา RFLP จากผลผลิตของ PCR (สุรินทร์, 2536)

นอกจากนี้ มีการประยุกต์เทคนิค PCR เพื่อตรวจหา RFLP ในพืชโดยใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว มีชื่อเรียกเฉพาะลงไปว่า Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) เพิ่มปริมาณส่วนของดีเอ็นเอโดยไม่ทราบลำดับเบสที่บริเวณใดเลย ใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียว ขนาดสั้นกว่าปกติประมาณ 8 – 10 นิวคลีโอไทด์ ดังนั้นโอกาสจะพบลำดับเบสแบบเดียวกับไพรเมอร์ คือ 1 ใน 4^8 – 4^{10} โดยสุ่ม ในจีโนมอาจจะมีหลายบริเวณที่ไพรเมอร์เข้าไปเกาะได้ ถ้าไพรเมอร์เข้าไปเกาะได้ในบริเวณที่ห่างไกลกันมากๆหรือในทิศทางเดียวกันจะไม่เกิดผลผลิตขึ้นหลังจากทำ PCR แต่ถ้าไปเกาะได้ในบริเวณใกล้กันและทิศทางเข้าหากันจะเกิดผลผลิตขึ้นหลังจากทำ PCR (ภาพที่ 3) เทคนิค RAPD นี้ทำได้โดยสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบนำมาทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวขนาดสั้นๆดังที่อธิบายมาแล้วหลังจากจบปฏิกิริยาแล้ว จึงนำผลที่ได้มาแยกโดยอิเล็กโทรโฟรีซิสและย้อมโดยเอธิเดียมโบรไมด์ จะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกันหรือแตกต่างกันก็ได้ ผลที่ได้นี้สามารถคิดความสัมพันธ์ของพืชแต่ละตัวอย่างได้ โดยคิดเฉพาะความแตกต่างของ RAPD หรือนำผลมารวมกับการทำ RFLP ปกติก็ได้เช่นกัน สามารถใช้จำแนกพืชได้เหมือนกับการวิเคราะห์ RFLP แต่ตรวจสอบผลได้ง่ายและรวดเร็วกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3 โพลิมอร์ฟิซึมที่เกิดจากการตัดดีเอ็นเอ จากพืช V1 และ V2

ด้วยเอนไซม์ B ไม่ทำให้เกิดโพลิเมอร์ฟิซึม (สุรินทร์, 2536)

เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme)

แบคทีเรียจำนวนมากมีระบบป้องกันตัวเองจากการบุกรุกของดีเอ็นเอแปลกปลอม โดยจะตัดดีเอ็นเอที่แปลกปลอมนั้นออกเป็นชิ้นๆด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ในขณะที่ดีเอ็นเอของตัวเซลล์เองจะมีการเปลี่ยนแปลงโดยเติมหมู่เมธิล (modification methylase) ที่เบสจำเพาะนั้นก่อน จึงไม่ถูกตัดโดยเอนไซม์ ระบบดังกล่าวนี้เรียกว่า restriction modification ซึ่งโดยทั่วไปจะอยู่ควบคู่กัน เอนไซม์ในระบบนี้แบ่งเป็น 3 แบบตามลักษณะการทำงาน องค์ประกอบของหน่วยย่อยของเอนไซม์ องค์ประกอบร่วม (cofactor) และวิธีการตัดดีเอ็นเอ

แบบที่ 1 เป็นเอนไซม์ที่มีโมเลกุลซับซ้อน ประกอบด้วยโพลีเพพไทด์ 3 ชนิดสามารถตัดดีเอ็นเอ (nuclease) และเปลี่ยนแปลงโดยเติมหมู่เมธิลเข้าไปที่เบสบางเบส (methylase) ได้ในขณะเดียวกัน เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะจับกับดีเอ็นเอที่บริเวณจดจำ (recognition site) ที่จำเพาะ แต่จะตัดสายคู่ของดีเอ็นเอที่ตำแหน่งที่ไม่เจาะจงห่างออกไป 400 – 7000 คู่เบส การตัดดีเอ็นเอต้องอาศัยแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) ATP และ S-adenosylmethionine (SAM) ขณะที่เกิดการตัดสายดีเอ็นเอแต่ยังคงมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ที่สลาย ATP (ATPase) ต่อไปได้อีก นอกจากนี้เอนไซม์ในแบบที่ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นี้จะเติมหมู่เมธิลเข้าที่ตำแหน่งจำเพาะในบริเวณจดจำด้วย เช่น เอนไซม์ที่พบใน *E.coli* K12 จะเติมหมู่เมธิลเข้าที่ตำแหน่งที่ 6 ของเบส A ที่บริเวณจดจำ ดังนี้

5′-AACNNNNNNGTGC-3′

3′-TTGNNNNNNCACG-5′

N คือเบสใดๆแต่เป็นคู่กันในสองสาย A คือตำแหน่งที่มีการเติมหมู่เมธิล เอนไซม์นี้จะตัดดีเอ็นเอเมื่อไม่มีหมู่เมธิลที่ A ทั้งสองสายของบริเวณจดจำเท่านั้น ถ้ามีหมู่เมธิลแม้เพียงสายเดียว เอนไซม์ก็จะไม่ตัดดีเอ็นเอนั้น แต่จะเติมหมู่เมธิลเข้าที่ A ของอีกสายหนึ่งที่ว่างอยู่

ในแบคทีเรียพวกที่อยู่ในทางเดินอาหาร เช่น *E.coli* โพลีเพพไทด์ทั้ง 3 ชนิดของเอนไซม์นี้ เกิดจากยีนที่อยู่ใกล้กันบนโครโมโซม คือ hsd R, hsd M และ hsd S การสร้าง mRNA นั้น hsd M และ hsd S จะสร้างร่วมกัน (dicistronic mRNA) และให้โพลีเพพไทด์ 2 ชนิดที่มีหน้าที่เติมหมู่เมธิลให้แก่เบส ส่วน hsd R ให้โพลีเพพไทด์ที่มีหน้าที่ตัดดีเอ็นเอ

แบบที่ 2 เป็นเอนไซม์ที่ใช้มากในการตัดต่อยีน เนื่องจากโมเลกุลไม่ซับซ้อนประกอบด้วยโพลีเพพไทด์เพียงชนิดเดียว การตัดดีเอ็นเอจะเกิดที่ตำแหน่งจำเพาะในบริเวณจดจำหรือที่จุดใกล้กับบริเวณจดจำ ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดแน่นอน และในปฏิกิริยาต้องการเฉพาะแมกนีเซียมไอออนเท่านั้น มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะเพียงอย่างเดียว การเติมหมู่เมธิลให้กับเบสอาศัยเอนไซม์อีกชนิดหนึ่ง

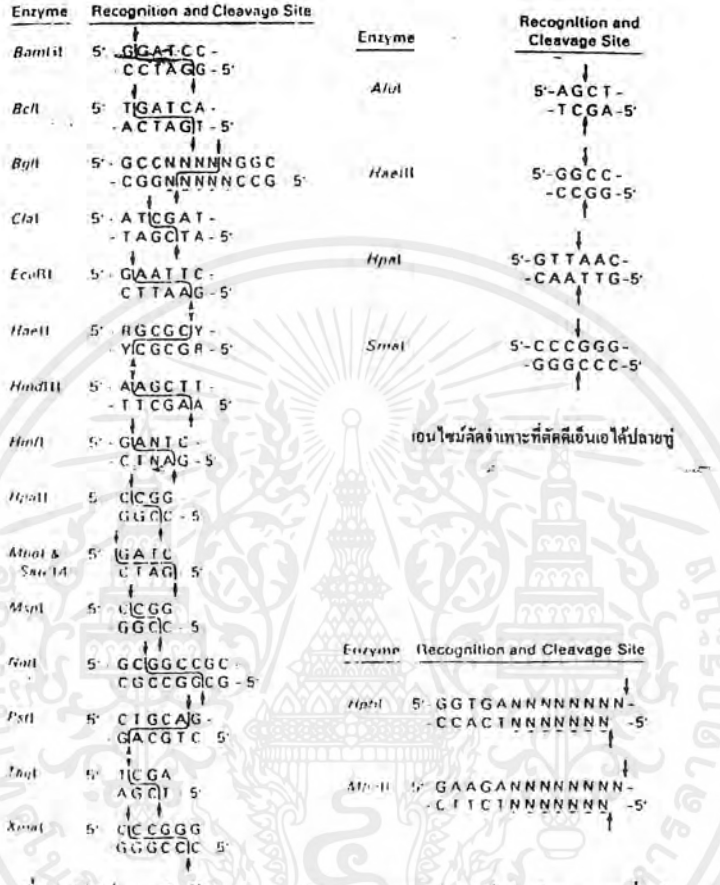
แบบที่ 3 ประกอบด้วยโพลีเพพไทด์ 2 ชนิด มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะและเติมหมู่เมธิลในขณะเดียวกัน การตัดดีเอ็นเอจะเกิดห่างจากบริเวณจดจำประมาณ 25 – 27 คู่เบส ในปฏิกิริยาต้องมีแมกนีเซียมไอออนและ ATP โดยไม่จำเป็นต้องมี S-adenosylmethionine แต่ถ้ามี S-adenosylmethionine จะช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์และเอนไซม์จะสามารถเติมหมู่เมธิลเข้าที่ตำแหน่งจำเพาะได้ พบว่ายีนที่กำหนดการสร้างโพลีเพพไทด์ทั้ง 2 ชนิดของเอนไซม์นี้มีตำแหน่งอยู่ใกล้ๆกัน ในส่วนของดีเอ็นเอที่อยู่นอกโครโมโซมของ *E.coli* บางสายพันธุ์ การสร้าง mRNA แยกกันเป็น 2 หน่วย ยีนหนึ่งทำหน้าที่ตัดดีเอ็นเอและอีกยีนหนึ่งทำหน้าที่เติมหมู่เมธิล

เอนไซม์แบบที่ 1 และแบบที่ 3 จะตัดดีเอ็นเอได้ชิ้นส่วนที่มีขนาดไม่แน่นอน และปฏิกิริยามีการแข่งขันกันว่าจะเกิดการตัดดีเอ็นเอหรือเติมหมู่เมธิล จึงไม่นิยมใช้ในการโคลนยีน

เอนไซม์ตัดจำเพาะแบบที่ 2 เอนไซม์ตัดจำเพาะแบบนี้แยกได้จากแบคทีเรียชนิดต่างๆ ปัจจุบันพบแล้วกว่า 400 ชนิดดังตัวอย่างในภาพที่ 4 การเรียกชื่อเอนไซม์ระบบอักษร 3 ตัว พิมพ์ตัวเอน ตัวแรกเป็นตัวพิมพ์ใหญ่อักษรแรกของชื่อ Genus ตัวที่ 2 และ 3 เป็นตัวพิมพ์เล็กอักษรแรกของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อ species ของแบคทีเรียที่แยกเอนไซม์นั้นได้ ถ้ามีชื่อหรือรหัสของสายพันธุ์ก็ใส่ตามมา และสุดท้ายเป็นเลขโรมันบอกลำดับของเอนไซม์ที่แยกได้จากแบคทีเรียดังกล่าว เช่น



เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ตัดดีเอ็นเอได้ปลายเหนียว เอนไซม์ตัดจำเพาะที่บริเวณจดจำที่ไม่เป็น palindrome และตัดดีเอ็นเอที่จุดห่างออกไป

ภาพที่ 4 ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (สุรินทร์, 2536)

อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีส (agarose gel electrophoresis)

อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีส (agarose gel electrophoresis) เป็นวิธีการมาตรฐานที่ใช้ในการแยก วิเคราะห์ และทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ ด้วยเหตุนี้จึงเป็นเทคนิคที่สำคัญมากในการศึกษาและวิจัยด้านพันธุวิศวกรรม อีกทั้งเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย รวดเร็วและประหยัด นอกจากนั้นยังมีข้อดีที่สำคัญคือ สามารถใช้แยกดีเอ็นเอที่มีขนาดไม่แตกต่างกันมากได้ โดยที่เทคนิคอื่นๆเช่นการหมุนเหวี่ยงในเกรเดียนต์ของความหนาแน่นไม่สามารถแยกได้ การตรวจหาตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอหลังอิเล็กโทรโฟริซีสทำได้ค่อนข้างง่ายและมีความไวสูง ซึ่งทำโดยการย้อมอะกาโรสเจลด้วยเอทิเดียมโบรไมด์ ความเข้มข้นต่ำๆจากนั้นตรวจหาสารเชิงซ้อนของเอทิเดียมโบรไมด์และดีเอ็นเอ โดยดู

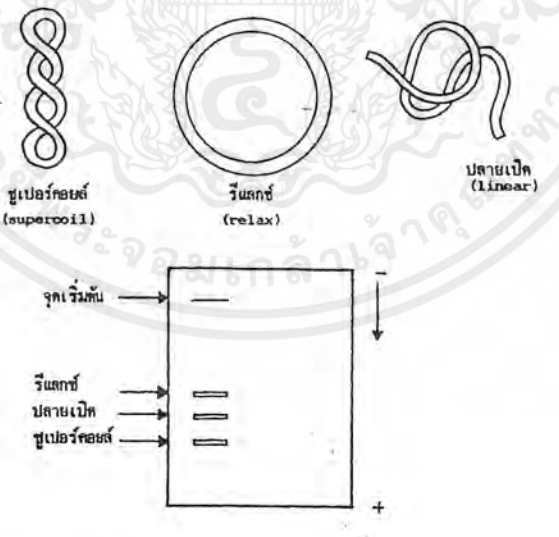
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวาวแสง (fluorescence) ของมันเมื่อส่องอะกาโรสเจลด้วยแสงอัลตราไวโอเลต โดยวิธีนี้สามารถที่จะตรวจแถบดีเอ็นเอ ที่มีปริมาณต่ำมากขนาด 1 นาโนกรัมได้

หลักการของอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีส

อิเล็กโทรโฟริซีสเป็นวิธีการที่ใช้แยกโปรตีน หรือกรดนิวคลีอิก ซึ่งอยู่ในสนามไฟฟ้าออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของสารนั้นๆในสนามไฟฟ้า ซึ่งเป็นผลจากความแตกต่างของชนิดและปริมาณของประจุ ขนาด และรูปร่าง ของโมเลกุลของสารที่ต้องการจะแยกนั้น การแยกชีวโมเลกุลในสนามไฟฟ้าโดยวิธีอิเล็กโทรโฟริซีสมักจะทำในตัวกลาง โดยการใส่สารที่ต้องการแยกลงในตัวกลาง แล้วจึงปล่อยกระแสไฟฟ้าให้ผ่านตัวกลางนั้น ดังนั้นจึงมีอิเล็กโทรโฟริซีสหลายชนิด ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของตัวกลาง เช่น โพลีอะครีลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซีส (polyacrylamide gel electrophoresis) เมื่อใช้ตัวกลางเป็นโพลีอะคริลาไมด์สตาร์ชเจลอิเล็กโทรโฟริซีส (starch gel electrophoresis) เมื่อใช้ตัวกลางเป็นสตาร์ชเจล เป็นต้น ส่วนอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีสก็ คืออิเล็กโทรโฟริซีสที่ทำในตัวกลางที่เป็นอะกาโรสเจลนั่นเอง

ในการแยกดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอโดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีส จะทำในบัฟเฟอร์ซึ่งมี pH ประมาณ 8 ซึ่งที่ pH นี้ดีเอ็นเอจะมีประจุลบเนื่องจากการแตกตัวของหมู่ฟอสเฟต อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้าจะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ดังต่อไปนี้



ภาพที่ 5 แสดงลักษณะการเคลื่อนที่ของพลาสมิดที่มีโครงรูปแตกต่างกัน ในอะกาโรสเจล

(สุรินทร์, 2536)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อะกาโรสเจลนั้น จะมีอยู่เพียงช่วงเดียวเท่านั้นที่การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอบนเจลจะมีความสัมพันธ์แบบเป็นเส้นตรงกับค่า log ของขนาดโมเลกุล ดังนั้นในการแยกดีเอ็นเอขนาดต่างๆจะต้องเลือกความเข้มข้นของอะกาโรสให้เหมาะสม จากภาพที่ 6 ขนาดของดีเอ็นเอที่มีการเคลื่อนที่แบบแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของอะกาโรสเจลได้ รวบรวมไว้ใน ตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล กับขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิด (สุรินทร์, 2536)

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

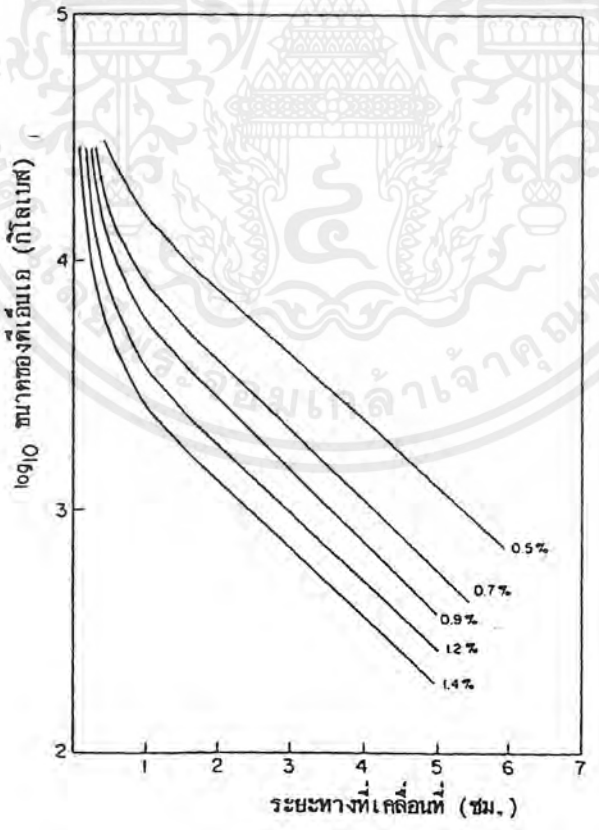
3. ความต่างศักย์ไฟฟ้า

โดยปกติอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีสจะทำโดยใช้ความต่างศักย์อยู่ในช่วง 0.5-5 โวลต์/เซนติเมตร แต่ค่าความต่างศักย์ที่นิยมใช้มักจะมีค่าต่ำๆ (ประมาณ 1 โวลต์/เซนติเมตร) ทั้งนี้เพราะที่ความต่างศักย์ต่ำๆอัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอปลายเปิดจะเป็นสัดส่วนกับความต่างศักย์ แต่ถ้าใช้ความต่างศักย์สูงขึ้น การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอปลายเปิดโมเลกุลใหญ่ๆจะเพิ่มขึ้นมากกว่าพวกที่มีขนาดโมเลกุลเล็กมากเป็นเหตุให้เมื่อใช้ความต่างศักย์สูงๆช่วงขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิดที่แยกได้จะแคบลง สำหรับดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่โดยเฉพาะที่ใหญ่กว่า 70 กิโลเบส การที่จะทำให้แยกจากกันได้ดีจะต้องใช้ความต่างศักย์ต่ำๆ (0.5 โวลต์/เซนติเมตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อใช้ความต่างศักย์ต่ำๆ (1 โวลต์/เซนติเมตร) เวลาสำหรับการแยกจะค่อนข้างยาว (มากกว่า 10 ชั่วโมง) ฉะนั้นจะเกิดการแพร่ของแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กได้มากทำให้แถบดีเอ็นเอที่แยกได้ไม่คม หรือในกรณีที่ขนาดโมเลกุลไม่ต่างกันมากจะไม่สามารถแยกจากกันได้เลย ดังนั้นสำหรับดีเอ็นเอที่มีขนาดค่อนข้างเล็ก (ต่ำกว่า 2 กิโลเบส) จึงมักจะทำอิเล็กโทรโฟริซีสโดยใช้ความต่างศักย์สูงๆเพื่อลดการแพร่ของแถบดีเอ็นเอลง

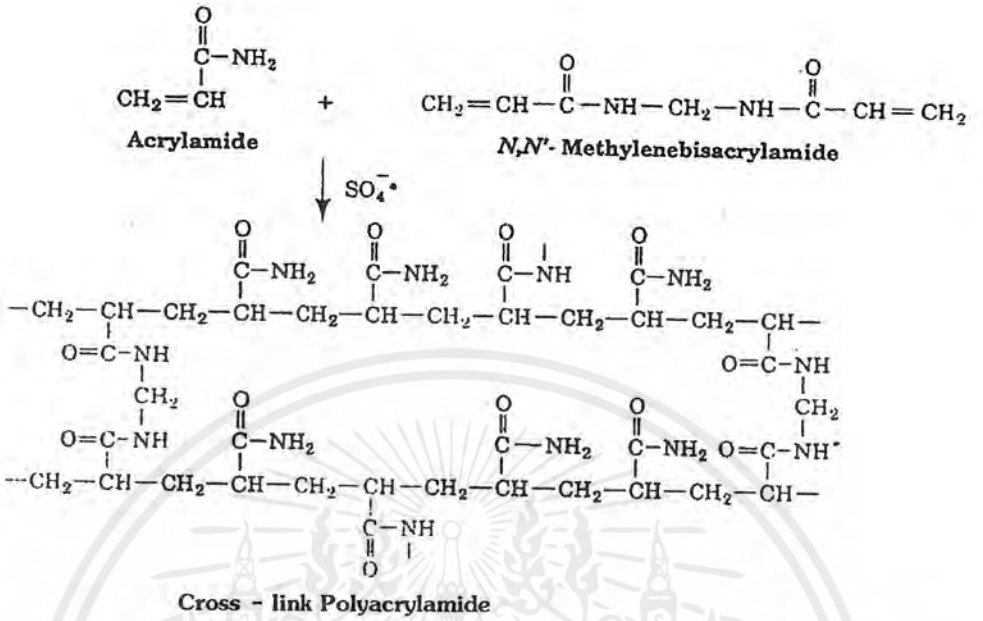
อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีสมักจะทำในแนวราบ โดยที่อะกาโรสเจลจะจมอยู่ใต้บัฟเฟอร์ประมาณไม่เกิน 3 มิลลิเมตร ด้วยเหตุที่ความต้านทานไฟฟ้าในอะกาโรสเจลและในบัฟเฟอร์ใกล้เคียงกันมาก ฉะนั้นกระแสไฟฟ้าส่วนใหญ่ที่ใช้สำหรับการอิเล็กโทรโฟริซีสจะเคลื่อนผ่านแผ่นอะกาโรสเจล อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซีสมักจะนิยมทำที่อุณหภูมิห้อง ทั้งนี้เพราะอัตราเร็วสัมพัทธ์ของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอปลายเปิดขนาดต่างๆจะไม่เปลี่ยนแปลงในช่วง 4 – 30 องศาเซลเซียส แต่กรณีที่ใช้ความเข้มข้นของอะกาโรสเจลต่ำกว่า 0.5% มักจะทำอิเล็กโทรโฟริซีสที่ 4 องศาเซลเซียส ทั้งนี้เพราะเมื่อความเข้มข้นของอะกาโรสต่ำเจลจะอยู่ในสภาพค่อนข้างนิ่ม ในที่เย็นจะช่วยให้เจลอยู่คงรูปมากขึ้น



ภาพที่ 6 กราฟ log แสดงขนาดของดีเอ็นเอ เทียบกับ ระยะทางที่เคลื่อนที่ (สุรินทร์, 2536)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



ภาพที่ 7 การเกิดปฏิกิริยาพอลีเมอร์ไรซ์เซชัน (สุรินทร์, 2536)

Polyacrylamide gel eletrophoresis

Polyacrylamide gel เกิดจากการ Polymerization ของ acrylamide monomer ต่อกันเป็นสายยาว เป็น Polyacrylamide โดยมี N, N'-methylenebis acrylamide เป็นตัวเชื่อมต่อระหว่างสายของ acrylamide ทำให้ได้ลักษณะตาขายหรือร่างแห 3 มิติ ความเข้มข้นของ acrylamide และ bis จะเป็นตัวกำหนดความยาวของสาย polymer และขนาดของรูตาขายที่เร็วขึ้น การเกิด Polymerization ของ acrylamide monomer จะต้องใช้ ammonium persulfate ทำให้เกิด free radical โดย $SO_2O_8^{2-}$ จะเปลี่ยนเป็น 2 SO_4^- โดยการกระตุ้นของ base-catalyst คือ N, N, N', N' - tetramethylethylenediamine (TEMED) หรือ 3-di-methylaminopropionitrile (DMAPN) นอกจากนี้แล้ว Polymerization ยังเกิดได้จาก Photo chemical reaetion ระหว่าง tiboflavin กับแสงอีกด้วยการเกิด polymerization จะถูกยับยั้งโดยออกซิเจน

Polyacrylamede gel มีความยุ่งยากในการเตรียม และการ run มากกว่า agarose gels ขนาดของแผ่น gel มีตั้งแต่ 10 เซนติเมตร ถึง 100 เซนติเมตร ขึ้นอยู่กับความต้องการในการแยก DNA โดยเราจะต้อง run ในแนวตั้งฉากกับพื้น (vertical) ซึ่ง agarose gel จะขั้นในแนวราบกับพื้น (horizotal) แต่ polyacrylamide gel มีข้อดีกว่า agarose gel 3 ประการคือ

1. ประสิทธิภาพในการแยกชิ้น DNA นั้นดีกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
35853

2. DNA ที่แยกได้นั้นมีประมาณมากถึง 100 μg ในพื้นที่ gel ขนาด 1 มิลลิเมตร x 1 เซนติเมตร ซึ่งถ้าเปรียบเทียบกับ agarose gel แล้ว จะมีปริมาณน้อยกว่า เพราะจะสูญเสีย DNA ไประหว่างการ run

3. DNA ที่แยกได้จาก polyacrylamide จะมีความบริสุทธิ์สูง ทำให้สามารถนำไปใช้ในวัตถุประสงค์อื่นอีกได้ เช่น microinjection of mouse embryos

รูปแบบของ polyacrylamide gel electrophoresis

1. Nondenaturing polyacrylamide gels ใช้สำหรับแยกชิ้นส่วนของ ดีเอ็นเอสายคู่ (fragment of double – stranded DNA) ในรูปแบบนี้จะ run ใน 1x TBE และใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าต่ำ (1 – 8 โวลต์/ซม.) เพื่อป้องกันการเสียสภาพของดีเอ็นเอชิ้นเล็ก ที่เกิดจากความร้อนของการไหลของกระแสไฟฟ้า ชิ้นส่วนของ ดีเอ็นเอสายคู่จะเคลื่อนผ่าน gel โดยมีอัตราการเคลื่อนที่ผกผันกับ $\log_{10}$ ของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ อย่างไรก็ตามการเคลื่อนที่บนสนามไฟฟ้าของชิ้นส่วนดีเอ็นเอไม่ได้มีผลมากจากขนาดอย่างเดียวสำหรับดีเอ็นเอสายคู่ แต่จะมีผลจากองค์ประกอบของเบสและลำดับเบส ในชิ้นส่วนดีเอ็นเอสายคู่ด้วย โดยอาจทำให้ดีเอ็นเอสายคู่ที่มีขนาดเท่ากัน เคลื่อนที่ได้ต่างกันถึง 10 % ผลดังกล่าวเชื่อว่าเกิดจากบางส่วนบนลำดับเบสเฉพาะของดีเอ็นเอสายคู่ จึงทำให้ไม่สามารถหาขนาดที่แน่นอนของชิ้นส่วนดีเอ็นเอสายคู่ที่ผิดปกติโดยการ run บน non deraturang polyacrylamide gel ได้

2. Denaturing polyacrylamide gels ใช้สำหรับแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single – stranded fragments of DNA) โดยใน gel จะมีสารบางชนิดเพื่อทำลายการจับคู่ของ nucleic acid สารดังกล่าวที่ใช้ เช่น urea, formamite (ไม่ค่อยนิยม) ส่วนสาร Alkaline จะใช้ไม่ได้ เพราะจะทำให้เกิดการสูญเสียหมู่ amino ของ acrylamide ส่วน methylmercuric hydroxide ก็จะยับยั้งการเกิด polymer จึงใช้ไม่ได้เช่นกัน ชิ้นส่วนดีเอ็นเอสายเดี่ยวจะเคลื่อนที่ผ่านเจลโดยมีอัตราการเคลื่อนที่ ขึ้นกับขนาดของชิ้นส่วน ดีเอ็นเอโดยไม่มีผลกระทบจากองค์ประกอบและลำดับเบสในสายดีเอ็นเอ เข้ามาเกี่ยวข้องด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 ความเหมาะสมของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ กับเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของ Acrylamide ใน Polyacrylamide gel (สุรินทร์, 2536)

Acrylamide (% [w/v])[a]	Effective range of separation (bp)	Xylene cyanol FF[b]	Bromophenol blue[b]
3.5	1000–2000	460	100
5.0	80–500	260	65
8.0	60–400	160	45
12.0	40–200	70	20
15.0	25–150	60	15
20.0	6–100	45	12

[a] *N,N'*-methylenebisacrylamide is included at 1/30th the concentration of acrylamide.
[b] The numbers given are the approximate sizes (in nucleotide pairs) of fragments of double-stranded DNA with which the dye comigrates.

Internal Transcribed Spacer (ITS)

เป็นหน่วยที่อยู่ซ้ำๆกันในยีนของ Ribosomal RNA (rRNA) เป็นส่วนที่ไม่ถูกแปลรหัสเป็นโปรตีน (noncoding resgion) และถูกถ่ายทอดในทุกรุ่นของสิ่งมีชีวิตนั้นๆมีความแตกต่างในระหว่างสปีชีย์ภายในจีนัสเดียวกันหรือระหว่างกลุ่มประชากรสูงมาก การวัดขนาดของบริเวณ ITS จึงไม่จำเป็นต้องสกัดดีเอ็นเอเป็นจำนวนมากและสามารถวัดได้จากดีเอ็นเอโดยตรงเพราะบริเวณ ITS เป็นส่วนที่อยู่บนยีนของ rRNA (White และคณะ, 1990) และบริเวณ ITS เป็นบริเวณที่ลำดับเบสไม่ได้ถูกอนุรักษ์ไว้ แต่ก็ยังมีส่วนที่ถูกอนุรักษ์คือส่วนของยีน 5.8S rRNA เช่นเดียวกับส่วนอื่นๆบนยีน Nuclear Small rRNA หรือ Nuclear Large rRNA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของเห็ดในสกุล *Plurotus* 7 ชนิด กับเห็ดสกุลอื่นที่นำมาศึกษา

ชื่อเห็ด / ลักษณะ	ภูฐาน	นางฟ้า	นางรม	เป๋าฮื้อ	นางรมทอง	นางนวล	ขอนขาว	หูหนู
หมวกเห็ด	รูปกรวย สีขาว, เทา ϕ4 – 9 ซม. ผิวเรียบ	รูปกรวย สีน้ำตาลอมเทา ϕ2 – 8 ซม.	รูปกรวย สีขาว ϕ3 – 6 ซม. ขนละเอียดสีขาว	รูปพัด สีน้ำตาลดำ ϕ4 – 12 ซม. ขอบเรียบ ขนละเอียดสีสีน้ำตาลดำ	รูปคล้ายร่ม สีขาวทอง ϕ5 – 6 ซม.	รูปกรวย สีชมพู ϕ3 – 6 ซม.	รูปกรวยตื้น สีขาว ϕ2 – 8 ซม. ขอบงอลงเล็กน้อย เกล็ด สี่เหลี่ยมเล็กๆ	รูปพัดไม่มีด้าม สีน้ำตาลแดง กว้างxยาว 2-6x5-15ซม. ขอบเป็นหยัก ขนละเอียด
ครีบ	สีขาวครีม ครีบเรียงตัวกันอย่าหนาแน่น ขยายลงด้านล่าง	สีขาวอมเหลือง ครีบขนานกันตามความยาวของก้าน	สีขาว ครีบยาวขนานเชื่อมกับก้านดอก	สีขาวนวล ครีบขนานกันตามความยาวของก้าน	สีขาวอมทอง ครีบเรียงตัวติดกับก้านดอก ขยายลงด้านล่าง	สีชมพู ครีบขนานลงไปเชื่อมกับก้านดอก	สีขาว ครีบขนานลงไปเชื่อมกับก้านดอก	ไม่มีครีบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเห็ด / ลักษณะ	ภูฏาน	นางฟ้า	นางรม	เป๋าฮื้อ	นางรมทอง	นางนวล	ขอนขาว	หูหนู
ก้าน	สีขาว ยาว 2 – 4 ซม. ผิวเรียบไม่ กลวง	สีขาว ยาว 3 – 5 ซม. กว้าง2 – 3 ซม. ไม่อยู่กึ่งกลาง หมวกเห็ด ก้าน โค้งงอเล็กน้อย	สีขาว ยาว 1 – 3 ซม. กว้าง2 –5 ซม. ไม่อยู่กึ่งกลาง หมวกเห็ด ก้าน โค้งงอเล็กน้อย	สีเทาดำ ยาว 4 – 6 ซม. กว้าง 2 – 3ซม. โคนก้านสอบ เล็ก ขนละเอียดสี เทาอมน้ำตาล	สีขาวอมเหลือง ยาว 6 – 8 ซม. ก้านไม่กรวง	ก้านไม่อยู่กึ่ง กลางหมวก และเว้าลึกลง ไป	สีขาว ยาว 2 – 6 ซม. กว้าง 0.5 – 1 ซม. โคนก้านเรียว บนก้านมีเกล็ด สี่เหลี่ยมเล็กๆ	ไม่มีก้าน
สปอร์	สีครีม รูปไข่ ขนาด 8 – 10 x 3 – 4 µm ผิวเรียบ	สีขาว รูปรี ขนาด 4 x 8.5 µm	สีขาว,ม่วงอ่อน รูปกลมรี มีติ่งที่ปลายข้าง หนึ่ง ขนาด 3 – 4 x 8 – 12 µm	สีขาว รูปรี ขนาด 4.5 x 10 – 13 µm ผิวเรียบ ผนัง หนา	สีขาว, เทา รูปยาวรี ขนาด 7 – 9 x 3 – 5 µm	สีชมพูถึงเทา แดง ขนาด 6 –10 x 4 – 5 µm	สีขาวนวล รูปทรง กระบอก ขนาด 2 – 2.5 x 5 – 8 µm ผิวเรียบผนัง บาง	สีใส รูปไส้กรอก ขนาด 5-6x13- 15 µm ผิวเรียบ สปอร์รูปทรง กระบอก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของลิขสิทธิ์ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
ขั้นตอนการดำเนินการ

อุปกรณ์ในการดำเนินการ

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ด
   - เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave)
   - ตู้ถ่ายเชื้อ (lamina air flow)
   - เครื่องเขย่า (shaker)
   - ตะเกียงแอลกอฮอล์
   - เข็มเขี่ยเชื้อ
   - ขวดรูปชมพู่
   - หลอดทดลอง
2. อุปกรณ์ที่ใช้สกัดดีเอ็นเอ
   - เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ของบริษัท HERMLE รุ่น Z383K
   - เครื่องผสมสาร (vortex mixer)
   - เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง
   - กระดาษกรอง
   - กรวยกรอง
   - โกร่ง (mortar)
   - micropipette
   - micropipette tips
   - microfuge tube
3. อุปกรณ์ที่ใช้ทำ PCR (Polymerase Chain Reaction)
   - เครื่อง PCR ใช้เครื่อง Authorized Thermal Cycle for PCR ของบริษัท HYBRID
   - micropipette
   - micropipette tips
   - microfuge tube

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำอิเล็คโตรฟอริซิส (electrophoresis)
   - ชุดอุปกรณ์อิเล็คโตรฟอริซิสแนวตั้ง (Vertical Electrophoresis) ของบริษัท SCIE – PLAS กระแสไฟสูงสุด 250 มิลลิแอมป์ ความต่างศักดิ์สูงสุด 500 โวลต์
   - เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply) ของบริษัท AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH
   - เครื่องฉายแสงยูวี ของบริษัท HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENTS

เชื้อพันธุ์เห็ดที่นำมาทำการทดลอง

จากศูนย์รวมสวนเห็ดบ้านอรัญญิก ได้แก่

- เห็ดนางฟ้าภูฐาน (*Pleurotus butan*)
- เห็ดนางฟ้า (*Pleurotus sajor - cajou*)
- เห็ดเป๋าฮื้อ (*Pleurotus cystidiosus* (Cream))
- เห็ดเป๋าฮื้อดำ (*Pleurotus cystidiosus* (Black))
- เห็ดนางรมทอง (*Pleurotus citrinopileatus*)
- เห็ดนางนวล (*Pleurotus flabellatus*)

จากศูนย์รวบรวมเชื้อพันธุ์เห็ดแห่งประเทศไทย ได้แก่

- เห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*)
- เห็ดหูหนู (*Auricalaria polytricha*)
- เห็ดขอนขาว (*Lentimus squarrosulus*)

การเตรียมไมซีเลียมของเห็ดในสกุล *Pleurotus*

1. นำไมซีเลียมที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มาทำการ subculture โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อตัดชิ้นวุ้นที่มีไมซีเลียมเจริญอยู่ เลือกบริเวณปลายเส้นใย โดยตัดขนาดชิ้นวุ้นประมาณ 1 ซม. x 1 ซม. ย้ายลงอาหารแข็ง PDA (Potato Dextrose Agar สำเร็จรูปของบริษัท Difco Laboratories USA) หลอดใหม่
2. ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาประมาณ 7 – 10 วัน หรือให้เส้นใยเจริญพอสมควร
3. ทำการเพาะเลี้ยงไมซีเลียมในอาหารเหลวโดยการใช้เข็มเขี่ยเชื้อ ตัดชิ้นวุ้น PDA ที่มีไมซีเลียมเจริญอยู่ เลือกบริเวณปลายเส้นใยโดยตัดชิ้นวุ้นขนาดประมาณ 1 ซม. x 1 ซม. ย้ายลงอาหารเหลว PDB (Potato Dextrose Broth สำเร็จรูปของบริษัท Difco Laboratories USA) pH 5.0 ในขวดรูปชมพู่ ซึ่งมีปริมาตรอาหารเหลว 1 ใน 5 ของปริมาตรขวด เขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 2 สัปดาห์หรือจนได้ผลึกไมซีเลียม (pellet) เพียงพอสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ

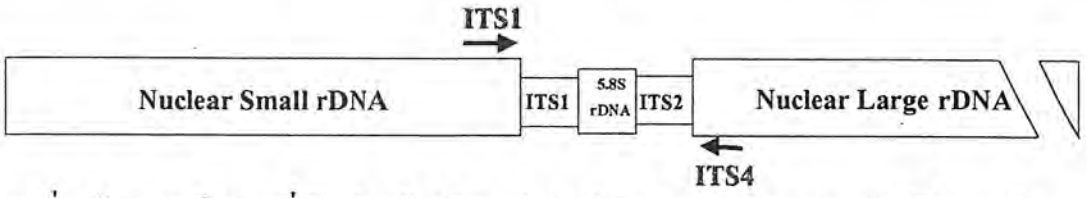
การสกัด DNA (Cenis, J. L., 1992)

1. นำผลึกไมซีเลียมจากการเก็บเกี่ยวโดยการกรองปริมาณ 0.1 – 0.3 กรัม ใส่ใน microfuge tube ขนาด 1.5 มล. ล้างผลึกไมซีเลียมด้วย 1x TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
2. รินสารละลายส่วนใสทิ้ง ย้ายผลึกไมซีเลียมลงโกร่ง เติมไนโตรเจนเหลวให้ท่วม (ประมาณครึ่งหนึ่งของปริมาตรความจุโกร่ง) บดผลึกไมซีเลียมด้วยสากให้ละเอียดอย่างรวดเร็วจนได้ผงแป้งสีขาว รีบย้ายลง microfuge tube หลอดใหม่ขนาด 1.5 มล. พยายามอย่าให้ผงแป้งละลาย
3. เติม Extraction buffer (200 mM Tris – HCl, pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5 % SDS) 300 µl เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติม 3M Sodium acetate pH 5.2 150 µl เขย่าให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
4. หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
5. ย้ายสารละลายส่วนใสลง microfuge tube ขนาด 1.5 มล. หลอดใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol ในปริมาตรที่เท่ากับสารละลายที่ได้ แล้วบ่มอย่างน้อย 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
6. หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
7. รินสารละลายส่วนใสทิ้ง แล้วล้างดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 70 % เอธานอล รินเอธานอลทิ้ง คว่ำ microfuge tube บนกระดาษทิชชู
8. หงาย microfuge tube รอจนแห้ง แล้วละลายดีเอ็นเอด้วย TE buffer 50 µl
9. เก็บดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้งาน

การทำ PCR

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วง ITS region ใช้ไพรเมอร์ 2 ชนิดคือ ITS1 และ ITS4 ซึ่งมีลำดับเบสเป็น 5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′ และ 5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′ ตามลำดับซึ่งเป็นบริเวณที่ถูกอนุรักษ์ไว้ และถ่ายทอดไปยังทุกรุ่นของสิ่งมีชีวิต (White *et al.*, 1990) อยู่ระหว่างปลาย 3′ ของ nuclear small rDNA กับปลาย 5′ ของ nuclear large rDNA โดยมีสารเคมีและสภาวะในการทำ PCR ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 8 ไพรเมอร์ ITS1 ที่เป็นคู่สมกับบริเวณปลาย 3′ ของ Nuclear Small rDNA ไพรเมอร์ ITS4 ที่เป็นคู่สมกับบริเวณปลาย 5′ ของ Nuclear Large rDNA และบริเวณ ITS ที่ประกอบไปด้วย ITS1, 5.8S rDNA และITS2 (White และคณะ 1990)

สารเคมีที่ใช้ในการทำ PCR

10x PCR buffer

(500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9.0 at 25°C), 15 mM $MgCl_2$ and 0.1% Triton® X-100)

$MgCl_2$	1.5	mM	ของบริษัท GIBCO LABOLATORIES
dNTP (dATP , dTTP , dCTP , dGTP)	0.1	mM	ของบริษัท GIBCO LABOLATORIES
Taq polymerase	0.025	Unit/µl	ของบริษัท GIBCO LABOLATORIES
Primer – ITS1	25	pM	
Primer – ITS4	25	pM	
DNA template	200	ng	

นำดีเอ็นเอแม่แบบ มาผสมกับสารทำPCR ทั้งหมดแล้วจึงนำไปใส่เครื่อง PCR ปรับสภาวะเครื่องให้เป็นดังนี้

สภาวะการทำ PCR

ขั้นที่ 1	Initial Denaturation	94 °C	5 นาที	1 รอบ	
ขั้นที่ 2	Denaturation	94 °C	40 วินาที	30 รอบ	
	Annealing	55 °C	40 วินาที		
	Extension	72 °C	60 วินาที		
ขั้นที่ 3	Final Extension	7 °C	7 นาที	1 รอบ	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากการทำ PCR เสร็จแล้ว นำ PCR product ที่ได้มาแยกตามขนาด โดยการทำอิเล็คโตรโฟริซิส บน polyacrylamide gel 6% กระแสไฟฟ้า 60 โวลต์ ใช้ 100 bp Molecular Ruler หรือ 123 bp DNA ladder เป็น DNA size marker เพื่อเป็นตัวบ่งชี้ขนาดคร่าวๆของชิ้นส่วน DNA แล้วบันทึกภาพด้วย Video Capture

การเตรียม Polyacrylamide gel ประกอบเข้ากับชุด Vertical electrophoresis

1. ประกอบกระจก (Sandwich glass) โดยใส่ spacer 3 อัน อยู่ระหว่างกระจก เรียง spacer เป็นรูปตัว U ให้ชิดขอบ 3 ด้าน เพื่อทำเป็นช่องเก็บเจล ใช้ greese ทาที่ spacer เพื่อเป็นตัวสมานไม่ให้เจลไหลซึมออกนอกช่องเก็บ

2. เตรียม polyacrylamide gel (ดูส่วนผสมจากตารางที่ 5) เมื่อได้สารละลายแล้วผสมให้เข้ากัน กรอกใส่ช่องระหว่างกระจกโดยใช้ไมโครปิเปตต์ นำหวี (well comb) มาเสียบระหว่างกระจก ปล่อยให้เจลแข็งตัว (การแข็งตัวของเจลเกิดจากปฏิกิริยาพอลิเมอร์ไรเซชั่น) จากนั้นค่อยๆ ดึงหวีออก

3. ประกบกระจก (Sandwich glass) เข้ากับเครื่องอิเลคโตรโฟริซิส โดยใช้ คลิ๊ปหนีบ เท สารละลาย 1x TBE (4.5 mM Tris – base 10.8 g, 1 mM Boric acid 5.5 g, 0.5 M EDTA 40 มล.)ให้ท่วมความสูงของเจล

4. ล้างช่อง well slot โดยนำ TBE ดูดเข้าออกเบาๆด้วยไมโครปิเปตต์ ไล่อากาศที่อยู่ระหว่างกระจก sandwich glass ให้หมด

5. นำสารละลายที่ได้จากการทำ PCR หรือได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมาผสมกับ loading dye แล้วนำไปหยดอย่างช้าๆในช่อง well slot ใส่ไปตัวอย่างละช่อง แล้วใช้ DNA size marker ใส่ลงไปในช่องแรกเพื่อเป็นตัวบ่งชี้ขนาดคร่าวๆของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

6. ปิดฝา เปิดเครื่อง power supply และปรับความต่างศักย์เป็น 60 โวลต์

7. หลังจากทำ electrophoresis เสร็จแล้ว นำโพลีอคริลาไมด์เจลไปย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (Ethedium Bromide 10 µl ใน 1x TBE 200 µl) เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงนำไปตรวจสอบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอด้วยแสง UV

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 การเตรียม Polyacrylamide gel ที่ความเข้มข้นต่างๆ (เปอร์เซ็นต์)

(White และคณะ 1990)

	6 %	12 %	15 %
Acrylamide 29 % Bisacrylamide 1 %	1.4 ml	2.8 ml	3.5 ml
TBE (5X)	1.4 ml	1.4 ml	1.4 ml
Water	4.2 ml	2.8 ml	2.1 ml
TEMED	7 µl		
10 % APS	100 µl		

Acrylamide, Bisacrylamide ของบริษัท BIO – RAD LABORATORIES

การวิเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี RFLP

นำ PCR product ที่ได้มา ทำ RFLP โดยใช้ Restriction enzyme (เอนไซม์ตัดจำเพาะ) 3 ชนิดดังนี้ *Eco*RI, *Alu*I และ*Sau*3A (ของบริษัท BOEHRINGER MANNHEIM) ซึ่งมีตำแหน่งตัดจำเพาะดังนี้ G$^{\downarrow}$AATTC, AG$^{\downarrow}$CT, G$^{\downarrow}$ATC ตามลำดับ

กรณีที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 1 ชนิด นำ PCR product ของเห็ดแต่ละชนิดตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 1 ชนิด

ส่วนประกอบสารละลายที่ใช้

PCR product	3	µg
Restriction enzyme	2	U
Buffer A	5	U

(Buffer A : Tris – Acetate 33 mM, Magnesium acetate 10 mM, Potassium acetate 66 mM, Dithiothreitol (DTT) 0.5 mM, pH at 37^{0}C 7.9)

บ่มในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลามากกว่า 2 ชั่วโมงแล้วนำไปทำอิเล็คโตรโฟริซิสบน polyarylamide gel 12 % กระแสไฟฟ้า 60 โวลต์ ใช้ 100 bp Molecular Ruler เป็น DNA size marker แล้วบันทึกภาพด้วย Video Capture

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรณีที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด

PCR product	3	µg
Restriction enzyme ชนิดที่ 1	1	U
Restriction enzyme ชนิดที่ 2	1	U
Buffer A	5	U

บ่มในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส มากกว่า 2 ชั่วโมงแล้วนำไปทำ อิเล็คโทรโฟริซิสบน Polyacylamide gel 15 % กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ ใช้ 100 bp Molecular Ruler เป็น DNA size marker แล้วบันทึกภาพด้วย Video Capture

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

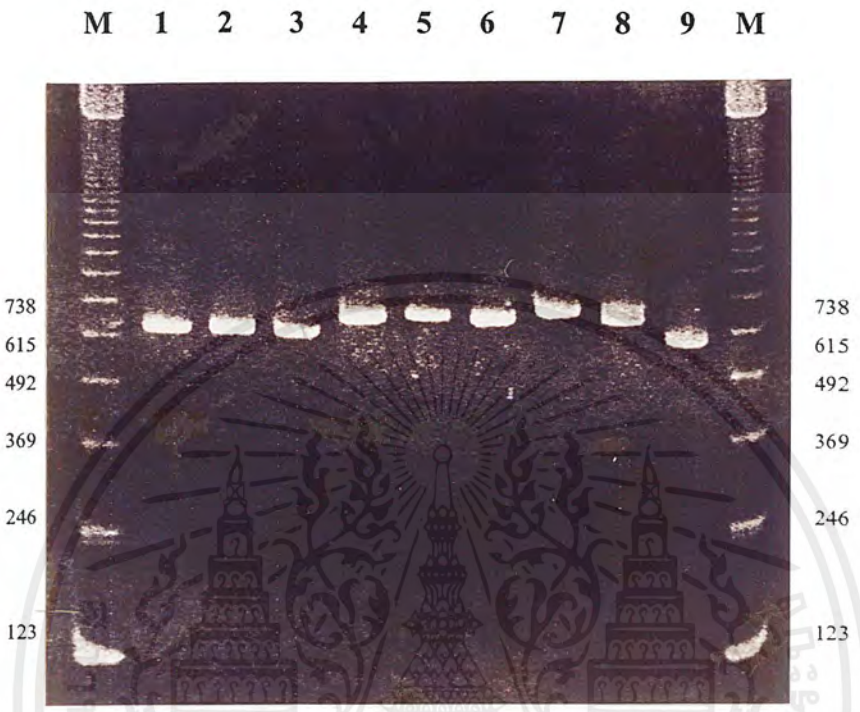
บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

การวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมจาก PCR product

ในการศึกษาความแปรผันของสารพันธุกรรมของเห็ดสกุล *Pleurotus* ครั้งนี้ได้นำเห็ดสกุลนี้มาศึกษารวม 7 ชนิด คือ เห็ดนางฟ้าภูฐาน(*Pleurotus butan*) เห็ดนางฟ้า(*P. sajor-cajou*) เห็ดนางรม(*P. ostreatus*) เห็ดเป๋าฮื้อ(*P. cystidiosus* (Cream)) เห็ดเป๋าฮื้อดำ(*P. cystidiosus* (Black)) เห็ดนางรมทอง(*P. citrinopileatus*) และเห็ดนางนวล(*P. flabellatus*) ร่วมกับเห็ดสายพันธุ์อื่นอีก 2 สายพันธุ์คือ เห็ดขอนขาว(*Lentinus squarrosulus*) และเห็ดหูหนู(*Auricularia polytricha*) โดยศึกษาจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS เนื่องจากบริเวณดังกล่าวเป็นบริเวณที่มีความแปรผันทางพันธุกรรมค่อนข้างสูงในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด โดยใช้เทคนิค PCR ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณดังกล่าวด้วยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 หลังจากนั้นจึงนำ PCR product ของบริเวณ ITS ที่ได้ไปวิเคราะห์ผลด้วย polyacrylamide gel electrophoresis พบว่าขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเห็ดทั้งหมดมีขนาดใกล้เคียงกันประมาณ 600 bp (ภาพที่ 9) แต่ยังไม่เห็นความแตกต่างชัดเจนนักในเห็ดแต่ละชนิด ดังนั้นเราจึงต้องศึกษาถึงความแตกต่างของลำดับเบสภายในบริเวณ ITS ของเห็ดแต่ละชนิดอย่างคร่าวๆโดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ PCR product



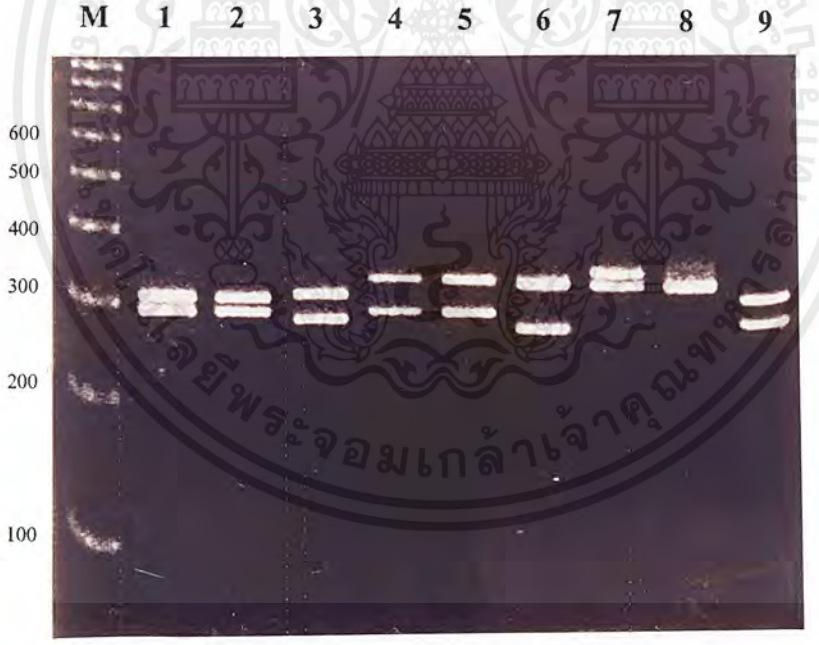
ภาพที่ 9 ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 โดยลำดับของแต่ละช่อง เป็นดังนี้ ช่องที่ M คือ 123 bp DNA ladder ซึ่งใช้เป็น size marker 1.เห็ดนางฟ้าภูฐาน(*Pleurotus butan*) 2.เห็ดนางฟ้า(*P. sajor-cajou*) 3.เห็ดนางรม(*P. ostreatus*) 4.เห็ดเป๋าฮื้อ(*P. cystidiosus* (Cream)) 5.เห็ดเป๋าฮื้อดำ(*P. cystidiosus* (Black)) 6.เห็ดนางรมทอง(*P. citrinopileatus*) 7.เห็ดนางนวล(*P. flabellatus*) 8.เห็ดขอนขาว(*Lentinus squarrosulus*) และ 9.เห็ดหูหนู(*Auricularia polytricha*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค RFLP

การวิเคราะห์ผล RFLP ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI

เนื่องจากเพียงแค่ขนาดของบริเวณ ITS ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR นั้น ยังไม่สามารถอธิบายความแตกต่างของเห็ดแต่ละสายพันธุ์ได้อย่างชัดเจน ดังนั้นเราจึงได้ศึกษาความแตกต่างของลำดับเบสภายในบริเวณ ITS อย่างคร่าวๆด้วยเทคนิค RFLP โดยการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าวโดยเริ่มจากการใช้เอนไซม์ *Eco*RI เนื่องจากเอนไซม์ *Eco*RI เป็นเอนไซม์ที่พบตำแหน่งตัดจำเพาะค่อนข้างมากในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดแม้ว่าจะมีตำแหน่งจดจำถึง 6 ตำแหน่งก็ตาม พบว่าเอนไซม์ *Eco*RI สามารถตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเห็ดทุกชนิดที่นำมาทดลองได้เพียงตำแหน่งเดียว และรูปแบบการตัดมีความใกล้เคียงกันคือถูกตัดในช่วงกลางของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 ขนาดของชิ้นส่วน DNA บริเวณ ITS ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI โดยลำดับของแต่ละช่องเป็นดังนี้ ช่องที่ M คือ 100 bp Molecular Ruler ซึ่งใช้เป็น size marker 1.เห็ดนางฟ้าภูฐาน(*Pleurotus butan*) 2.เห็ดนางฟ้า(*P. sajor-cajou*) 3.เห็ดนางรม(*P. ostreatus*) 4.เห็ดเป๋าฮื้อ(*P. cystidiosus* (Cream)) 5.เห็ดเป๋าฮื้อดำ(*P. cystidiosus* (Black)) 6.เห็ดนางรมทอง(*P. citrinopileatus*) 7.เห็ดนางนวล(*P. flabellatus*) 8.เห็ดขอนขาว(*Lentinus squarrosulus*) และ 9.เห็ดหูหนู(*Auricularia polytricha*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ผล RFLP ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Alu*I

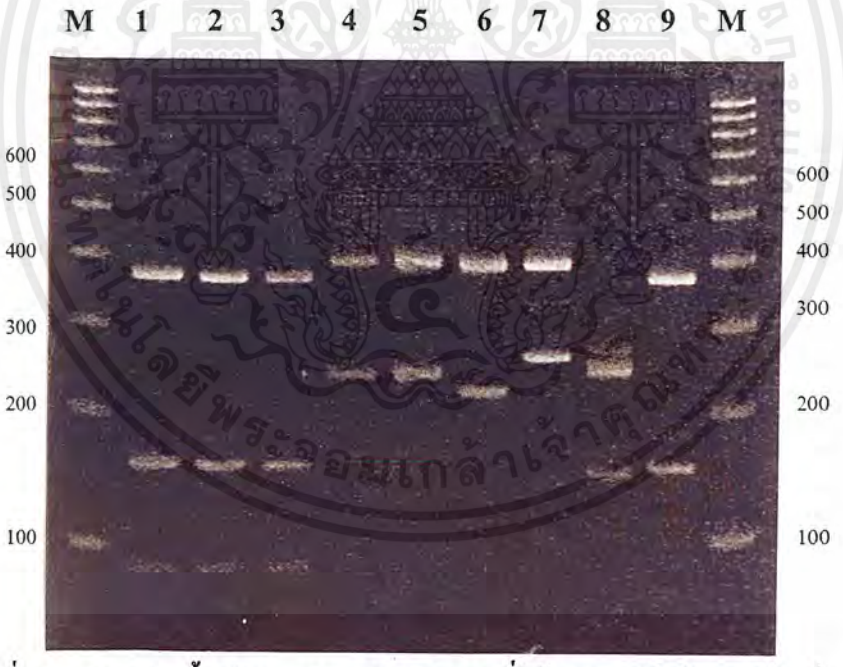
เนื่องจาก RFLP ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI นั้นยังไม่สามารถอธิบายความแตกต่างของเห็ดแต่ละชนิดได้ชัดเจนนัก ดังนั้นเราจึงได้ใช้เอนไซม์อีกชนิด คือเอนไซม์ *Alu*I มาใช้ในการทดสอบเนื่องจากเอนไซม์ *Alu*I นั้นเป็นเอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำเพียง 4 ตำแหน่งเท่านั้น ดังนั้นจึงมีโอกาสสูงที่จะตัดสายดีเอ็นเอได้ พบว่าเอนไซม์ *Alu*I นั้นสามารถตัดบริเวณ ITS ของเห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรม และเห็ดนางรมทองได้ 1 ตำแหน่ง และรูปแบบการตัดก็มีความคล้ายคลึงกัน คือได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 550 bp และ 80 bp ส่วนเห็ดเป๋าฮื้อ เห็ดเป๋าฮื้อดำ และเห็ดนางนวลนั้นถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Alu*I 2 ตำแหน่ง และมีรูปแบบการตัดที่คล้ายคลึงกันคือได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 bp 150 bp และ 80 bp ซึ่งสามารถจำแนกเห็ดสกุล *Pleurotus* ทั้ง 7 ชนิดได้ 2 กลุ่มตามรูปแบบการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Alu*I ดังนี้คือ กลุ่มที่ 1 ได้แก่เห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรม และเห็ดนางรมทอง กลุ่มที่ 2 ได้แก่เห็ดเป๋าฮื้อ เห็ดเป๋าฮื้อดำ และเห็ดนางนวล

ภาพที่ 11 ขนาดของชิ้นส่วน DNA บริเวณ ITS ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *Alu*I โดยลำดับของแต่ละช่องเป็นดังนี้ ช่องที่ M คือ 100 bp Molecular Ruler ซึ่งใช้เป็น size marker 1.เห็ดนางฟ้าภูฐาน(*Pleurotus butan*) 2.เห็ดนางฟ้า(*P. sajor-cajou*) 3.เห็ดนางรม(*P. ostreatus*) 4.เห็ดเป๋าฮื้อ(*P. cystidiosus* (Cream)) 5.เห็ดเป๋าฮื้อดำ(*P. cystidiosus* (Black)) 6.เห็ดนางรมทอง(*P. citrinopileatus*) 7.เห็ดนางนวล(*P. flabellatus*) 8.เห็ดขอนขาว(*Lentinus squarrosulus*) และ 9.เห็ดหูหนู(*Auricularia polytricha*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ผล RFLP ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Sau*3A

เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของการวิเคราะห์ผล RFLP ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Alu*I ดังภาพที่ 11 เราจึงได้ทดลองตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Sau*3A ที่มีตำแหน่งจดจำ 4 ตำแหน่งเช่นเดียวกับเอนไซม์ *Alu*I พบว่าเอนไซม์ *Sau*3A นั้นสามารถตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเห็ดภูฐาน เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรม ได้ 2 ตำแหน่ง ซึ่งมีรูปแบบการตัดที่คล้ายคลึงกัน คือได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 370 bp 160 bp และ 80 bp เห็ดเป๋าฮื้อ เห็ดเป๋าฮื้อดำ เห็ดนางรมทอง และเห็ดนางนวล นั้นถูกตัดโดยเอนไซม์ *Sau*3A ได้ 1 ตำแหน่ง โดยรูปแบบการตัดของ เห็ดเป๋าฮื้อ เห็ดเป๋าฮื้อดำ และเห็ดนางนวลคล้ายคลึงกัน คือได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 390 bp และ 250 bp ส่วนรูปแบบการตัดของเห็ดนางรมทองจะแตกต่างออกไป คือได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 390 bp และ 230 bp สำหรับเห็ดอีก 2 ชนิดซึ่งเป็นเห็ดนอกกลุ่มคือเห็ดขอนขาว และเห็ดหูหนู มีรูปแบบการตัดที่แตกต่างไปจากเห็ดในกลุ่ม *Pleurotus* ทั้ง 7 ชนิด



ภาพที่ 12 ขนาดของชิ้นส่วน DNA บริเวณ ITS ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *Sau*3A โดยลำดับของแต่ละช่องเป็นดังนี้ ช่องที่ M คือ 100 bp Molecular Ruler ซึ่งใช้เป็น size marker 1.เห็ดนางฟ้าภูฐาน(*Pleurotus butan*) 2.เห็ดนางฟ้า(*P. sajor-cajou*) 3.เห็ดนางรม(*P. ostreatus*) 4.เห็ดเป๋าฮื้อ(*P. cystidiosus* (Cream)) 5.เห็ดเป๋าฮื้อดำ(*P. cystidiosus* (Black)) 6.เห็ดนางรมทอง(*P. citrinopileatus*) 7.เห็ดนางนวล(*P. flabellatus*) 8.เห็ดขอนขาว(*Lentinus squarrosulus*) และ 9.เห็ดหูหนู(*Auricularia polytricha*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

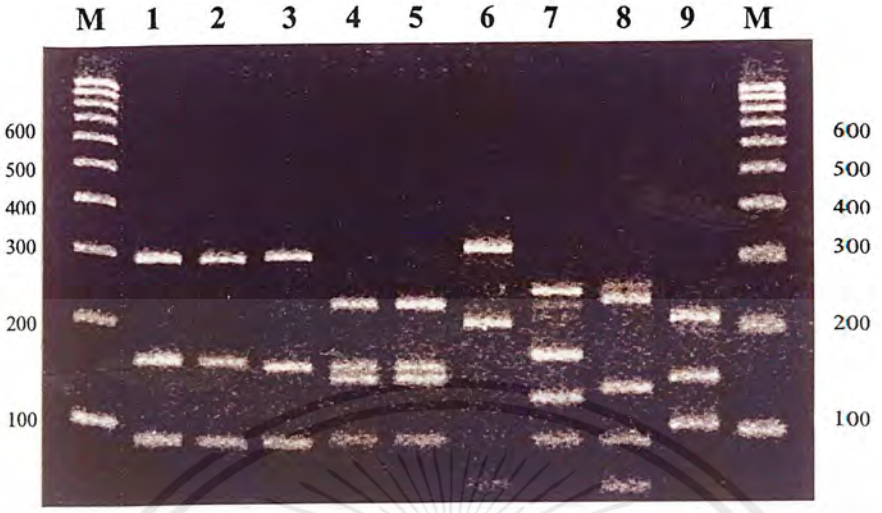
การวิเคราะห์ผล RFLP ที่ตัดด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดพร้อมกัน (double cut)

จากผล RFLP ที่ได้จากการ ใช้เอนไซม์ 1 ชนิดตัดนั้นเกิดรูปแบบการตัดที่แตกต่างกัน คือ ในการตัดด้วยเอนไซม์ *Alu*I จะแบ่งเห็ดในสกุล *Pleurotus* ทั้ง 7 ชนิดได้ 2 กลุ่มคือ กลุ่มของเห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรม เห็ดนางรมทอง และกลุ่มของเห็ดเป๋าฮื้อ เห็ดเป๋าฮื้อดำ และเห็ดนางนวล ส่วนการตัดโดยใช้เอนไซม์ *Sau*3A จะแบ่งเห็ดในสกุล *Pleurotus* ทั้ง 7 ชนิดได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มของเห็ดนางฟ้า เห็ดนางฟ้าภูฐาน และเห็ดนางรม กลุ่มของเห็ดเป๋าฮื้อ เห็ดเป๋าฮื้อดำ เห็ดนางนวล และกลุ่มของเห็ดนางรมทอง จะเห็นได้ว่ารูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเห็ดนางรมทองที่ได้การตัดด้วยเอนไซม์ *Alu*I จะคล้ายคลึงกับรูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเห็ดนางฟ้า เห็ดนางฟ้าภูฐาน และเห็ดนางรม แต่จากรูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเห็ดนางรมทองที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *Sau*3A จะแตกต่างจากรูปแบบของกลุ่มดังกล่าว ทำให้เราต้องศึกษาเพิ่มเติมด้วยเทคนิค RFLP โดยใช้เอนไซม์ 2 ชนิดตัดพร้อมกัน

สำหรับผล RFLP ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *Alu*I และ *Sau*3A พร้อมกันพบว่าสามารถจำแนกรูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของเห็ดในสกุล *Pleurotus* ออกเป็น 4 กลุ่มคือ กลุ่มของเห็ดนางฟ้า เห็ดนางฟ้าภูฐาน และเห็ดนางรมมีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอใกล้เคียงกันคือประมาณ 300 bp 160 bp และ 80 bp 2 ชิ้น กลุ่มที่ 2 เห็ดเป๋าฮื้อ และเห็ดเป๋าฮื้อดำได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดใกล้เคียงกันคือประมาณ 220 bp 160 bp 150 bp และ 80 bp กลุ่มที่ 3 เห็ดนางรมทอง มีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 320 bp 200 bp และ50 bp และกลุ่มของเห็ดนางนวลมีขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอประมาณ 220 bp 150 bp และ100 bp ดังภาพที่ 13 ส่วนเห็ดอีก 2 ชนิดซึ่งเป็นเห็ดนอกกลุ่ม *Pleurotus* คือเห็ดขอนขาว และเห็ดหูหนู นั้นมีรูปแบบการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แตกต่างจากรูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเห็ดสกุล *Pleurotus* ทั้ง 7 ชนิด

สำหรับผล RFLP ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ *Alu*I และ *Eco*RI หรือเอนไซม์ *Sau*3A และ *Eco*RI ตัดพร้อมกันก็สามารถจำแนกรูปแบบการตัดได้ 4 กลุ่มเช่นเดียวกับผล RFLP ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *Alu*I และ *Sau*3A (ภาพที่ 14 และ 15)

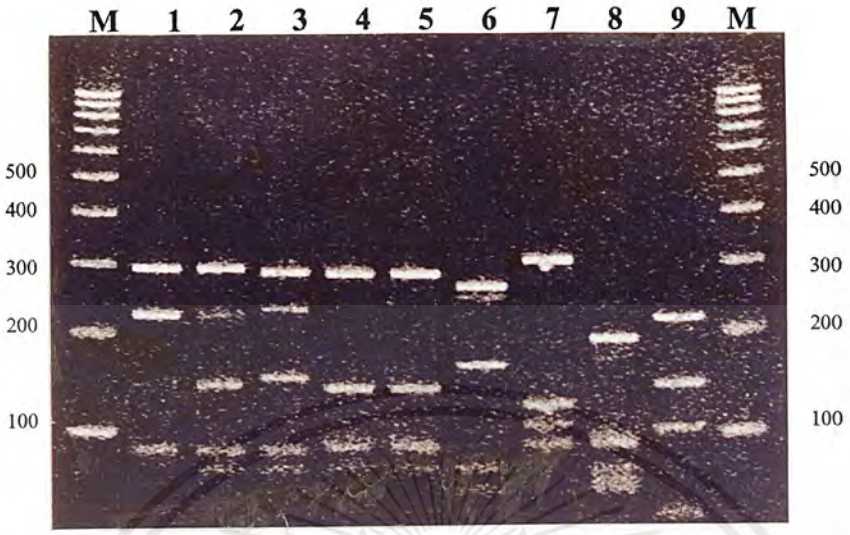
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 13 ขนาดของชิ้นส่วน DNA บริเวณ ITS ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *Alu*I และ *Sau*3A โดยลำดับของแต่ละช่องเป็นดังนี้ ช่องที่ M คือ 100 bp Molecular Ruler ซึ่งใช้เป็น size marker 1.เห็ดนางฟ้าภูฐาน(*Pleurotus butan*) 2.เห็ดนางฟ้า(*P. sajor-cajou*) 3.เห็ดนางรม(*P. ostreatus*) 4.เห็ดเป๋าฮื้อ(*P. cystidiosus* (Cream)) 5.เห็ดเป๋าฮื้อดำ(*P. cystidiosus* (Black)) 6.เห็ดนางรมทอง(*P. citrinopileatus*) 7.เห็ดนางนวล(*P. flabellatus*) 8.เห็ดขอนขาว(*Lentinus squarrosulus*) และ 9.เห็ดหูหนู(*Auricularia polytricha*)

ภาพที่ 14 ขนาดของชิ้นส่วน DNA บริเวณ ITS ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ *Sau*3A โดยลำดับของแต่ละช่องเป็นดังนี้ ช่องที่ M คือ 100 bp Molecular Ruler ซึ่งใช้เป็น size marker 1.เห็ดนางฟ้าภูฐาน(*Pleurotus butan*) 2.เห็ดนางฟ้า(*P. sajor-cajou*) 3.เห็ดนางรม(*P. ostreatus*) 4.เห็ดเป๋าฮื้อ(*P. cystidiosus* (Cream)) 5.เห็ดเป๋าฮื้อดำ(*P. cystidiosus* (Black)) 6.เห็ดนางรมทอง(*P. citrinopileatus*) 7.เห็ดนางนวล(*P. flabellatus*) 8.เห็ดขอนขาว(*Lentinus squarrosulus*) และ 9.เห็ดหูหนู(*Auricularia polytricha*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 15 ขนาดของชิ้นส่วน DNA บริเวณ ITS ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และ *Alu*I โดยลำดับของแต่ละช่องเป็นดังนี้ ช่องที่ M คือ 100 bp Molecular Ruler ซึ่งใช้เป็น size marker 1.เห็ดนางฟ้าภูฐาน(*Pleurotus butan*) 2.เห็ดนางฟ้า(*P. sajor-cajou*) 3.เห็ดนางรม(*P. ostreatus*) 4.เห็ดเป๋าฮื้อ(*P. cystidiosus* (Cream)) 5.เห็ดเป๋าฮื้อดำ(*P. cystidiosus* (Black)) 6.เห็ดนางรมทอง(*P. citrinopileatus*) 7.เห็ดนางนวล(*P. flabellatus*) 8.เห็ดขอนขาว(*Lentinus squarrosulus*) และ 9.เห็ดหูหนู(*Auricularia polytricha*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองพบว่าบริเวณ ITS ของเห็ดสกุล *Pleurotus* ทั้ง 7 ชนิดมีขนาดประมาณ 600 bp ซึ่งขนาดดังกล่าวมีความใกล้เคียงกับขนาดของบริเวณ ITS ของเห็ดชนิดอื่นเช่น *Pisolithus* (John, 1999) เนื่องจากเพียงแค่ขนาดของบริเวณ ITS ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ยังไม่สามารถแสดงความแตกต่างของเห็ดแต่ละสายพันธุ์ได้อย่างชัดเจน ดังนั้นเราจึงนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RFLP โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณดังกล่าว โดยเริ่มจากการใช้เอนไซม์ *Eco*RI พบว่ารูปแบบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ *Eco*RI นั้นมีขนาดใกล้เคียงกันและรูปแบบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเห็ดแต่ละชนิดก็มีความคล้ายคลึงกัน ซึ่งเป็นไปได้ว่าตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *Eco*RI อาจจะอยู่ในบริเวณ 5.8S rDNA (ภาพที่ 8) ซึ่งมีลำดับเบสที่ถูกอนุรักษ์ไว้ เนื่องจากผล RFLP ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI นั้นยังไม่สามารถแสดงความแตกต่างของเห็ดแต่ละชนิดได้ชัดเจนนักดังนั้นเราซึ่งใช้เอนไซม์อีกชนิดคือ *Alu*I ทดลองตัดบริเวณ ITS พบว่ารูปแบบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *Alu*I นั้นสามารถจำแนกเห็ดสกุล *Plurotus* ได้ 2 กลุ่มคือ กลุ่มของเห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรม เห็ดนางรมทอง และกลุ่มของเห็ดเป๋าฮื้อ เห็ดเป๋าฮื้อดำ และเห็ดนางนวล แต่จากรูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเห็ดนางรมทองที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ *Sau*3A นั้นจะแตกต่างจากรูปแบบของกลุ่มเห็ดนางฟ้า เห็ดนางฟ้าภูฐาน และเห็ดนางรม ทำให้เราต้องศึกษาเพิ่มเติมด้วยเทคนิค RFLP ที่ตัดด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดพร้อมกันคือ *Alu*I และ *Sau*3A *Sau*3A และ *Eco*RI *Alu*I และ *Eco*RI พบว่าสามารถจำแนกรูปแบบของการตัดด้วยเอนไซม์ออกเป็น 4 รูปแบบ คือ 1.)กลุ่มเห็ดนางรม เห็ดนางฟ้า และเห็ดนางฟ้าภูฐาน 2.)เห็ดเป๋าฮื้อ และเห็ดเป๋าฮื้อดำ 3.)เห็ดนางรมทอง และ 4.)เห็ดนางนวล ดังนั้นจึงคาดได้ว่า เห็ดในสกุล *Pleurotus* ทั้ง 7 ชนิดที่นำมาทดสอบสามารถถูกแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มตามรูปแบบที่ได้จากการทดลอง RFLP ซึ่งความผันแปรของสารพันธุกรรมในบริเวณ ITS ของเห็ดทั้ง 7 ชนิดนั้นเป็นไปในแนวทางเดียวกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคาดได้ว่าบริเวณ ITS น่าจะใช้เป็นบริเวณบ่งชี้ถึงความแตกต่างทางพันธุกรรมในเห็ดชนิดอื่นได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยทั่วไปสารพันธุกรรมจะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงตามการเจริญ และสภาพแวดล้อม ซึ่งแตกต่างจากลักษณะทางสัญฐานวิทยาที่อาจจะเปลี่ยนแปลงไปตามปัจจัยต่างๆได้ ดังนั้นการศึกษาถึงความแตกต่างทางพันธุกรรม น่าจะมีความถูกต้องมากกว่าการศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากการศึกษาโดยวิธี RFLP เป็นการศึกษาการหาความแตกต่างของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะซึ่ง เป็นการตรวจหาลำดับเบสของสารพันธุกรรมเฉพาะที่บริเวณตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะนั้นๆ ดังนั้นจึงสามารถจัดจำแนกความแตกต่างของสายพันธุกรรมได้รวดเร็วและไม่ยุ่งยาก แต่การใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะนั้นยังไม่สามารถบอกลำดับเบสทั้งหมดได้ และไม่สามารถตรวจสอบความผันแปรของสารพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตที่มีวิวัฒนาการใกล้กันมากๆได้ ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจสอบ จึงควรศึกษาโดยหาลำดับเบสทั้งหมดในสารพันธุกรรม ซึ่งจะให้ความละเอียดมากกว่าในการเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ด 7 ชนิดในสกุล *Pleurotus* ที่ศึกษามีดังต่อไปนี้

เห็ดภูฐาน

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Pleurotus butan*

ชื่อสามัญ (ไทย) เห็ดภูฐาน / เห็ดนางรมภูฐาน / เห็ดนางฟ้าภูฐาน

(อังกฤษ) Bhutan Oyster Mushroom

ลักษณะประจำพันธุ์

ดอกออกเป็นกลุ่มตั้งแต่ 3 – 5 ดอก หรือดอกเดี่ยว สีขาวนวลหรือสีน้ำตาลเทา ในสภาพแวดล้อมที่มีอากาศเย็น อุณหภูมิประมาณ 25 – 27 องศาเซลเซียส ดอกเห็ดจะมีสีเทาดำหรือดำ ดอกมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 – 8 เซนติเมตร น้ำหนักดีพอสมควร เกิดดอกง่าย

ลักษณะการเจริญเติบโต

ระยะเส้นใย เส้นใยเจริญได้ดีบนอาหาร พีดีเอ มีสีขาว และเต็มจานแก้วเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ในเวลาประมาณ 8 – 9 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ระยะหัวเชื้อ เส้นใยเจริญเต็มเมล็ดข้าวฟ่างนึ่งฆ่าเชื้อ 170 กรัม (น้ำหนักเปียก) ในเวลาประมาณ 11 – 13 วันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ระยะบ่มเชื้อ เส้นใยเจริญเต็มอาหารผสมขี้เลื่อย (1,000กรัม) ในในเวลาประมาณ 30 – 40 วัน ที่อุณหภูมิ 30 – 33 องศาเซลเซียส

ระยะออกดอก เห็ดออกดอกเก็บได้นาน 2 – 3 เดือน ที่อุณหภูมิ 25 – 32 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75 – 85 %

เห็ดนางฟ้า

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Pleurotus sajor-caju*

ชื่อสามัญ (ไทย) เห็ดนางฟ้า

(อังกฤษ) Phoenix Oyster Mushroom

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะประจำพันธุ์

ลักษณะดอกเห็ด เกิดเป็นกลุ่มจำนวน 2 – 4 ดอก หรือดอกเดี่ยว สีน้ำตาลดำอมเทา ดอกมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 – 8 เซนติเมตร

ลักษณะการเจริญเติบโต

ระยะเส้นใย เส้นใยเจริญได้ดีบนอาหาร พีดีเอ และเต็มจานแก้วเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ในเวลาประมาณ 9 – 10 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ระยะหัวเชื้อ เส้นใยเจริญเต็มเมล็ดข้าวฟ่างนึ่งฆ่าเชื้อ 170 กรัม (น้ำหนักเปียก) ในเวลาประมาณ 11 – 13 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ระยะบ่มเชื้อ เส้นใยเจริญเต็มอาหารผสมขี้เลื่อย (1,000 กรัม) ในเวลาประมาณ 30 – 40 วัน ที่อุณหภูมิ 30 – 33 องศาเซลเซียส

ระยะออกดอก เห็ดออกดอกเห็ดได้นาน 2 – 3 เดือน ที่อุณหภูมิ 20 – 30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75 – 85 %

เห็ดนางรม

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Pleurotus ostreatus*

ชื่อสามัญ (ไทย) เห็ดนางรมขาว/เห็ดนางรม

(อังกฤษ) Oyster Mushroom

ลักษณะประจำพันธุ์

ดอกเห็ด เกิดเป็นกลุ่มจำนวน 4 – 6 ดอก มีสีขาว ดอกค่อนข้างใหญ่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 – 8 เซนติเมตร และน้ำหนักดี เกิดดอกง่าย

ลักษณะการเจริญเติบโต

ระยะเส้นใย เส้นใยเจริญได้ดีบนอาหาร ดีดีเอ และเต็มจานแก้วเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ในเวลาประมาณ 8 – 10 วันที่อุณหภูมิ 25องศาเซลเซียส

ระยะหัวเชื้อ เส้นใยเจริญเต็มเมล็ดข้าวฟ่างนึ่งฆ่าเชื้อ 170 กรัม (น้ำหนักเปียก)ในเวลาประมาณ 11 – 13 วัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ระยะบ่มเชื้อ เส้นใยเจริญเต็มอาหารผสมขี้เลื่อย (1,000 กรัม) ในเวลาประมาณ 30 – 40 วัน ที่อุณหภูมิ 30 – 35 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระยะออกดอก เห็ดออกดอกเก็บได้นาน 2 – 3 เดือนที่อุณหภูมิ 20 – 30 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 75 – 85 %

เห็ดเป๋าฮื้อ

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Pleurotus cystidiosus*
ชื่อสามัญ (ไทย) เห็ดเป๋าฮื้อ / เห็ดโข่งทะเล
(อังกฤษ) Abalone Mushroom

ลักษณะประจำพันธุ์

หมวกเห็ดรูปพัด สีน้ำตาลดำ หรือสีเทาดำ เส้นผ่านศูนย์กลาง 4 – 12 เซนติเมตร เนื้อหนา กลางหมวกเว้าตื้น มีขนกำมะหยี่สีน้ำตาลดำบางๆซึ่งจะหลุดหายไปเมื่อดอกแก่ คงเหลืออยู่บ้างบริเวณกลางหมวกโดยรวมกันเหมือนเกล็ดเล็กๆขอบเรียบ สีน้ำตาลดำ เนื้อเห็ดสดสีขาว เปราะหักง่าย แต่จะเหนียวเมื่อดอกแก่ ครีบสีขาวนวลขนานกันตามยาว มีหลายขนาดและบางอันเชื่อมติดกันบางตอน ก้านสีเทาดำยาว 4 – 6 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 2 – 3 เซนติเมตร ไม่อยู่กึ่งกลางดอกด้านหนึ่งอยู่ติดขอบหมวกทำให้ดูเหมือนเป็นด้ามพัด โคนก้านสอบเล็ก มีขนละเอียดสีเทาอมน้ำตาลคล้ายกำมะหยี่บางๆ สปอร์รูปรี สีขาวขนาด 4.5 x 10 – 13 ไมโครเมตร ผิวเรียบ ผนังบางมีเซลล์หมัน 2 ชนิด ชนิดสีน้ำตาล รูปกระบอง ขนาด 6 – 10 x 25 – 35 ไมโครเมตรผิวเรียบ ผนังบาง อยู่บนผิวและขอบครีบ ในสภาพอากาศชื้นและในอาหารวุ้นเห็ดชนิดนี้จะสร้างสปอร์อีกชนิดหนึ่งมีสีน้ำตาลดำ ขนาด 5 – 6 x 14 – 15 ไมโครเมตร ผิวเรียบ ผนังบางเกิดเป็นกลุ่มมองดูคล้ายหยดน้ำหมึกบนปลายเส้นใยที่รวมตัวกันเป็นมัดๆซึ่งเรียกว่า คอรีเมีย (coremia)

เห็ดเป๋าฮื้อเป็นเห็ดที่นำเข้ามาจากประเทศไต้หวันเพื่อเพาะเลี้ยงเป็นการค้า ขึ้นเป็นดอกเดี่ยวโคนติดกัน 3 – 5 ดอก กินได้ เมื่อนำมาหุงต้มเนื้อเห็ดจะยืดหยุ่น และสีคล้ายหอยโข่งทะเล

เห็ดนางรมทอง

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Pleurotus citrinopileatus*
ชื่อสามัญ (ไทย)เห็ดนางรมทอง
(อังกฤษ)ไม่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะประจำพันธุ์

เห็ดนางรมทอง มีหลายสายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์สีขาว และสีทอง เป็นต้น ดอกเห็ดมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 – 6 เซนติเมตรหรือมากกว่า ลักษณะโค้งลงกลางลึกคล้ายร่ม มีตั้งแต่สีขาว สีขาวปนเทา สีน้ำตาลอ่อนอมส้มและสีเหลืองทอง ใต้ดอกเห็ดมีครีบสีเดียวกันกับดอกเห็ดจะจางกว่าเล็กน้อย ครีบจะเรียงตัวติดกับก้านดอกเห็ดและขยายลงทางด้านล่างชัดเจน ครีบอาจเชื่อมติดกันจนดูคล้ายร่างแห ก้านดอกเห็ดยาว 6 – 8 เซนติเมตร สีขาวหรือเหลืองอ่อน ไม่กลวง ขณะดอกเห็ดสดจะอ่อนนุ่ม สีขาว เมื่อแก่จะเหนียว สปอร์สีขาวหรือสีเทา รูปร่างยาวรี ผิวเรียบ ขนาด 7 – 9 x 3 – 5 ไมครอน เกิดเป็นกลุ่มๆตามท่อนไม้ผุพัง นิยมรับประทานกันมาก และมีการเพาะเป็นการค้า

เห็ดนางนวล

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Pleurotus flabellatus*

ชื่อสามัญ (ไทย) เห็ดนางนวล

(อังกฤษ) Pink Oyster Mushroom

ลักษณะประจำพันธุ์

การแบ่งรูปร่างโดยทั่วไป และสิ่งที่เห็นได้คล้ายกับเห็ดนางรม ตรงที่ดอกเห็ดมีสีชมพู สีอาจมีการเปลี่ยนไปเป็น สีชมพูทึบ สีชมพูอบเชย และการเปลี่ยนเป็นสีเหลืองฟาง ในสภาพธรรมชาติ หมวกดอกด้านล่างมีครีบหมวกสีชมพูยาวขนาน ลงไปเชื่อมกับก้านดอก รอบหมวกดอกจะมีก้านหมวกไม่อยู่กึ่งกลาง และเว้าลึกลงไป หมวกเห็ดอาจจะโย้ไปข้างใดข้างหนึ่ง สปอร์สีชมพูถึงสีเทาแดง ขนาด 6 – 10 x 4 – 5 ไมครอน เมื่อดอกอ่อนสีจะออกชมพูส้ม เมื่อโตขึ้น จนโตเต็มวัย สีของดอกก็จะซีดลง ขึ้นอยู่กับสภาพของสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอุณหภูมิ อุณหภูมิต่ำสีจะเข้มขึ้น แต่ถ้าต่ำเกินไปก็จะไม่เกิดดอก

เห็ดขอนขาว

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Lentinus squarrosulus* Mont.

ชื่อสามัญ (ไทย)เห็ดขอนขาว

(อังกฤษ)ไม่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะประจำพันธุ์

หมวกเห็ดรูปกรวยตื้น สีขาว เส้นผ่านศูนย์กลาง 2-8 ซม. ขอบงอลงเล็กน้อย ผิวมีเกล็ดสี่เหลี่ยมเล็กๆสีขาวนวล น้ำตาลหม่น หรือเทา เรียงกระจายจากกลางหมวกออกไปยังขอบ เนื้อบางและเหนียวเล็กน้อยเมื่อเป็นเห็ดอ่อน ครีบสีขาว แคบและเรียงชิดกัน ยาวขนานกับกรวยลงไปยึดติดกับก้าน ก้านรูปทรงกระบอก สีขาว ยาว 2-6 ซม. เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1 ซม. โคนก้านเรียว บนก้านมีเกล็ดเช่นเดียวกับหมวก เนื้อสีขาว แน่นและเหนียว สปอร์รูปทรงกระบอก สีขาวนวล ขนาด 2-2.5 × 5-8 ไมโครเมตร ผิวเรียบ ผนังบาง

เห็ดขอนขาวมีเขตกระจายพันธุ์ในประเทศไทยทั่วทุกภาค ขึ้นเป็นดอกเดี่ยวหรือเป็นกลุ่มโคนติดกัน 3-6 ดอก กินได้ เมื่อแก่แห้งแล้วเหนียว หากขึ้นบนขอนไม้จะทำให้แก่นเกิดการผุสีขาว ในต่างประเทศพบที่ทวีปเอเชียและออสเตรเลีย

เห็ดชนิดนี้คล้ายเห็ดลม (*Lentinus polychorus* Lév.) แตกต่างกันที่ครีบไม่ปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดงหรือน้ำตาลอมม่วงเหมือนเห็ดลม

เห็ดหูหนู

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Auricularia polytricha*

ชื่อสามัญ (ไทย) เห็ดหูหนู

(อังกฤษ) (Jew's) Ear Mushroom

ลักษณะประจำพันธุ์

ดอกเห็ดคล้ายแผ่นวุ้น สีน้ำตาลอมม่วง รูปถ้วย กว้าง 2 – 8 เซนติเมตร ยาว 2 – 10 เซนติเมตร หนา 1 – 2 มิลลิเมตร ผิวด้านบนเรียบ ด้านล่างมีขนหนาแน่นสีขาวหม่น เทา หรือน้ำตาลอ่อน โคนดอกมีรอยจีบและยึดติด กับขอนไม้

สปอร์ รูปไส้กรอก ใสไม่มีสี ขนาด 5 – 6 x 12 – 15 ไมโครเมตร

ก้านสปอร์ รูปทรงกระบอก ขนาด 4 – 5 x 50 – 60 ไมโครเมตร

เห็ดชนิดนี้มีเขตการกระจายพันธุ์ในประเทศไทยทั่วทุกภาค ขึ้นเป็นกลุ่มโคนชิด ติดกันบนขอนไม้ในผ่าดิบกินได้ ปัจจุบันเพาะเลี้ยงเป็นการค้าโดยนำเชื้อเห็ดมาจากต่างประเทศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

1. เกษม สร้อยทอง. เห็ดและราขนาดใหญ่ในประเทศไทย. ภาควิชาเทคโนฯการจัดการศตรูพืช คณะเทคโนฯการเกษตร สถาบันเทคโนฯพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. โรงพิมพ์ศิริธรรม ออฟเซ็ท. อุบลราชธานี. 2537.

2. ทรงศักดิ์ เพ็ชรมิตร. เอนไซม์ Thermostable DNA polymerase. ทฤษฎีการปะยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR Technology (วัชรี อัตถทิพพหลกุล). พิมพ์ครั้งแรก. หน้า 1–12. โรงพิมพ์เรือนแก้ว. กรุงเทพฯ. 2536.

3. เทพบุตร ดีรักษาพร ประพิณศรา สอนเล็ก และแสงชัย ศรีประโคน. การศึกษารูปแบบไอโซไซม์เพื่อทดสอบความเป็น พ่อ แม่ ลูก ระหว่างลูกผสมของเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว. โครงงานพิเศษระดับปริญญาตรี. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 2540.

4. บุญพฤกษ์ จาฏามระ และคณะ. เห็ดกินได้และเห็ดมีพิษในประเทศไทย ฉบับราชบัณฑิตยสถาน. สำนักพิมพ์อมรินทร์. กรุงเทพฯ. 2539.

5. พรทิพย์ พงศ์พรเชษฐา. การพิสูจน์ความเป็นพ่อแม่ลูกในเห็ดลูกผสมที่เกิดจากการรวมโปรโตพลาสต์ ระหว่างเห็ดหอมและเห็ดหูหนู. วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 2540.

6. วัชรี อัตถทิพพหลคุณ. วิวัฒนาการของ PCR Technology, การออกแบบและการปรับหาสภาวะพอเหมาะของ PCR. ทฤษฎีการปะยุกต์ใช้ประโยชน์ PCR Technology (วัชรี อัตถทิพพหลกุล). พิมพ์ครั้งแรก. หน้า 1–12. โรงพิมพ์เรือนแก้ว. กรุงเทพฯ. 2536.

7. ศิริพร สิทธิประณีต. พันธุวิศวกรรม ปฏิบัติการเบื้องต้น. ภาควิชาชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ. 2531.

8. สุรินทร์ ปียะโชคณากุล. การทำแผนที่ยีนโดยเทคนิค RFLP. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 2536.

9. Balardin, R. S., Smith, J. J. and Kelley J. D. 1999. Ribosomal DNA polymorphism in *Colletorichum lindemuthianum*. Mycologist Research. 103 (7), 841 – 848.

10. Cairney, J. W. G., Chambers, S. M. and Anderson, I. C. 1999. *Pisolithus* systematics – molecular methods provide fresh insights. Mycorrhiza Research. 13, 31 – 35.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

11. Huffman, J. L., Molina, F. I. and Jong, S.-C. 1992. Authentication of ATCC Strains in the *Saccharomyces cerevisiae* Complex by PCR Fingerprinting. Experimental Mycology. 16, 316 – 319.

12. Skouboe P., Frisvad J. C., Taylor J. W., Lauritsen D., Boysen M. and Rossen L. 1999. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the ITS region of terverticillate *Penicillium* sp. Mycologist Research. 103 (7), 873 – 881.

13. Valente, P., Gouveia, F. C., Lemos, G. A., Pimentel D., Mendonca – Hagler L. C. and Hagler A. N. 1997. PCR – amplified ITS length variation within the yeast genus *Metschnikowia*. Genetic Applied Microbiologist. 43, 179 – 181.

14. Watling, R. 1973. Identification of the Larger Fungi. Hulton Group Keys. Hulton Educational Publications Ltd. Amersham.

15. White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and Direct Sequencing. PCR Protocols: A guide to methods and application. Academic Press.

16. Witthuhn, R. C., Wingfield, B. D., Wingfield, M. J. and Harrington T. C. 1999. PCR – based identification and phylogeny of species of *Ceratocystis sensu stricto*. Mycologist Research. 103 (6), 743 – 749.

17. Yan – Chun Su, Hu Huang, Xiao – Yong Leu and Ru – Yang Zhena. 1999. Systematic relationship of several controversial *Cunninghamella* taxa inferred from sequence comparisons of ITS2 of rDNA. Mycologist Research.103, 805 – 810.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้