

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาความผันแปรของลักษณะทางพันธุกรรมของเห็ดตีนแรด (*Tricholoma crassum*) ด้วย
เทคนิค RAPD-PCR



เลขหมู่.....
เลขทะเบียน..... 61829
วัน,เดือน,ปี..... 21 ก.ค. 2549

b. 11603702
i.

โครงการพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษานั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Studies on Genetic Variation of *Tricholoma crassum* by RAPD-PCR technique



A 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

Academic Year 2004

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง การศึกษาความผันแปรของลักษณะทางพันธุกรรมของเห็ดตีนแรด
(*Tricholoma crassum*) ด้วยเทคนิค RAPD-PCR

นักศึกษา นางสาวเชาวนี มีหวัง
นายภควดี สีม่วงคำ
นางสาววันพร กันธวิวัฒน์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์มาลินี ตันติยาภรณ์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร
ลาดกระบัง อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศา
สตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	 (ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พุกภัย)
กรรมการ	 (รศ.มาลินี ตันติยาภรณ์)
กรรมการ	 (รศ.สุขใจ ชูจันทร์)
กรรมการ	 (ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์)

.....
(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)
หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงการพิเศษเรื่อง การศึกษาความผันแปรของลักษณะพันธุกรรมของเห็ดตีนแรด (*Tricholoma crassum*) ด้วยเทคนิค RAPD-PCR

นักศึกษา นางสาวเชาวนี มีหวัง
 นายภควุฒิ สีม่วงคำ
 นางสาววันพร กันธวิวัฒน์
 ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
 สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
 อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ มาลีณี ตันติยาภรณ์

บทคัดย่อ

ในการศึกษาหาความผันแปรของลักษณะพันธุกรรมของเห็ดตีนแรดใน 4 จังหวัด คือ จังหวัด กรุงเทพฯ(ศูนย์เพาะเห็ดบ้านอรุณญิก) จังหวัดขอนแก่น จังหวัดมหาสารคาม และจังหวัดปทุมธานี โดยทำการเพาะเลี้ยงเส้นใยในอาหารเหลว PDYB ในสภาวะที่เหมาะสมที่ 25 องศาเซลเซียส พีเอช 6 แล้วนำตัวอย่างเห็ดตีนแรดทั้งหมดทุกจังหวัดมาวิเคราะห์ความผันแปรโดยใช้เทคนิค RAPD-PCR จากนั้นนำผลจากการทำ RAPD-PCR ที่ได้นำมาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์วิเคราะห์ผล จากการทดลองพบว่าไพรเมอร์ OPA01 ไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเห็ดตีนแรดทุกตัวอย่าง ขณะที่ไพรเมอร์ OPA02 สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในตัวอย่างเห็ดตีนแรดของจังหวัดขอนแก่น จังหวัดมหาสารคามและจังหวัดปทุมธานี ไพรเมอร์ OPA03 และ OPA04 เท่านั้นที่เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ในทุกตัวอย่างเห็ดตีนแรด และผลจากการทำ RAPD-PCR ทำให้ทราบว่า ตัวอย่างเห็ดตีนแรดจากกรุงเทพฯ(ศูนย์เพาะเห็ดบ้านอรุณญิก) มีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างกว่า ตัวอย่างเห็ดตีนแรดใน 3 จังหวัด คือ จังหวัดขอนแก่น จังหวัดมหาสารคามและจังหวัดปทุมธานี

Special Project Title Studies on Genetic Variation of *Tricholoma crassum* by RAPD - PCR technique

Name Miss Chowwancee Meewang
Mr. Phakhawoot Seemungkhom
Miss Wonphorn Kandhavivorn

Department Applied Biology

Program Biotechnology

Academic Year 2004

Special Project Adviser Assoc.Prof. Malinee Tantiyaporn

ABSTRACT

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

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รศ.มาลินี ดันติยาภรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษที่กรุณาให้คำปรึกษา ระหว่างการศึกษาค้นคว้าวิจัย และการเขียนโครงการพิเศษฉบับนี้ รวมถึงการตรวจทานแก้ไข โครงการพิเศษนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พุกภัย ที่คอยแนะนำให้คำปรึกษาที่เกี่ยวกับวิธีการในการ ปฏิบัติในโครงการพิเศษครั้งนี้ รศ.สุขใจ ชูจันทร์ และผศ.อารี ฤทธิบุรณ์ ที่เป็นคณะกรรมการใน โครงการพิเศษ และช่วยในการตรวจทานแก้ไขโครงการพิเศษให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณศูนย์เพาะเห็ดบ้านอรุณฤกษ์ ที่กรุณาให้เห็ดเชื้อเห็ดดินแดงเพื่อมาศึกษาในโครง งานพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ในการทดลอง

ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ด้วยความเคารพยิ่ง และขอขอบคุณเพื่อนๆ และทุกท่านที่มีได้ กล่าวนามมา ณ ที่นี้ด้วย ที่ให้การสนับสนุนและกำลังใจในการศึกษามาตลอด รวมถึงมีส่วนช่วยให้ โครงการพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี

นางสาวเชาวนี มีหวัง

นายกฤตติ สีม่วงคำ

นางสาววันพร กันธวิวัฒน์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาของโครงการพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ	2
1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีดำเนินงาน	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	4
2.1 ลักษณะทางชีววิทยาของเห็ดตีนแรด	4
2.2 หลักการการสกัดดีเอ็นเอ	6
2.3 เทคนิค RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase chain reaction)	7
2.4 หลักการของอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส	11
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	18
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	20
3.1 ขั้นตอนการดำเนินงาน	20
3.2 แหล่งที่มาของเส้นใยเห็ดตีนแรดที่ใช้ในการทดลอง	21
3.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	21
3.4 วิธีการทดลอง	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลองและการอภิปรายผล	26
4.1 การสกัดดีเอ็นเอ	26
4.2 ความหลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอหลังจากการทำRAPD-PCR	27
4.3 การวิเคราะห์ผล RAPD-PCR	30
บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ	35
เอกสารอ้างอิง	36
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	38
ภาคผนวก ข	39
ภาคผนวก ค	40

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า	
2.1	แสดงลำดับเบสและน้ำหนักโมเลกุลของไพรเมอร์ที่ใช้	10
2.2	แสดงปัญหาที่อาจเกิดขึ้นในขณะทำRAPD-PCR	12
2.3	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของอะกาโรสเจลกับขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิด	15
2.4	แสดงส่วนประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้	16
4.1	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างไพรเมอร์ และผลที่ได้จากการทำ RAPD-PCR ในเห็ดดิน แร่จังหวัดต่างๆ	31
4.2	แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD – PCR โดยใช้ไพรเมอร์ OPA02 - OPA04 ในการวิเคราะห์ผล โดยให้สัญลักษณ์แทนการพบแถบดีเอ็นเอ และสัญลักษณ์ – แทนการไม่พบแถบดีเอ็นเอ	33
ก	ลำดับเบสไพรเมอร์ที่นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเห็ดดินแร่	39

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	แสดงการเกิดปฏิกิริยาและรูปแบบที่ได้จากการทำ RAPD-PCR	9
4.1	แสดงแถบ genomic DNA ของเส้นใยเห็ดดินแรดจังหวัดต่าง ๆ ดังนี้	26
4.2	แสดงแถบดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มปริมาณแบบสุ่มของเห็ดดินแรดใน จังหวัดต่างๆ โดยใช้ไพรเมอร์ OPA01	27
4.3	แสดงแถบดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มปริมาณแบบสุ่มของเห็ดดินแรดใน จังหวัดต่างๆ โดยใช้ไพรเมอร์ OPA02	28
4.4	แสดงแถบดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มปริมาณแบบสุ่มของเห็ดดินแรดใน จังหวัดต่างๆ โดยใช้ไพรเมอร์ OPA03	29
4.5	แสดงแถบดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มปริมาณแบบสุ่มของเห็ดดินแรดใน จังหวัดต่างๆ โดยใช้ไพรเมอร์ OPA04	30
4.6	แสดงรูปแบบที่ได้จากการทำ RAPD-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ OPA02-OPA04 ในตัวอย่างเห็ดดินแรดจังหวัดต่างๆ	32

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงการพิเศษ

เห็ดดินแรดมีลักษณะดอกขนาดใหญ่สีขาวหรือสีขาวปนเทาเป็นเห็ดรับประทานได้ มีคุณค่าทางโภชนาการสูง คุณค่าทางโภชนาการของเห็ดดินแรดประกอบไปด้วยโปรตีน 18.58 กรัม ไขมัน 0.287 กรัม คาร์โบไฮเดรต 10.02 กรัม แคลเซียม 2.71 กรัม เหล็ก 3.35 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักเห็ด 100 กรัม (กรมส่งเสริมการเกษตร. 2538) รสชาติดี มีสารช่วยป้องกันโรคมะเร็ง (ศิริวรรณ สุทธิจิตต์และไมตรีสุทธิจิต. 2538) สามารถเก็บได้นาน ในรูปเห็ดสามารถเก็บไว้ในตู้เย็นนาน 1 สัปดาห์โดยไม่เน่าเสีย เนื่องจากมีคุณสมบัติไม่ย่อยสลายตัวเอง (ดิพร้อมไชยวงศ์เกียรติ. 2529) ในรูปของเห็ดแห้งยังคงมีรสชาติและคุณภาพที่เปลี่ยนแปลงไปไม่มากนัก (ปัญญา โพธิ์จิตรพันธ์และกิตติพงษ์ ศิริวานิชกุล. 2538) เห็ดดินแรดสามารถเจริญเติบโตได้ดีทุกภูมิภาคของประเทศไทย ถ้าเปรียบเทียบกับรสชาติกับเห็ดที่ขึ้นตามธรรมชาติแล้วจะเป็นรองเฉพาะเห็ดโคน คุณภาพจะใกล้เคียงกับเห็ดเผาะ เห็ดมันปูและเห็ดขาไก่ เมื่อนำมาประกอบอาหารมีกลิ่นหอม รสหวาน เนื้อกรอบไม่เหนียว ในประเทศไทยมีชื่อเรียกแตกต่างกันออกไปในแต่ละท้องถิ่น โดยภาคเหนือจะเรียกว่า”เห็ดจั่น” ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเรียกว่า”เห็ดดินแรด” ส่วนภาคกลางเรียกว่า”เห็ดดับเต้าขาว”(ปัญญาและกิตติพงษ์. 2538) และมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Tricholoma crassum* เป็นเห็ดในวงศ์ Tricholomataceae เช่นเดียวกับเห็ดนางรมและเห็ดเป๋าฮื้อ จากคุณสมบัติที่ดีหลายประการเห็ดดินแรดจึงเป็นเห็ดที่น่าสนใจและนำมาพัฒนาเป็นเห็ดเศรษฐกิจที่สำคัญในอนาคตได้

ในปัจจุบันเห็ดดินแรดเริ่มเป็นที่ต้องการของตลาด ซึ่งโดยปกติธรรมชาติของเห็ดดินแรดจะออกดอกในช่วงฤดูฝนเท่านั้น แต่เนื่องจากเทคโนโลยีมีความเจริญก้าวหน้ามากยิ่งขึ้น จึงสามารถนำเชื้อเห็ดมาเพาะเป็นการค้าได้ตลอดทั้งปี มีฟาร์มหลายแห่งที่ทำการเพาะเห็ดชนิดนี้ โดยผลิตก้อนเชื้อและดอกเห็ดจำหน่าย เกษตรดลองส่งออกป้อนองได้รับคามนิยมนามากและได้รับการเสนอราคาที่สูง (เกษม สร้อยทอง. 2529) จากการรวมกลุ่มกันของเกษตรกรจังหวัดสุพรรณบุรีในต้นปี 2002 เพื่อหารายได้เสริมโดยเฉพาะเห็ดดินแรดร่วมกับการปลูกผักกินใบเพื่อลดต้นทุนการผลิตและไม่ต้องใช้สารเคมี (ชาญยุทธ์ ภาณุทัต และคณะ. 2543) ทำให้เห็ดดินแรดเป็นที่รู้จักกันมากขึ้นซึ่งราคาเห็ดประมาณ 50 บาทต่อกิโลกรัม แต่เนื่องจากขนาดของเห็ดมีขนาดใหญ่มาก ทำให้ผู้บริโภคที่ไม่รู้จักเห็ดชนิดนี้มาก่อนไม่กล้ารับประทาน ประกอบกับมีข้อมูลในเรื่องการผลิตและการปรับปรุง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธุ์ไม่มากพอ รวมถึงขาดการประชาสัมพันธ์ที่ดี จึงทำให้ตลาดผู้บริโภครู้จักเห็ดชนิดนี้ไม่เท่ากับ เห็ดฟาง เห็ดนางฟ้า เห็ดหอม เห็ดขอนขาว เห็ดหลินจือ และเห็ดชนิดอื่นๆในตลาดภายในประเทศ

ในการปรับปรุงสายพันธุ์เห็ด ลักษณะที่ดีของสายพันธุ์ที่ต้องการจะมี 4 ประการหลัก ได้แก่ ผลผลิตดอกที่สูงเมื่อใช้วัสดุเพาะที่เหมือนกันและเท่ากัน การเจริญของเส้นใยเติบโตได้เร็วและปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปในขณะที่เพาะอยู่ การออกดอกเร็วและพร้อมกันเพื่อลดค่าใช้จ่ายในการดูแลและให้ผลตอบแทนที่ดีขึ้น ประการสุดท้ายคือ สันฐานวิทยา โดยเห็ดมีรูปร่าง ขนาด สี และรสชาติที่ตรงกับความต้องการของผู้บริโภค ลักษณะเหล่านี้จะเป็นลักษณะเฉพาะที่แตกต่างไปตามชนิดของเห็ด

ในประเทศไทย การจัดจำแนกเห็ดส่วนใหญ่ยังไม่เป็นมาตรฐานเดียวกันเพราะยังเป็นการตรวจสอบทางสันฐานวิทยาจึงมีความแตกต่างกันออกไป ทำให้ไม่ชัดเจน เพราะเหตุนี้ จึงได้มีการนำเอาเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์มาศึกษาความผันแปรของลักษณะทางพันธุกรรมเพื่อใช้ในการจัดจำแนกร่วมกับการตรวจสอบทางสันฐานวิทยา เทคนิคที่นำมาใช้และนิยมได้แก่ isoenzyme electrophoresis, RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP(Amplified fragment Length Polymorphism) และ RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)

ในงานวิจัยนี้ได้นำเทคนิคของRAPD-PCR ซึ่งเป็นเทคนิควิเคราะห์ความหลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวในการทำPCR ไพรเมอร์ที่ใช้คือ OPA01-OPA04 (Maki และคณะ, 2001) ซึ่งเป็นไพรเมอร์ที่ใช้ในการขยายบริเวณดีเอ็นเอแบบสุ่ม และเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่ยังไม่เคยใช้ในการศึกษาเห็ดดินแตรมาก่อน ซึ่งคาดว่าจะมีความจำเพาะในการขยายยีนในบริเวณที่เราต้องการมากกว่าเนื่องจากการใช้ไพรเมอร์เพียงชนิดเดียวในการขยายยีนบริเวณนั้น ดังนั้นการใช้เทคนิคนี้จึงสามารถนำมาช่วยในการศึกษาความผันแปรของลักษณะพันธุกรรมร่วมกับเทคนิคอื่นๆได้

1.2 วัตถุประสงค์

ศึกษาความผันแปรของลักษณะพันธุกรรมของเห็ดดินแตร ด้วยเทคนิค RAPD-PCR โดยใช้ไพรเมอร์OPA01-OPA04

1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

ศึกษาลักษณะความผันแปรของลักษณะทางพันธุกรรมในเห็ดดินแตรที่เก็บรวบรวมจากจังหวัดต่างๆ ด้วยเทคนิค RAPD-PCR บนตัวกลางเจลอะกาโรส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน

1.4.1 การเลี้ยงเส้นใยบนอาหาร เพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดดินแรดในอาหาร PDA 7 วัน ที่ 30 องศาเซลเซียส และถ่ายเส้นใยมาเลี้ยงในอาหารเหลว PDYB ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

1.4.2 การสกัดดีเอ็นเอ

ทำการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยวิธีของ Cenis ในปี 1992 เก็บสารละลายที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้งาน ตรวจสอบคุณภาพและความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอด้วยการดูกลิ่นแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร จากนั้นนำมาตรวจสอบบนตัวกลางอะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 7 ด้วยเจลสแตร์เพื่อเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอกับ marker ขนาด 100 เบส (ดัดแปลงจาก Cenis, 1992)

1.4.3 ขั้นตอน RAPD-PCR reaction (Maki, 2001) นำดีเอ็นเอ ตัวอย่างมาทำปฏิกิริยาใน PCR mixture ทำปฏิกิริยาในเครื่องเตาเพิ่มขยายปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ 4 ชนิด คือ OPA01, OPA02, OPA03 และ OPA04 การเพิ่มขยายอินด้วยเทคนิค PCR 35 รอบ ทุกการทดลองจะต้องมีตัวควบคุมที่ไม่ได้ดีเอ็นเอตัวอย่างทุกครั้งเสมอ (Negative control) นำผลจากการทำ RAPD-PCR ตรวจสอบบนตัวกลางอะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 1.2 ด้วยเจลสแตร์ พิจารณแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏได้แสง อัลตราไวโอเลตและบันทึกภาพ

1.4.4 การวิเคราะห์ผล นำข้อมูลของ RAPD-PCR ทั้งหมดแปลงเป็นข้อมูล - และ + (- หมายถึงไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอและ + หมายถึงปรากฏแถบดีเอ็นเอ)

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถนำเทคนิค RAPD-PCR มาใช้ประโยชน์ในการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของเห็ดดินที่มีลักษณะพันธุกรรมใกล้เคียงกัน

2. ความหลากหลายของลักษณะทางพันธุกรรมในเห็ดดินแรดที่ได้จากเทคนิค RAPD-PCR ในการจัดจำแนกกลุ่มเห็ดดินแรดที่เก็บรวบรวมจากหลายๆแห่ง เพื่อประโยชน์ในการคัดเลือกและผสมพันธุ์

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการ

2.1 ลักษณะทางชีววิทยาของเห็ดตีนแรด

การจัดจำแนกเห็ดตีนแรด (Taxonomy)

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Tricholoma crassum* (Berk) Sacc.

ชื่อสามัญ : เห็ดตีนแรดขาว เห็ดจั้น เห็ดดับเต่าขาว

Class : Basidiomycetes

Subclass : Holobasidiomycetidae

Order : Agaricales

Family : Tricholomataceae

Genus : *Tricholoma*

Species : *crassum*

2.1.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เห็ดในสกุล *Tricholoma* อยู่ในเขตอบอุ่นเป็นส่วนใหญ่ มีเพียง 2-3 ชนิดเท่านั้นที่อยู่ในเขตร้อน และมีหลายชนิดที่นำมารับประทานได้ เช่น เขตยุโรป ได้แก่ *T. albobrunneum* และ *T. Flavovirens* อเมริกาใต้ ได้แก่ *T. Mutsukake* (วสันต์ เพชรรัตน์, 2522) ญี่ปุ่นและฮ่องกง ได้แก่ *T. mutsukake* และ *T. mongolicum* ส่วนในประเทศไทย ได้แก่ *T. eussum* (ปัญญา โพธิ์รัตน์ และ กิตติพงษ์ ศิริวานิชกุล, 2538) เห็ดตีนแรดเป็นเห็ดที่มีขนาดใหญ่ เจริญได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทยและในแต่ละภาคก็มีชื่อเรียกแตกต่างกันออกไป เช่น ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเรียกว่าเห็ดตีนแรด ภาคกลางเรียกเห็ดดับเต่าขาวหรือเห็ดจักษ์ ภาคเหนือเรียกว่าเห็ดจั้น ภาคใต้เรียกเห็ดหัวส้ม (ชาญยุทธ์ ภาณุทัตและคณะ, 2543) นอกจากนั้นยังพบว่ามีการเจริญเติบโตทางธรรมชาติสามารถนำมาเพาะเลี้ยงได้แต่มีขั้นตอนยุ่งยากกว่าเห็ดทั่วไป

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

สปอร์ (spore) เมื่อเห็ดดินแรดเจริญเต็มที่จะสร้างสปอร์ที่บริเวณครีบดอก สปอร์มีสีขาว มีลักษณะเป็นรูปไข่ ขนาด $5-5.6 \times 6.5-7.6$ ไมโครเมตร (ปัญญา โพธิ์จิตร์รัตน์.2538)

2.1.3 ลักษณะการเจริญเติบโต เห็ดดินแรดจัดเป็นเห็ดที่เจริญได้ดีบนพื้นดินที่มีอินทรีย์วัตถุหรือทั้งส่วนรากเอาไว้ในดินเมื่อต้นไม้เริ่มผุเห็ดดินแรดก็เจริญตามรากไม้หรือพื้นดินที่มีอินทรีย์วัตถุ หลังจากนั้นเมื่อความชื้นและสภาวะเหมาะสมเห็ดดินแรดจะเจริญและสร้างดอกเห็ดโผล่ขึ้นมาบนพื้นดินเป็นกลุ่มๆ สำหรับการเจริญของเส้นใย จากการศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดดินแรดในสภาพแวดล้อมต่างๆ โดยนุสรา เริงใหญ่ (2547) สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยและดอกเห็ดดินแรดคือ

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

2.1.3.2 ชนิดของอาหารฐาน เมื่อทดลองเลี้ยงในอาหารฐานสูตรต่างๆ พบว่าเส้นใยเจริญได้ดีและหนาแน่นมากในอาหาร PDA

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

2.1.3.4 จุลินทรีย์ชนิดอื่น พบว่าเชื้อยีสต์หลายชนิดมีอิทธิพลต่อการงอกของสปอร์ของเห็ดดินแรดบนอาหารฐาน ซึ่งสปอร์ของเห็ดดินแรดไม่สามารถงอกได้ถ้าหากไม่มีโคโคโนไมซิสของยีสต์เจริญร่วมอยู่ด้วย มียีสต์หลายชนิดที่กระตุ้นให้สปอร์ของเห็ดดินแรดงอก ได้แก่ *Endomycopsis sp.* , *Hasenula sp.* , *Kluveromyces sp.* และ *Saccharomyces cerevisiae* โดยเชื้อ *S. cerevisiae* จะกระตุ้นการงอกของสปอร์ได้ดีที่สุด โดยงอกได้ประมาณร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ชาญยุทธ์ ภาณุทัต และคณะ. 2543)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาการผลิตก้อนเชื้อเห็ดตีนแรดของกรมวิชาการเกษตร (2543) พบว่าอุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์และแสงที่เหมาะสมมีผลอย่างมากต่อการเจริญของเส้นใยและระยะการเกิดดอกซึ่ง อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดดอกเป็น 28-32 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 75-90 เปอร์เซ็นต์ และแสงที่มีความเข้มขึ้นสูง ใช้เวลาในการบ่มเชื้อประมาณ 50-60 วัน ก่อนนำก้อนเชื้อ มาเพาะให้เกิดดอกปล่อยให้ฟักตัวประมาณ 7-10 วัน จะทำให้ก้อนเห็ดเจริญได้ดี

2.2 การสกัดดีเอ็นเอ

ในการสกัดดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด เช่นในรา แบคทีเรีย ยีสต์ เป็นต้น จะมีวิธีการสกัดดีเอ็นเอที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับความเหมาะสมกับตัวอย่างที่ต้องการศึกษา เช่นตัวอย่างที่มีผนังเซลล์หนาจะต้องมีการทำให้ผนังเซลล์แตกโดยวิธีการต่างๆดังนี้

1. วิธีนำเซลล์ตัวอย่างมาทุบด้วยโกลบเบด glass bead ลงในบัฟเฟอร์
2. วิธีบดเซลล์ด้วยในโตรเจนเหลวโดยใช้โกร่ง
3. วิธีบดเซลล์ด้วย microscope slide (Weir and Blackwell, 2001)
4. วิธีย่อยผนังเซลล์ด้วยเอนไซม์ zymolase และ glucalase โดยปกติเอนไซม์ zymolase จะย่อยผนังเซลล์ได้ดีกว่า glucalase

5. วิธีการ sonication นิยมนำมาใช้เพราะจะทำให้สายดีเอ็นเอเล็กขนาดได้

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

ภายหลังจากที่เซลล์แตกสามารถแยกดีเอ็นเอและทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์โดยวิธีการต่างๆดังนี้

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

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

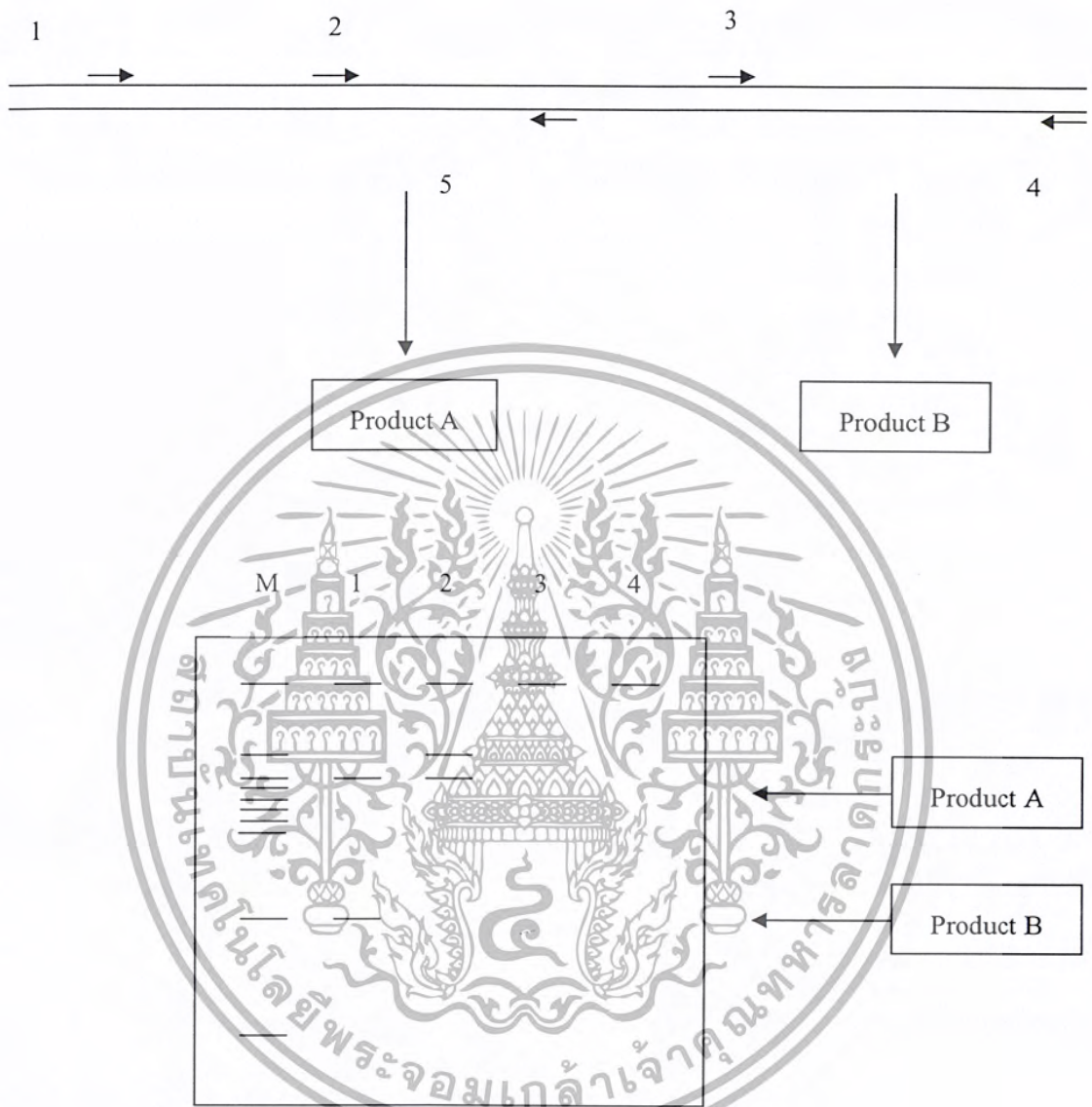
ขั้นตอนการทำ PCR ในแต่ละรอบของปฏิกิริยาประกอบด้วย 3 ขั้นตอนดังนี้

1. Denaturation เป็นการแยกดีเอ็นเอสายคู่เป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเอสายเดี่ยวทั้งสองสายที่แยกได้จะถูกใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อไป
2. Primer annealing ขั้นตอนนี้จะเป็นการลดอุณหภูมิลงมาที่ช่วง 40-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไพรเมอร์เข้าจับคู่อย่างจำเพาะที่ด้านปลาย 3' ของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณทั้งสองสาย
3. Primer extension ขั้นตอนนี้จะสังเคราะห์สายดีเอ็นเอใหม่ให้ยาวขึ้น โดยมีการเชื่อมต่อของ dNTP ที่ปลาย 3' ของไพรเมอร์ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่มีทิศทางจาก 5' ไป 3' สายดีเอ็นเอใหม่ที่สังเคราะห์ต่อจากไพรเมอร์จะมีลำดับเบสที่จับคู่จำเพาะกับดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยามักอยู่ในช่วง 70-75 องศาเซลเซียส

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

การใช้เทคนิค PCR มีทั้งข้อดีและข้อจำกัด ข้อดีที่นิยมใช้เนื่องจากดีเอ็นเอเป้าหมายที่นำมาศึกษาไม่ต้องใช้ปริมาณมาก การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสามารถทำได้จำนวนมากในเวลาที่ยำกัก ปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มนี้มีขนาดเบสได้ตั้งแต่ 50 คู่เบส - 2000 คู่เบส สำหรับข้อจำกัดที่ใช้เทคนิค PCR นั้นได้แก่ การพิจารณาหาไพรเมอร์ที่เหมาะสมและทราบลำดับเบสของยีนที่ต้องการศึกษาด้วย การปนเปื้อนในระหว่างขั้นตอนเตรียมดีเอ็นเอจากการถ่ายหลอด จากการดูดสารละลายโดยการปิเปต จะมีผลต่อการใช้เทคนิค PCR ได้

ผลผลิตที่ได้มาเมื่อแยกขนาดโดยอิเล็กโตรโฟรีซิส และเชื่อมด้วยเอทีเคียม โพรไมด์จะปรากฏแถบดีเอ็นเอ ที่เหมือนและแตกต่างกัน ข้อมูลเหล่านี้จะนำมาวิเคราะห์เพื่อดูความสัมพันธ์ที่จะนำมาใช้ในการจัดจำแนกกลุ่มเห็ดต่อไป



รูปที่ 2.1 แสดงการเกิดปฏิกิริยาและรูปแบบที่ได้จากการทำ RAPD-PCR

2.3.2 ข้อดีของเทคนิค RAPD-PCR (Maki. 2001)

1. ปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้้น้อย(ปริมาณ 5-50 นาโนกรัม)
2. โพรเมอร์ที่ใช้มีลำดับเบสไม่ยาวมากนัก
3. การดำเนินงานสามารถทำได้รวดเร็ว และง่ายต่อการวิเคราะห์ผล
4. ค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานไม่สูงมาก
5. การเข้าจับแบบสุ่มของโพรเมอร์ นั้นทำให้โพรเมอร์สามารถจับได้ทั้งสายดีเอ็นเอ
6. ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3 ข้อเสียของเทคนิค RAPD-PCR

- 1. ดีเอ็นเอที่ใช้ต้องมีความบริสุทธิ์สูง และมีขนาดของน้ำหนักโมเลกุลสูง
- 2. ในการทำแต่ละครั้งต้องระวังการปนเปื้อนของดีเอ็นเออื่น
- 3. สภาพะที่ให้มีคามผันแปรได้ง่าย
- 4. ไม่สามารถบอกตำแหน่งของอัลลิลได้

2.3.4 ไพรเมอร์(Primer)

การเลือกใช้ไพรเมอร์มีความสำคัญในเทคนิค RAPD-PCR เนื่องจากใช้ในการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอเป้าหมายที่เราจะนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างของสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตที่เราต้องการจะ เปรียบเทียบ ซึ่งอาจมีการออกแบบไพรเมอร์เพื่อหาลำดับเบสที่เป็นคู่สมกับยีนที่เราสนใจ การ ออกแบบไพรเมอร์อาจใช้คอมพิวเตอร์ช่วยจากเว็บไซต์ของ National Center for Biotechnology information ซึ่งสามารถพบข้อมูลของเรียงลำดับของกรดอะมิโน และนำลำดับการเรียงตัวของ กรดอะมิโนที่ได้มาจัดเรียง (alignment) ให้เหมาะสมโดยใช้เว็บไซต์ของ toulouse (<http://www.toulouse.inra.fr/multalin.html>) จะได้ไพรเมอร์ทั้งด้านปลาย 3' และปลาย 5' โดยมีลำดับเบสขนาด ความยาวพอเหมาะสำหรับการทำ PCR ไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในการทดลองนี้คือ OPA01-04 ซึ่งไพร เมอร์ชนิดนี้ได้มีผู้ทดลองนำมาใช้กับเห็ดชนิดอื่นๆ เช่น *Lentinula edodes*, *Agaricus bisporus*

ตารางที่ 2.1 แสดงลำดับเบสและน้ำหนักโมเลกุลของไพรเมอร์ที่ใช้

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

ที่มา : Maki. 2001

2.3.5 ปัญหาที่อาจเกิดขึ้นในขณะทำRAPD-PCR มีดังนี้

1. ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่หลากหลายเกินไปนั้นสามารถเปลี่ยนแปลงจำนวนของแถบดีเอ็นเอที่จะเกิดขึ้นได้ ควรใช้ความเข้มข้นดีเอ็นเอประมาณ 20-50 นาโนกรัมต่อหนึ่งปฏิกิริยา ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะคงที่และน่าเชื่อถือ

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

3. *Taq* polymerase มาจากหลายแหล่งที่แตกต่างกันและการเกิดปฏิกิริยาย่อมแตกต่างกันออกไปด้วยการคำนวณปริมาณสาร จึงต้องกำหนดความเข้มข้นให้ถูกต้อง

4. ในการกำหนดรอบของการเกิดปฏิกิริยา อุณหภูมิและเวลานั้นสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามความเหมาะสมขึ้นอยู่กับความสามารถของเครื่องและความหนาของหลอดที่ใช้ทำปฏิกิริยา

การวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค RAPD-PCR แล้วผลที่เกิดขึ้นไม่ถูกต้องนั้นน่าจะเกิดขึ้นจาก DNA Template, primers, *Taq* polymerase หรือสภาวะที่ใช้ จึงควรทำซ้ำในสภาวะเดิมเพื่อให้แน่ใจว่าใส่สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาครบ และควรทำตัวควบคุมทั้ง Positive control และ Negative control การทำ Positive control นั้นเพื่อให้เป็นตัวอย่างบอกว่าสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาทุกตัวใส่ครบและสามารถทำงานได้ โดยจะแสดงแถบที่ถูกต้องออกมา Negative control จะใส่สารในการทำปฏิกิริยาทุกอย่างเช่นเดียวกับหลอดอื่นๆแต่จะไม่ใส่ดีเอ็นเอที่เป็นตัวควบคุมเช่น อาจเป็น DNA Template หรือ primers ก็ได้ขึ้นอยู่กับผู้ทดลอง ใช้ในการบ่งบอกว่าถ้าไม่แสดงแถบใดๆ คือ สารที่เราใช้ในการทำปฏิกิริยาไม่มีการปนเปื้อนจากดีเอ็นเออื่นๆภายนอก สาเหตุของปัญหาที่มักจะเกิดขึ้น และทางแก้ไขจะแสดงดังตารางที่ 2.2

2.4 หลักการของอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

อิเล็กโทรโฟรีซิสเป็นวิธีการที่ใช้แยกโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิก ซึ่งอยู่ในสนามไฟฟ้าออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของสารนั้นๆ ในสนามไฟฟ้า ซึ่งเป็นผลจากความแตกต่างของชนิดและปริมาณของประจุ ขนาด และรูปร่างของโมเลกุลของสารที่ต้องการจะแยกนั้น การแยกชีวโมเลกุลในสนามไฟฟ้าโดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสสมักจะทำในตัวอย่าง (medium) โดยการใส่สารที่ต้องการแยกลงในตัวอย่าง แล้วจึงปล่อยกระแสไฟฟ้าให้ผ่านตัวกลางนั้น ดังนั้นจึงมีอิเล็กโทรโฟรีซิสหลายชนิด ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดตัวกลาง เช่น โพลีอะคริลาไมด์

เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (polyacrylamide gel electrophoresis) เมื่อใช้ตัวกลางเป็น โพลีอะคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel)

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏวชิรเวศน์บุรีรัมย์ เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 แสดงปัญหาที่อาจเกิดขึ้นในขณะทำRAPD-PCR

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)แสดงปัญหาที่อาจเกิดขึ้นในขณะทำRAPD-PCR

ปัญหา	สาเหตุ	วิธีแก้ไข
ใช้อิเล็กโทรโพลีซิสแยกผลิตภัณฑ์ได้ไม่ถูกต้อง	ความเข้มข้นของอะการโรสเจลไม่ถูกต้อง	ใช้อะการโรสเข้มข้นสูงแยกผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดเล็ก เช่นใช้ความเข้มข้นร้อยละ 2
ผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่บริสุทธิ์	ใช้เวลาในช่วง extension นานเกินไป จำนวนรอบมากเกินไป อุณหภูมिन้อยเกินไป (จะไม่จำเพาะกับดีเอ็นเอ) ใช้ดีเอ็นเอมากเกินไป	ลดจำนวนรอบลง ลดเวลาลงทีละ 1 นาที ลดความเข้มข้นของดีเอ็นเอ และตรวจดูว่าอุณหภูมิที่ใช้เหมาะสมหรือไม่อาจเพิ่มทีละ 1 องศาเซลเซียส
แถบที่แสดงนั้นอยู่ชิดกันมาก	ผลิตภัณฑ์ที่ได้อาจเป็นไฟรเมอร์ ที่ใช้ทำปฏิกิริยา	เปลี่ยนไฟรเมอร์
แถบที่แสดงนั้น ไม่สามารถนำไปใช้ได้	มีดีเอ็นเอน้อยหรือมากเกินไป	ใช้ดีเอ็นเอเข้มข้นประมาณ20-50 นาโนกรัม ถ้าดีเอ็นเอน้อยเกินไปทำให้ไฟรเมอร์ค้นหาบริเวณที่ถูกต้องไม่ได้(หาไม่เจอ) ดีเอ็นเอมากเกินไปเพิ่มจำนวนผลิตภัณฑ์

ที่มา: Micheltmore. 1991

สตาร์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (starch gel electrophoresis) เมื่อใช้ตัวกลางเป็นสตาร์เจล (star gel) เป็นต้น ส่วนอะการโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสก็คืออิเล็กโทรโฟรีซิสทำในตัวกลางที่เป็นอะการโรสเจลนั่นเอง

ในการแยกดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอโดยอะการโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส จะทำในบัฟเฟอร์ซึ่งมีพีเอชประมาณ 8 ซึ่งที่พีเอชนี้ดีเอ็นเอจะมีประจุลบ เนื่องจากการแตกตัวของหมู่ฟอสเฟต อัตราการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้าจะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ดังต่อไปนี้

2.4.1 ขนาดและโครงรูป (conformation) ของดีเอ็นเอ เมื่อพิจารณาจากลักษณะโครงสร้างทาง

เคมีของดีเอ็นเอ จะเห็น ได้ชัดเจนว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ ถึงแม้จะมีจำนวนประจุลบสูงเมื่อเทียบกับโมเลกุลขนาดเล็กก็เคลื่อนที่ช้ากว่าโมเลกุลขนาดเล็ก เนื่องจากมีแรงเสียดทานภายในโมเลกุลสูง การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้าจะขึ้นกับปัจจัยต่างๆ ดังต่อไปนี้

กับดีเอ็นเอขนาดเล็ก (จำนวนหมู่ฟอสเฟตมากกว่า) แต่อัตราส่วนของประจุลบต่อมวล (mass) ของดีเอ็นเอไม่ว่าโมเลกุลใหญ่หรือเล็กจะเท่ากัน ดังนั้นอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในสนามไฟฟ้าจึงเป็นผลจากขนาดของดีเอ็นเอโดยตรง ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก แต่ทั้งนี้หมายถึงการเปรียบเทียบในขณะที่ดีเอ็นเอนั้นอยู่ในโครงแบบเดียวกัน ดีเอ็นเอที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากันแต่โครงรูปต่างกัน จะมีผลทำให้การเคลื่อนที่ต่างกันไปด้วย ตัวอย่างที่เห็นได้ชัดได้แก่ เมื่อพลาสมิดชนิดหนึ่งๆ อยู่ในรูปที่เรียกว่าซูเปอร์คอยล์ (supercoil form) จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าเมื่ออยู่ในรูปปลายเปิด (linear form) และรูปรีแลกซ์ (relaxed form) ตามลำดับ

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

$$\log \mu = \log \mu_0 + K_r C$$

เมื่อ μ = ระยะทางของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในอะกาโรสเจล

μ_0 = ระยะทางของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอในสภาวะที่ไม่มีอะกาโรสเจล

C = ความเข้มข้นของอะกาโรสเจล

K_r = สัมประสิทธิ์ความหน่วง (retardation coefficient)

โดยปกติค่าสัมประสิทธิ์ความหน่วง (K_r) เป็นค่าคงที่ขึ้นกับขนาดและโครงรูปของดีเอ็นเอที่เคลื่อนที่ในอะกาโรสเจลอัน ถ้ากำหนดให้ดีเอ็นเอปลายเปิดรูปร่างเป็นแท่งกลมยาว ค่าสัมประสิทธิ์ความหน่วงจะขึ้นกับขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอนั้น ดังนั้นที่ความเข้มข้นหนึ่งของอะกาโรสเจล ค่า $\log$ ของขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุลของดีเอ็นเอจะมีความสัมพันธ์ในลักษณะผกผันกับการเคลื่อนที่ ดังนั้นในการแยกดีเอ็นเอขนาดต่างๆ จะต้องเลือกความเข้มข้นของอะกาโรสให้เหมาะสม

ตารางที่ 2.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของอะกาโรสเจลกับขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิด

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

ที่มา : สุรินทร์, 2543

2.4.3 ความต่างศักย์ไฟฟ้า โดยปกติแล้วอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสจะทำโดยใช้ความต่างศักย์อยู่ในช่วง 0.5 - 5 โวลต์/เซนติเมตร แต่ถ้าความต่างศักย์ที่นิยมใช้มักจะมีค่าต่ำๆ (ประมาณ 1 โวลต์/เซนติเมตร) ทั้งนี้เพราะที่ความต่างศักย์ต่ำๆ อัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอปลายเปิดจะเป็นสัดส่วนกันกับความต่างศักย์ แต่ถ้าใช้ความต่างศักย์สูงขึ้นการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอปลายเปิดโมเลกุลใหญ่จะเพิ่มขึ้นมากกว่าพวกที่มีขนาดโมเลกุลเล็กมาก เป็นเหตุให้เมื่อใช้ความต่างศักย์สูงๆ ช่วงขนาดของดีเอ็นเอปลายเปิดที่แยกได้จะแคบลง สำหรับดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่เฉพาะดีเอ็นเอที่ใหญ่กว่า 70 กิโลเบส การที่จะทำให้แยกจากกันได้ดีจะต้องใช้ความต่างศักย์ต่ำๆ (0.5 โวลต์ต่อเซนติเมตร)

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

อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสมักจะทำในแนวนอน โดยที่อะกาโรสเจลจะจมอยู่ใต้บัฟเฟอร์ประมาณไม่เกิน 3 มิลลิเมตร ด้วยเหตุที่ความต้านทานไฟฟ้าในอะกาโรสเจลและในบัฟเฟอร์ใกล้เคียงกันมาก ฉะนั้นกระแสไฟฟ้าส่วนใหญ่ที่ใช้สำหรับการอิเล็กโทรโฟรีซิสจะเคลื่อนผ่านแผ่นอะกาโรสเจล โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสมักจะนิยมทำที่อุณหภูมิห้อง ทั้งนี้เพราะอัตราเร็ว

เซลเซียส แต่กรณีที่ใช้ความเข้มข้นของอะกาโรสเจลดต่ำกว่าร้อยละ 0.5 มักจะทำอิเล็กโทรโฟรีซิสที่ 4 องศาเซลเซียส ทั้งนี้เพราะเมื่อความเข้มข้นของอะกาโรสต่ำเจลจะอยู่ในสภาพค่อนข้างนิ่ม ในที่เย็นจะช่วยให้เจลอยู่คงรูปมากขึ้น

2.4.4 ชนิดของบัฟเฟอร์ บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส แสดงดังตารางที่ 2 ในที่นี้จะกล่าวถึงวิธีการทดลองที่ใช้ TBE buffer ซึ่งสามารถทำอิเล็กโทรโฟรีซิสได้ที่มีความต่างศักย์ไฟฟ้าสูง (50 – 100 โวลต์) ในระยะเวลาสั้น แต่การใช้ความต่างศักย์ที่สูงขึ้นจะลดประสิทธิภาพการแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดเล็ก ความต่างศักย์ไฟฟ้าสูงจะมีผลให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ในเจลได้เร็วขึ้น แต่อาจมีผลให้เกิดแถบ (band) ดีเอ็นเอเป็นรูปตัวยู นอกจากนี้ยังจะทำให้ความร้อนเกิดขึ้นในระบบ ในกรณีที่ความร้อนสูงอาจทำให้เจลละลายได้ มีผลให้ช่องว่างภายในเจลเปลี่ยนแปลงไป ปกติแล้วจะไม่ใช้ความต่างศักย์สูงเกิน 125 โวลต์ในเจลขนาดเล็ก

ตารางที่ 2.4 แสดงส่วนประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้

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

ที่มา : สุรินทร์. 2543

2.4.5 การติดตามการเคลื่อนที่ของโมเลกุล DNA ดีเอ็นเอไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ในขณะที่ทำอิเล็กโตรโฟรีซิสนั้นจึงต้องใช้สารสำหรับบอกถึงการเคลื่อนที่ของโมเลกุลดีเอ็นเออย่างคร่าวๆ โดยจะมีการผสมตัวอย่างของ ดีเอ็นเอกับสารละลายสีย้อมสำหรับการหยอดดีเอ็นเอที่เรียกว่าโหลดดิ้งได (loading dye) ลงในช่องเจลในสารละลายสีย้อมนี้จะมีองค์ประกอบของ Ficoll 400 ซึ่งมีผลให้สารละลายดีเอ็นเอ มีน้ำหนักและจมอยู่ในช่องเจล ไม่ฟุ้งกระจายในบัฟเฟอร์ก่อนการให้กระแสไฟฟ้า โมเลกุลที่ให้สีในสารละลายสีย้อมนี้จะมีองค์ประกอบของ Ficoll 400 ซึ่งมีผลให้สารละลายดีเอ็นเอมีน้ำหนักและจมอยู่ในช่องเจลไม่ฟุ้งกระจายในบัฟเฟอร์ก่อนการให้กระแสไฟฟ้า โมเลกุลที่ให้สีในสารละลายสีย้อมซึ่งเรียกว่า แทรกกิงได (tracking dye) จะใช้ติดตามการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ ได้แก่ โบรโมฟินอลบลู (bromophenol blue) มีสีม่วงจะเคลื่อนที่ในเจลความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ได้อัตราเร็วใกล้เคียงกับชิ้นส่วนของดีเอ็นเอขนาด 300 คู่เบส ส่วนไซลิโนไซยานอล (Xylene cyanol) จะมีสีฟ้ามีขนาดใหญ่กว่าจะเคลื่อนที่ได้ในอัตราเร็วใกล้เคียงกับดีเอ็นเอขนาด 900 คู่เบส ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยทั่วไปพลาสมิดดีเอ็นเอจะแยกจากกันได้ดี เมื่อโบรโมฟินอลบลูเคลื่อนที่ห่างจากจุดเริ่มต้นประมาณ 40-70 เซนติเมตร

2.4.6 การย้อมดีเอ็นเอ ชิ้นส่วนดีเอ็นเอภายในเจลซึ่งไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าจะต้องย้อมด้วยสีย้อมฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent dye) ส่วนใหญ่จะใช้เอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) โดยสารประกอบดีเอ็นเอ และเอธิเดียมโบรไมด์จะดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 302 และ 306 นาโนเมตร การดูดกลืนคลื่นแสงนี้ส่งผลให้เกิดการแตกตัวของพลังงานและปลดปล่อยแสงสีส้มที่มีความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ซึ่งสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า (Lepecy และ Paoletti 1967) เอธิเดียมโบรไมด์ นั้นสามารถนำมาย้อมดีเอ็นเอได้อย่างรวดเร็วและให้ผลที่ดี แต่สารที่เป็นสารที่อาจก่อให้เกิดมะเร็งได้ โดยเฉพาะถ้าหายใจสูดเข้าปอดโดยตรง โดยทั่วไปจึงนิยมซื้อในรูปของสารละลายเข้มข้น (10 มิลลิกรัม) เมื่อต้องการใช้งานจะเจือจางลงเหลือความเข้มข้นประมาณ 0.5-1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ใช้เวลาในการย้อมเจลที่มีดีเอ็นเอประมาณ 5-10 นาที ตามด้วยล้างเจลประมาณ 10 นาทีในน้ำเปล่า ในปัจจุบันการพัฒนาสีย้อมดีเอ็นเอที่มีความปลอดภัยสูงและขายเป็นการค้าให้เลือกใช้หลายชนิด เช่น สตาร์เจล (star gel) แต่ราคาอาจจะสูงกว่าเอธิเดียมโบรไมด์

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

พรทิพย์ ภูมิเกล้า (2546) ได้ศึกษาเกี่ยวกับอุณหภูมิ ชนิดของอาหาร ระยะเวลาที่มีการเจริญสูงสุดของเส้นใยที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดดินเรด พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเห็ดแต่ละจังหวัดมีการเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อาหารเหลวที่เหมาะสมต่อเห็ดดินเรดจังหวัดต่างๆเจริญได้ดีที่สุดในอาหาร PDYB และระยะเวลาที่มีการเจริญสูงสุดคือ 21 วัน

วสันต์ เพชรรัตน์ (2522) ศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดดินเรด พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 องศาเซลเซียส และสูตรอาหารวันที่เหมาะสมต่อการเจริญคืออาหาร PDA

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

Maki et al. (2001) ได้ทำการวิเคราะห์ความหลากหลายของเห็ดหอม (*Lentinula edodes*) ด้วยเส้นใยโดยใช้เทคนิค RAPD molecular marker และไพรเมอร์ OPA01-OPA20 ในการวิเคราะห์ พบว่า มี 17 ไพรเมอร์ที่สามารถใช้ในการจัดจำแนกสายพันธุ์เห็ดหอม ได้ออกเป็น 2 กลุ่ม

Moore AJ, Challen MP, Warner PJ, Elliott TJ. ใช้เทคนิค RAPD-PCR แยกสายพันธุ์ของ *A. bisporus* 26 สายพันธุ์และอีก 24 สายพันธุ์ของเห็ดชนิดอื่นๆ เพื่อใช้บอกถึงความสัมพันธ์ต่างๆ โดยใช้ไพรเมอร์ 20 ชนิด สามารถจัดจำแนกออกมาโดยการเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ธรรมชาติ 2 ชนิด ของ *A. bisporus* คือเห็ดสีน้ำตาลและสีขาวกับสายพันธุ์ผสมโดยใช้เห็ดลูกผสม 15 ชนิด พบว่า มีความแตกต่างกันมากกว่า 28%

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Roy and Samajpati (1981) ค้นพบเห็ดดินแรดที่เบงกอลตะวันตกของประเทศอินเดียเป็นครั้งแรก พบว่า มีลักษณะของหมวกดอกมีสีขาวเมื่อโตเต็มที่จะเปลี่ยนเป็นสีครีม สปอร์มีรูปร่างรี ลายสปอร์พิมพ์สีขาว

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

Siu-Wai Chiu, Ai-Man Ma, Fang-can Lin and David moore(1996) ใช้เทคนิค RPAD-PCR ร่วมกับ AP-PCR และ rDNA-RFLPs ระบุจำแนกshitake 19 สายพันธุ์โดยใช้เส้นใยและไพรเมอร์ OPA04, OPB07, OPC02 ผลที่ได้คือ shitake นั้นมีความคล้ายคลึงกับ *Agaricus bisporus* และ *Volvariella volvacea* แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบสายพันธุ์ที่เก็บมาจากธรรมชาติในระบบนิเวศเดียวกับแต่ต่างพื้นที่กันก็จะพบความหลากหลาย ข้อสำคัญคือ การเก็บรักษาสายพันธุ์ของ shitake ในธรรมชาติ เพื่ออนุรักษ์ความหลากหลายเอาไว้ใช้ประโยชน์ในการค้าต่อไป

Yasuhiro ITO and Sonoe O. YANAGI (1998) ใช้วิธี RAPD-PCR ในการจำแนกสายพันธุ์ของเห็ดในclass Basidiomycetae โดยใช้เส้นใยของเห็ดสายพันธุ์ *Coprinus* 7 สปีชีส์ และ *Tricholoma* 5 สปีชีส์ (*T. mutsutake*, *T. caligatum*, *T. magniveTare*, *T. fluvocusTanium*, *T. bakamaTsuTake*) โดยใช้ไพรเมอร์ 10 ชนิด พบว่ารูปแบบที่ได้จากการทำ RAPD ในเห็ด *T. mutsutake* มีรูปแบบที่มีความคล้ายคลึงกันซึ่งคิดออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังนี้ระหว่าง *T. mutsutake* กับ *T. caligatum* ได้ 52% กับ *T. magniveTare*, *T. fluvocusTanium*, *T. bakamaTsuTake* ได้ 41.8, 38.7, 24.6 ตามลำดับ

Yinfang Zhang, Francis I. Molina (1995) นำไพรเมอร์ขนาด 10 เบส มาใช้ในการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค RAPD-PCR ในเห็ดชิตาเกะ 15 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ 7 ชนิด ได้ผลออกมา 12-19 แถบขนาดประมาณ 0.34-2.52 kb. พบว่า 13 สายพันธุ์จาก 15 สายพันธุ์มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอเดียวกัน การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในเห็ดชนิดต่างๆและใช้ร่วมกับโปรแกรมวิเคราะห์สายพันธุ์ได้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 ขั้นตอนในการดำเนินงาน

3.1.1 อุปกรณ์ดำเนินการในการเพาะเลี้ยงเส้นใย

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

3.1.2 อุปกรณ์ในการสกัดดีเอ็นเอ

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

3.1.3 อุปกรณ์ในการทำ การเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ (PCR)

- PCR-200 Peltier Thermal Cycler
- Microfuge tube

3.1.4 อุปกรณ์ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis)

- ชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส
- เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

เครื่องฉายแสงยูวี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 แหล่งที่มาของเส้นใยเห็ดตีนแรดที่ใช้ในการทดลอง

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

3.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.3.1 สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

1. TE buffer			
Tris-HCl	pH8.0	10	มิลลิโมลาร์
EDTA	pH8.0	1	มิลลิโมลาร์
2. Extraction buffer			
Tris-HCl	pH8.5	200	มิลลิโมลาร์
NaCl		250	มิลลิโมลาร์
EDTA		25	มิลลิโมลาร์
SDS 0.5%		25	มิลลิโมลาร์
3. 3M Sodium acetate	pH5.2		
4. isopropanol			
5. liquid nitrogen			
6. ethanol 70%			

3.3.2 สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR-RAPD

1. PCR reaction mixture ประกอบด้วย		
Taq polymerase	0.5	ไมโครลิตร
MgCl ₂	3	ไมโครลิตร
dNTPs อย่างละ	2	ไมโครลิตร
Primer 1	2	ไมโครลิตร
2. ดีเอ็นเอ(template)	1	ไมโครลิตร
3. 10xBuffer	5	ไมโครลิตร
4. H ₂ O	37.5	ไมโครลิตร

3.3.3 สารเคมีที่ใช้ในการทำอิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis)

1. TBE(Tris-borate)

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

2. Bromophenol blue

3. Agarose(Agar)powder

4. Marker 100 bp ladder

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเลี้ยงเส้นใยเห็ดดินแรดเพื่อสกัดดีเอ็นเอ (บุสรุา เฟิงใหญ่. 2547)

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

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

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

3.4.2 การสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยเห็ดดินแรด (ดัดแปลงจาก Cenis. 1992)

นำเส้นใยที่เลี้ยงในอาหารเหลวมาสกัดดีเอ็นเอ

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

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

3.4.2.3 รินสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง นำเส้นใยใส่โกรงที่เย็นจัด เติมนิโตรเจนเหลวให้ท่วม แล้วบดเส้นใยอย่างรวดเร็วจนมีลักษณะคล้ายผงแป้ง(ถ้าในไนโตรเจนเหลวหมดให้เติมใหม่)

จากนั้นก็ถ่ายลงไปในหลอดไมโครเซนติฟิวส์หลอดใหม่ จากนั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

3.4.2.6 คูดสารละลายส่วนใสที่อยู่ด้านบนมาใส่หลอดไมโครเซนติฟิวส์หลอดใหม่ผสมไอโซโพรพานอล (Isopropanol) ลงในหลอดปริมาตรที่เท่ากันเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เขย่าเบาๆ ให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 5 นาที

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

3.4.2.8 รินส่วนใสทิ้งเหลือดีเอ็นเอกันหลอด เติม RNase 100 ไมโครลิตร บ่ม 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

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

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

3.4.2.11 คูดสารละลายส่วนใสมาใส่หลอดไมโครเซนติฟิวส์หลอดใหม่ผสมไอโซโพรพานอล (Isopropanol) ในปริมาตรที่เท่ากัน เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเออีกครั้ง เขย่า บ่มข้ามคืน

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

3.4.2.13 รินส่วนใสทิ้ง เหลือตะกอนดีเอ็นเอกันหลอด ล้างดีเอ็นเอด้วยเอธานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (คูดส่วนใสเท่าใดเติมเอธานอลเท่านั้นเพื่อล้างดีเอ็นเอ) ทิ้งไว้ 3-5 นาที

3.4.2.14 คว่ำหลอดบนกระดาษทิชชู ทิ้งไว้ให้แห้ง

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

3.4.2.16 เก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.4.3 การศึกษาความแตกต่างกันของเห็ดตีนแรดในแต่ละจังหวัดโดยใช้เทคนิค RAPD-PCR (ดัดแปลงจาก Maki. 2001)

3.4.3.1 การทำ RAPD-PCR จะต้องเตรียมสารละลายผสม (master mix) ซึ่งประกอบด้วย น้ำกลั่น, 10X buffer, MgCl₂, dNTPs, Templates, *Taq* นำมาผสมกันตามลำดับและปริมาตรต่อไปนี้ ปฏิบัติดังต่อไปนี้

1. Distillation deioning water	37.5	ไมโครลิตร
2. 10X buffer	5	ไมโครลิตร
3. MgCl ₂	3	ไมโครลิตร
4. dNTPs	1	ไมโครลิตร
5. Template	1	ไมโครลิตร
6. <i>Taq</i>	0.5	ไมโครลิตร

ไพรเมอร์ที่ใช้มี 4 ชนิดคือ OPA01-04 จึงนำสารละลายผสมสำหรับทำ 5 ปฏิบัติ แบ่งสารละลายผสมนี้ใส่หลอดพีซีอาร์ปริมาตร 48 ไมโครลิตร จากนั้นใส่ไพรเมอร์ 4 ชนิดปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในหลอดแล้วเขย่า(vortex) นำไปเข้าเครื่องทำพีซีอาร์ แล้วตั้งค่าในการทำปฏิบัติดังต่อไปนี้

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

ทำปฏิบัติ 45 รอบ

3.4.4 การตรวจสอบดีเอ็นเอ

3.4.4.1 ตรวจสอบผลที่ได้โดยทำอเล็กโตรโฟรีซิส และใช้สตาร์เจล

3.4.4.2 เตรียมเจลอะการโรส 1 เปอร์เซนต์ในTE Buffer แล้วใส่สตาร์เจล 1 ไมโครลิตร ต่อเจลอะการโรส 20 ไมโครลิตร ใช้กระแสไฟฟ้าต่ำ เป็นเวลาประมาณหนึ่งถึงหนึ่งชั่วโมงครึ่ง นำเจลไปดูผลโดยใช้แสง UV เพื่อตรวจสอบ โดยวางสตาร์เจลบนแหล่งกำเนิดแสงที่ให้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่นปานกลาง (260-360 นาโนเมตร) ควรหลีกเลี่ยงหลอดไฟที่ให้ความยาวคลื่นสั้น เนื่องจากจะเป็นอันตรายต่อผู้ใช้และทำลายดีเอ็นเอ ส่วนความยาวคลื่นแสง (black light) นั้นจะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปลอดภัยแต่จะให้ความเข้มแสงต่ำ แสงอัลตราไวโอเลตนั้นสามารถทำลายเรตินาของดวงตาได้ ไม่ควรดูด้วยตาเปล่า

3.4.5 การถ่ายภาพเจล

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

- 23 A orange วางที่ใกล้กล้องเพื่อเป็นการเพิ่มความแตกต่างสำหรับการย้อมด้วยเมธิลีนบลู
- 2B UV-blocking filter(clear) ใกล้วัตถุ

ในปัจจุบันมีการพัฒนาเครื่องถ่ายภาพเจลเฉพาะซึ่งสามารถทำงานได้สะดวก

3.4.6 การวิเคราะห์ผล RAPD-PCR (Paulol และคณะ. 1999)

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

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากเห็ดตีนแรด

จากการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีที่พัฒนาจาก Ceniz ในปี 1992 จากเห็ดตีนแรดทั้ง 4 ตัวอย่างคือ จังหวัดกรุงเทพ (ศูนย์เห็ดบ้านอรุณฤกษ์) จังหวัดขอนแก่น จังหวัดมหาสารคาม และจังหวัดปทุมธานี ผลปรากฏว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความเข้มข้น เท่ากับ 350 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ดังรูปที่ 4.1)



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

4.2 ความหลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากการทำ RAPD-PCR

4.2.1 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD-PCR โดยไพรเมอร์ OPA01

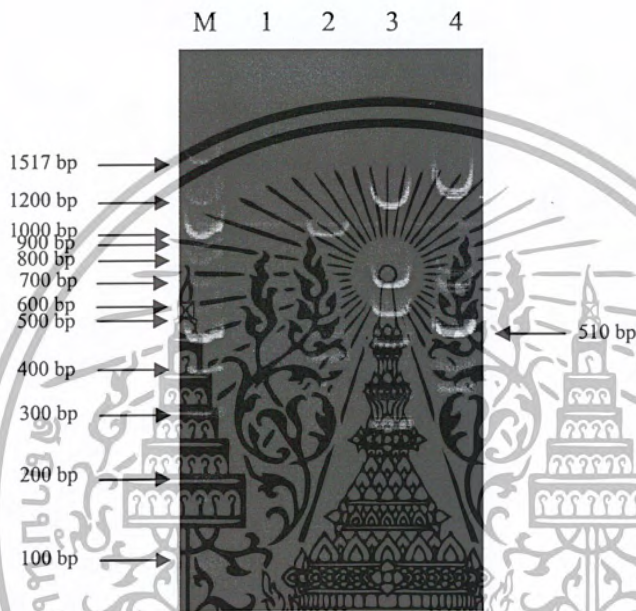
จากการใช้ไพรเมอร์ OPA01 ไม่พบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (ดังรูปที่ 4.2) ซึ่งทำทราบว่าไพรเมอร์ชนิดนี้ไม่สามารถทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (amplification) ในตัวอย่างเห็ดดินแรดทุกจังหวัด



รูปที่ 4.2 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มปริมาณแบบสุ่มของเห็ดดินแรดในจังหวัดต่างๆโดยใช้ไพรเมอร์ OPA01 ซึ่งเลน M คือแถบของ marker 100 เบส และเลนที่ 1, 2, 3 และ 4 คือแถบของจีโนมดีเอ็นเอจากจังหวัดกรุงเทพฯ (ศูนย์เห็ดบ้านอรัญญิก) จังหวัดขอนแก่น จังหวัดมหาสารคาม และจังหวัดปทุมธานี ตามลำดับ

4.2.2 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD-PCR โดยไพรเมอร์ OPA02

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



รูปที่ 4.3 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มปริมาณแบบคู่ของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ โดยใช้ไพรเมอร์ OPA02 ซึ่งเลน M คือแถบของ marker 100 เบสและเลนที่ 1, 2, 3 และ 4 คือแถบของจีโนมดีเอ็นเอจากจังหวัดกรุงเทพฯ (ศูนย์เห็ดบ้านอรัญญิก) จังหวัดขอนแก่น จังหวัดมหาสารคาม และจังหวัดปทุมธานี ตามลำดับ

4.2.3 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ OPA03

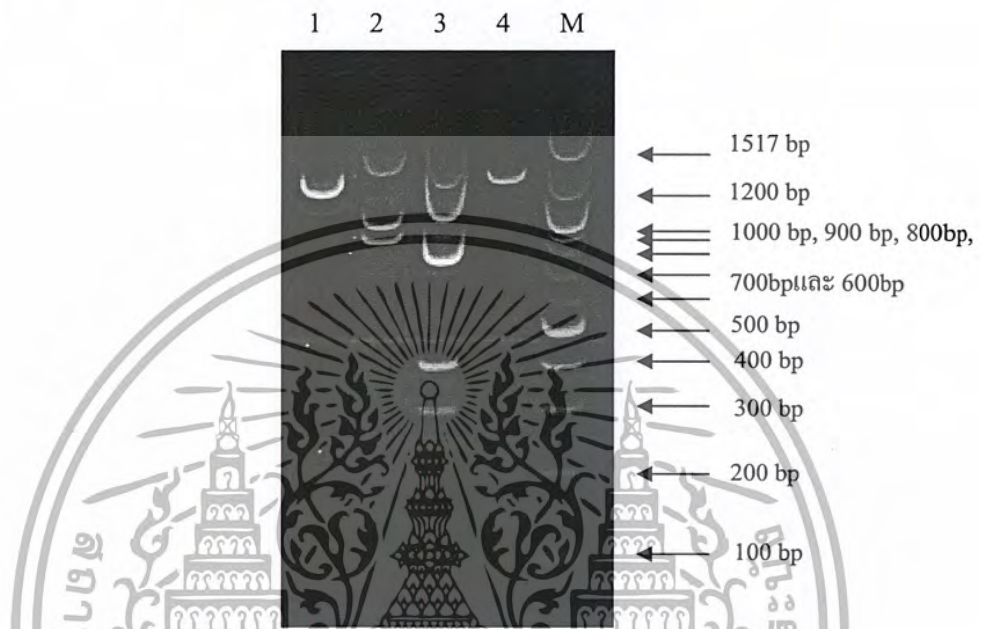
ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ OPA03 พบว่ามีแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่ปรากฏขึ้นหลังจากการทำ RAPD-PCR 25 แถบ และพบว่ามีขนาดดีเอ็นเอที่เท่ากัน ดังนี้ ที่ขนาด 800 คู่เบส ในเลนที่ 1, 2 และ 4 ที่ขนาด 610 คู่เบส ในเลนที่ 1 และ 2 (ดังรูปที่4.4)



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

4.2.4 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD-PCR โดยไพรเมอร์ OPA04

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ OPA04 พบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดเท่ากับ 9 แถบ (ดังรูปที่ 4.5)



รูปที่ 4.5 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ทำการเพิ่มปริมาณแบบสุ่มของเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ โดยใช้ไพรเมอร์ OPA04 ซึ่งเลน M คือแถบของ marker 100 เบสและเลนที่ 1, 2, 3 และ 4 คือแถบของจีโนมดีเอ็นเอจากจังหวัดกรุงเทพฯ (ศูนย์เห็ดบ้านอรุณภูมิ) จังหวัดขอนแก่น จังหวัดมหาสารคาม และจังหวัดปทุมธานี ตามลำดับ

4.3 การวิเคราะห์ผล RAPD-PCR

การวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมของเห็ดตีนแรดทั้ง 4 ตัวอย่างจากเทคนิค RAPD โดยนำแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 49 แถบ ซึ่งกำหนดสัญลักษณ์ + แทนการเกิดแถบดีเอ็นเอและสัญลักษณ์ - แทนการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ นำมาใช้ในการวิเคราะห์ผลเห็ดตีนแรดในจังหวัดต่างๆ พิจารณาความแตกต่างหรือความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรม ผลจากแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ 4 ชนิดพบว่า ไพรเมอร์ OPA01 ไม่สามารถทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (amplification) ได้หลังจากการทำ RAPD - PCR ในตัวอย่างเห็ดตีนแรดทุกจังหวัด ในขณะที่ในการศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมในเห็ดหอมของ Maki และคณะ (2001) ได้ทำการทดลองโดยใช้ไพรเมอร์ OPA01-OPA20 พบว่า ไพรเมอร์ OPA01 สามารถที่จะทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ และพบแถบดี

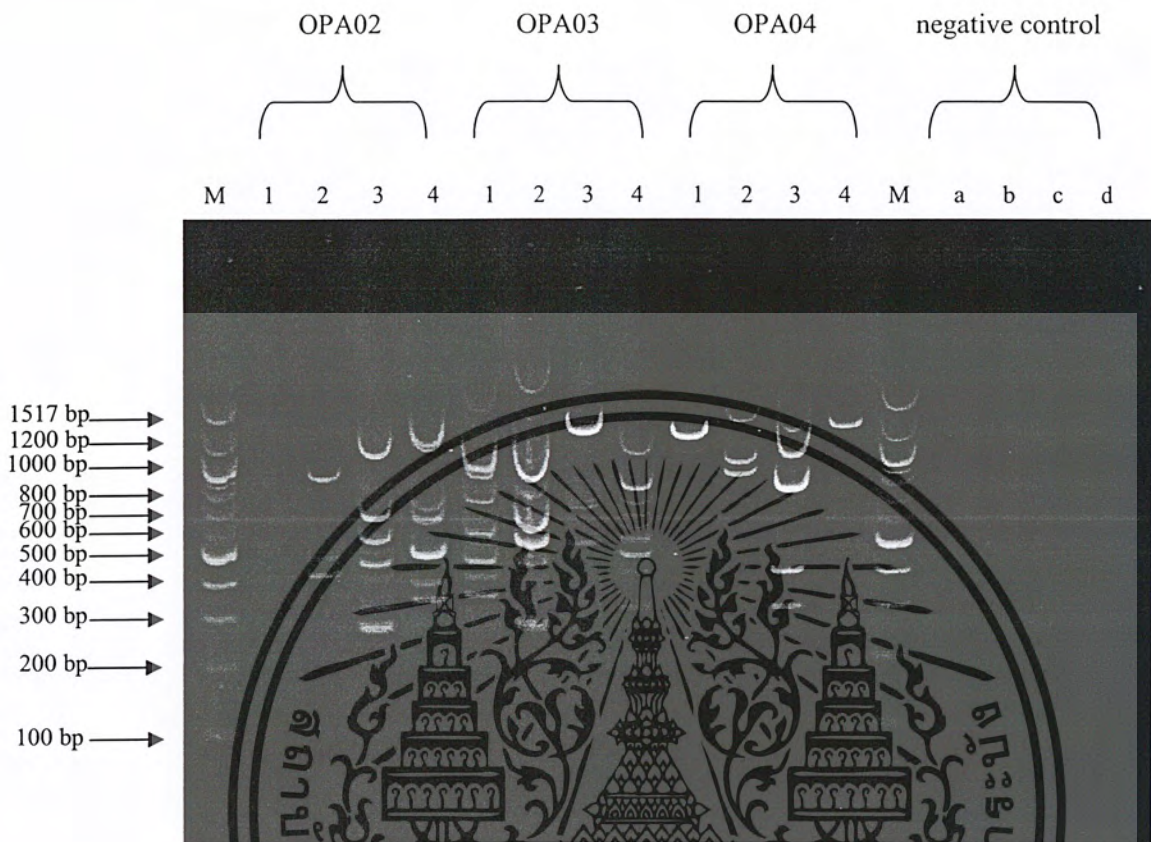
เอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ OPA02, OPA03 และ OPA04 แถบดีเอ็นเอที่มีความหลากหลาย

ของขนาดดีเอ็นเอแตกต่างกันออกไป ผลที่ได้แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรม เช่นเดียวกันกับการศึกษาหาความผันแปรลักษณะทางพันธุกรรมในเห็ดหอม *Lentinula edodes* ของ Yingfang Zhang และคณะ (1995)โดยใช้ไพรเมอร์ 7 ชนิดซึ่งหนึ่งในนี้มีไพรเมอร์ OPA02 และ OPA04 ที่ใช้เหมือนกับการทดลองนี้พบว่าสามารถให้รูปแบบที่ได้จากการทำ RAPD-PCR ที่มีความแตกต่างกัน ดังนั้นแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่ปรากฏหลังจากการทำ RAPD-PCR 57 แถบ จึงนำมาวิเคราะห์หาความคล้ายคลึงกันจากเปอร์เซ็นต์การเกิดแถบโดยใช้วิธีการของ Paulo และคณะ(1999)พบว่า เมื่อนำแถบทั้งหมด 57 แถบที่ปรากฏในเห็ดดินเรดในทั้ง 4 จังหวัด คือ จังหวัดกรุงเทพฯ (ศูนย์เพาะเห็ดอัญญิก) จังหวัดขอนแก่น จังหวัดมหาสารคาม และจังหวัดปทุมธานี ที่ใช้ไพรเมอร์ OPA02, OPA03และOPA04 วิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันพบว่าจังหวัดกรุงเทพฯ(ศูนย์เพาะเห็ดอัญญิก) มีเปอร์เซ็นต์ 14.28 เปอร์เซ็นต์ ขอนแก่นมี 24.48 เปอร์เซ็นต์ มหาสารคามมี 28.57 เปอร์เซ็นต์ และปทุมธานีมี 32.65 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าตัวอย่างเห็ดดินเรดจากจังหวัดขอนแก่น มหาสารคาม และปทุมธานี มีความคล้ายคลึงกันมากกว่าในตัวอย่างเห็ดดินเรดจากศูนย์เพาะเห็ดอัญญิก เมื่อดูจากเปอร์เซ็นต์ของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ (แสดงดังรูปที่ 4.5 และตารางที่ 4.6)

ตารางที่ 4.1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างไพรเมอร์และผลที่ได้จากการทำ RAPD-PCR ในเห็ดดินเรดจังหวัดต่างๆ

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

เมื่อ : + คือ สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ
X คือ ไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ



รูปที่ 4.6 แสดงรูปแบบที่ได้จากการทำ RAPD-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ OPA02, OPA03 และ OPA04 ในตัวอย่างเห็ดตีนแรดจังหวัดต่างๆ ซึ่งเลน M คือแถบของ marker 100 เบส และเลนที่ 1, 2, 3 และ 4 คือแถบของจีโนมิคดีเอ็นเอจากจังหวัดกรุงเทพฯ (ศูนย์เห็ดบ้านอรัญญิก) จังหวัดขอนแก่น จังหวัดมหาสารคาม และจังหวัดปทุมธานี ตามลำดับ negative control แทนด้วย a b c d คือไพรเมอร์ OPA01, OPA02, OPA03 และ OPA04 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.2 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD – PCR โดยใช้ไพรเมอร์ OPA02 - OPA04 ในการวิเคราะห์ผล โดยให้สัญลักษณ์ + แทนการพบแถบ ดีเอ็นเอ และสัญลักษณ์ – แทนการไม่พบแถบดีเอ็นเอ

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

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

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RAPD – PCR โดยใช้ไพรเมอร์ OPA02 - OPA04 ในการวิเคราะห์ผล โดยให้สัญลักษณ์ + แทนการพบแถบ ดีเอ็นเอ และสัญลักษณ์ – แทนการไม่พบแถบดีเอ็นเอ

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

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาแถบทั้งหมด 57 แถบที่ปรากฏของเห็ดดินแร่ใน 4 จังหวัดคือ จังหวัดปทุมธานี จังหวัดขอนแก่น จังหวัดมหาสารคามและศูนย์เห็ดบ้านอรัญญิก เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับตามวิธีการของ Paulo J. Elisario (1999) พบว่าเห็ดดินแร่ 3 จังหวัด คือ จังหวัดปทุมธานี จังหวัดขอนแก่น จังหวัดมหาสารคาม มีความคล้ายคลึงกันของแถบมากกว่าเห็ดดินแร่ของจังหวัดกรุงเทพฯ (ศูนย์เห็ดบ้านอรัญญิก) อาจเป็นไปได้ว่า เห็ดดินแร่จากจังหวัดกรุงเทพฯ(ศูนย์เห็ดบ้านอรัญญิก)นั้นอาจเกิดการแปรผันทางพันธุกรรมไปจากเดิมเนื่องจากเป็นเห็ดที่เลี้ยงในโรงเพาะเห็ดมาแล้วหลายรุ่นอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรมมากกว่าเห็ดที่เลี้ยงตามธรรมชาติ นอกจากนี้อาจเกิดจากการผสมพันธุ์ขึ้นใหม่เพื่อใช้ในการการค้าระหว่างเห็ดต่างชนิดและมีสายพันธุ์ใกล้เคียงกันและนำมาเลี้ยงด้วยกันภายในโรงเพาะเห็ดเดียวกัน จึงควรการนำเส้นใยเห็ดดินแร่จากทุกจังหวัดที่เพาะเลี้ยงมาทำการเปิดดอกเห็ด เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของลักษณะดอกเห็ดในแต่ละจังหวัด จะช่วยยืนยันผลการทดลองได้ดียิ่งขึ้น

ไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในการทดลองนี้คือ ไพรเมอร์ชนิด OPA01, OPA02, OPA03และOPA04 ที่สามารถขยายปริมาณดีเอ็นเอของเห็ดดินแร่ได้ แสดงว่าไพรเมอร์ OPA นี้สามารถนำมาใช้กับเห็ดดินแร่ได้

ข้อเสนอแนะจากการทดลองนี้คือ เพิ่มจำนวนตัวอย่างเห็ดดินแร่ที่ใช้ในการทดลองควรมีหลายกลุ่มจากพื้นที่ต่างๆกันมากกว่านี้ และจำนวนชนิดไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในการทดลองควรมีมากขึ้น เช่นไพรเมอร์ OPA05 - 20, OPB, OPL และไพรเมอร์อื่นๆที่เคยได้มีผู้ทดลองนำมาใช้ทดลองกับเห็ดราชนิดต่าง ตัวอย่างที่เคยมีผู้ทดลองนำมาใช้คือ ไพรเมอร์ OPB01, OPB08 ถูกนำมาใช้กับ *Penicillium commune* (Flemming Lund, Anni Bech Nielsen, Pernille Skouboe. 2002) และการศึกษาหาความผันแปรลักษณะทางพันธุกรรมในเห็ด *Pleurotus eryngii* ของ Georgios I (2001) โดยใช้ไพรเมอร์ OPB01-OPB20 พบว่ามีไพรเมอร์ OPB01, OPB02, OPB10, OPB14 และ OPB18 เท่านั้นที่สามารถทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ซึ่งให้รูปแบบที่ได้จากการทำ RAPD-PCR ที่แตกต่างกัน เพื่อจะได้นำมาทำการจัดจำแนกแล้วแยกทำการปรับปรุงพันธุ์ให้มีสายพันธุ์ที่ดียิ่งขึ้น

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- ชาญยุทธ์ ภาณุทัต นงนุช แดงทรัพย์ และสวัสดิ์ เชียงแจ้ง. 2543. การศึกษาการเพาะเลี้ยงเห็ดดินแรด ร่วมกับการปลูกผัก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ. 2529. การเพาะเห็ดบางชนิดในประเทศไทย. กรุงเทพฯ : อักษรสยามการพิมพ์.
- ปัญญา โพธิ์จิตรรัตน์ และกิตติพงษ์ ศิริราชกุล. 2528. เทคโนโลยีการเพาะเห็ด. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- วสันต์ เพชรรัตน์. 2522. “I.การศึกษาสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและการเพาะเลี้ยงเห็ดดินแรดII ลักษณะการสืบพันธุ์ทางเพศของเห็ดดินแรด.วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์
- สุรินทร์ ปิยะโชคณกุล. 2543. พันธุวิศวกรรม ปฏิบัติการเบื้องต้น. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์.
- ศิริวรรณ สุทธิจิตต์ และไมตรี สุทธิจิตต์. 2545. “เห็ดสมุนไพโร: จากอดีต สู่ปัจจุบันและอนาคต.” เห็ดไทย. 1-11.
- ณัฐภรณ์ เวียนงาม. 2546. ความผันแปรทางพันธุกรรมของกลุ่มเห็ดดินแรดในบางพื้นที่ของประเทศไทย ด้วยเทคนิค PCR - RFLP. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยี ชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- นุสรุา เฟิงใหญ่. 2547. ระบบการผสมพันธุ์และอินคอมแพทIBILิตี้อัลลีลของเห็ดดินแรด. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบัน เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- พรทิพย์ ภูมิเกล้า. 2546. การศึกษาความผันแปรของลักษณะพันธุกรรมของเห็ดดินแรดด้วยเทคนิค ไอ โซไซม์. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิต วิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- Ayago Tanaka, Kazuhiro Miyazaki, Haruki Murakami and Susumu Shiraishi. 2004. “Sequence characterized amplified region markers tightly linked to the mating factors of *Lentinula edodes*.” Genome. 47(1) : 156-162

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Flemming Lund, Anni Bech Neilsen and Pernille Skouboe. 2002. "Distribution of *Penicillium commune* isolates in cheese dairies mapped using secondary metabolite profiles, morphotypes, RAPD and RFLP fingerprinting." *Food Microbiology*. 20(2003): 725-734.
- Maki. 2001. Analyses of genetic variability in *Lentinula edodes* through mycelia responses to different abiotic conditions and RAPD molecular markers. : 1517-8382
- Nelson Barros Coluato, Eutstacio souza Dias, Marcos Aparecido Gimenés and Augusto Ferreira da Eira. 2002. "Genetic Characterization of isolates of the Basidiomycete *Agaricus blazei* by RAPD." *Departamento de Biologia : Universidade Federal de Lavras*.
- Saghai – Maroof, M.A. et. al. 1989. *Fungal DNA Isolation*. MSU – DOE plant Research Laboratory Press, Michigan.
- Siu-Wai Chiu, Ai-Manma, Fang-Can Lin and David Moore. 1996. "Genetic homogeneity of cultivated strains of Shitake (*Lentinula edodes*) used in China as revealed by the polymerase chain reaction." *Mycological Research*. 100(11) : 1393-1399.
- Weir, A. and Blackwell, M. 2001. "Molecular data support the Laboulbeniales as a separate class of Ascomycota, Laboulbeniomycetes. *Mycological research*. 105 (10) : 1182 – 1190.
- Yasuhiro ITO and Sonoe O. YANAGI. 1999. "Discrimination of the Basidiomycete Species and strains by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis." *Biological Function Division. National Food Research Institute. Japan*. 305-8642.
- Yinfang Zhang and Francis I. Nolina. 1995. "Strain typing of *Lentinula edodes* by Random Amplified Polymorphic DNA assay." *FEMS Microbiology Letters*. 131(1995) : 17-20.

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเส้นใยเห็ด

1. PDA (potato dextrose agar)

PDB	24	กรัมต่อลิตร
Agar	16	กรัมต่อลิตร

2. PDYB (potato dextrose yeast broth)

PDB	24	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	5	กรัมต่อลิตร



ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

3M Sodium acetate

ชั่ง Sodium acetate 3 H₂O 408.1 กรัม ละลายในน้ำ 750 มิลลิลิตร เติม glacial acetic acid จนกระทั่งได้ pH 5.2 ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร และนึ่งฆ่าเชื้อโดยการ autoclave

1M Tris-HCl

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

TE buffer

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

0.5 M EDTA

disodium ethylenediaminetetraacetate 2 H₂O 186.1 กรัม ในน้ำ 800 มิลลิลิตร ใช้ magnetic stirrer หมุนช่วยละลายปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย NaOH ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร และนึ่งฆ่าเชื้อโดยการ autoclave

Extraction buffer

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

5 M NaCl

ละลาย sodium chloride 292.2 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร และนึ่งฆ่าเชื้อโดยการ autoclave

5 X TBE

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

ภาคผนวก ก

ตารางภาคผนวก ก ลำดับเบสไพรเมอร์ที่นำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหีดยีนแรก

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

