สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษารูปแบบไอโซไซม์เพื่อทดสอบความเป็น พ่อ แม่ ลูก ระหว่างลูกผสมของเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว

นายเทพบุตร ดีรักษาพร
นางสาวประพิณศรา สอนเล็ก
นายแสงชัย ศรีประโคน

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2540

ว/ท.
ท614 ก
เลขหมู่ 2540
เลขทะเบียน 30607
วัน, เดือน, ปี 28 ก.ค. 2541

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Isozyme Studies on Relationship between Fusants and their Parents – *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler and *Lentinus squarrosulus* (Mont.) Pegler

Mr. Theppaboot Deeraksaporn
Miss Prapinsara Sornlek
Mr. Sangchai Sriprakone

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 1997

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษารูปแบบไอโซไซม์เพื่อทดสอบความเป็นพ่อ แม่ ลูก ระหว่างลูกผสมของเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว

โดย นายเท่พบุตร ดีรักษาพร
นางสาวประพิณศรา สอนเล็ก
นายแสงชัย ศรีประโคน

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ. ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต
ผศ. มาลินี ตันติยาภรณ์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต

..... หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
(รศ. ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต)

คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

..... ประธานกรรมการ
(อาจารย์อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม)

..... กรรมการ
(ผศ. มาลินี ตันติยาภรณ์)

..... กรรมการ
(รศ. ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษารูปแบบไอโซไซม์เพื่อทดสอบความเป็นพ่อ แม่ ลูก ระหว่างลูกผสมของเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว

โดย นายเทพบุตร ดีรักษาพร
นางสาวประพิณศรา สอนเล็ก
นายแสงชัย ศรีประโคน

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ. ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต
ผศ. มาลินี ตันติยาภรณ์

ปีการศึกษา 2540

บทคัดย่อ

ลูกผสมจากการรวมโปรโตพลาสต์ (fusant) ระหว่างเห็ดหอม (*Lentinula edodes*) และเห็ดขอนขาว (*Lentinus squarrsulus*) ที่สามารถคัดเลือกออกมาได้โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา 3 สายพันธุ์ได้แก่ PP_1 PP_2 และ PP_3 เมื่อนำมาศึกษารูปแบบของไอโซไซม์โดยเทคนิค vertical polyacrylamide gel electrophoresis เพื่อบ่งบอกลักษณะทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์พ่อ แม่ และลูกผสม พบว่ารูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ MDH สามารถบ่งบอกความสัมพันธ์ระหว่างเห็ดหอมและเห็ดขอนขาวกับเห็ดลูกผสมได้ ส่วนรูปแบบของ SKDH ไม่สามารถอ่านไซโมแกรมได้เนื่องจากมีแถบสีที่ไม่ชัดเจน รูปแบบของ EST ไม่สามารถบ่งบอกความแตกต่างได้เนื่องจากมีไซโมแกรมที่ตรงกัน นอกจากนั้นไม่พบรูปแบบของเอนไซม์ 3 ชนิดซึ่งได้แก่ DIA FDH และ 6-PGDH

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Isozyme Studies on Relationship between Fusants and their Parents — *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler and *Lentinus squarrosulus* (Mont.) Pegler
Name	Mr. Theppaboot Deeraksaporn Miss Prapinsara Sornlek Mr. Sangchai Sriprakone
Special Project Adviser	Associate Professor Dr. Pannee Dhitaphichit Assistant Professor Malinee Tantiyaporn
Department	Applied Biology
Academic Year	1997

Abstract

Three fusants from protoplast fusion (PP_1, PP_2 and PP_3) between *Lentinula edodes* and *Lentinus squarrosulus* were selected by morphological characteristics. Isozyme patterns were used to study the genetic variations between fusants and their parents. Vertical PAGE technique was used. It was found that the relationship between fusants and their parents could be described by MDH zymograms; however, the SKDH zymograms were not clear, while that of EST could not be identified because they were all alike. Finally, the other 3 systems namely: DIA, FDH and 6-PGDH could not be identified due to their non-stained bands.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต อาจารย์ที่ปรึกษาที่กรุณาช่วยเหลือแนะนำ ชี้แนะแนวทางในการศึกษาวิจัย ให้ความรู้ ให้กำลังใจ ตรวจและแก้ไขวิทยานิพนธ์นี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ. มาลินี ตันติยาภรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่กรุณาเอื้อเฟื้อสารเคมีสำหรับใช้ในการวิจัย และให้คำปรึกษาในการทำการทดลองและวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบังทุกๆ ท่านที่กรุณาช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในทุกๆ ด้านเป็นอย่างดี

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และพี่ๆ น้องๆ ทุกคนที่คอยเป็นกำลังใจให้เสมอมา

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2541

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่	
1. บทนำ	1
2. ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง	3
3. การดำเนินการวิจัย	18
4. ผลการทดลอง	24
5. วิจารณ์ผลการทดลอง	28
6. สรุปผลการทดลอง	30
ภาคผนวก ก.	31
ภาคผนวก ข.	32
ภาคผนวก ค.	34
เอกสารอ้างอิง	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	แสดงลักษณะของไซโมแกรมของ homozygote และ heterozygote ของเอนไซม์ที่เป็น monomer, dimer, trimer และ tetramer	17
ตารางที่ 2	วิธีเตรียม buffer	32
ตารางที่ 3	การเตรียม polyacrylamide gel ที่เปอร์เซ็นต์ต่างๆ กัน	33
ตารางที่ 4	สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบในการศึกษาแถบของเอนไซม์	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 1	แสดงแรงกระทำต่างๆ ที่มีต่อโมเลกุลที่มีประจุในสนามไฟฟ้า	8
รูปที่ 2	แสดงผลของ pH ที่มีต่อการแสดงประจุของหมู่อะมิโน และคาร์บอกซิลของไกลซีน	9
รูปที่ 3	การเกิด polymerization	11
รูปที่ 4	Electrophoresis แบบต่างๆ	13
รูปที่ 5	แสดงเครื่อง pack gel และอุปกรณ์ที่ใช้ในการ pack gel	19
รูปที่ 6	แสดงชุดอุปกรณ์อิเล็คโตรฟอริซิส ประกอบด้วย เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply) และกล่องใส่บัฟเฟอร์ และขั้วไฟฟ้า (chamber and electrode)	19
รูปที่ 7	แสดงลักษณะของเส้นใยเห็ดในอาหารเหลวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงก่อนนำมาสกัดเอนไซม์	21
รูปที่ 8	แสดงไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์ Malate dehydrogenase (MDH)	25
รูปที่ 9	แสดงไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์ Esterase (EST)	26
รูปที่10	แสดงไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์ Shikimate dehydrogenase (SKDH)	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ

การรวมโปรโตพลาสต์ระหว่างเห็ดหอม (*Lentinula edodes*) และเห็ดขอนขาว (*Lentinus squarrsulus*) เป็นการปรับปรุงสายพันธุ์ของเห็ดเพื่อให้ได้ลูกผสม (fusant) ที่มีลักษณะเด่นของทั้งสองฝ่ายออกมา ซึ่งจะทำให้ได้สายพันธุ์ที่เหมาะกับสภาพแวดล้อมและให้ผลผลิตสูง โดยเห็ดหอมจะเป็นเห็ดที่มีรสชาติดี มีกลิ่นหอมและมีสรรพคุณเป็นยาสมุนไพร ซึ่งพันธุ์เห็ดหอมที่เพาะเลี้ยงในประเทศไทยนั้นต้องนำเข้าจากต่างประเทศ เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในประเทศไทยจะได้ผลผลิตไม่ดี เนื่องจากสภาวะไม่เหมาะสม ส่วนเห็ดขอนขาวนั้นเป็นเห็ดที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีภายใต้สภาวะแวดล้อมในเขตร้อนอย่างประเทศไทย แต่มีรสชาติไม่ดีเพราะเมื่อดอกแก่จะเหนียวมากจึงต้องรับประทานเมื่อเป็นดอกอ่อนมากๆ นอกจากนี้สรรพคุณทางยาหรือคุณค่าทางอาหารยังไม่มีผู้รายงาน (พรรณีและประภัสสร,2539)

การบ่งชี้ว่าลูกผสมที่คัดเลือกได้นั้นได้รับการถ่ายทอดยีนจากสายพันธุ์ของพ่อและแม่จริงนั้นจะต้องมีการตรวจสอบซึ่งทำได้หลายวิธีด้วยกัน เช่น การทดสอบสันฐานวิทยาของเห็ด การหาปริมาณ DNA ภายในเซลล์ การย้อมสีนิวเคลียส การวิเคราะห์ DNA hybridization โดยมีตัวติดตาม (probe) ที่เหมาะสม การวิเคราะห์แบบอย่างของไอโซไซม์(isozyme pattern) โดยวิธีอิเล็คโตรโฟริซิสสำหรับโปรตีน เป็นต้น (ประภัสสร,2539)

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษา เพื่อพิสูจน์ว่าลูกผสมที่ได้จากการรวมโปรโตพลาสต์เป็นลูกผสมที่เกิดจากสายพันธุ์พ่อและแม่จริงหรือไม่ โดยวิธีการวิเคราะห์แบบอย่างไอโซไซม์โดยวิธีอิเล็คโตรโฟริซิสสำหรับโปรตีนของพ่อแม่เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ลูกผสมที่คัดเลือกได้สามสายพันธุ์คือ PP_1 PP_2 และ PP_3

วัตถุประสงค์

1. เพื่อพิสูจน์ความเป็นพ่อ แม่ ลูกของเห็ดลูกผสมระหว่างเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว
2. เพื่อวิเคราะห์รูปแบบของไอโซไซม์ โดยวิธีอิเล็คโตรโฟริซิส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขอบเขต

ศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของฟิวแซนต์ (fusants) ซึ่งเกิดจากการรวมโปรโตพลาสต์ของเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว ซึ่งได้แก่ สายพันธุ์ PP_1, PP_2 และ PP_3 แล้วเปรียบเทียบกันระหว่างพันธุ์ลูกผสมกับพันธุ์เห็ดหอมและเห็ดขอนขาว

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ของเห็ดลูกผสมที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการรวมโปรโตพลาสต์ของเห็ดหอมและเห็ดขอนขาวว่าเกิดจากการรวมโปรโตพลาสต์จริงหรือไม่อย่างไร
2. ได้เรียนรู้เทคนิคในการสกัดเอนไซม์จากเส้นใยเห็ดและเทคนิคการทำอิเล็คโตรโฟริซิส
3. เพื่อเป็นแนวทางสำหรับการศึกษารูปแบบไอโซไซม์สำหรับเห็ดราชนิดอื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง

เห็ดหอมมีชื่อสามัญเรียกแตกต่างกันไปตามแต่ละประเทศ เช่นประเทศญี่ปุ่นถือว่าเห็ดหอมขึ้นอยู่กับไม้โอ๊คหรือไม้ก่อ ซึ่งทางญี่ปุ่นเรียกว่า "ไม้ไชอิ" (shii) ส่วนคำว่าเห็ดนั้นคือ "ตาเกะ"(ta - ke) จึงเรียกเห็ดหอมว่า "ไชอิตาเกะ" (shii - take) ฯลฯ ชื่อวิทยาศาสตร์ของเห็ดหอมคือ *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (Pegler,1983) ดังการจัดจำแนก (classification) ดังนี้

ชื่อวิทยาศาสตร์		*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler
ชื่อสามัญ	(ไทย)	เห็ดหอม
	(อังกฤษ)	Chinese Mushroom, Japanese Mushroom, Shiitake.

Kingdom ..... Fungi
Division ..... Amastigomycota
Subdivision ..... Basidiomycotina
Class ..... Basidiomycetes
Subclass ..... Holobasidiomycetidae II
Order ..... Agaricales
Family ..... Tricholomataceae
Genus ..... *Lentinula*
Species ..... *edodes*

เห็ดหอมเป็นเห็ดที่มีความสำคัญชนิดหนึ่ง เนื่องจากเป็นเห็ดที่มีรสชาติดีมีกลิ่นหอมและมีคุณค่าทางโภชนาการสูง นอกจากนั้นยังมีสรรพคุณทางยาสามารถป้องกันโรค เช่น ลดการสะสมของไขมันในหลอดเลือด ความดันโลหิตสูง มีสารต่อต้านเนื้องอกไวรัสและมะเร็ง

นอกจากคุณค่าทางอาหารในเห็ดหอมที่มีอยู่สูงแล้ว เห็ดหอมยังมีคุณสมบัติพิเศษคือมีกลิ่นหอมเฉพาะตัวไม่ว่าจะอยู่ในสภาพของดอกสดหรือแห้ง สารที่ทำให้มีกลิ่นหอมคือ Guanosine 5′ - monophosphate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประเทศที่ส่งออกเห็ดหอมมากได้แก่ ญี่ปุ่น, จีน, ไต้หวัน, และเกาหลีซึ่งมีผลผลิตรวมกันมากกว่า 95% ของผลผลิตเห็ดหอมทั้งโลก ประเทศไทยก็เป็นอีกประเทศหนึ่งที่มีการทำการเพาะเลี้ยงเห็ดหอมในเชิงพาณิชย์นี้ด้วยเช่นเดียวกัน

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดหอมมีดังนี้

ดอกเห็ด (cap, pileus) มีขนาด 1.0 - 5.1 ซม. มีรูปร่างนูน (convex) จนถึงเกือบแบนราบ ผิวของหมวกดอก (cuticle) มีสีน้ำตาลออกแดงตั้งแต่อ่อนจนถึงเข้ม เนื้อมีสีขาวหรือออกสีน้ำตาลในบริเวณใกล้ส่วนเคลือบผิว ครีบดอก (lamellae) ติดกับก้านดอกแบบ adnate ก้านดอก (stalk, stipe) กว้าง 0.5 - 1.4 ซม. และมีความยาว 2.0 - 4.4 ซม. มีความกว้างเกือบเท่ากันตลอดทั้งก้านหรืออาจใหญ่ตรงโคนก้าน บริเวณผิวมีเยื่อบางๆ คล้ายขนปกคลุม สปอร์พิมพ์มีสีขาวขุ่น ผลการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายใน พบว่าเส้นใยมีความกว้าง 2.0 ± 0.50 μ มี clamp connection และ septum ที่เห็นได้อย่างชัดเจน ในแถวของ hymenium ไม่มี cystidium และ basidium มี 4 สปอร์ (basidiospore) ซึ่งอยู่บน sterigma สปอร์มีขนาด $2.4\pm0.10 \times 5.2\pm0.15$ μ รูปร่างค่อนข้างรี (subcylidric) ผิวเรียบ ผนังบางและใส

เห็ดขอนขาว (*Lentinus Squarrosulus* (Mont.) Pegler) เป็นชื่อของเห็ดป่าชนิดหนึ่งที่เรียกกันในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ, ภาคเหนือ และภาคใต้ของประเทศไทย ส่วนภาคกลางเรียกเห็ดมะม่วง เป็นเห็ดที่ชอบขึ้นบนขอนไม้ตระกูลเต็งรังและมะม่วง เป็นเห็ดป่าที่นิยมรับประทานกันมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคเหนือ มีลักษณะคล้ายเห็ดบด (เห็ดลม, เห็ดกระด้าง, เห็ดขอนขาวสีน้ำตาลหรือ *Lentinus praerigidus*) ดอกอ่อนมีรสหวาน แต่เนื้อเหนียวคล้ายเนื้อสัตว์และความเหนียวจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อดอกแก่ขึ้น มีราคาแพงกว่าเห็ดที่เพาะเลี้ยงหลายชนิดเช่น เห็ดนางฟ้า ในปัจจุบันการศึกษาในด้านต่างๆ เกี่ยวกับเห็ดขอนขาวยังแทบจะไม่มีรายงานเผยแพร่ พรรณี และประภัสสร (2539) ได้ตรวจเอกลักษณ์ (identify) ของเห็ดขอนขาวและพบว่าเห็ดขอนขาวควรเป็นเห็ดจำพวก agarics ที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Lentinus squarrosulus* (Mont.) Pegler (Pegler, 1986)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดขอนขาวมีดังต่อไปนี้

ดอกเห็ดมีขนาด 1.8 - 10.2 ซม. มีสีขาวนวลหรือสีครีมถึงสีเหลืองอ่อน ในระยะดอกอ่อนขอบหมวกดอกจะม้วนงอลงเล็กน้อย แต่เมื่อดอกบานเต็มที่ขอบหมวกจะม้วนงอลงจนมีลักษณะคล้ายแตร (infundibuliform) ตรงกลางหมวกดอกบุ๋มลึกลงไปเกือบครึ่งดอก ครีบดอกติดกับก้านดอกแบบ decurrent ผิวด้านบนของดอกเห็ดจะมีขนสีน้ำตาลอ่อนละเอียดปกคลุมทั่วเนื้อหมวกเห็ดบาง ก้านดอก มีสีเดียวกับดอกเห็ด เนื้อเหนียวแน่น ผิวไม่เรียบ มักขึ้นอยู่บนขอนไม้เป็นกระจุกโดยมีโคนก้านดอกติดกัน ก้านดอกมีความกว้าง 0.8 - 1.5 ซม. และมีความยาว 2.0 - 8.0 ซม. สปอร์พิมพ์มีสีขาวครีม ผลการศึกษาลักษณะภายใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่าเส้นใยมีความกว้าง 3±0.10 μ มี clamp connection ที่เรียงสลับข้างและสามารถมองเห็น septum ได้อย่างชัดเจน นอกจากนี้ยังพบ pseudocystidium ที่มีขนาด 3±0.10×16±0.45 μ แทรกอยู่ระหว่าง basidium (ขนาด 4±0.10 × 12±0.30 μ) ซึ่งมี sterigma 4 อัน สปอร์มีขนาด 3±0.05 × 8±0.10 μ และมีสีใส รูปรียาว ผนังบางและเรียบ เมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เซลล์ที่ประกอบกันเป็นเส้นใยจะสร้างผนังหนาขึ้นห่อหุ้มเกิดเป็น chlamydospore ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 12.5±0.50

จากข้อมูลดังกล่าวจึงได้มีผู้ทำการศึกษาการรวมโปรโตพลาสต์ของเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว (ประภัสสร) เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ของเห็ดหอมและเห็ดขอนขาวให้ได้สายพันธุ์ลูกผสม ซึ่งจากการทำการทดลองนี้ปรากฏว่าได้ฟิวแซนท์ออกมา 3 สายพันธุ์ด้วยกันคือ สายพันธุ์ PP_1, PP_2 และ PP_3 และในการศึกษานี้ยังได้มีการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสายพันธุ์ฟิวแซนท์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่แล้วปรากฏว่า สายพันธุ์ PP_1 และ PP_2 น่าจะเป็นลูกผสมระหว่างเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว ส่วน PP_3 น่าจะเป็นผลมาจากการรวมโปรโตพลาสต์ของเห็ดหอมกับเห็ดหอมด้วยกัน งานวิจัยครั้งนี้จึงมีความประสงค์จะตรวจวิเคราะห์รูปแบบของไอโซไซม์เพื่อพิสูจน์ว่า PP_1, PP_2, และ PP_3 เป็นลูกผสมระหว่างเห็ดหอมและเห็ดขอนขาวหรือไม่อย่างไร

เทคนิคไอโซไซม์(Isozyme technique)

การศึกษาลักษณะความปรวนแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) ของสิ่งมีชีวิตสามารถศึกษาได้จากการทำงานของเอนไซม์ในสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ เพราะเอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งนั้นเป็นผลจากการทำงานของยีนโดยวิธีการสังเคราะห์โปรตีน (protein synthesis) โดยพบว่าเอนไซม์บางชนิดประกอบด้วยโปรตีนที่มีรูปร่างของโมเลกุล แตกต่างกันแต่สามารถเร่งปฏิกิริยาเดียวกัน ในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันได้ เรียกว่าไอโซไซม์ (isozyme) ไอโซไซม์ที่พบในเซลล์เดียวกันหรือระหว่างเซลล์ของเนื้อเยื่อที่แตกต่างกันหรือระยะของการพัฒนาที่ต่างกันก็อาจมีรูปแบบต่างกันได้ การเกิดไอโซไซม์อาจเกิดขึ้นที่โครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) โดยเกิดจากยีนหลายยีนที่แปลรหัสให้โครงสร้างของสายโพลีเปปไทด์ของเอนไซม์แตกต่างกันหรืออาจเกิดจากหลายอัลลีลที่ตำแหน่งเดียวกันหรืออาจเกิดจากโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงหลังสร้างโครงสร้างปฐมภูมิแล้ว เช่นการเติมหมู่อะมิโน (amino group) หรือหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) หรือหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ในสายโพลีเปปไทด์ หรืออาจมีการเชื่อมกับ prosthetic group อื่นๆ เช่น ไขมัน คาร์โบไฮเดรต แต่การเปลี่ยนแปลงนี้ไม่ใช่ส่วนจำเป็นในการทำงานของเอนไซม์ ดังนั้นไอโซไซม์ยังคงมีหน้าที่เหมือนเดิม แต่มีรูปร่างโมเลกุลที่ต่างไปเท่านั้น (Shannon, 1968 และ Scandalious, 1974) การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้เกิดจากพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่เป็นคุณสมบัติของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยตรง ดังนั้นการศึกษาไอโซไซม์จึงสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ได้ และการศึกษาไอโซไซม์ในปัจจุบันก็สามารถทำได้ง่ายโดยสกัดจากตัวอย่างสด (crude extract) แล้วนำมาใช้ได้โดยตรงไม่ต้องทำให้บริสุทธิ ใช้ปริมาณน้อยในการตรวจสอบสามารถตรวจสอบพร้อมๆ กันได้หลายตัวอย่างสะดวกในการเปรียบเทียบ ให้ผลแม่นยำ ตัวกลางที่ใช้ในการทำอิเล็คโตรโฟริซิสแบบเจล (gel electrophoresis) มีหลายชนิดเช่น เจลแป้ง (potato starch gel) โพลีอคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) อะกาโรสเจล (agarose gel) อะกาโรส - อะคริลาไมด์เจล (agarose - acrylamide gel) (อาภัสสรา, 2537) ซึ่งสารแต่ละชนิดมีคุณสมบัติและประสิทธิภาพในการแยกสารได้ต่างๆ กัน และขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ที่จะแยกด้วยชนิดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดคือ โพลีอคริลาไมด์เจลแต่เป็นพิษสูง เจลแป้งเป็นตัวกลางอีกชนิดหนึ่งที่นิยมใช้ในปัจจุบันเนื่องจากเตรียมง่าย เป็นพิษน้อยกว่า ได้จำนวนตัวอย่างมากและวิเคราะห์เอนไซม์ได้หลายชนิดต่อหนึ่งแผ่นเจล และให้แถบของเอนไซม์น้อยสามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมได้ง่าย

คำจำกัดความ(Terminology)

isozyme(isoenzyme)	เมื่อเอนไซม์ปรากฏในลักษณะที่มีการผันแปรของ separable molecular หลายรูปแบบซึ่งแต่ละรูปแบบนั้น เรียกว่า isozyme enzyme คือ โปรตีนประกอบด้วย amino acid ซึ่งลำดับของ amino acid ที่ประกอบกันเป็นโปรตีน ถูกควบคุมด้วยลำดับของ DNA nucleotides ในหน่วยพันธุกรรม (ยีน)
isozyme technique	การใช้ประจุ และหรือขนาดของ isozyme molecules ที่แตกต่างกันแยกจากกันใน gel ในการทำ gel electrophoresis โปรตีนที่คุณสมบัติทางเคมีที่คล้ายคลึงกัน จะสามารถแยกออกจากกันได้
zymogram	isozyme (banding) pattern ซึ่งเกิดจากการย้อมสีของ enzyme ที่จำเพาะของโปรตีนที่ถูกแยกออกจากกันหลังจากการทำ gel electrophoresis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลักการและเทคนิคทาง Electrophoresis

วิธีการแยกสารชีวโมเลกุลโดยทั่วๆ ไปมักอาศัยความแตกต่างของขนาดประจุและคุณสมบัติจำเพาะทางชีวภาพหรือทางเคมีของสารนั้น Electrophoresis เป็นเทคนิคหนึ่งที่มีประโยชน์และใช้กันแพร่หลายในหมู่นักวิจัยด้านชีวเคมี ในที่นี้จะขอกล่าวถึงหลักการพื้นฐานทั่วๆ ไปของ electrophoresis โดยเฉพาะ polyacrylamide gel electrophoresis ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์และใช้มากในการวิเคราะห์โปรตีนและ isoenyme

Electrophoresis เป็นวิธีการทางชีวเคมีที่แยกสารออกจากกันในสนามไฟฟ้า โดยอาศัยความแตกต่างของชนิดและปริมาณของประจุ ในบางกรณีก็รวมทั้งขนาดและรูปร่างของสารตัวอย่างที่ต้องการแยกด้วย นอกจากนี้ยังมีปัจจัยร่วมอื่นๆ ที่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ (migrating rate) ของสารในการทำ electrophoresis อีกหลายประการ

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำ Electrophoresis

1. <u>คุณสมบัติของสารตัวอย่าง</u>

1.1<u>ชนิดและปริมาณของประจุ</u> ชนิดของประจุของโมเลกุลจะเป็นตัวกำหนดทิศทางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้า เช่น โมเลกุลที่มีประจุบวกจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วลบ และในทางตรงกันข้ามโมเลกุลที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวกของสนามไฟฟ้า นอกจากนี้ปริมาณของประจุจะมีผลต่ออัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้าด้วย กล่าวคือ โมเลกุลที่มีประจุมาก เช่น -3 จะเคลื่อนที่ไปยังขั้วบวกได้เร็วกว่าโมเลกุลที่มีประจุ -1 เป็นต้น ชนิดและปริมาณของประจุของสารนี้มีความสัมพันธ์โดยตรงกับภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของ buffer ของสารตัวอย่างนั้น

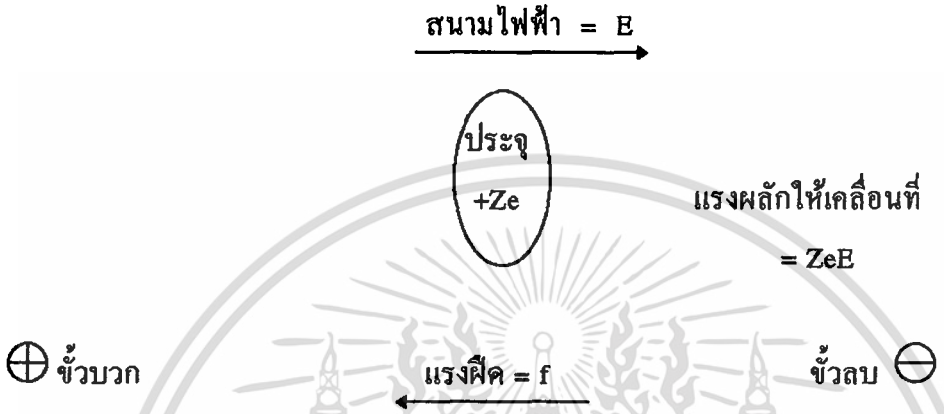
1.2<u>ขนาดของโมเลกุล</u> โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่จะมีแรงเสียดทาน (frictrion) และ electrostatic force ซึ่งเกิดกับตัวกลางแวดล้อม (surrounding medium) สูงกว่าโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก ดังนั้นอัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ จึงช้ากว่าโมเลกุลที่มีขนาดเล็ก

1.3<u>รูปร่างของโมเลกุล</u> โมเลกุลที่มีรูปร่างต่างกันจะเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วที่ต่างกัน โมเลกุลที่มีรูปร่างทรงกลม (spherical หรือ globular shape) จะเคลื่อนที่ได้ดีกว่าโมเลกุลที่มีรูปร่างยาวรี หรือ fibrous shape ทั้งนี้เนื่องจากแรกเสียดทานและ electrostatic force ที่เกิดกับสารที่มีรูปร่างไม่เหมือนกันจะต่างกันนั่นเอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. <u>สนามไฟฟ้า</u>

อัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้าเป็นสัดส่วนโดยตรงกับกระแสไฟฟ้า ความต่างศักย์และระยะเวลาในการทำอิเล็คโตรโฟริซิส แต่แปรผกผันกับความต้านทานไฟฟ้า



รูปที่ 1 แสดงแรงกระทำต่างๆ ที่มีต่อโมเลกุลที่มีประจุในสนามไฟฟ้า

เมื่อ Z = จำนวนประจุบนโมเลกุล

e = หน่วยอิเล็คตรอนสถิตในหนึ่งหน่วยประจุ

E = ความแรงของสนามไฟฟ้า (โวลต์/เซนติเมตร)

v = ความเร็วของโมเลกุลที่เคลื่อนที่ไปด้วยความสม่ำเสมอ (เซนติเมตร/วินาที)

จากรูปที่ 1 จะเห็นว่าที่ความเร็วปลาย

แรงที่เกิดจากสนามไฟฟ้า = แรงฝืด

$ZeE = fv$

$v/E = Ze/f$

อัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลต่อหน่วยสนามไฟฟ้า = Ze/f

(Electrophoretic Mobility)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถึงแม้อัตราการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้าจะขึ้นอยู่กับความแรงของสนามไฟฟ้าที่ใช้ แต่การใช้กำลังไฟฟ้าที่สูงเกินไปในการทำอิเล็คโตรโฟริซิสจะทำให้เกิดผลเสียได้หลายประการคือ ทำให้เกิดการระเหยของสารละลายและทำให้เกิดความร้อนสูงในระหว่างทำอิเล็คโตรโฟริซิส ซึ่งทำให้เกิดการ diffusion ของโมเลกุลและผลของการแยกสารจะไม่ดีเท่าที่ควร โดยเฉพาะในกรณีที่ทำอิเล็คโตรโฟริซิสของสารที่เสียสภาพธรรมชาติ (denaturation) ได้ง่ายเมื่อถูกความร้อน เช่น เอนไซม์ ก็อาจทำให้เอนไซม์นั้นเสียสภาพและหมดประสิทธิภาพในการทำงาน (enzyme activity) ได้ ในทางตรงกันข้ามหากใช้กำลังไฟฟ้าที่ต่ำเกินไป ถึงแม้จะช่วยลดปัญหาความร้อนที่เกิดขึ้น แต่ผลของการทำอิเล็คโตรโฟริซิสจะไม่ดี เนื่องจากต้องใช้เวลาในการทำนานขึ้น ซึ่งเป็นการเพิ่มอัตราการเกิด diffusion ของสารเช่นกัน ดังนั้นเพื่อให้ได้ผลที่ดีจึงควรเลือกใช้กระแสหรือความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมด้วย

3. Buffer

Buffer นอกจากทำหน้าที่รักษาสภาวะความเป็นกรด-ด่าง ของตัวกลางค้ำจุน (supporting medium) และเป็นตัวทำละลายของสารตัวอย่างแล้ว Buffer ยังเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามไฟฟ้าอีกด้วย คือ

3.1 ความเป็นกรด-ด่างของ buffer เนื่องจากชีวโมเลกุลโดยทั่วไปไม่ว่าจะเป็นโปรตีนหรือกรดนิวคลีอิค มักมีหมู่ที่แสดงประจุบวกและลบอยู่ในโมเลกุล ซึ่งมีค่าการแตกตัว (dissociation constant, pK) ต่างๆ กัน การแตกตัวของหมู่ประจุเหล่านี้ขึ้นอยู่กับ pH ของสารละลายนั้น เช่น ไกลซีน มีหมู่อะมิโน (NH^+_3) และคาร์บอกซิล (COOH) ซึ่งมีค่าการแตกตัวที่ 9.6 และ 2.34 ตามลำดับ จากรูปที่ 2 จะเห็นได้ว่าประจุสุทธิของไกลซีนจะเปลี่ยนไปเมื่ออยู่ใน buffer ที่มี pH ต่างๆ กัน ดังนั้น pH ของ buffer จึงมีบทบาทสำคัญในการกำหนดชนิดและปริมาณของประจุของสาร

$^+H_3N\text{-}CH_2\text{-}COOH \rightleftarrows {}^+H_3N\text{-}CH_2\text{-}COO^- \rightleftarrows H_2N\text{-}CH_2\text{-}COO^-$

pH ของสารละลาย	acidic	isotonic	alkaline
Ionic form	cation	Zwitterion	anion
ประจุสุทธิ	-	0	+
ทิศทางการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า	towards cathode	stationary	towards anode

รูปที่ 2 แสดงผลของ pH ที่มีต่อการแสดงประจุของหมู่อะมิโนและคาร์บอกซิลของไกลซีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 Ionic strength ของ buffer การเคลื่อนที่ของสารที่มีประจุในสนามไฟฟ้าแปรผกผันกับรากที่สองของ ionic strength นั่นคือสารชนิดเดียวกันจะเคลื่อนที่ใน buffer ที่มี ionic strength ต่ำได้ดีกว่าใน buffer ที่มี ionic strength สูง แต่ในขณะเดียวกัน การทำ electrophoresis ใน buffer ที่มี ionic strength สูง จะได้แถบ (band) ของการแยกคมชัดกว่าเมื่อใช้ buffer ที่มี ionic strength ต่ำ

Ionic strength ของ buffer นอกจากมีความสำคัญดังกล่าวแล้วยังเกี่ยวข้องกับความร้อนที่เกิดขึ้นในระหว่างทำ electrophoresis ด้วย คือ ถึงแม้การใช้ buffer ที่มี ionic strength สูงจะทำให้ได้การแยกตัวของสารที่คมชัดก็ตาม แต่ก็ทำให้เกิดความร้อนสูง ซึ่งเป็นผลเสียต่อการทำ electrophoresis เนื่องจากความร้อนที่เพิ่มสูงขึ้นนี้จะเพิ่มการ diffusion และอัตราการเคลื่อนที่ของอิออนประมาณ 2.4% ต่ออุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น 1° นอกจากนี้ความร้อนที่เกิดขึ้นยังไปลดความหนืดของตัวค้ำจุน ทำให้ความต้านทานไฟฟ้าลดลง ซึ่งเป็นผลให้กระแสไฟฟ้าเพิ่มขึ้น (V =IR, เมื่อใช้ constant voltage) และทำให้เกิดความร้อนเพิ่มขึ้นต่อเนื่องกันไปอีก ดังนั้นเพื่อที่จะให้ได้ผลดีควรคำนึงถึง ionic strength ของ buffer ที่ใช้ด้วย โดยปกติจะใช้ buffer ที่มี ionic strength ระหว่าง 0.05-0.10 mole/lit

4. ตัวกลางค้ำจุน

การเลือกใช้ตัวกลางค้ำจุนให้เหมาะสมกับสารตัวอย่างที่ต้องการแยกโดยวิธี electrophoresis มีผลต่อการแยกของสาร เพราะตัวกลางค้ำจุนบางชนิดอาจทำให้เกิดการดูดซับ (adsorption) ระหว่างสารตัวอย่างกับตัวกลางค้ำจุน หรืออาจมีการแลกเปลี่ยนประจุของสารตัวอย่างกับตัวกลางค้ำจุนได้ รวมทั้งความไม่เป็นเนื้อเดียวกัน (inhomogenesis) ของตัวค้ำจุน สิ่งเหล่านี้มีผลต่อการแยกของสารโดยวิธีนี้ทั้งสิ้น โดยเฉพาะการเกิด electroendosmosis ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นจากประจุของตัวค้ำจุนเอง

จะเห็นได้ว่าตัวกลางค้ำจุนมีบทบาทสำคัญต่อการแยกสารโดยวิธี electrophoresis ไม่ยิ่งหย่อนไปกว่าปัจจัยอื่นๆ ที่ได้กล่าวมาแล้ว ตัวกลางค้ำจุนที่ดีควรมีลักษณะทั่วไปดังนี้

- ไม่ไวในการทำปฏิกิริยา
- ยอมให้สารตัวอย่างผ่านได้อย่างรวดเร็ว
- สามารถแยกสารตัวอย่างได้ชัดเจน
- สามารถถูกแยกเป็นส่วนๆ ได้ง่าย

ตัวกลางค้ำจุนมีหลายชนิด จะเลือกใช้ชนิดใดนั้นขึ้นอยู่กับลักษณะของการทดลองและชนิดของสารที่ต้องการแยก แต่ในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะการทำ polyacrylamide gel เท่านั้น

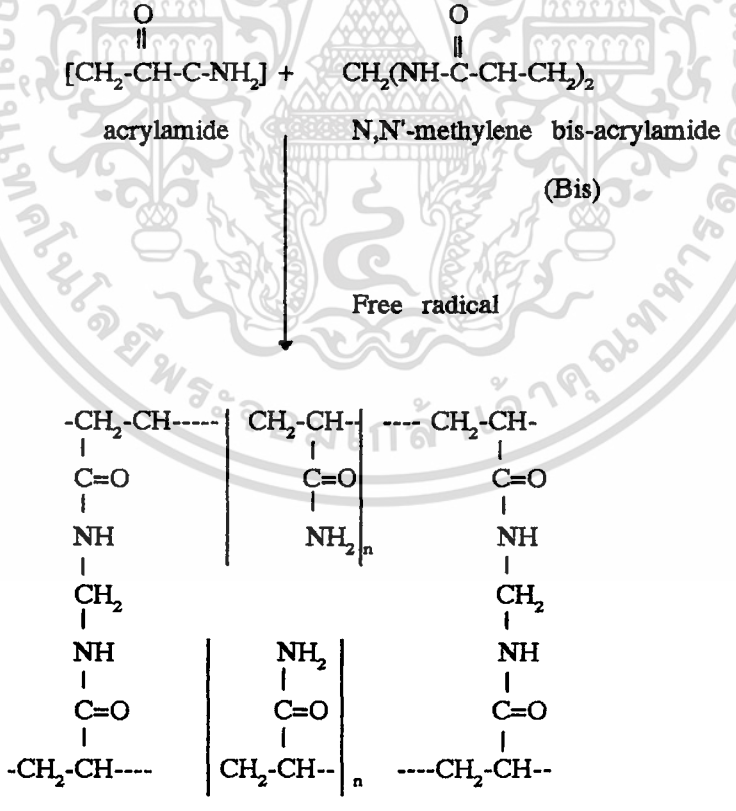
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับ polyacrylamide gel

1.ความเข้มข้นของ polyacrylamide gel

การที่โปรตีนขนาดต่างๆ สามารถแยกจากกันโดยใช้ polyacrylamide gel ทั้งๆ ที่มีรูปร่างและแรงเคลื่อนไฟฟ้าต่อมวลเท่ากัน ก็เนื่องจากคุณสมบัติการเป็นตาข่ายหรือตะแกรง (sieving properties) ของ polyacrylamide gel ตาข่ายหรือตะแกรงนี้ทำหน้าที่กักหรือกรองสารที่มีขนาดต่างๆ กันออกจากกัน ดังนั้นการใช้ความเข้มข้นของ gel เพื่อให้ได้ขนาดตาข่ายหรือตะแกรงที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญ

Polyacrylamide gel เป็นสารสังเคราะห์ซึ่งเกิดจากการ polymerization ของ acrylamide monomer ต่อกันเป็นสายยาวเป็น polyacrylamide โดยมี N,N' - methylenebis-acrylamide (หรือเรียกสั้นๆ ว่า Bis) ทำหน้าที่เป็นตัว cross-link ต่อเชื่อมระหว่างสายของ acrylamide ทำให้ได้ลักษณะตาข่ายหรือร่างแหสามมิติ รูปที่ 3 ความเข้มข้นของ acrylamide และ Bis จะเป็นตัวกำหนดความยาวของสาย polymer และขนาดของรูตาข่ายที่เกิดขึ้น ซึ่งทำหน้าที่เป็นตะแกรงกรองสารขนาดต่างๆ กันออกจากกัน



รูปที่ 3 การเกิด polymerization

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.การเกิด polymerization

Polyacrylamide gel เกิดจากการ polymerization ของ acrylamide monomer โดย free radical ซึ่งได้จาก ammonium persulphate โดยการกระตุ้นของ base-catalyst คือ N,N,N',N' - tetramethylethylenediamine (TEMED) หรือ 3-di-methylaminopropionitrile (DMAPN) นอกจาก free radical แล้ว polymerization ยังเกิดขึ้นได้จาก photochemical reaction ระหว่าง riboflavin กับแสงอีกด้วย

ปริมาณของ ammonium persulphate และ base catalyst ที่ใช้มีผลต่อการ polymerization ของ gel ซึ่งถ้าใช้ในอัตราส่วนที่ไม่พอเหมาะก็จะทำให้ polymeriztion เกิดอย่างไม่สมบูรณ์ และการแยกสารจะไม่ได้ผลดีเท่าที่ควร

อุปกรณ์ทั่วไปในการทำ electrophoresis

1. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply)

เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าที่ใช้ใน electrophoresis เป็นชนิดกระแสตรง (Direct current, D.C.) ซึ่งมีทั้งแบบ low voltage (100-500 volt) และ high voltage (500-10,000 volt) ปัจจุบันเราสามารถผลิตเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าได้เองในประเทศไทยและราคาไม่แพงนัก

2. กล่องใส่ buffer และขั้วไฟฟ้า (chamber and electrode)

ไม่ว่าจะเป็น electrophoresis แบบใดก็ตาม กล่องใส่ buffer จะมีอยู่ 2 ส่วนคือ ส่วนหนึ่งสำหรับขั้วไฟฟ้าบวก (cathode) และอีกส่วนสำหรับขั้วไฟฟ้าลบ (annode) กล่อง buffer มีลักษณะแตกต่างกันแล้วแต่ชนิดของ electrophoresis มีทั้งชนิดในแนวราบ แนวดิ่งแบบหลอด (cylindrical rods) หรือ เป็นแผ่น (slab) แต่ละแบบมีข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกัน

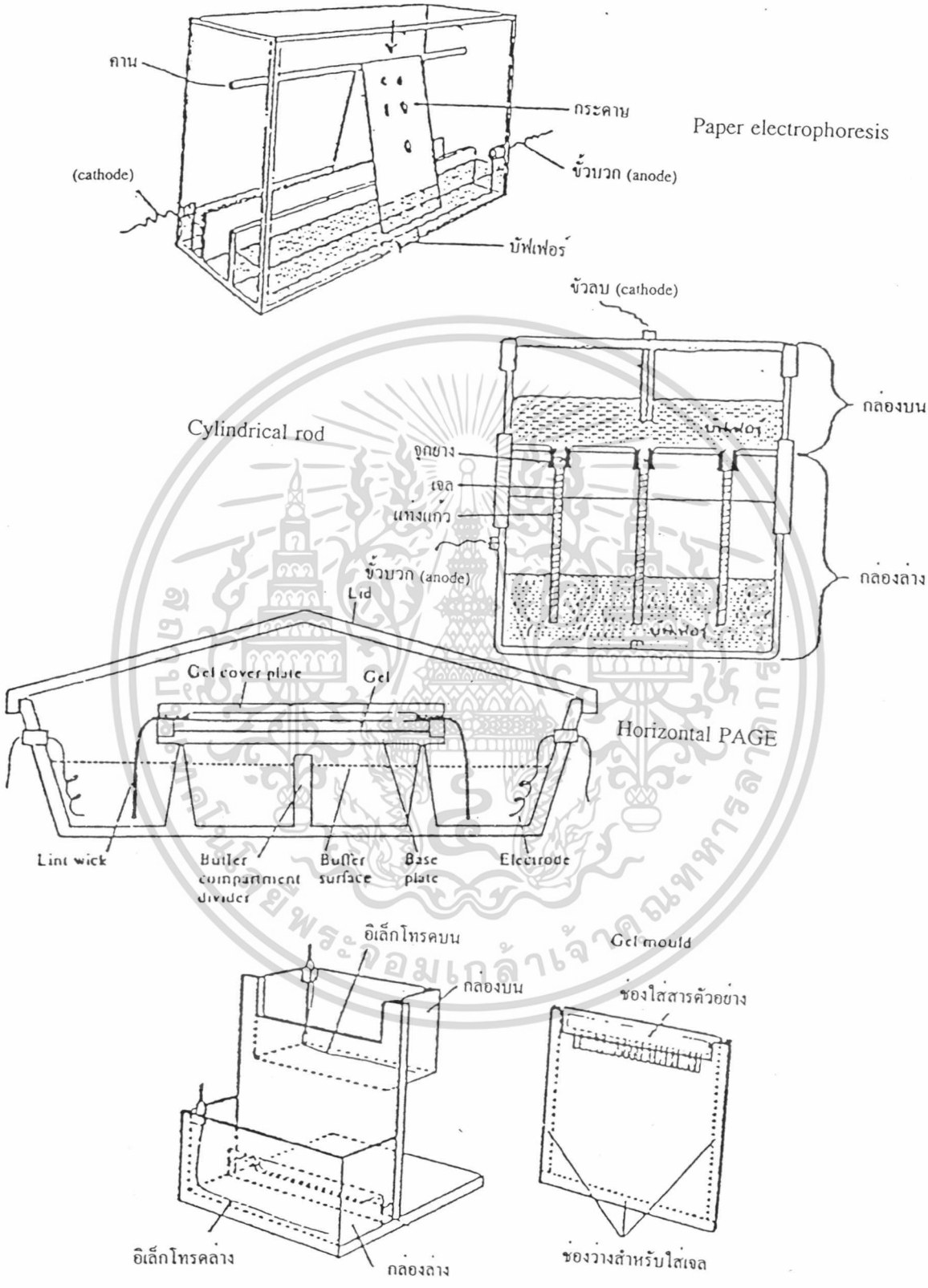
การติดตามสารตัวอย่างหลังจากทำ electrophoresis

เมื่อพิจารณาเลือกชนิดของ electrophoresis และทำการแยกสารตัวอย่างโดยวิธีนี้แล้ว ก็ถึงวิธีการติดตามสารตัวอย่างที่เรากำลังศึกษาอยู่ว่าอยู่ที่ตำแหน่งไหน ซึ่งมีวิธีการต่างๆ มากมาย

การย้อมสี (staining)

สีที่ใช้ย้อมสารหลังทำ electrophoresis มีหลายชนิด ตั้งแต่สีธรรมดาไปจนถึงสีที่มีความจำเพาะกับสารชนิดหนึ่งชนิดใดโดยเฉพาะ แต่การศึกษา isozyme การติดตามเอนไซม์ที่ต้องการศึกษาทำได้โดยใช้ activity stain ซึ่งมีความจำเพาะเฉพาะกับเอนไซม์ที่ต้องการศึกษาเท่านั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4 Electrophoresis แบบต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องและคล้ายคลึง

ไอโซไซม์และอิเล็คโตรโฟริซิส

ไอโซไซม์เป็นโปรตีนที่มีประจุซึ่งเกิดจาก หมู่อะมิโน หมู่คาร์บอกซิล และหมู่ฟังก์ชันในสายรอง (side chain) ของกรดอะมิโนที่ประกอบขึ้นเป็นโปรตีน เมื่อเคลื่อนที่ในกระแสไฟฟ้าแล้วสามารถตรวจสอบได้ โดยการนำ substrate ที่ทำปฏิกิริยาเฉพาะกับเอนไซม์ที่ถูกแยกด้วยกระแสไฟฟ้า ทำให้เกิดการตกตะกอนเป็นแถบ (band) ซึ่งแสดงความแตกต่างระหว่างตัวอย่างที่ศึกษาได้ (สุจิตรา, 2535)

การศึกษาไอโซไซม์เริ่มตั้งแต่ปี 1950 โดยอาศัยวิธีโครมาโตกราฟีและอิเล็คโตรโฟริซิสแบบกระดาษ (paper chromatography) Smithies (1955) ได้พัฒนาเทคนิคอิเล็คโตรโฟริซิส ชนิดเจลแป้ง และสามารถย้อมสีเอนไซม์โดยตรงบนเจลแป้ง ซึ่ง Hunter และ Market (1957) ได้เสนอให้ใช้คำว่าไซโมแกรม (zymogram) เพื่อแสดงถึงแถบของเอนไซม์ที่ปรากฏบนแผ่นเจล และให้นิยามคำว่า ไอโซไซม์ เป็นเอนไซม์ที่มีโมเลกุลหลายรูปแบบแต่เร่งปฏิกิริยาเดียวกันในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน สามารถแยกออกจากกันได้โดยใช้อิเล็คโตรโฟริซิส

ดังนั้นอิเล็คโตรโฟริซิสจึงเป็นคำที่ใช้อธิบายการเคลื่อนที่ของอนุภาคที่มีประจุไฟฟ้าในสนามไฟฟ้า ส่วนใหญ่เป็นสารโพลิเมอร์ในทางชีวภาพ (biological polymer) ซึ่งมีประจุจึงสามารถเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าได้ อาศัยคุณสมบัติดังกล่าวนี้ เทคนิคอิเล็คโตรโฟริซิสจึงถูกนำมาใช้ในการศึกษาคุณสมบัติของแมคโครโมเลกุล (macromolecule) เช่น โปรตีน (อาภัสสรา,2537)

ปัจจุบันมีผู้นิยมใช้เทคนิคทางชีวเคมีและพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล ในการศึกษาการปรับปรุงและคัดเลือกสายพันธุ์ของเห็ดตามต้องการ (Lu *et al.*, 1988) เทคนิคทางชีวเคมี เช่น เทคนิคเจลอิเล็คโตรโฟริซิส ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์รูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์บางชนิดที่ถูกสร้างขึ้นอย่างกว้างขวาง ใช้ในการกำหนดและติดตามคุณลักษณะของสิ่งมีชีวิตทั้งในพืช (Menendez *et al.*, 1986 ; Bournival and Korban, 1987 ; Doong and Kiang, 1987 ; ดวงพร วรสุนทโรสถ, 2530) สัตว์ (DeLorenzo and Ruddle, 1969 ; Nelson *et al.*, 1987) สำหรับในเห็ดรารูปแบบไอโซไซม์ของเอ็นไซม์ ได้รับการศึกษาและวิจัยกันอย่างมากมาย อาทิเช่น Spieth (1975) วิเคราะห์โปรตีนและไอโซไซม์ 2 ชนิดคือ acid phosphatase และ esterase ในรา *Neurospora intermedia* ที่มาจากแหล่งต่างๆ ของโลก พบว่ามีความผันแปรมากทั้งในประชากรที่มาจากที่เดียวกัน และที่มาจากที่ต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชัชฎาพร (2538) ได้ทำการศึกษารูปแบบไอโซไซม์ของเห็ดโคน (*Termitomyces sp.*) โดยใช้รูปแบบของไอโซไซม์ 4 ชนิดคือ 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGDH), isocitrate dehydrogenase (IDH), malate dehydrogenase (MDH), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6PDH) โดยไอโซไซม์ทั้ง 4 ชนิด สามารถแยกความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรมของไอโซไซม์ในเห็ดโคน 11 ตัวอย่าง ได้เป็น 6 กลุ่ม

วันดี (2533) ได้ทำการศึกษาสหสัมพันธ์ระหว่างไอโซไซม์ กับความสามารถในการเกิดดอกของสายพันธุ์ลูกผสมเห็ดหอม โดยการตรวจสอบรูปแบบการผลิตเอนไซม์ glutamate dehydrogenase และ acid phosphatase โดยวิธีอิเล็คโตรโฟริซิส พบว่าเส้นใยเห็ดหอมที่ทดลองผลิตเอนไซม์ทั้งสองนี้ได้อย่างละรูปแบบเดียว (monomorphic pattern) ในขณะที่รูปแบบเอนไซม์ laccase และ esterase เมื่อวิเคราะห์ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการเจริญพบว่ามีรูปแบบแตกต่างกันหลายรูปแบบ

จากรายงานของ Okunishi (1979) ซึ่งใช้อิเล็คโตรโฟริซิส ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ 6 ระบบที่สกัดจากเส้นใย primodium, ก้าน, หมวกเห็ด และ hymenophore (gills) ของเห็ดหอม (*Lentinus edodes SJ* 8541) ได้แก่ เอนไซม์ esterase, acid phosphatase, malate dehydrogenase, glucose - 6 phosphate dehydrogenase และ 6 - phosphogluconate dehydrogenase และเอนไซม์ esterase ที่สกัดจากเห็ด *Corpinus kimurae* AJ 8239 และ *Polyporellus brumalis* AJ 8169 พบว่าเอนไซม์ esterase, tyrosinase, malate dehydrogenase และ 6 - phosphogluconate dehydrogenase มีคุณสมบัติเป็นไอโซไซม์ และยังพบว่าเอนไซม์ esterase จะมีรูปแบบของไอโซไซม์ ที่แตกต่างกันในเส้นใย primodium, ก้านดอกและหมวกเห็ด

Toyomasu และ Zennyozi (1981) พบว่าสามารถใช้ electrophoresis patterns ของเอนไซม์ esterase, ribonuclease, glucose - 6 phosphate dehydrogenase และ malate dehydrogenase ที่สกัดจากเส้นใยของเห็ดในการจำแนกสายพันธุ์ของเห็ดหอมได้ ในเห็ด *Agaricus brunesscens* สามารถใช้วิธีทางชีวเคมีและพันธุศาสตร์ในการจำแนกสายพันธุ์ทางการค้าออกเป็นกลุ่มๆ โดยใช้ลักษณะทาง genotypic classes ของไอโซไซม์ 5 ชนิดคือ mannosephosphate isomerase, peptidase with leucyl - leucyl - leucine - 1, peptidase with leucyl -leucyl -leucine - 2, glutamate pyruvate transaminase และ alcohol dehydrogenase พบว่าลูกผสมมีรูปแบบไอโซไซม์เป็นแบบผสมระหว่างพ่อกับแม่ (Royse and May, 1982a, 1982b ; May and Royse, 1982)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Electrophoresis pattern ของเอนไซม์ 9 ชนิด ของเส้นใยเห็ดหอม 93 สายพันธุ์ที่วิเคราะห์ได้สามารถใช้แยกความปรวนแปรของเห็ดหอมในธรรมชาติได้ โดยพบว่าเห็ดหอมจากประเทศญี่ปุ่น จีน ปาปัวนิวกินี และนิวซีแลนด์ แต่ละสายพันธุ์มี isozyme pattern ของเอนไซม์ 9 ชนิดที่แตกต่างกัน ยกเว้น เห็ดหอมที่มาจากประเทศญี่ปุ่นและจีน มี isozyme pattern ใกล้เคียงกัน (Fukuda and Tokimoto, 1991)

สุจิตรา (2535ก) ใช้เทคนิค horizontal starch gel electrophoresis ศึกษาการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของไอโซไซม์ของสนสองใบ จากเอนไซม์ LAP พบว่าถูกควบคุมด้วยยีน 2 ตำแหน่งคือ LAP - A มี 2 อัลลีล คือ A_0 และ A_1 และ LAP - B มี 2 อัลลีล คือ B_1 และ B_2 อัลลีล A_0 เป็นยีนด้อย (recessive gene) ไม่สามารถแสดงฟีโนไทค์ออกมาได้ ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ยาก แต่สามารถศึกษาได้ด้วยอิเล็คโตรโฟริซิส ซึ่งยีน LAP มีการถ่ายทอดลักษณะการกระจายตัว (segregation) เป็นไปตามกฎของเมนเดล

ในปี 1987 Wang and Wang ใช้อิเล็คโตรโฟริซิสของเอนไซม์ esterase, polyphenol oxidase, cytochrome oxidase, peroxidase, alcohol dehydrogenase, lactic dehydrogenase, acid phophatase, malate dehydrogenase และ โปรตีน ในการทำนายลักษณะที่ดีของสายพันธุ์เห็ดแชมปิญอง (*Agaricus bisporus*) ขณะที่เป็นเส้นใยก่อนที่จะนำไปเพาะเลี้ยง เพื่อลดระยะเวลาในการคัดเลือกพันธุ์ ส่วนใน *L. edodes* มีการวิจัยทดสอบเพื่อใช้ไอโซไซม์ในการจำแนกสายพันธุ์มากมาย ไอโซไซม์ที่นิยมใช้ได้แก่ glucose phophate isomerase, peptidase, malate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase, alkaline phosphatase เป็นต้น จากรูปแบบไอโซไซม์ดังกล่าวนี้ สามารถจำแนกสายพันธุ์ *L. edodes* ออกเป็นกลุ่มๆ และคำนวณค่าความคล้ายคลึงกัน (similarity coefficient) ของสายพันธุ์ได้ (Royse *et al.*, 1983a, 1983b ; Royse and May, 1987 ; Ohmasa and Furukawa, 1986)

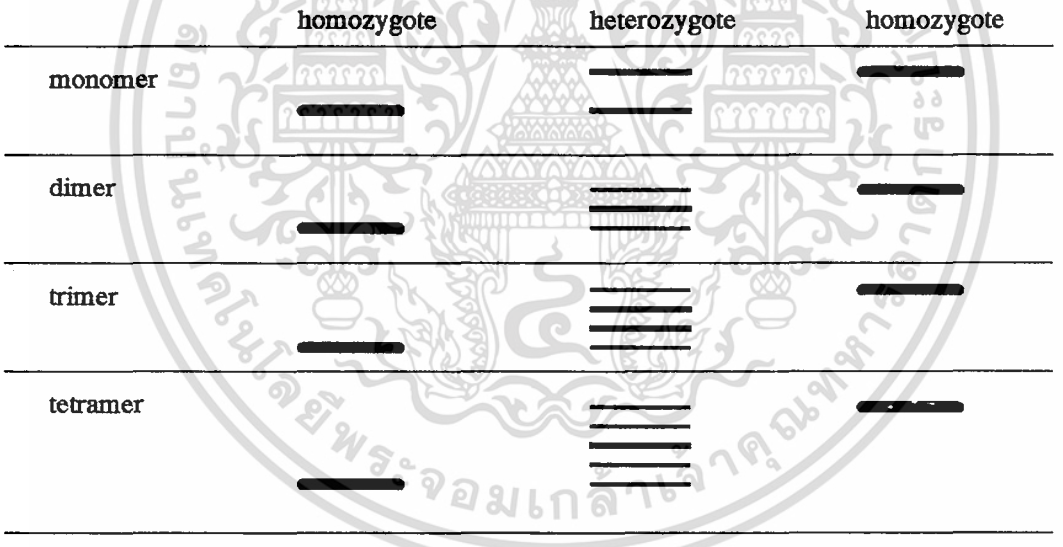
เอนไซม์ที่มักพบในเห็ด คือ tyrosinase และ laccase จัดอยู่ในกลุ่ม monophenol monooxygenase (EC. 1.14.18.1) ซึ่งยังรวมถึงเอนไซม์อื่นๆ อีกได้แก่ phenolase, catechol oxidase, polyphenol oxidase, monophenol oxidase, *o*- and *p*- diphenol oxidase, orthophenolase และ urushiol oxidase เอนไซม์กลุ่ม monophenol monooxygenase นี้เป็น copper - protein มี systematic name ว่า monophenol dihydroxyphenylalnine : oxygen oxidoreductase (Florkin and Stotz, 1973)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

จะเห็นว่าการศึกษาฟีโนไทป์ของไอโซไซม์ จำเป็นต้องทราบว่าไซโมแกรมแต่ละแถบเป็นผลมาจากความปรวนแปรทางพันธุกรรม และมีการถ่ายทอดลักษณะการกระจายตัวเป็นไปตามกฎของเมนเดล และการวิเคราะห์ไซโมแกรม ที่เกิดขึ้นบนเจลแป้งจำเป็นต้องทราบลักษณะพื้นฐานทางพันธุกรรมของไอโซไซม์แต่ละชนิด เพราะไอโซไซม์เกิดจากความแตกต่างของชนิดของสายโพลีเปปไทด์และจำนวนของหน่วยย่อย (subunit) โดยเอนไซม์ที่เป็นโมโนเมอร์ประกอบด้วย 1 สายของโพลีเปปไทด์ ซึ่งถูกควบคุมโดยยีน 1 คู่ 2 อัลลีล จากพ่อและแม่ ดังนั้นถ้าลูกเกิดจากการผสมของพ่อและแม่ที่มีอัลลีลต่างกัน แสดงว่ามีจีโนไทป์เป็นแบบ heterozygote จะปรากฏแถบสี 2 แถบเหมือนทั้งพ่อและแม่ ส่วนเอนไซม์ที่มีโครงสร้างโมเลกุลมากกว่า 1 หน่วย (multimeric enzymes) จะปรากฏแถบสีดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะของไซโมแกรมของ homozygote และ heterozygote ของเอนไซม์ที่เป็น monomer, dimer, trimer และ tetramer



ที่มา : Harris และ Hopkinson (1976)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

30607

บทที่ 3

การดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1.<u>อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ด</u> ได้แก่

- flask (ขวดแก้วรูปชมพู่) ขนาด 250 ml. และ 125 ml.
- จานเพาะเชื้อ (petridish)
- หลอดทดลอง
- เข็มเขี่ยเชื้อ (needle)
- กระบอกตวง
- บีกเกอร์ขนาดต่างๆ
- ตู้ถ่ายเชื้อ
- ตู้บ่มเชื้อ

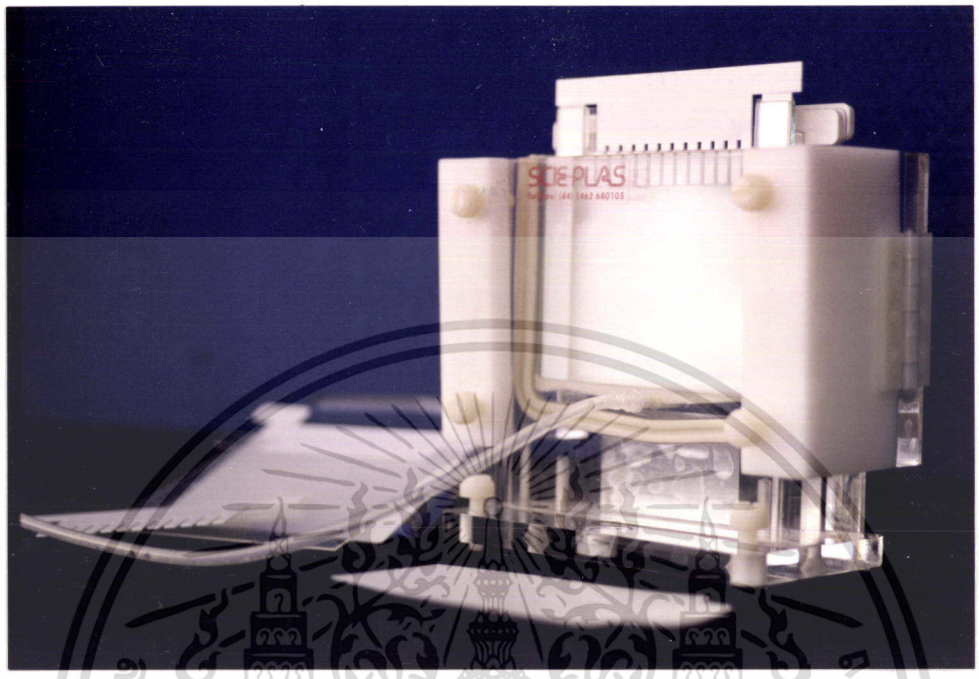
2.<u>อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์จากเส้นใยเห็ด</u> ได้แก่

- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
- โกร่ง
- microtube
- suction pump และ suction flask
- กระดาษกรองเบอร์ 1
- forcept
- petridish

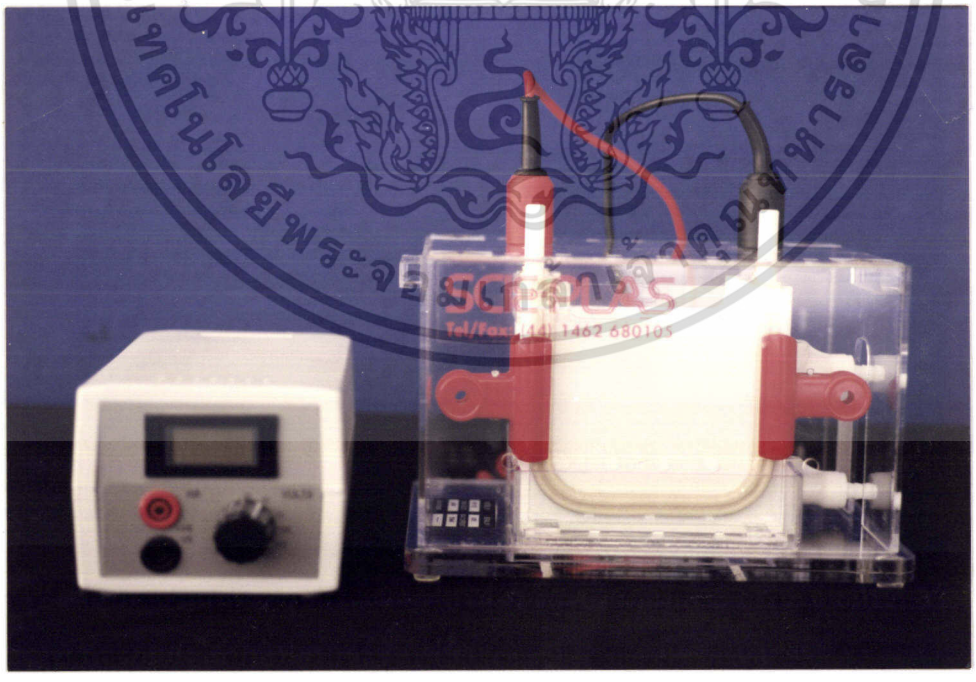
3.<u>อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำอิเล็คโตรฟอริซิส</u>

- เครื่อง pack gel และอุปกรณ์ที่ใช้ในการ pack gel (รูปที่ 5)
- ชุดอุปกรณ์อิเล็คโตรฟอริซิส ประกอบด้วย เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply) และกล่องใส่บัฟเฟอร์และขั้วไฟฟ้า (chamber and electrode)(รูปที่ 6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 5 แสดงเครื่อง pack gel และอุปกรณ์ที่ใช้ในการ pack gel



รูปที่ 6 แสดงชุดอุปกรณ์อิเล็คโตรฟอริซิส ประกอบด้วย เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply) และกล่องใส่บัฟเฟอร์และขั้วไฟฟ้า (chamber and electrode)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.อุปกรณ์ที่ใช้ในการย้อมสีเจล

- กล่องย้อมสี
- กล่องดำ หรือห้องมืด
- magnetic stirror
- ขวดสีชา

5.สารเคมีและวิธีการเตรียม stock solution (ดูภาคผนวก ข.)

วิธีการทดลอง

การเพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ด

1. เตรียมอาหารสูตร PDA และ PDB สำหรับเห็ดขอนขาวและเห็ดลูกผสม,อาหารสูตร MA และ PDYB หรือ MB สำหรับเห็ดหอม (ดูภาคผนวก ก.)

2.เพาะเลี้ยงเส้นใยเห็ดเพื่อใช้ในการสกัดเอนไซม์สำหรับทำอิเล็คโตรโฟริซิสโดยถ่ายเชื้อจากอาหารแข็ง (stock culture) ลงในอาหารเหลว สำหรับเห็ดขอนขาวและเห็ดลูกผสมจะใช้อาหารสูตร PDB ส่วนเห็ดหอมจะเพาะในอาหารสูตร PDYB หรือ MB โดยจะต้องให้กลุ่มของเส้นใยลอยอยู่บนผิวหน้าของอาหารเหลวบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน

การเก็บเกี่ยวและสกัดเอนไซม์จากเส้นใยเห็ดอายุ 30 วัน

1.เก็บเกี่ยวเส้นใยเห็ดที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว โดยการกรองด้วย Buchner funnel ผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 ล้างเส้นใยให้สะอาดปราศจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง

2.นำเส้นใยที่ได้มาบดให้ละเอียดในโกร่งที่เย็นจัดภายในอ่างน้ำแข็ง นำเส้นใยที่บดแล้วใส่ลงในหลอด microtube แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำส่วนใส (supernatant) เก็บไว้ใช้ในการทำอิเลคโตรโฟริซิส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 7 แสดงลักษณะของเส้นใยเห็ดในอาหารเหลวที่ได้จากการเพาะเลี้ยงก่อนนำมาสกัดเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมโพลิอคริลาไมด์เจล

1. ประกอบกระจก (sanwich glass) ลงในเครื่องแพ็คเจล ตั้งลูกน้ำให้อยู่ในจุดที่สมดุลย์

2. เตรียม resolving gel 7.5% acrylamide (ดูภาคผนวก ข.) เมื่อได้สารละลายสำหรับทำ resolving gel แล้ว ผสมให้เข้ากัน และดูดอากาศออกให้หมดโดยใช้ suction pump ร่วมกับ sonicator นำสารละลายที่ได้กรอกใส่ช่องระหว่างกระจก โดยใช้ไมโครปิเปต เททับด้วยน้ำเพื่อให้ผิวหน้าของเจลเรียบ จากนั้นนำไปวางไว้ในที่มีแสง ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 1 ชั่วโมง (การแข็งตัวของเจลเกิดจากปฏิกิริยาโพลิเมอร์ไรเซชั่น) แล้วดูดน้ำออกด้วยเข็มฉีดยา

3. เตรียม stacking gel (ดูภาคผนวก ข.) โดยผสมสารละลายให้เข้ากัน แล้วดูดอากาศออกโดยวิธีเดียวกันกับในข้อ 2 กรอกสารละลายที่ได้เหนือ resolving gel จนถึงขอบกระจกแล้วนำหวี (well comb) มาเสียบระหว่างกระจก ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการ โพลิเมอร์ไรเซชั่น จากนั้นค่อย ๆ ดึงหวีออก นำมาล้างช่อง well slot ที่เกิดบน stacking gel เพื่อล้างเจลส่วนที่โพลิเมอร์ไรซ์ไม่หมดออก โดยใช้เข็มฉีดยาดูด running buffer (tris-glycine pH 8.3) หลังจากนั้นดูดเอา running buffer ออกให้หมด ทำการล้าง 2 ครั้ง

การทำอิเลคโตรโฟริซิส

1. ประกอบกระจก (sanwich glass) ลงในเครื่องอิเลคโตรโฟริซิส ปิดฝาและต่อเครื่อง power supply

2. นำสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้มาบรรจุลงในแผ่นโพลิอคริลาไมด์เจลโดยใช้ไมโครปิเปตขนาด 10 ไมโครลิตร ดูดสารละลายปริมาตร 10 ไมโครลิตรลงในช่อง well slot เท running buffer ลงใน chamber ให้เต็ม จากนั้นดูดสารละลาย bromphenol blue (ดูภาคผนวก ข.) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบน upper tank electrophoresis แล้วปิดฝา จากนั้นเปิดเครื่อง power supply และปรับโวลต์

3. หลังจาก running electrophoresis ไปประมาณ 5-6 ชั่วโมง จะเห็นเส้นสีน้ำเงินของ bromphenol blue อยู่เหนือขอบกระจกด้านล่างประมาณ 0.5 เซนติเมตร จึงปิดสวิตช์เครื่อง power supply

การเตรียมสีย้อม (ดูภาคผนวก ค.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การย้อมสีไอโซไซม์ด้วยวิธี stain activity

1. นำแผ่นกระจก (sandwich glass) ออกจากเครื่องอิเลคโตรโฟริซิส จากนั้นแกะเอาแผ่นเจลออกใส่ลงในกล่องย้อมสีโดยการศึกษาระบบไอโซไซม์ในที่นี้จะทำการศึกษาเอนไซม์ 6 ระบบ ซึ่งมีดังต่อไปนี้

- Malate dehydrogenase (MDH)
- Esterase (EST)
- Shikimate dehydrogenase (SKDH)
- Formate dehydrogenase (FDH)
- 6-Phosphogluconate dehydrogenase (6-PGDH)
- Diaphorase (DIA)

2. เตรียมส่วนผสมของสีย้อม (ภาคผนวก) ลงในขวดสีชา ปิดด้วยกล่องดำ คนส่วนผสมด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 15 นาที รินส่วนผสมลงในกล่องย้อมสีที่บรรจุแผ่นเจลไว้แล้ว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ถึง 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วเทสารละลายสีย้อมออก และล้างด้วยน้ำ บันทึกไซโมแกรมที่ได้ด้วยการถ่ายรูปพร้อมทั้งบันทึกลงในกระดาษดูแถบสีที่ปรากฏ

3. การวิเคราะห์ไซโมแกรม นำไซโมแกรมที่ได้มาประเมินผลเปรียบเทียบแถบสีที่ปรากฏ โดยการคำนวณหาค่า R_f (Relative fraction) ซึ่งเป็นค่าคงที่เฉพาะตัวของแถบ ไอโซไซม์แต่ละชนิดมีสูตรดังนี้

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

นำค่า R_f ที่ได้บันทึกลงในแถบไซโมแกรมที่ได้วาดไว้ของเอนไซม์แต่ละชนิด เพื่อนำมาเรียงลำดับเปรียบเทียบแยกความแตกต่างระหว่างพันธุกรรมของเส้นใยเห็ด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

จากการศึกษาระบบไอโซไซม์ในเส้นใยเห็ดหอม,เห็ดขอนขาว และเห็ดลูกผสมจากการรวมโปรโตพลาสต์ได้แก่ PP_1, PP_2 และ PP_3 โดยทำการศึกษาจากระบบเอนไซม์ 6 ระบบด้วยกัน คือ

1.Malate dehydrogenase (MDH)

2.Esterase (EST)

3.Shikimate dehydrogenase (SKDH)

4.Formate dehydrogenase (FDH)

5.6-Phosphogluconate dehydrogenase (6-PGDH)

6.Diaphorase (DIA)

ทำการทดลองโดยใช้เทคนิค polyacrylamide gel electrophoresis ที่เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้น 7.5% acrylamide ซึ่งจากการตรวจสอบรูปแบบไอโซไซม์ของเอนไซม์ต่างๆ ในขั้นต้นพบว่าปรากฏไซโมแกรมในเอนไซม์ 3 ชนิดด้วยกันคือ

Malate dehydrogenase (MDH)

จากการศึกษารูปแบบไอโซไซม์พบว่าไซโมแกรมของเอนไซม์ MDH ในเห็ดที่ทำการศึกษาชนิดต่างๆ นี้มีแถบ (banding) ดังนี้

เห็ดหอม	มี 4 แถบซึ่งมีค่า R_f เท่ากับ 0.67, 0.60, 0.56 และ 0.25 ตามลำดับ
เห็ดขอนขาว	มี 3 แถบซึ่งมีค่า R_f เท่ากับ 0.67, 0.60 และ 0.25 ตามลำดับ
PP_1	มี 1 แถบซึ่งมีค่า R_f เท่ากับ 0.67
PP_2	มี 1 แถบซึ่งมีค่า R_f เท่ากับ 0.67
PP_3	มี 4 แถบซึ่งมีค่า R_f เท่ากับ 0.67, 0.60, 0.56 และ 0.25 ตามลำดับ

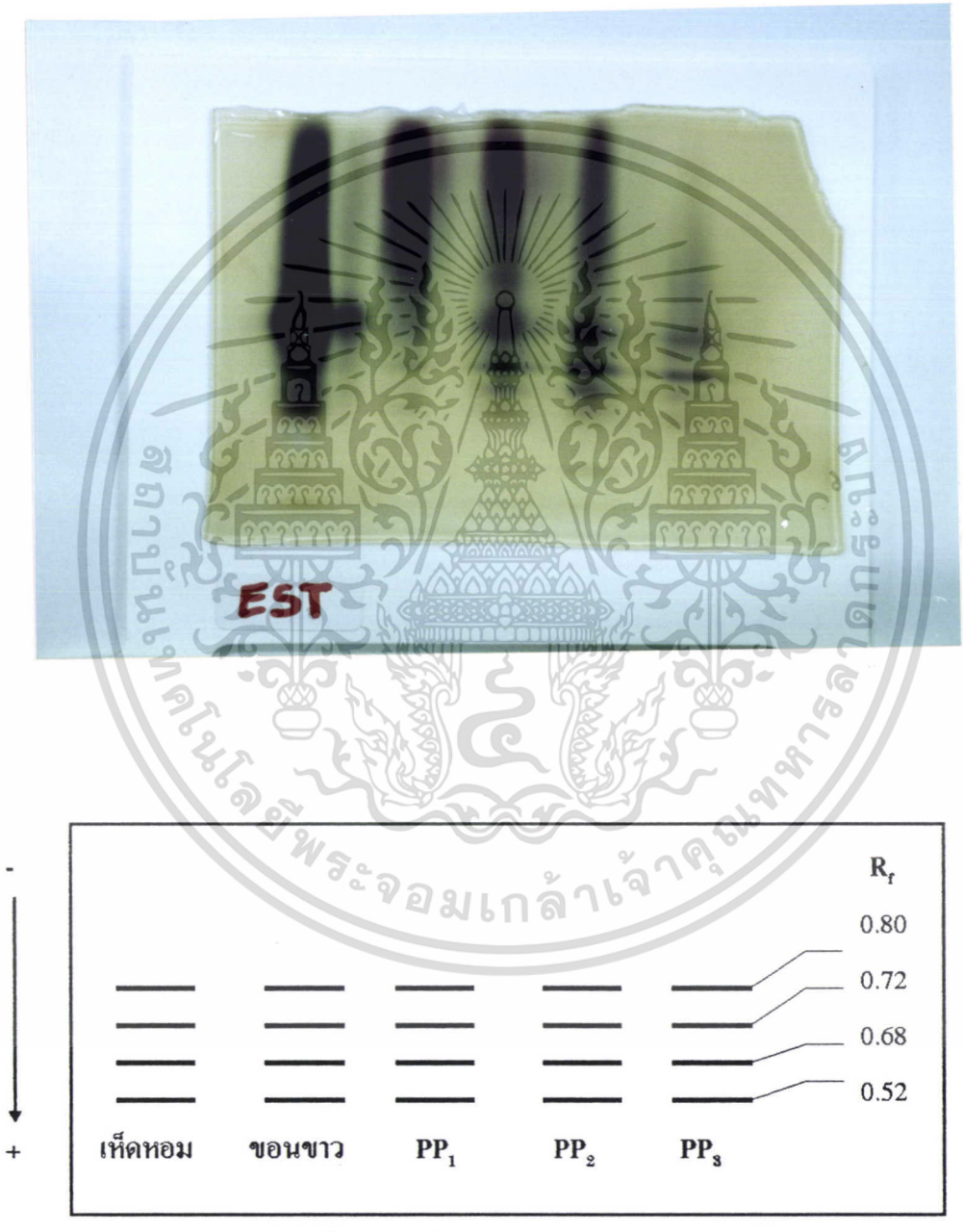
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 8 แสดงไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์ **Malate dehydrogenase (MDH)**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Esterase (EST)

ไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์ EST เมื่อตรวจสอบจากเส้นใยอายุ 30 วัน โดยพบว่าเห็ดทุกสายพันธุ์มีไซโมแกรม 4 แถบด้วยกันและแต่ละแถบมีรูปแบบไอโซไซม์ที่ตรงกันดังรูป

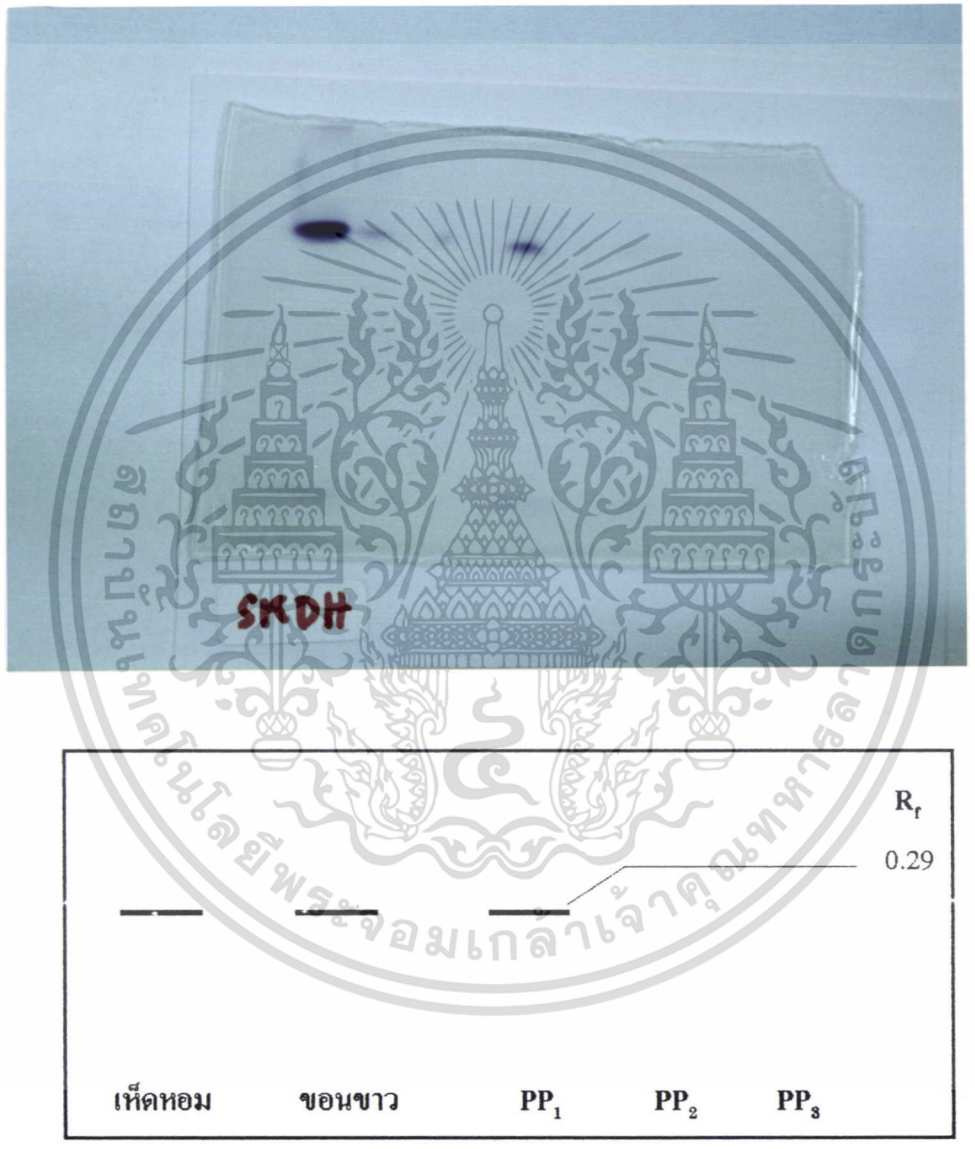


รูปที่ 9 แสดงไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์ **Esterase (EST)**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Shikimate dehydrogenase (SKDH)

จากการศึกษาพบว่าแถบสีที่ได้จากเอนไซม์ SKDH นั้นให้แถบที่ไม่ชัดเจนโดยจะปรากฏแถบในเห็ดหอม, เห็ดขอนขาว และ PP_1 เท่านั้น ส่วนใน PP_2 และ PP_3 ไม่เกิดแถบสี



รูปที่ 10 แสดง ไซโมแกรมที่ได้จากเอนไซม์ **Shikimate dehydrogenase (SKDH)**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการรวมโปรโตพลาสต์ของเห็ดหอมและเห็ดขอนขาวแล้วทำการคัดเลือกลูกผสมพบว่ามีสายพันธุ์ลูกผสมคือ PP_1, PP_2 และ PP_3 ซึ่งการคัดเลือกทำได้โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ดูจากลักษณะหมวกดอก ลักษณะความยาวของก้อนดอก และขนาดของสปอร์ (ประภัสสร, 2539) แต่การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวยังไม่เพียงพอในการตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างลูกผสมกับสายพันธุ์พ่อแม่ ดังนั้นจึงต้องนำวิธีตรวจสอบอื่นๆ ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้ได้ใช้รูปแบบของไอโซไซม์เข้ามาประกอบการพิจารณา

ผลจากการศึกษาไซโมแกรมของไอโซไซม์ 6 ระบบ พบว่ามีไซโมแกรมปรากฏเพียง 3 ระบบ คือ Malate dehydrogenase, Esterase และ Shikimate dehydrogenase แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างสายพันธุ์พ่อ แม่ และลูกผสม ซึ่งสอดคล้องกับการจำแนกทางสัณฐานวิทยาในขั้นต้น

จากการศึกษารูปแบบของไอโซไซม์สามารถวิเคราะห์ได้ดังนี้ สำหรับไอโซไซม์ MDH พบว่าเห็ดหอมมีแถบของไซโมแกรมปรากฏอยู่ 4 แถบคือ มีค่า R_f เท่ากับ 0.67, 0.60, 0.56 และ 0.25 เห็ดขอนขาว ปรากฏไซโมแกรม 3 แถบ มีค่า R_f เท่ากับ 0.67, 0.60 และ 0.25 ไซโมแกรมของ PP_1 และ PP_2 ปรากฏ 1 แถบ โดยมีค่า R_f เท่ากับ 0.67 เท่ากันซึ่งคาดว่า PP_1 และ PP_2 อาจเป็นลูกผสมของเห็ดหอมกับเห็ดขอนขาว โดยไซโมแกรมที่ปรากฏเพียงแถบเดียวแสดงให้เห็นว่าแถบของไอโซไซม์ที่เกิดขึ้นในลูกผสม PP_1 และ PP_2 อาจจะเป็นผลมาจากการแสดงออกของยีนจากเห็ดหอมหรือเห็ดขอนขาวเพียงอย่างใดอย่างหนึ่งหรือทั้งสองอย่าง ส่วนลูกผสม PP_3 มีแถบไซโมแกรมปรากฏ 4 แถบซึ่งมีค่า R_f เท่ากับ 0.67, 0.60, 0.56 และ 0.25 ซึ่งตรงกันกับไซโมแกรมของเห็ดหอม ซึ่งสามารถแสดงลักษณะออกมาให้เห็น (phenotype) ในรูปไอโซไซม์ แต่จากการสังเกตการเจริญเติบโตของเส้นใยในอาหารเหลวพบว่า PP_3 เจริญเติบโตได้รวดเร็วใน PDB ซึ่งแตกต่างจากเห็ดหอมซึ่งเจริญได้ช้ามากใน PDB แต่จะเจริญได้ดีใน MB หรือ PDYB (กล่าวคือ PP_3 เจริญได้ดีใน PDB มากกว่าเห็ดหอม แต่น้อยกว่าเห็ดขอนขาว) ดังนั้น PP_3 อาจได้รับ Mitochondrial DNA จากไซโตพลาสซึมของเห็ดขอนขาวเข้าไปด้วย ซึ่ง Mitochondrial DNA จะมียีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโตของเส้นใย จึงทำให้ลักษณะการเจริญเติบโตของเส้นใยอยู่ระหว่างเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว ส่วนลักษณะอื่นๆ ทางสัณฐานวิทยาควรเกิดจากการควบคุมของยีนต่างๆ ในนิวเคลียสซึ่ง PP_3 จะได้รับยีนดังกล่าวเฉพาะจากนิวเคลียสของเห็ดหอม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับไอโซไซม์ EST พบว่าทั้งในเห็ดสายพันธุ์พ่อ แม่ และลูกผสมปรากฏไซโมแกรมที่ตรงกันหมดทุกแถบ คือ มีค่า R_f เท่ากับ 0.80, 0.72, 0.68 และ 0.52 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่ายีนที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ EST ในเห็ดสายพันธุ์พ่อ แม่ และลูกผสมอาจมีความเหมือนกัน ทำให้ไม่สามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์ได้ แต่ก็สามารถบอกได้ว่าเห็ดทั้งหมดที่นำมาวิเคราะห์อยู่ในกลุ่มเดียวกัน(มีความสัมพันธ์กัน)

ไอโซไซม์ SKDH ปรากฏไซโมแกรมที่ไม่ชัดเจน คือในเห็ดหอม, เห็ดขอนขาว และ PP_1 มีไซโมแกรม 1 แถบเหมือนกัน และค่า R_f เท่ากันคือ 0.29 ส่วน PP_2 และ PP_3 ไม่ปรากฏแถบสีซึ่งอาจจะมีสาเหตุมาจากการเสียสภาพ (denature) ของเอนไซม์ในระหว่างขั้นตอนการสกัดเอนไซม์ออกจากเส้นใยทำให้ความเข้มข้นของเอนไซม์น้อยเกินไปจนไม่สามารถวิเคราะห์ได้

จะเห็นได้ว่า รูปแบบของเอนไซม์แต่ละระบบสามารถบอกความสัมพันธ์ได้ต่างๆ กัน ดังนั้นในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์จึงจำเป็นต้องใช้ระบบไอโซไซม์มากกว่า 1 ระบบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษารูปแบบไอโซไซม์จากระบบเอนไซม์ 6 ระบบด้วยกันคือ MDH, EST, SKDH, FDH, DIA และ 6-PGDH พบว่ามีไซโมแกรมปรากฏเพียง 3 ระบบ คือ MDH, EST และ SKDH จากการพิจารณาไซโมแกรมของเอนไซม์ MDH พบว่า ลูกผสม PP_3 อาจเกิดจากการรวมตัวกันของโปรโตพลาสต์ของเห็ดหอมกับเห็ดหอมแต่อาจมีการรับเอา Mitochondrial DNA จากไซโตพลาสซึมของเห็ดขอนขาวเข้าไปด้วย ส่วนลูกผสม PP_1 และ PP_2 มีแนวโน้มที่จะเป็นลูกผสมของเห็ดหอมและเห็ดขอนขาวจริงเนื่องจากมีแถบไซโมแกรมที่ตรงกันกับไซโมแกรมของเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว สำหรับไซโมแกรมของเอนไซม์ EST ไม่สามารถอธิบายความสัมพันธ์ได้เนื่องจากมีไซโมแกรมที่เหมือนกันทั้งหมด ส่วนไซโมแกรมของเอนไซม์ SKDH ไม่สามารถใช้ในการพิจารณาความสัมพันธ์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

สูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเห็ด

สูตรอาหารแข็งที่ใช้เพาะเลี้ยงเห็ดหอม

Malt Extract Agar

ในสารละลาย 1 ลิตรประกอบด้วย	Malt extract	20	กรัม
	Peptone	5	กรัม
	Agar	15	กรัม

สูตรอาหารเหลวที่ใช้เพาะเลี้ยงเห็ดหอม

Malt Extract Broth

ในสารละลาย 1 ลิตรประกอบด้วย	Malt extract	20	กรัม
	Peptone	5	กรัม

Potato Dextrose Yeast extract Broth

ในสารละลาย 1 ลิตรประกอบด้วย	มันฝรั่ง	200	กรัม
	Dextrose	20	กรัม
	Yeast extract	5	กรัม

สูตรอาหารแข็งที่ใช้เพาะเลี้ยงเห็ดขอนขาวและเห็ดลูกผสม PP_1, PP_2 และ PP_3

Potato Dextrose Agar

ในสารละลาย 1 ลิตรประกอบด้วย	Potato Dextrose Agar	39 กรัม

สูตรอาหารเหลวที่ใช้เพาะเลี้ยงเห็ดขอนขาวและเห็ดลูกผสม PP_1, PP_2 และ PP_3

Potato Dextrose Broth

ในสารละลาย 1 ลิตรประกอบด้วย	Potato Dextrose Broth	12 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

การเตรียม Stock solution สำหรับทำ polyacrylamide gel

Stock solution

Acrylamide-bisacrylamide (30:0.8)

acrylamide	30 g
bisacrylamide	0.8 g

ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ml จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 2 ครั้ง เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4°C

การเตรียม Stock Bromphenol blue (Dye maker)

สารละลายประกอบด้วย

Bromphenol blue	100 g
Tris-glycine solution	100 ml

ตารางที่ 2 วิธีเตรียม buffer

Stacks at pH 8.3, separates at pH 9.5	
Stacking gel buffer:	Tris-HCl(pH 6.8; dissolve 6.0 g of Tris in 40 ml of water and titrate it to ph 6.8 with 1 M HCL (~ 48 ml). Adjust to 100 ml final volume.
Resolving gel buffer:	Tris-HCl(pH 8.8); mix 36.3 g of Tris and 48.0 ml of 1 M HCl and bring to 100 ml final volume with water. Titrate the solution to pH 8.8, with HCl, if necessary.
Reservoir buffer:	Tris-glycine(pH 8.3) at the correct concentration for use; dissolve 3.0 g of Tris and 14.4 g of glycine in water and bring to 1 litre final volume.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 การเตรียม polyacrylamide gel ที่เปอร์เซ็นต์ต่างๆ กัน

Stock solution	Stacking gel (riboflavin as catalyst)	Final acrylamide concentration in resolving gel (%)[a]							Reservoir buffer[b]
		20.0	17.5	15.0	12.5	10.0	7.5	5.0	-
Acrylamide-bisacrylamide (30:0.8)	2.5	20.0	17.5	15.0	12.5	10.0	7.5	5.0	-
Stacking gel buffer stock[c]	5.0	-	-	-	-	-	-	-	-
Resolving gel buffer stock[c]	-	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	-
Reservoir buffer stock[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-
									1000 (i.e. undiluted)
1.5% ammonium persulphate[d]	-	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	-
0.004% riboflavin	2.5	-	-	-	-	-	-	-	-
Water	10.0	4.75	7.25	9.75	12.25	14.75	17.25	19.75	-
TEMED[d]	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	-

[a] The columns represent volumes (ml) of the various reagents required to make 30 ml of gel mixture.

[b] Volumes (ml) of reagents required to make 1 liter of reservoir buffer.

[c] Stock solution prepared as described in Table 2.

[d] When the low pH discontinuous buffer system is used with ammonium persulphate as catalyst, increase the volume of TEMED to 0.15 ml for the resolving gel and adjust the water volume accordingly. Riboflavin is usually more effective than ammonium persulphate/TEMED at low pH whilst the latter is more Effective at high pH.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.

การเตรียมสีย้อมเอนไซม์

ตารางที่ 4 สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบในการศึกษาแถบของเอนไซม์

ชนิดของเอนไซม์	สารละลายสีย้อมเอนไซม์	ปริมาณ
1. Diaphorase	0.0825 M Tris-HCl, pH 8.0	50.0 ml
	0.096 M Tetrazolium thiazolyl blue (MTT)	2.5 ml
	0.003 M β-nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)	50.0 mg
	2,6- dichiorophenol-indophenol (DICIP)	1.0 mg
2. Formate Dehydrogenase (FDH)	0.0825 M Tris-HCl, pH 8.0	40.0 ml
	0.0032 M Phenazine methosulfate (PMS)	1.3 ml
	0.003 M β-nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)	6 ml
	0.096 M Tetrazolium thiazolyl blue (MTT)	2.5 ml
	Formic acid	3.0 g
3. Malate dehydrogenase (MDH)	0.0825 M Tris-HCl, pH 8.0	40.0 ml
	0.0032 M Phenazine methosulfate (PMS)	1.3 ml
	0.4918 M $MgCl_2$ - 6 H_2O	1.3 ml
	0.096 M Tetrazolium thiazolyl blue (MTT)	2.5 ml
	0.003 M β-nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)	5.3 ml
	DL-Malic acid	60.0 mg
4. 6-Phosphogluconate dehydrogenase (6-PGDH)	0.0825 M Tris-HCl, pH 8.0	40.0 ml
	0.0032 M Phenazine methosulfate (PMS)	1.3 ml
	0.4918 M $MgCl_2$ - 6 H_2O	1.3 ml
	0.096 M Tetrazolium thiazolyl blue (MTT)	2.5 ml
	0.0026 M β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP)	5.3 ml
	6-phosphogluconic acid trisodium salt	40.0 mg

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดของเอนไซม์	สารละลายสีย้อมเอนไซม์	ปริมาณ
5. Shikimate dehydrogenase (SKDH)	0.0825 M Tris-HCl, pH 8.0	40.0 ml
	0.0032 M Phenazine methosulfate (PMS)	1.3 ml
	0.096 M Tetrazolium thiazolyl blue (MTT)	2.5 ml
	0.0026 M β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP)	5.3 ml
	Shikimi acid	50.0 mg
6. Esterase (EST)	Solution A	
	0.12 M Phosphate buffer, pH 5.6	50.0 ml
	Fast blue RR salt	100 mg
	(filtrate)	5.3 ml
	Solution B	
	0.12 M Phosphate buffer, pH 5.6	50.0 ml
	Ethyl alcohol (absolute)	5.0 ml
	0.1 M α-Napthyl propionate (in ethyl alcohol)	2.0 ml
	0.1 M α-napthyl acetate (in ethyl alcohol)	1.0 ml

หมายเหตุ

1-5 mix สารละลายเข้าด้วยกันภายในขวดสีชาแล้วปิดด้วยกล่องสีดำเป็นเวลา 15 นาที โดยใช้ magenetic stirror แล้วจึงเทลงในกล่องย้อมสีที่มีแผ่นเจลอยู่

6 เท solution A ลงใน กล่องย้อมสี แช่แผ่นเจลลงใน staining solution 10-15 นาที ที่ 37° C เติม solution B และ inculate ต่ออีก 20-30 นาที ในที่มืด zone ของ esterase activity จะมีแถบสีดำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

1) ชัชฎาพร อินทำมา . 2538 . การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและไอโซไซม์ของเห็ดโคน *Termitomyces spp.* (STUDY OF MORPHOLOGY AND ISOZYME IN *Termitomyces*) . วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท แผนกพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, จำนวน 67 หน้า.

2) ดวงพร วรสุนทโรสถ . 2530 . การใช้เอนไซม์ในพืชทางการเกษตร . วิทยาศาสตร์, 41(7) : พ1 - พ9.

3) ประภัสสร โชคสวนทรัพย์ . 2539 . การผสมพันธุ์ระหว่างเห็ดหอมและเห็ดขอนขาว . วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, จำนวน 140 หน้า.

4) วันดี ยินดียั่งยืน . 2533 . สหสัมพันธ์ระหว่างไอโซไซม์กับความสามารถในการเกิดดอกของสายพันธุ์ลูกผสมของเห็ดหอม (*Lentinula edodes*) . วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, จำนวน 126 หน้า.

5) Bournival, B.L. and S.S. Korban . 1987 . Electrophoretic analysis of genetic variability Apply. Sci. Hort. 31 : 233 - 243.

6) Davis B.J. . 1964 . Ann. New York Acad. Sci . 121-404

7) DeLorenzo, R. J. and F. H. Ruddle . 1969 . Genetic control of two electrophoretic variants of glucosephosphate isomerase in the mouse (*Mus musculus*) . Biochem. Gen. 3 : 151 - 162.

8) Doong, J - Y H. and Y. -T. Kiang . 1987 . Inheritance of aconitase isozymes in soybean . Genome 29 : 713 - 717.

9) Florkin, M. and E. H. Stotz . 1973 . Comprehensive Biochemistry, Enzyme Nomenclature . vol. 13, pp. 114 - 115, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, London, New York, 3rd ed.

10) Lu, S. -I., T. J. Leonard, S. Dick and G. F. Leatham . 1988 . A new strategy for genetic improvement of edible fungi through enhancement of their lignocellulose degrading and fruiting ablities . *Mic. Neotrop. Aplic.* 1 : 5 - 19.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

11) Mennendez, R. A., F. E. Larsen and R. Fritts, J. R. . 1986 . Protein and isozyme electrophoresis and isoelectric focusing for the characterization of apple clones . 29 : 211 - 220.

12) Nelson, K., R. J. Baker and R. L. Honeycutt . 1987 . Mitochondrial and protein differentiation between cytotype of the white footed mouse, *Peromyscus leucopus* .Envolution 41 (4) : 845 - 872.

13) Ohmasa, M. and H. Furudawa . 1986 . Analysis of esterase and malate dehydrogenase isozymes of *Lentinus edodes* by isoelectric focusing for the identification and discrimination of stocks . *Trans. Mycol. Soc. Japan* 27 : 74 - 90.

14) Royse, D. J. and B. May . 1982a . Use of isozyme variation to idnetify genotypic classes of *Agaricus brunnescens* . Mycologia 74(1) : 93 - 102.

15) Royse, D. J. and B. May . 1982b . Genetic relatedness and its application in selective breeding of *Agaricus brunnescens* . Mycologia 74(4) : 569 - 575.

16) Royse, D. J. and B. May . 1987 . Identification of shiitake genotypes by multilocus enzyme electrophoresis : catalog lines . *Biochem. Gen.* 25(9/10) : 705 - 716.

17) Royse, D. J., C. Spear and B. May . 1983a . Cell line authentication and genetic relatedness of lines of the shiitake mushroom, *Lentinus edodes* . *J. Gen. Appl. Microbiol.* 29 : 205 - 216.

18) Spieth, P. T. . 1975 . Population genetics of allozyme variation in *Neurospora intermedia* . *Genetics* 80 : 785 - 805.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้