บทที่ 4

ผลการทดลอง

การเจริญของเส้นใยเห็ดหอม (*Lentinula edodes*) ในอาหารเหลวสูตร PDB

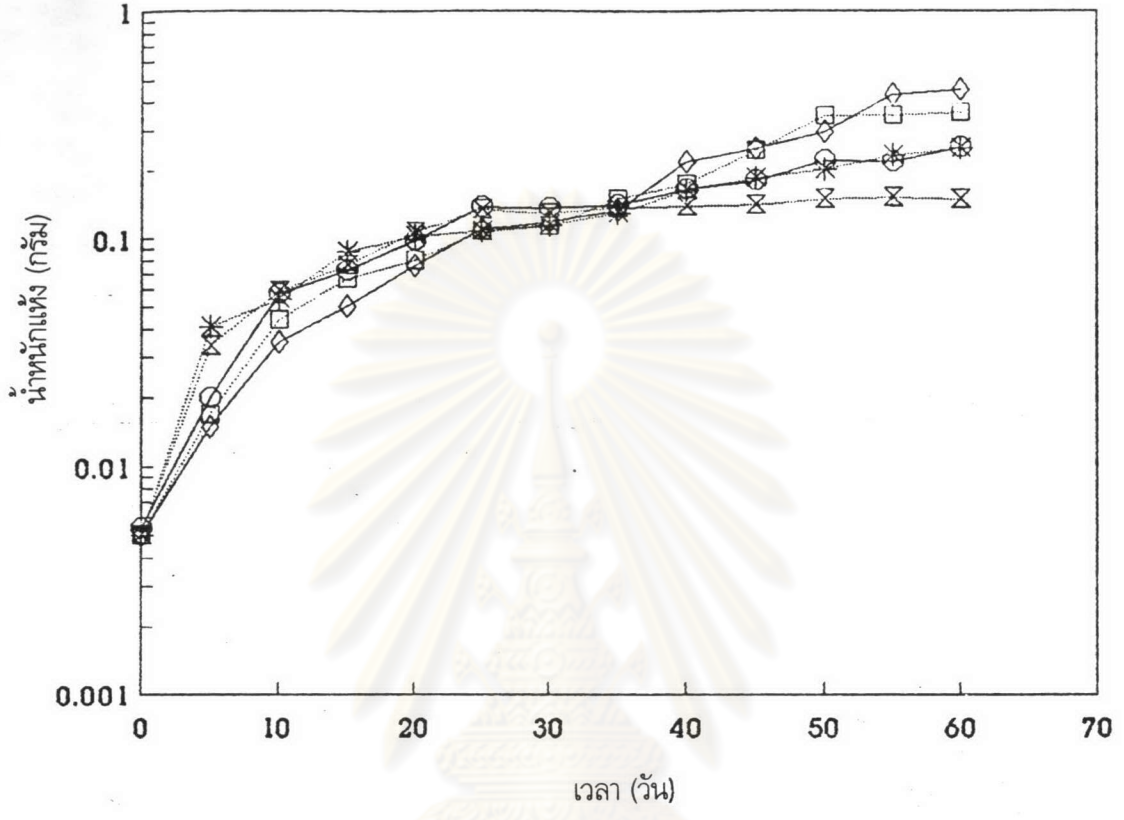
1. ลักษณะการเจริญและการพัฒนาของเส้นใยเห็ดหอม (*Lentinula edodes*)

เมื่อทำการเลี้ยงเส้นใยบนผิวหน้าอาหารเหลวสูตร PDB พบว่าหลังจากที่ใส่ชิ้นเส้นใยที่เจริญบนจานอาหาร PDA ลงบนผิวหน้าอาหารเหลวแล้ว เส้นใยจะเจริญเต็มผิวหน้าอาหารภายในเวลา 10 วัน มีลักษณะฟูหนา สีขาว บริเวณริมโคโลนีที่อยู่ติดกับข้างขวดทดลองจะมีเส้นใยเจริญไต่ไปตามข้างขวดบ้างเล็กน้อยสูงประมาณ 5-7 มม. เมื่ออายุของเส้นใยมากขึ้นเส้นใยจะมีความฟูลดลงและเกิดการรวมตัวกันเป็นแผ่นหนาประมาณ 0.2 มม. มีลักษณะละเอียดคล้ายหนัง และบริเวณริมโคโลนีที่ติดอยู่กับข้างขวดจะเกิดการหยักงอย่นจนดูคล้ายตุ่มดอก เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 25 วัน จะเกิดตุ่มดอกมีสีขาวลักษณะฉ่ำน้ำโดยเกิดมากที่บริเวณขอบโคโลนี มีการเพิ่มขนาดและปริมาณมากขึ้นเมื่ออายุมากขึ้น ตุ่มดอกมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.4-2.0 ซม. ในขณะเดียวกันกับการเกิดตุ่มดอก เส้นใยจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและมีความเข้มของสีมากขึ้นตามอายุที่เพิ่มยกเว้นในสายพันธุ์ MU12 จะไม่เกิดการผลิตตุ่มดอกและการเปลี่ยนสีของเส้นใย ตุ่มดอกมีการพัฒนาเป็นดอกเห็ดภายใน 40 วัน

2. การติดตามการเจริญของเส้นใยเห็ดหอม (*L. edodes*)

ติดตามการเจริญของเส้นใยเห็ดหอม โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักแห้งของเส้นใยที่ได้จากการเจริญบนผิวหน้าอาหารเหลวสูตร PDB เป็นระยะเวลา 60 วัน โดยเก็บผลทุก 5 วัน แล้วนำมาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการเจริญ (วัน) กับน้ำหนักแห้งของเส้นใย (กรัม)(รูปที่ 2) พบว่าในช่วงตั้งแต่เริ่มใส่ชิ้นเส้นใยจนถึง 20 วัน เส้นใยอยู่ในระยะ log มีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักแห้งอย่างรวดเร็วและมีการเพิ่มของน้ำหนักแห้งเพียงเล็กน้อยถึงคงที่เมื่ออายุประมาณ 25 วัน ซึ่งเส้นใยอยู่ในระยะ Late-log น้ำหนักแห้งของเส้นใยจะคงที่เช่นนี้จนอายุประมาณ 35-40 วันแล้วจึงเพิ่มขึ้น

เมื่อทำการเปรียบเทียบลักษณะการเจริญและการพัฒนาของเส้นใย กับการติดตามน้ำหนักแห้ง พบว่ามีความสอดคล้องกันคือ ช่วงตั้งแต่ทำการใส่ชิ้นเส้นใยจนถึงอายุ 20 วันเป็นช่วงที่เส้นใยอยู่ในระยะ log เส้นใยมีการเจริญอย่างรวดเร็วทำให้มีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักแห้งอย่างรวดเร็วเช่นกัน ดูได้จากที่เส้นกราฟมี



รูปที่ 2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการเจริญ (วัน) กับน้ำหนักแห้งของเส้นใย (กรัม)

ได้จากการเลี้ยงเส้นใยเห็ดหอมสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารเหลวสูตร PDB ในที่มืดอุณหภูมิประมาณ 25 ^{o}ซ นาน 60 วัน เก็บผลการทดลองโดยการชั่งหาน้ำหนักแห้งเส้นใยเฉลี่ยจาก 3 ขวด ทุก 5 วัน

- สายพันธุ์ MU2
- สายพันธุ์ MU4
- สายพันธุ์ MU5
- สายพันธุ์ MU12
- สายพันธุ์ HY (สายพันธุ์ลูกผสม)

ความชันมาก เมื่อเส้นใยมีอายุ 25-40 วันซึ่งเป็นช่วงที่มีการพัฒนาของตุ่มดอก เส้นใยมีการเจริญช้าลงมีการเพิ่มของน้ำหนักแห้งเพียงเล็กน้อยถึงคงที่ จนเมื่ออายุ 40 วันขึ้นไปตุ่มดอกได้พัฒนากลายเป็นดอกเห็ดอย่างสมบูรณ์มีการสร้างหมวกดอก ก้านดอกและครีบดอก เกิดการขยายขนาดของดอก จึงมีผลให้น้ำหนักแห้งของเส้นใยเพิ่มมากขึ้นอีกครั้งหนึ่ง ยกเว้นในสายพันธุ์ MU12 ที่ไม่มีการพัฒนาของตุ่มดอกจะเห็นได้ว่าตั้งแต่อายุประมาณ 35 วันเป็นต้นไปน้ำหนักแห้งของเส้นใยมีการเพิ่มน้อยมากจนถึงคงที่

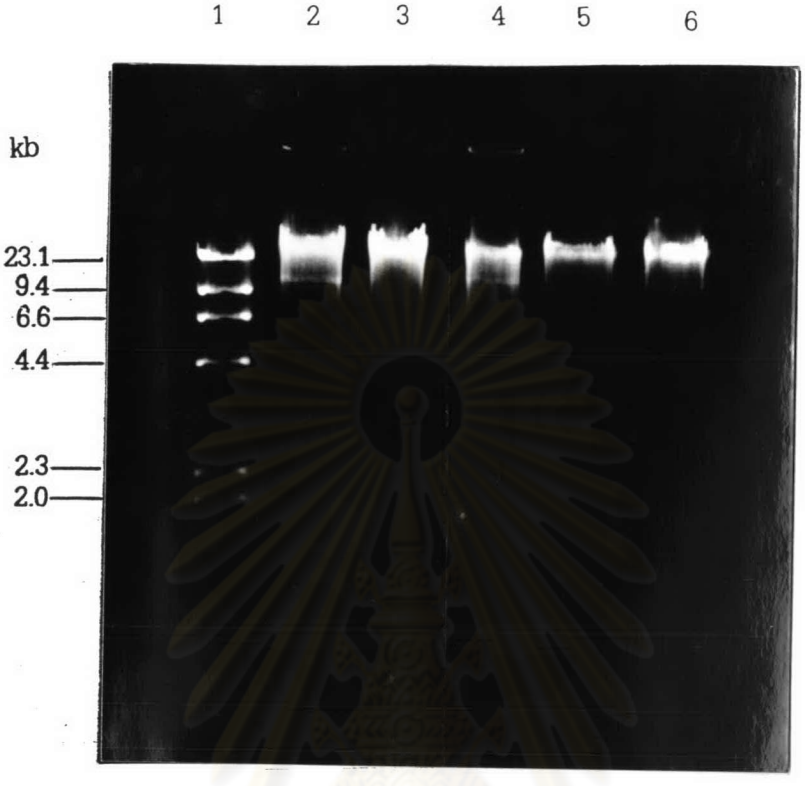
การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอจากเส้นใยเห็ดหอม (*L. edodes*)

ในการวิจัยนี้ใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอแบบทั้งหมดของเซลล์ (total DNA) เมื่อนำมาวิเคราะห์โดยการทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซีสเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hin*dIII) พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้อยู่ในรูปของ high molecular weight DNA มีขนาดมากกว่า 23.1 กิโลเบส (รูปที่ 3) จากนั้นทำการเตรียมชิ้นดีเอ็นเอเพื่อนำไปโคลนโดยย่อยดีเอ็นเอของสายพันธุ์ MU12 ที่สกัดได้ด้วย *Eco*RI หาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการย่อยดีเอ็นเออย่างสมบูรณ์ โดยทดลองย่อยดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัมด้วยเอนไซม์ *Eco*RI ปริมาณ 5, 10 และ 15 หน่วย บ่มที่ 37°ซ นาน 3 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซีส (รูปที่ 4) พบว่าดีเอ็นเอถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ที่ตั้งแต่ปริมาณเอนไซม์ 10 หน่วย (รูปที่ 4 ช่องที่ 4) และให้ลักษณะแถบดีเอ็นเอขนาดต่างๆกันจากต่ำกว่า 23.1 กิโลเบสจนถึงขนาดต่ำกว่า 2.0 กิโลเบส ดังนั้นในการย่อยดีเอ็นเออย่างสมบูรณ์เพื่อใช้ในการโคลนจึงใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 10 หน่วยต่อ ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 1 ไมโครกรัม ดีเอ็นเอที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์นี้จะนำไปใช้ในการโคลนโดยเชื่อมกับ ดีเอ็นเอพาหะที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI เช่นกันต่อไป

การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอพาหะ

ดีเอ็นเอพาหะที่ใช้ได้แก่ พลาสมิด pUC118 ซึ่งได้จากการสกัดดีเอ็นเอของพลาสมิดโดยวิธีอัลคาไลน์ (Alkaline Extraction) พลาสมิดที่เตรียมได้นี้ได้รับการยืนยันว่าเป็นพลาสมิด pUC118 จริงโดยย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Sca*I, *Hin*dIII, *Nde*I และ *Pvu*II (รูปที่ 5) ผลการย่อยพบว่าได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดตรงกับที่แสดงในแผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pUC118 (ภาคผนวกที่ 3) คือ เมื่อย่อยด้วย *Sca*I และ *Hin*dIII จะได้แถบดีเอ็นเอ 2 ชิ้นขนาด 1.7 และ 1.4 กิโลเบส ย่อยด้วย *Sca*I และ *Nde*I ได้ชิ้นดีเอ็นเอ 1 ชิ้นขนาด 3.1 กิโลเบส ย่อยด้วย *Sca*I และ *Pvu*II ได้แถบดีเอ็นเอ 3 ชิ้นขนาด 1.5, 1.3 และ 0.3 กิโลเบส และเมื่อย่อยด้วยเอนไซม์ *Sca*I ก็จะได้ดีเอ็นเอ 1 ชิ้นมีขนาด 3.1 กิโลเบส

เมื่อได้พลาสมิดดีเอ็นเอตามที่ต้องการแล้ว ได้ศึกษาหาปริมาณของเอนไซม์ *Eco*RI ที่เหมาะสมในการย่อยพลาสมิด pUC118 จำนวน 1 ไมโครกรัมอย่างสมบูรณ์ โดยบ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ให้ความ

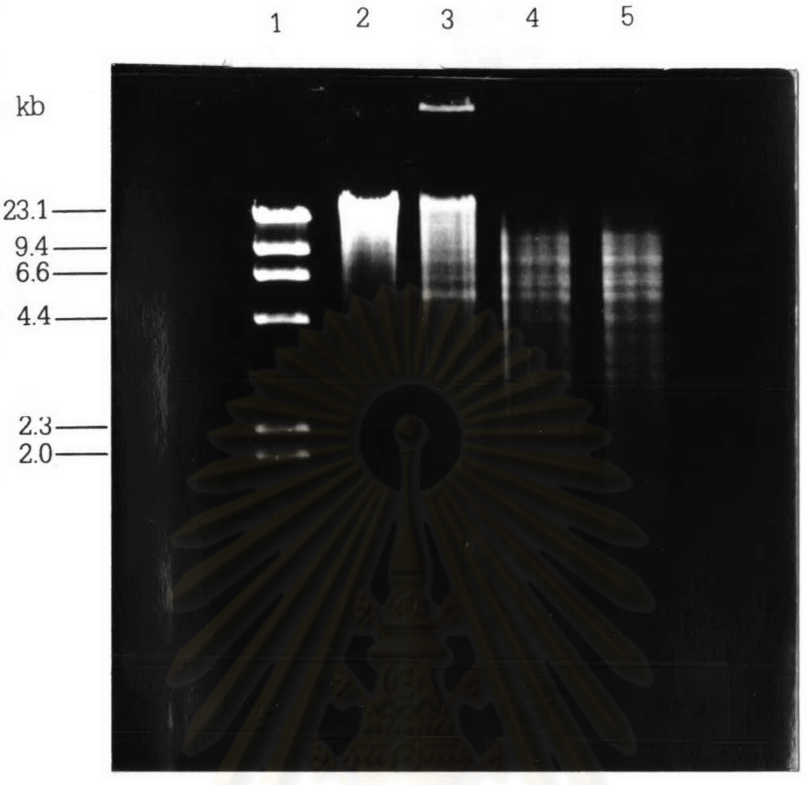


รูปที่ 3 ผลการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยเห็ดหอม (*Lentinula edodes*)

ได้จากการสกัดดีเอ็นเอจากเส้นใยเห็ดหอมที่เลี้ยงบนผิวหน้าอาหารเหลวสูตร PDB นาน 20-25 วัน แยกบนอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีสที่ความเข้มข้นเจล 0.7 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2
ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4
ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5
ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12
ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ HY

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4 ผลการหาปริมาณเอนไซม์ *Eco*RI ที่เหมาะสมในการย่อยอย่างสมบูรณ์ของดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12

ย่อยดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ปริมาณ 1 ไมโครกรัมด้วยเอนไซม์ *Eco*RI จำนวน 5, 10 และ 15 หน่วย บ่มที่ 37°ซ นาน 3 ชั่วโมง แยกด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีสที่ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง

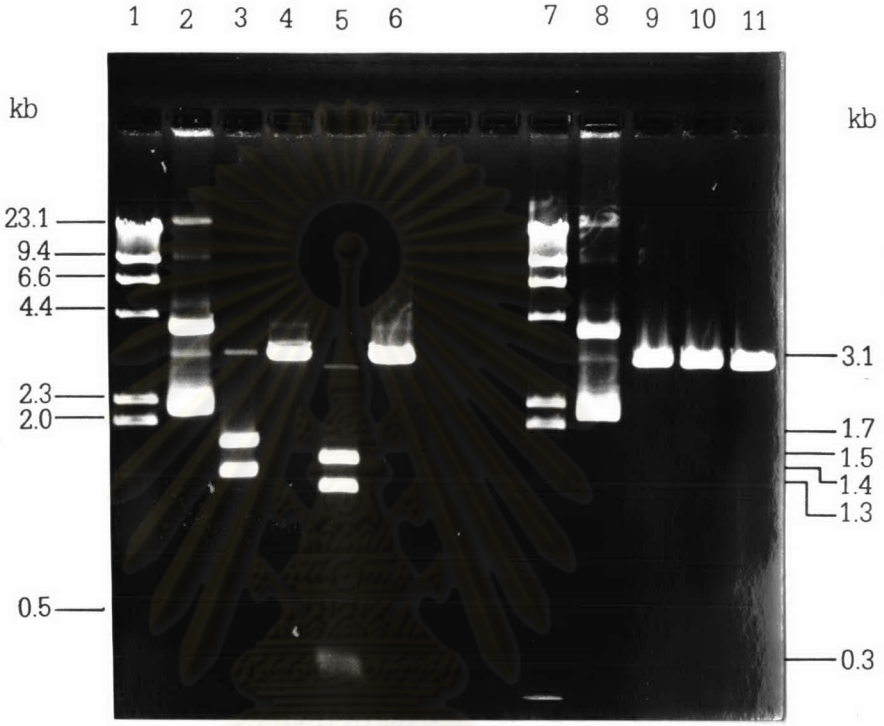
ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)

ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ยังไม่ถูกย่อย

ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *Eco*RI 5 หน่วย

ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *Eco*RI 10 หน่วย

ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *Eco*RI 15 หน่วย



รูปที่ 5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I16318XX

รูปที่ 5 การตรวจสอบขนาดของพลาสมิด pUC118 ตามแผนที่เรสทริกชัน และการหาปริมาณเอนไซม์ *Eco*RI ที่เหมาะสม

ย่อยพลาสมิด pUC118 ปริมาณ 1 ไมโครกรัมด้วยเอนไซม์ *Sca*I, *Hind*III, *Nde*I และ *Pvu*II บ่มที่ 37°ซ นาน 3 ชั่วโมง และย่อยพลาสมิด pUC118 ปริมาณ 1 ไมโครกรัมด้วย *Eco*RI จำนวน 5, 10 และ 15 หน่วย บ่มที่ 37°ซ นาน 3 ชั่วโมง เพื่อหาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสม ตรวจสอบโดยทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีสที่ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 2 พลาสมิด pUC118 ที่ยังไม่ได้ถูกย่อย
ช่องที่ 3 พลาสมิด pUC118 ที่ถูกย่อยด้วย *Sca*I และ *Hind*III
ช่องที่ 4 พลาสมิด pUC118 ที่ถูกย่อยด้วย *Sca*I และ *Nde*I
ช่องที่ 5 พลาสมิด pUC118 ที่ถูกย่อยด้วย *Sca*I และ *Pvu*II
ช่องที่ 6 พลาสมิด pUC118 ที่ถูกย่อยด้วย *Sca*I
ช่องที่ 7 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 8 พลาสมิด pUC118 ที่ยังไม่ได้ถูกย่อย
ช่องที่ 9 พลาสมิด pUC118 ที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI 5 หน่วย
ช่องที่ 10 พลาสมิด pUC118 ที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI 10 หน่วย
ช่องที่ 11 พลาสมิด pUC118 ที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI 15 หน่วย

เข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 5, 10 และ 15 หน่วย (รูปที่ 5 ช่องที่ 9, 10 และ 11) จากผลการทดลองพบว่าพลาสมิดดีเอ็นเอให้ผลการย่อยเหมือนกันทั้งหมด คือ ได้แถบดีเอ็นเอเพียงขนาดเดียวที่ 3.1 กิโลเบส และพลาสมิดดีเอ็นเอได้ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์แล้วตั้งแต่ที่ค่าความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 5 หน่วย ดังนั้นในการเตรียมชิ้นดีเอ็นเอของพลาสมิดเพื่อการโคลนจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของ *Eco*RI เท่ากับ 5 หน่วยต่อการย่อยดีเอ็นเอ 1 ไมโครกรัม

ผลการทำทรานสฟอร์เมชัน (Transformation)

ทำการทรานสฟอร์มดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้จากการเชื่อมต่อดีเอ็นเอ เข้าสู่เซลล์เจ้าเรือน *E. coli* JM101 ที่เตรียมโดยใช้แคลเซียมคลอไรด์ หลังจากทำทรานสฟอร์มแล้วจึงคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้บนอาหารสูตรอุดม LB ที่เสริมด้วยยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน X-gal และ IPTG จากการทดลองได้โคโลนีสีขาวจำนวน 125 โคโลนีและได้โคโลนีสีน้ำเงินจำนวน 952 โคโลนี หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้ไปทดสอบหา repetitive sequences โดยการทำ Dot-blot hybridization ต่อไป

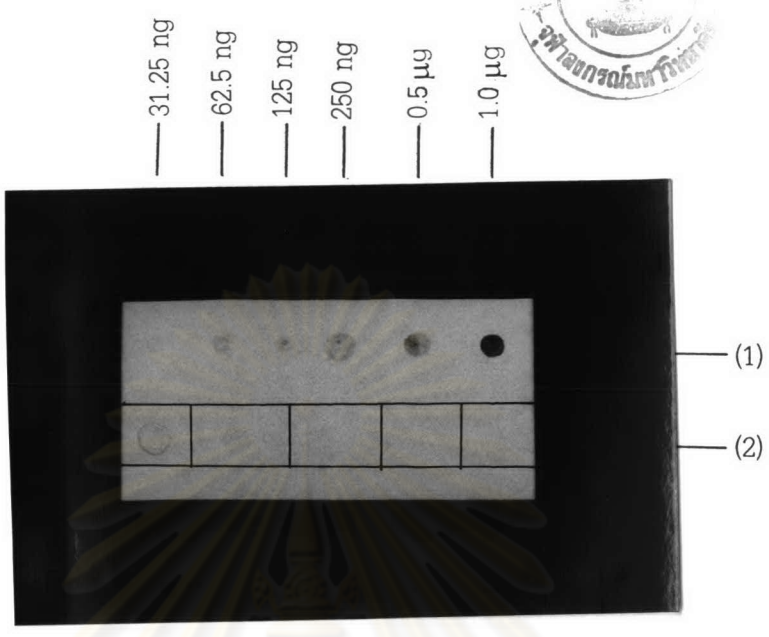
การคัดเลือกดีเอ็นเอลูกผสมโดยทำ Dot-blot hybridization

นำทรานสฟอร์แมท์ที่ได้มาสกัดดีเอ็นเอลูกผสมตามวิธีสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอปริมาณน้อย สุ่มจุดดีเอ็นเอที่สกัดได้มา 59 โคลนและพลาสมิด pUC118 อย่างละ 1 ไมโครกรัม ลงบนแผ่น ไนล่อนเมมเบรน ตามวิธี Dot-blot Transfer แล้วทำไฮบริไดเซชันกับตัวติดตามที่สร้างจากดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 (รูปที่ 6) โดยมีดีเอ็นเอชนิดต่างๆ (ดีเอ็นเอของ calf thymus, พลาสมิด pUC118, พลาสมิด pBR322, พลาสมิด pSE411 และดีเอ็นเอของแลมป์ดา) เป็นดีเอ็นเอควบคุม จากผลการทดลองคัดเลือกเฉพาะโคลนที่ให้สัญญานการไฮบริไดซ์เข้มจนถึงปานกลางได้ 10 โคลน คือ #9, #17, #18, #20, #21, #22, #35, #42, #50 และ #53 (รูปที่ 7) นำโคลนที่คัดเลือกได้นี้ไปศึกษาขนาดของชิ้นดีเอ็นเอลูกผสม และทำการทดสอบความเหมาะสมที่จะใช้เป็นดีเอ็นเอติดตามที่เหมาะสมต่อไป

การคัดดีเอ็นเอลูกผสมที่มีความเหมาะสมเพื่อนำไปใช้สร้างดีเอ็นเอติดตามสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RFLP (RFLP analysis)

1. การศึกษาขนาดของดีเอ็นเอลูกผสม

นำดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลนที่คัดเลือกได้จากการทำไฮบริไดเซชันกับดีเอ็นเอติดตาม MU12 มาศึกษาขนาดของดีเอ็นเอ โดยย่อยดีเอ็นเออย่างสมบูรณ์ด้วย *Eco*RI แยกด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส

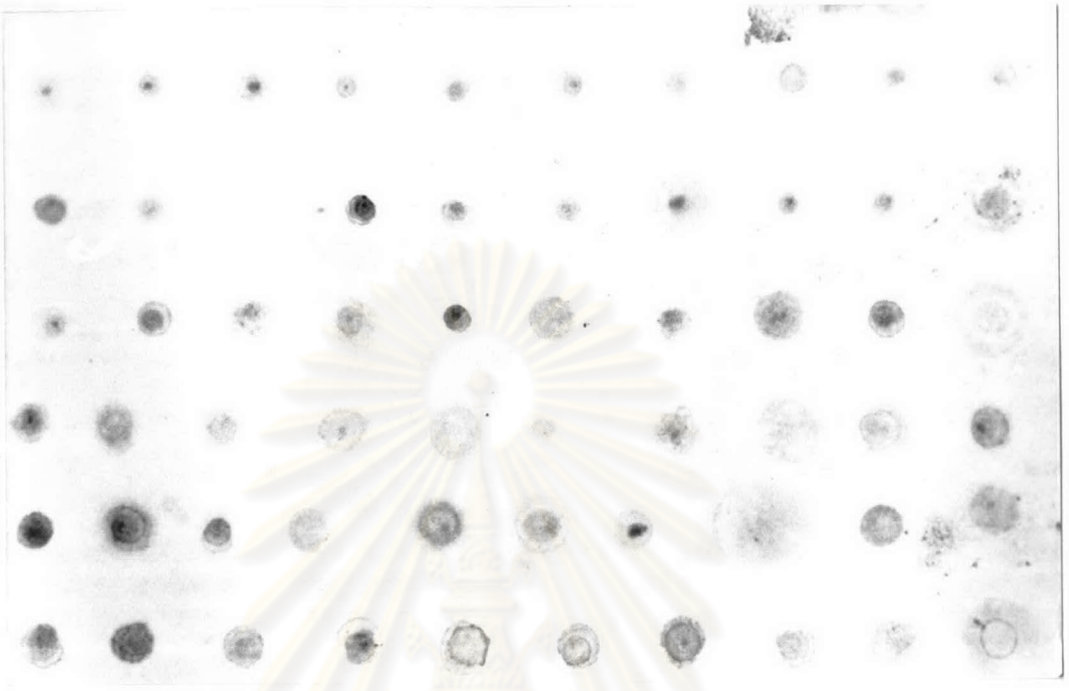


รูปที่ 6 ผลแสดงความเข้มของสัญญานการไฮบริไดซ์ระหว่างตัวติดตามที่สร้างจากดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 กับ ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 และดีเอ็นเอชนิดอื่นๆ

ตรึงดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ความเข้มข้นต่างๆและดีเอ็นเอชนิดอื่นๆ ลงบนแผ่นไนล่อนเมมเบรน จากนั้นทำไฮบริไดเซชันกับตัวติดตามที่สร้างจากดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ด้วยวิธี Dot-blot hybridization แล้วตรวจหาสัญญานการไฮบริไดซ์ที่เกิดขึ้น

ส่วนที่ 1 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ปริมาณ 31.25, 62.5, 125, 250 นาโนกรัม, 0.5 และ 1.0 ไมโครกรัม

ส่วนที่ 2 ดีเอ็นเอชนิดอื่นๆ ได้แก่ Calf Thymus DNA, พลาสมิด pUC118, พลาสมิด pBR322, พลาสมิด pSE411 และดีเอ็นเอจากแลมป์ดา ปริมาณอย่างละ 1 ไมโครกรัม



รูปที่ 7 ผลการวิเคราะห์หาโคลนที่ให้สัญญานการไฮบริไดซ์เข้มเมื่อทำการไฮบริไดซ์กับตัวติดตามที่สร้างจากดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12

ตรึงดีเอ็นเอลูกผสมที่เตรียมได้จากโคลนต่างๆจำนวน 59 โคลนและพลาสมิด pUC118 ปริมาณอย่างละ 1 ไมโครกรัม ลงบนแผ่นไนล่อนเมมเบรน จากนั้นทำไฮบริไดเซชันกับตัวติดตามที่สร้างจากดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ด้วยวิธี Dot-blot hybridization แล้วตรวจหาสัญญานการไฮบริไดซ์ที่เกิดขึ้นเคัดเลือกโคลนที่ให้สัญญานที่ชัดเจนไปศึกษาชิ้นดีเอ็นเอ insert

-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	42	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	50	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	22	-	-	53	-	-	-	-	-
20	21	-	35	-	-	-	-	-	pUC118

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

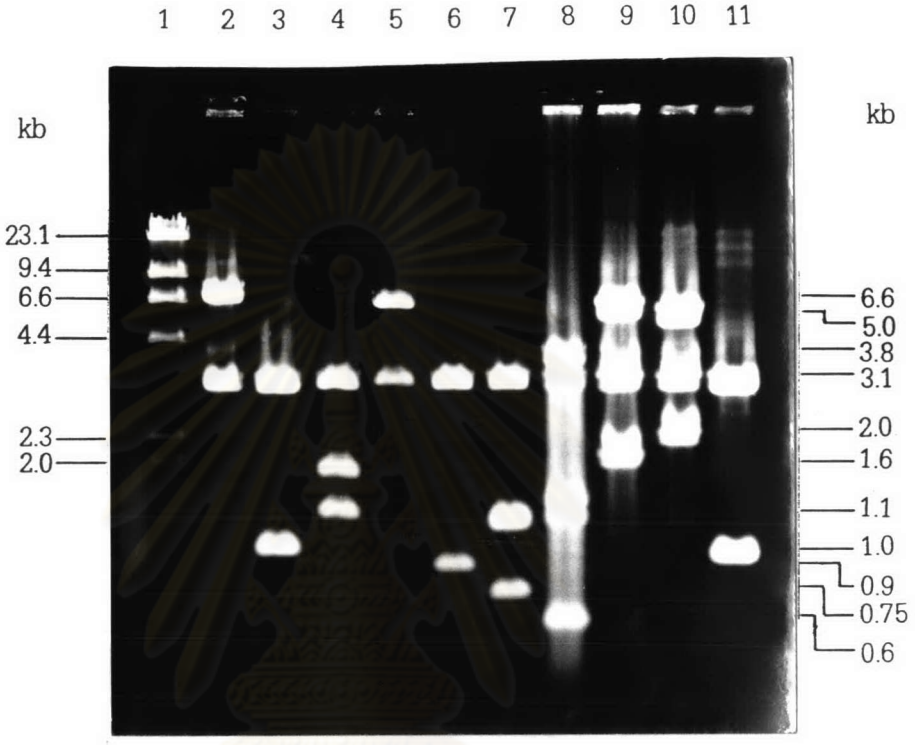
ที่ความเข้มข้นของเจล 1 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 3-4 ชั่วโมง เปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III) (รูปที่ 8) จากรูปจะสังเกตุเห็นแถบของพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีขนาด 3.1 กิโลเบสในทุกช่องของตัวอย่าง และนอกจากแถบดีเอ็นเอของพลาสมิดแล้วจะปรากฏแถบของดีเอ็นเอจากเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ได้รับการเชื่อมต่อ โดยมีขนาดต่างๆกัน คือ โคลน #9 มีชิ้นดีเอ็นเอ 1 ชิ้นขนาด 6.6 กิโลเบส, โคลน #17 มีชิ้นดีเอ็นเอ 1 ชิ้นขนาด 1.0 กิโลเบส, โคลน #18 มีชิ้นดีเอ็นเอ 2 ชิ้นขนาด 1.6 และ 1.1 กิโลเบส, โคลน #20 มีชิ้นดีเอ็นเอ 1 ชิ้นขนาด 6.0 กิโลเบส, โคลน #21 มีชิ้นดีเอ็นเอ 1 ชิ้นขนาด 0.9 กิโลเบส, โคลน #22 มีชิ้นดีเอ็นเอ 2 ชิ้นขนาด 1.1 และ 0.75 กิโลเบส, โคลน #35 มีชิ้นดีเอ็นเอ 4 ชิ้นขนาด 3.8, 1.35, 1.1 และ 0.6 กิโลเบส, โคลน #42 มีชิ้นดีเอ็นเอ 2 ชิ้นขนาด 5.5 และ 1.9 กิโลเบส, โคลน #50 มีชิ้นดีเอ็นเอ 2 ชิ้นขนาด 5.0 และ 2.0 กิโลเบส และโคลน #53 มีชิ้นดีเอ็นเอ 1 ชิ้นขนาด 0.9 กิโลเบส (รูปที่ 8 ช่องที่ 2-11 ตามลำดับ)

2. <u>การคัดเลือกหาชิ้นดีเอ็นเอที่เหมาะสมต่อการนำไปสร้างตัวติดตามสำหรับ RFLP analysis</u>

เมื่อศึกษาขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเชื่อมต่อแล้ว จึงสกัดเฉพาะชิ้นดีเอ็นเอ insert (ไม่รวมพลาสมิด) ไปทำ Dot-blot hybridization กับตัวติดตามที่สร้างจากดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 เพื่อตรวจสอบหาชิ้นดีเอ็นเอที่คาดว่ามี repetitive sequence โดยจุดดีเอ็นเอที่สกัดได้แต่ละชิ้น จำนวน 1 ไมโครกรัมลงบนแผ่นไนล่อนเมมเบรน แล้วเปรียบเทียบสัญญานการไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 (positive control) ที่มีความเข้มข้น 1ไมโครกรัมเช่นกัน จากผลการทดลองสามารถสกัดเฉพาะชิ้นดีเอ็นเอ insert ได้ 15 ชิ้น คือ ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 6.6 กิโลเบสจากโคลน #9, ขนาด 1.0 กิโลเบสจากโคลน #17, ขนาด 1.6 และ 1.1 กิโลเบสจากโคลน #18, ขนาด 6.0 กิโลเบสจากโคลน #20, ขนาด 0.9 กิโลเบสจากโคลน #21, ขนาด 1.1 และ 0.75 กิโลเบสจากโคลน #22, ขนาด 1.35 และ 0.6 กิโลเบสจากโคลน #35, ขนาด 5.5 และ 1.9 กิโลเบสจากโคลน #42, ขนาด 5.0 และ 2.0 กิโลเบส จากโคลน #50 และชิ้นดีเอ็นเอขนาด 0.9 กิโลเบสจากโคลน #53 ผลการเปรียบเทียบความเข้มของสัญญานการไฮบริไดซ์แสดงในรูปที่ 9 สามารถคัดเลือกชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการได้ 3 ชิ้น คือ ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 5.0 และ 2.0 กิโลเบสจากโคลน #50 และชิ้นดีเอ็นเอขนาด 0.9 กิโลเบสจากโคลน #21 แล้วให้หมายเลขประจำชิ้นดีเอ็นเอเป็น #50.1, #50.2 และ #21 ตามลำดับ

<u>การสร้างตัวติดตามจากชิ้นดีเอ็นเอที่คัดเลือกได้</u>

เมื่อได้ชิ้นดีเอ็นเอที่จะนำมาสร้างตัวติดตามจากข้อ 4.7 แล้ว จึงติดฉลากชิ้นดีเอ็นเอเหล่านี้ด้วยสารปลอดรังสี DIG-11-dUTP หาความเข้มข้นของตัวติดตามที่สร้างขึ้น โดยเปรียบเทียบความเข้มของสัญญานสารปลอดรังสีที่ติดฉลากไว้ กับดีเอ็นเอควบคุมติดฉลาก (Labelled control DNA : digoxigenin



รูปที่ 8

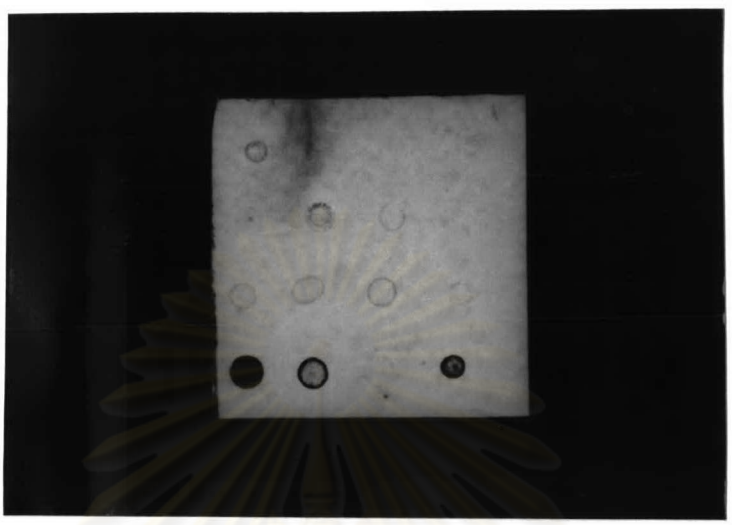
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 8 การวิเคราะห์ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ insert ที่ได้จากโคลนที่ให้สัญญานการไฮบริไดซ์ที่ชัดเจนกับตัวติดตามที่สร้างจากดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12

ย่อยดีเอ็นเอของโคลนที่คัดเลือกแล้วปริมาณ 1 ไมโครกรัมด้วยเอนไซม์ *Eco*RI บ่มที่ 37°ซ นาน ประมาณ 12 ชั่วโมง แล้วศึกษาขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วยการแยกบนอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีสที่ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 4 ชั่วโมง

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 2 โคลน #9 ย่อยด้วย *Eco*RI
ช่องที่ 3 โคลน #17 ย่อยด้วย *Eco*RI
ช่องที่ 4 โคลน #18 ย่อยด้วย *Eco*RI
ช่องที่ 5 โคลน #20 ย่อยด้วย *Eco*RI
ช่องที่ 6 โคลน #21 ย่อยด้วย *Eco*RI
ช่องที่ 7 โคลน #22 ย่อยด้วย *Eco*RI
ช่องที่ 8 โคลน #35 ย่อยด้วย *Eco*RI
ช่องที่ 9 โคลน #42 ย่อยด้วย *Eco*RI
ช่องที่ 10 โคลน #50 ย่อยด้วย *Eco*RI
ช่องที่ 11 โคลน #53 ย่อยด้วย *Eco*RI

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 9 ผลการวิเคราะห์ repetitive sequences จากชิ้นดีเอ็นเอ insert ที่แยกได้จากโคลนที่คัดเลือก โดยการทำ Dot-blot hybridization กับตัวติดตามที่สร้างจากดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12

ตรึงชิ้นดีเอ็นเอ insert ที่แยกได้จากโคลนที่คัดเลือกไว้ ปริมาณชิ้นละ 1 ไมโครกรัมลงบนแผ่นไนล่อนเมมเบรน จากนั้นทำไฮบริไดซ์เซชันกับตัวติดตามที่สร้างจากดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ด้วยวิธี Dot-blot hybridization เปรียบเทียบสัญญาณการไฮบริไดซ์ที่เกิดขึ้น โดยมีดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ปริมาณ 1 ไมโครกรัมเป็นดีเอ็นเอควบคุมชนิดบวก

9	17	18.1	18.2
(6.6)	(1.0)	(1.6)	(1.1)
20	21	22.2	22.2
(6.0)	(0.9)	(1.1)	(0.75)
35.1	35.2	42.1	42.2
(3.8)	(1.35)	(5.5)	(1.9)
50.1	50.2	53	MU12
(5.0)	(2.0)	(9.0)	(kb)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

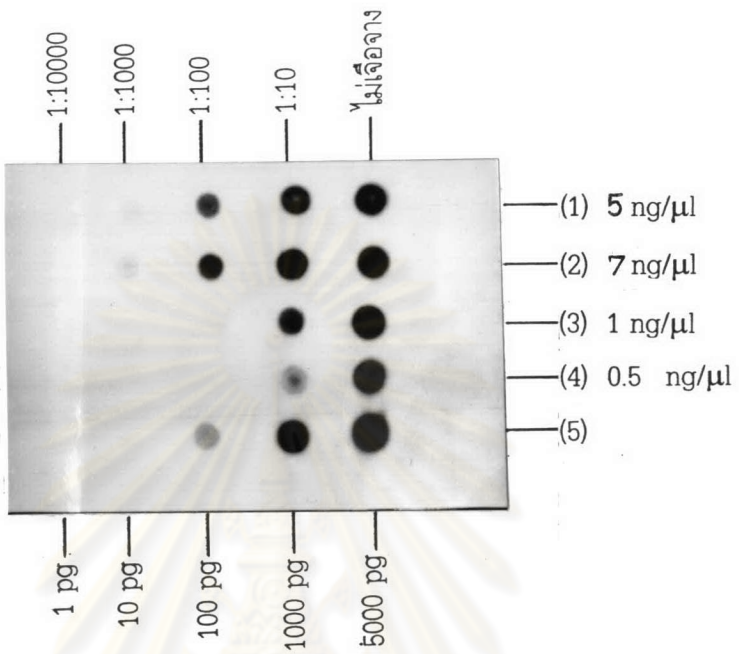
labelled pBR328) ที่ให้มากับชุดการติดฉลาก (รูปที่ 10) จากผลการทดลองพบว่า ดีเอ็นเอติดตามที่สร้างจากดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 มีความเข้มข้นประมาณ 5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร, ดีเอ็นเอติดตามที่ได้จากชิ้นดีเอ็นเอ #50.1 มีความเข้มข้นประมาณ 7 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร, ดีเอ็นเอติดตามที่ได้จากชิ้น ดีเอ็นเอ #50.2 มีความเข้มข้นประมาณ 1 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และดีเอ็นเอติดตามที่ได้จากชิ้นดีเอ็นเอ #21 มีความเข้มข้นประมาณ 0.5 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (รูปที่ 11 ส่วนที่ 1-4 ตามลำดับ)

การวิเคราะห์ความแปรผันของสายพันธุ์เห็ดหอม *L. edodes*

1. ผลการวิเคราะห์ความแปรผันของสายพันธุ์เห็ดหอมที่ใช้ในการทดลอง โดยการศึกษาแถบดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์

1.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นของเรสทริกชันเอนไซม์ที่เหมาะสม ทำการย่อยสารละลายดีเอ็นเอของเห็ดหอมสายพันธุ์ต่างๆ จำนวน 1 ไมโครกรัมด้วยเอนไซม์ *Bam*HI, *Eco*RI, *Hae*III และ *Hind*III อย่างละ 10 และ 20 หน่วย ย่อยด้วย *Alu*I ปริมาณ 4 และ 8 หน่วย *Pvu*II จำนวน 3 และ 6 หน่วย และย่อยดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Sau*3AI จำนวน 5 และ 10 หน่วย บ่มที่ 37°ซ นาน 12-18 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาและทำอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีสที่ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 3-4 ชั่วโมง จากผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 11-17 พบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการย่อยดีเอ็นเอปริมาณ 1 ไมโครกรัมอย่างสมบูรณ์ของเอนไซม์ *Bam*HI, *Eco*RI และ *Hind*III เท่ากับ 20 หน่วย (รูปที่ 11, 12 และ 14 ตามลำดับ) การย่อยของ *Hae*III เท่ากับ 10 หน่วย (รูปที่ 13) ส่วนปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการย่อยด้วย *Alu*I, *Pvu*II และ *Sau*3AI จะเท่ากับ 4, 3 และ 5 หน่วยตามลำดับ (รูปที่ 15, 16 และ 17 ตามลำดับ)

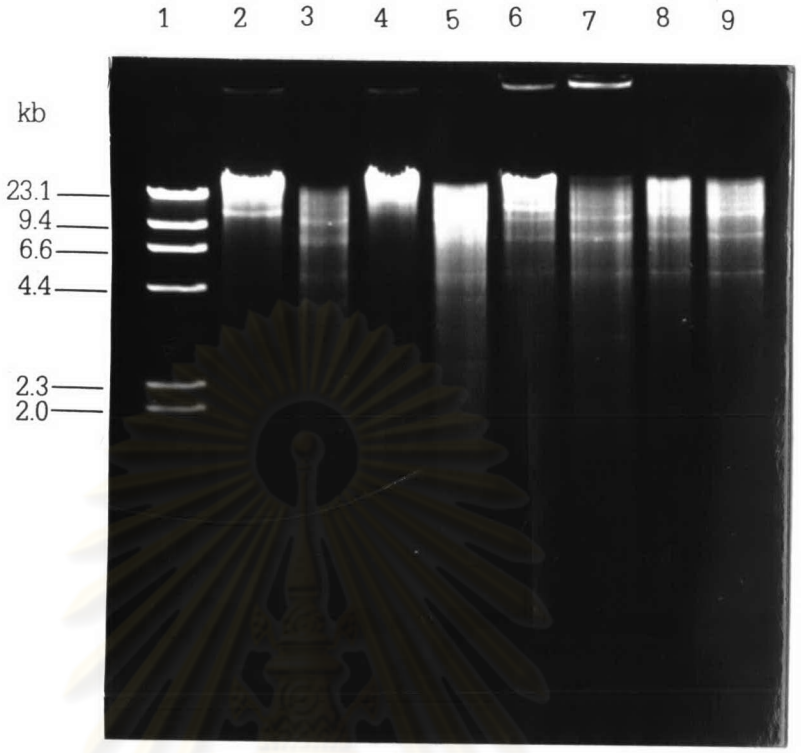
1.2 ผลการศึกษาเปรียบเทียบความผันแปรของแถบดีเอ็นเอเห็ดหอม เมื่อศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการย่อยดีเอ็นเออย่างสมบูรณ์แล้ว จึงทำการย่อยดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ต่างๆเพื่อศึกษาการแปรผันของแถบดีเอ็นเอ โดยการย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Alu*I, *Bam*HI, *Eco*RI, *Hae*III, *Hind*III, *Pvu*II, *Sau*3AI และ *Tag*I ได้ผลของการทดลองดังรูปที่ 18-25 ซึ่งพบว่าสามารถจัดกลุ่มความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง ได้ดังรวบรวมไว้ในตารางที่ 4 คือ เอนไซม์ *Bam*HI ไม่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอ (สายพันธุ์ HY ไม่สามารถเห็นแถบดีเอ็นเอได้), *Eco*RI ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในทุกสายพันธุ์ที่ใช้ทดลอง (สายพันธุ์ HY ไม่สามารถเห็นแถบดีเอ็นเอได้), *Hae*III ไม่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในสายพันธุ์ MU2 MU4 และ HY แต่ให้ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ MU5 และ MU12, *Hind*III ไม่ให้ความแตกต่างกันในสายพันธุ์ MU2, MU4 และ MU5 แต่ให้ความแตกต่างในสายพันธุ์ MU12 (สายพันธุ์ HY ไม่สามารถเห็น แถบดีเอ็นเอได้), *Pvu*II ไม่ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในสายพันธุ์ MU2 และ MU4 แต่ให้ความแตกต่างระหว่าสายพันธุ์ MU5 และ MU12



รูปที่ 10 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณความเข้มข้นของตัวติดตามที่สร้างขึ้น

ตรึงดีเอ็นเอติดตามที่สร้างขึ้นในปริมาณการเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ ไม่เจือจาง, เจือจาง 1:10, 1:100, 1:1000 และ 1:10000 ค่าละ 1 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นไนล่อนเมมเบรน แล้วตรวจหาความเข้มสัญญาณของสารปลอดรังสีที่ติดฉลากไว้ เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอควบคุมติดฉลาก (Labelled control DNA : digoxigenin labelled pBR328) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

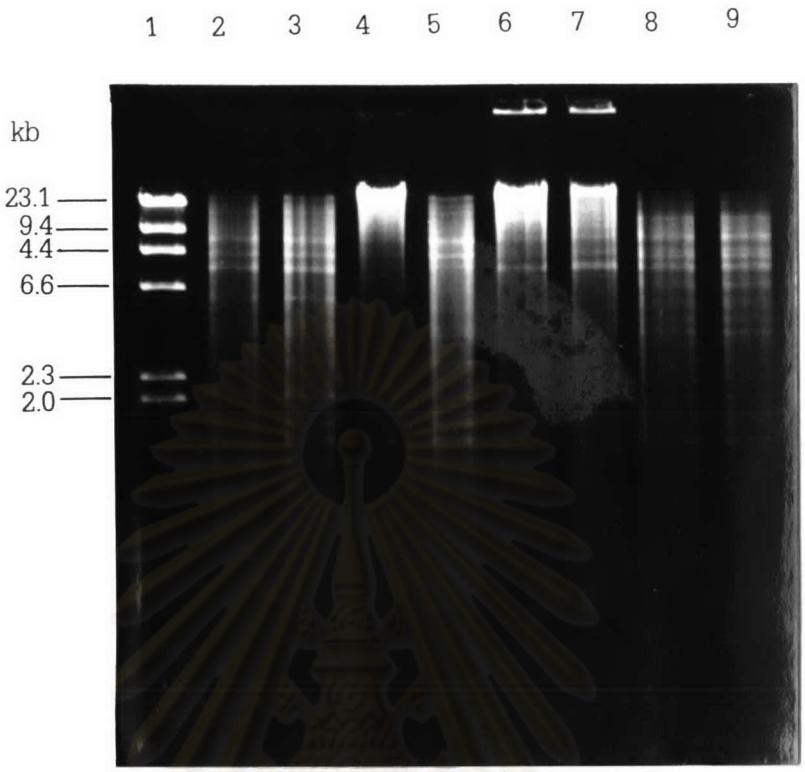
(1) ดีเอ็นเอติดตามที่สร้างจากดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12
(2) ดีเอ็นเอติดตามที่สร้างจากชิ้นดีเอ็นเอ insert #50.1
(3) ดีเอ็นเอติดตามที่สร้างจากชิ้นดีเอ็นเอ insert #50.2
(4) ดีเอ็นเอติดตามที่สร้างจากชิ้นดีเอ็นเอ insert #21
(5) ดีเอ็นเอควบคุมติดฉลาก (digoxigenin labelled pBR328)



รูปที่ 11 แสดงผลการย่อยดีเอ็นเอเพื่อศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการย่อยดีเอ็นเอเห็ดหอมอย่างสมบูรณ์ด้วย *Bam*HI

ย่อยดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ต่างๆปริมาณ 1 ไมโครกรัมด้วยเอนไซม์ *Bam*HI ปริมาณ 10 และ 20 หน่วย บ่มที่ 37°ซ นานประมาณ 12 ชั่วโมง แล้วแยกด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีสที่ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 4 ชั่วโมง

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 10 หน่วย
ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 20 หน่วย
ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 10 หน่วย
ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 20 หน่วย
ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 10 หน่วย
ช่องที่ 7 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 20 หน่วย
ช่องที่ 8 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 10 หน่วย
ช่องที่ 9 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 20 หน่วย

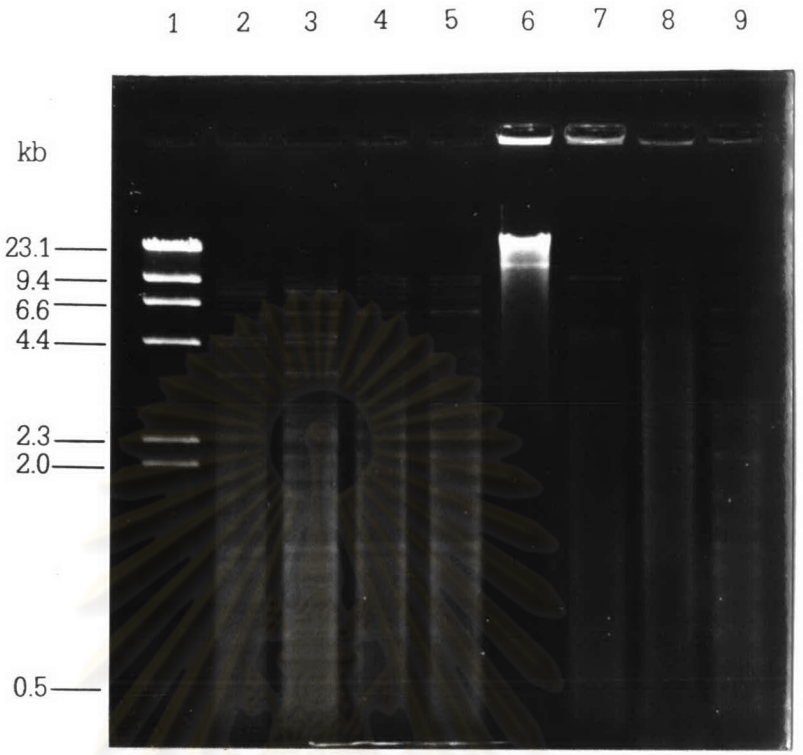


รูปที่ 12 แสดงผลการย่อยดีเอ็นเอเพื่อศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการย่อยดีเอ็นเอเห็ดหอมอย่างสมบูรณ์ด้วย *Eco*RI

ย่อยดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ต่างๆปริมาณ 1 ไมโครกรัมด้วยเอนไซม์ *Eco*RI ปริมาณ 10 และ 20 หน่วย บ่มที่ 37°ซ นานประมาณ 12 ชั่วโมง แล้วแยกด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีสที่ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 4 ชั่วโมง

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 10 หน่วย
ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 20 หน่วย
ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 10 หน่วย
ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 20 หน่วย
ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 10 หน่วย
ช่องที่ 7 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 20 หน่วย
ช่องที่ 8 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 10 หน่วย
ช่องที่ 9 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 20 หน่วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

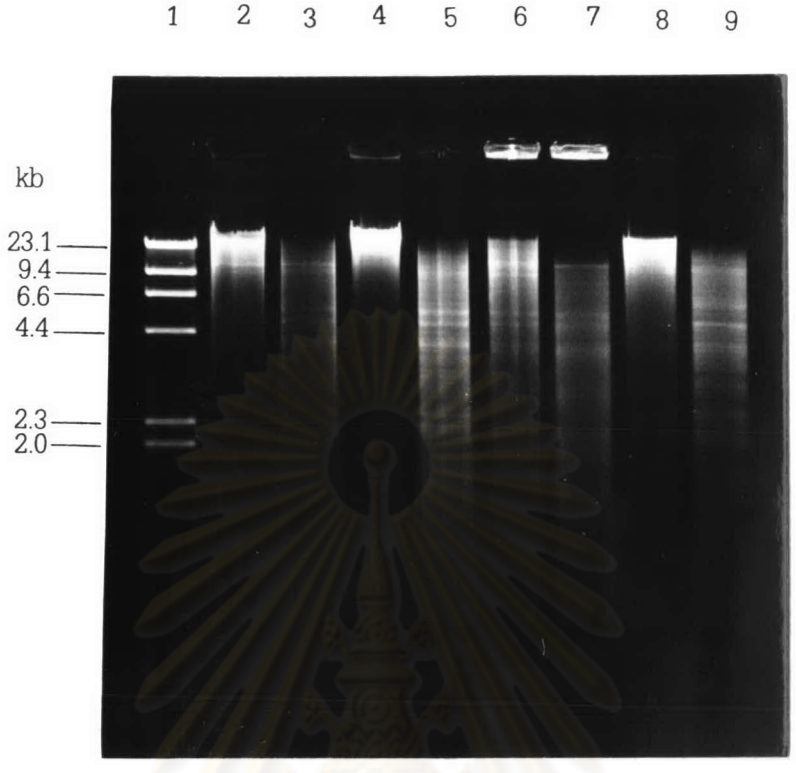


รูปที่ 13 แสดงผลการย่อยดีเอ็นเอเพื่อศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการย่อยดีเอ็นเอเห็ดหอมอย่างสมบูรณ์ด้วย *Hae*III

ย่อยดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ต่างๆปริมาณ 1 ไมโครกรัมด้วยเอนไซม์ *Hae*III ปริมาณ 10 และ 20 หน่วย บ่มที่ 37°ซ นานประมาณ 12 ชั่วโมง แล้วแยกด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีสที่ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 4 ชั่วโมง

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 10 หน่วย
ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 20 หน่วย
ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 10 หน่วย
ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 20 หน่วย
ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 10 หน่วย
ช่องที่ 7 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 20 หน่วย
ช่องที่ 8 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 10 หน่วย
ช่องที่ 9 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 20 หน่วย

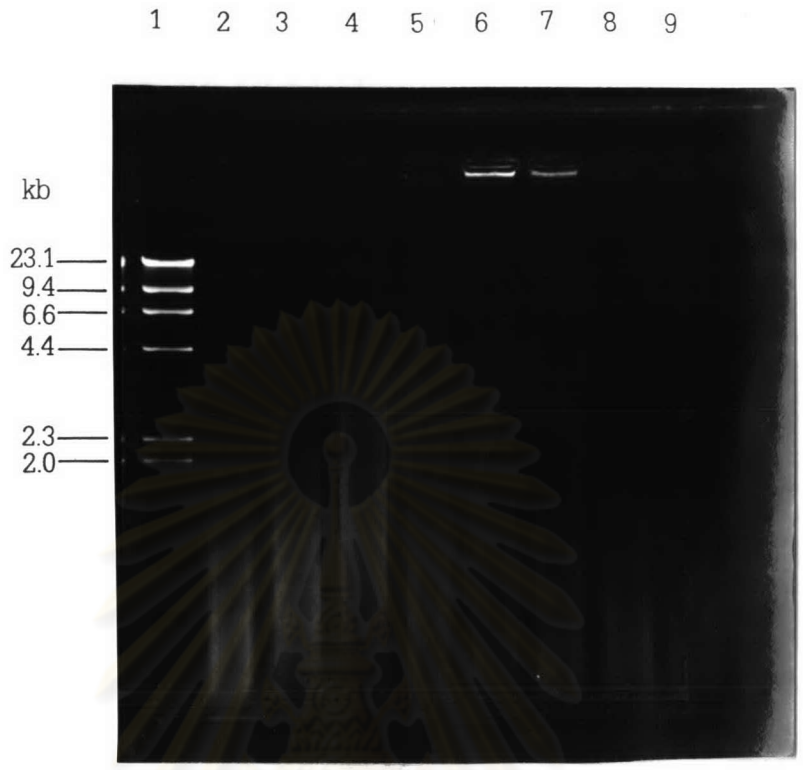
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 14 แสดงผลการย่อยดีเอ็นเอเพื่อศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการย่อยดีเอ็นเอเห็ดหอมอย่างสมบูรณ์ด้วย *Hind*III

ย่อยดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ต่างๆปริมาณ 1 ไมโครกรัมด้วยเอนไซม์ *Hind*III ปริมาณ 10 และ 20 หน่วย บ่มที่ 37°ซ นานประมาณ 12 ชั่วโมง แล้วแยกด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีสที่ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 4 ชั่วโมง

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 10 หน่วย
ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 20 หน่วย
ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 10 หน่วย
ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 20 หน่วย
ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 10 หน่วย
ช่องที่ 7 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 20 หน่วย
ช่องที่ 8 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 10 หน่วย
ช่องที่ 9 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 20 หน่วย



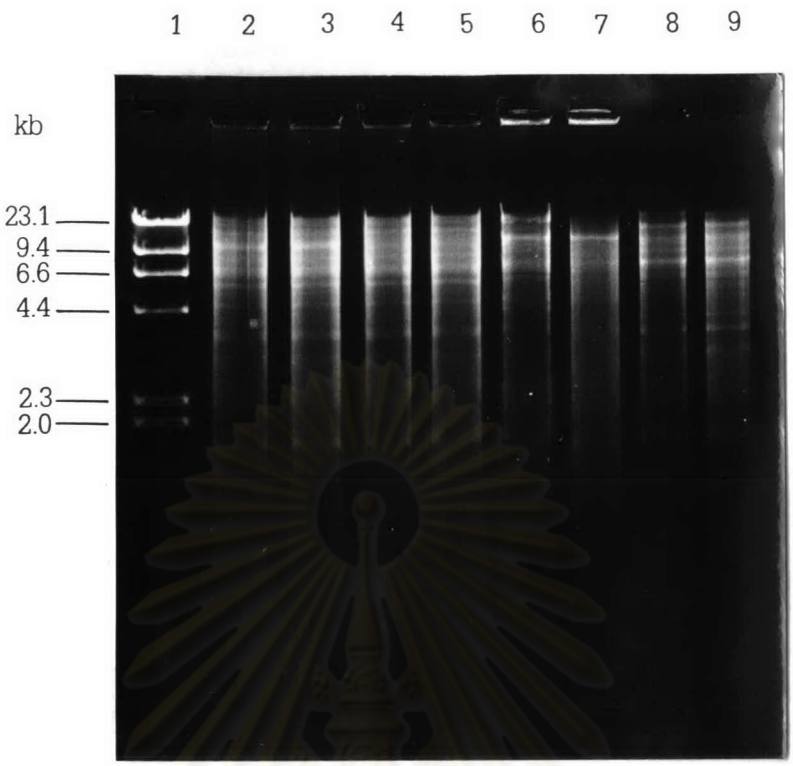
หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>รูปที่ 15</u> แสดงผลการย่อยดีเอ็นเอเพื่อศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการย่อยดีเอ็นเอเห็ดหอมอย่างสมบูรณ์ด้วย *Alu*I

ย่อยดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ต่างๆปริมาณ 1 ไมโครกรัมด้วยเอนไซม์ *Alu*I ปริมาณ 4 และ 8 หน่วย บ่มที่ 37°ซ นานประมาณ 12 ชั่วโมง แล้วแยกด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีสที่ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 4 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 4 หน่วย
ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 8 หน่วย
ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 4 หน่วย
ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 8 หน่วย
ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 4 หน่วย
ช่องที่ 7 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 8 หน่วย
ช่องที่ 8 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 4 หน่วย
ช่องที่ 9 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 8 หน่วย

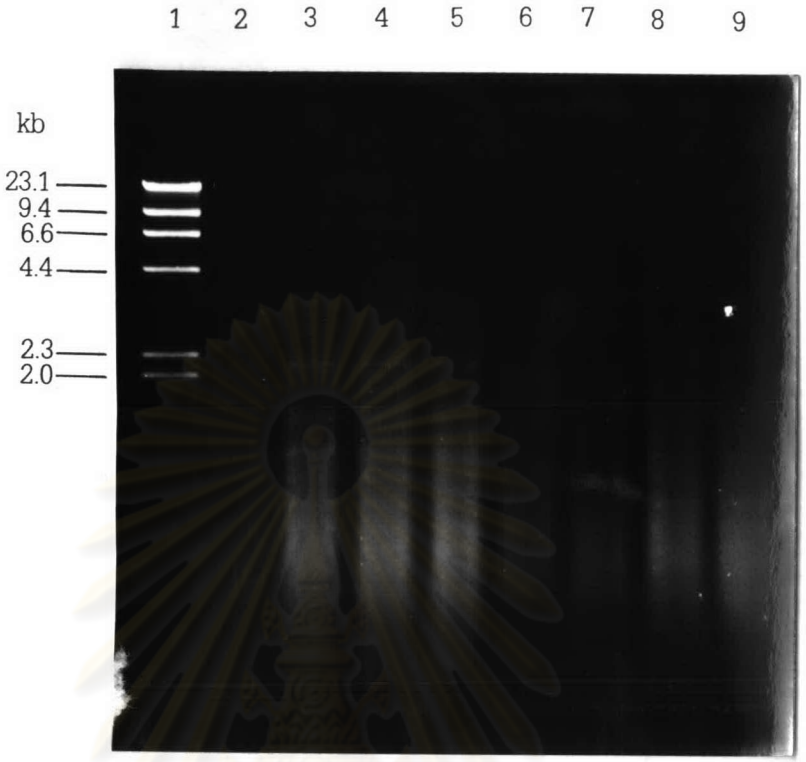


<u>รูปที่ 16</u> แสดงผลการย่อยดีเอ็นเอเพื่อศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการย่อยดีเอ็นเอเห็ดหอมอย่างสมบูรณ์ด้วย *Pvu*II

ย่อยดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ต่างๆปริมาณ 1 ไมโครกรัมด้วยเอนไซม์ *Pvu*II ปริมาณ 3 และ 6 หน่วย บ่มที่ 37°ซ นานประมาณ 12 ชั่วโมง แล้วแยกด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีสที่ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 4 ชั่วโมง

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 3 หน่วย
ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 6 หน่วย
ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 3 หน่วย
ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 6 หน่วย
ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 3 หน่วย
ช่องที่ 7 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 6 หน่วย
ช่องที่ 8 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 3 หน่วย
ช่องที่ 9 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 6 หน่วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

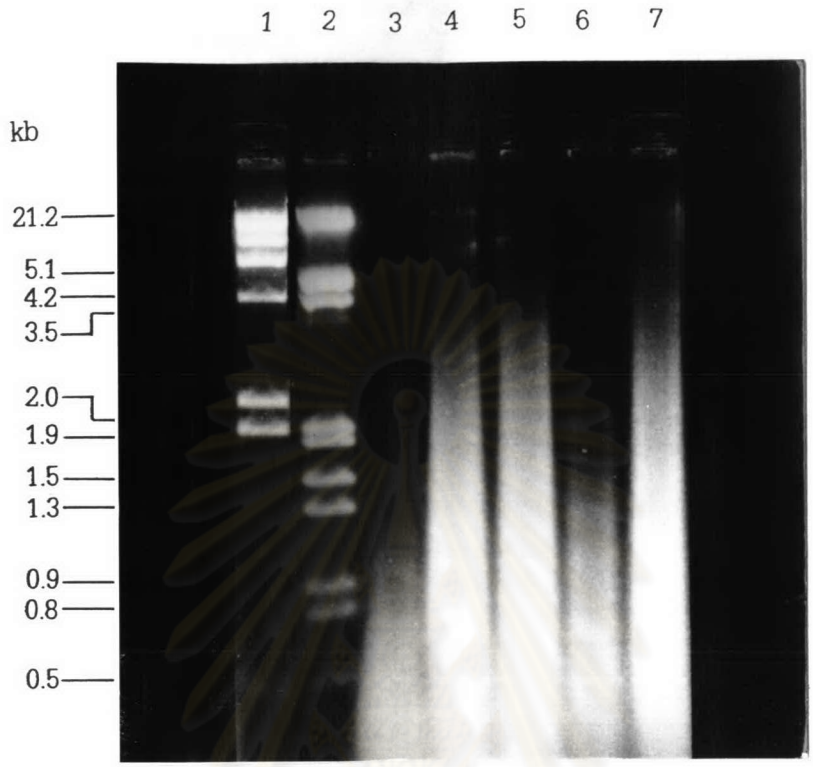


รูปที่ 17 แสดงผลการย่อยดีเอ็นเอเพื่อศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการย่อยดีเอ็นเอเห็ดหอมอย่างสมบูรณ์ด้วย *Sau*3AI

ย่อยดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ต่างๆปริมาณ 1 ไมโครกรัมด้วยเอนไซม์ *Sau*3AI ปริมาณ 5 และ 10 หน่วย บ่มที่ 37°ซ นานประมาณ 12 ชั่วโมง แล้วแยกด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีสที่ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ นาน 4 ชั่วโมง

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 5 หน่วย
ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 10 หน่วย
ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 5 หน่วย
ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 10 หน่วย
ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 5 หน่วย
ช่องที่ 7 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 10 หน่วย
ช่องที 8 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 5 หน่วย
ช่องที่ 9 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ 10 หน่วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

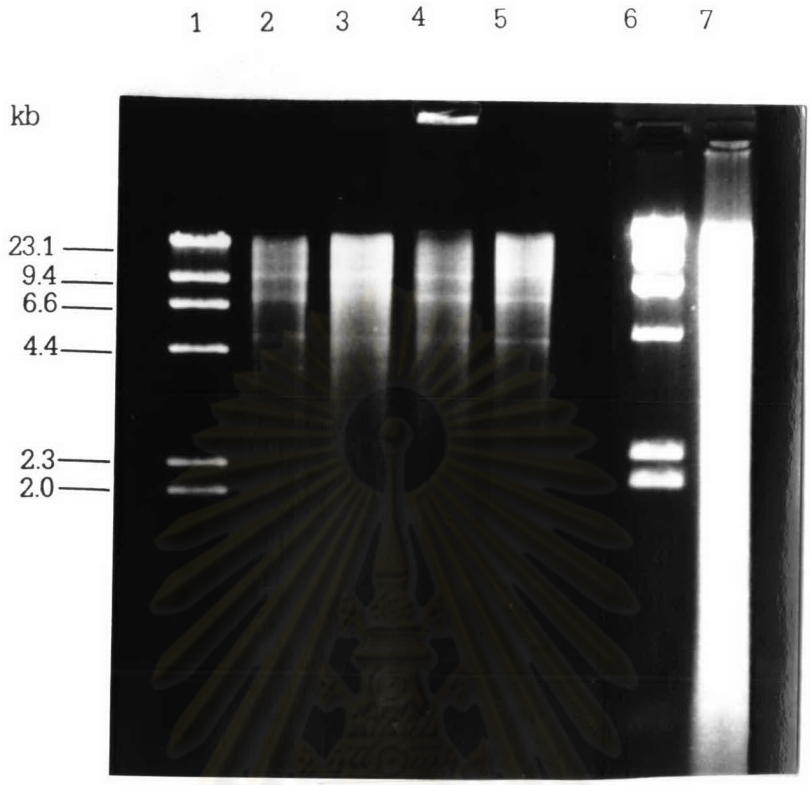


รูปที่ 18 การศึกษาแถบดีเอ็นเอเห็ดหอมที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วย *Alu*I

ย่อยดีเอ็นเอเห็ดหอมปริมาณ 1 ไมโครกรัมอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ *Alu*I บ่มที่ 37°ซ นาน ประมาณ 12 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส ที่ความเข้มข้นเจล 1.5 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 4 ชั่วโมง

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III, *Eco*RI)
ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2
ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4
ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5
ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12
ช่องที่ 7 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ HY

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

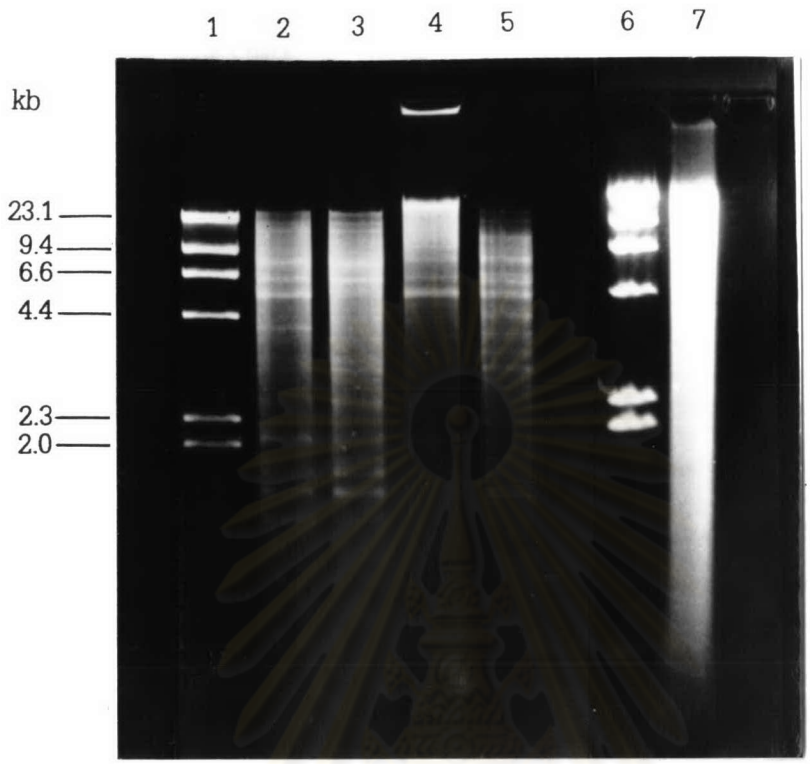


รูปที่ 19 การศึกษาแถบดีเอ็นเอเห็ดหอมที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วย *Bam*HI

ย่อยดีเอ็นเอเห็ดหอมปริมาณ 1 ไมโครกรัมอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ *Bam*HI บ่มที่ 37°ซ นาน ประมาณ 12 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส ที่ความเข้มข้นเจล 1.0 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2
ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4
ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5
ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12
ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 7 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ HY

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



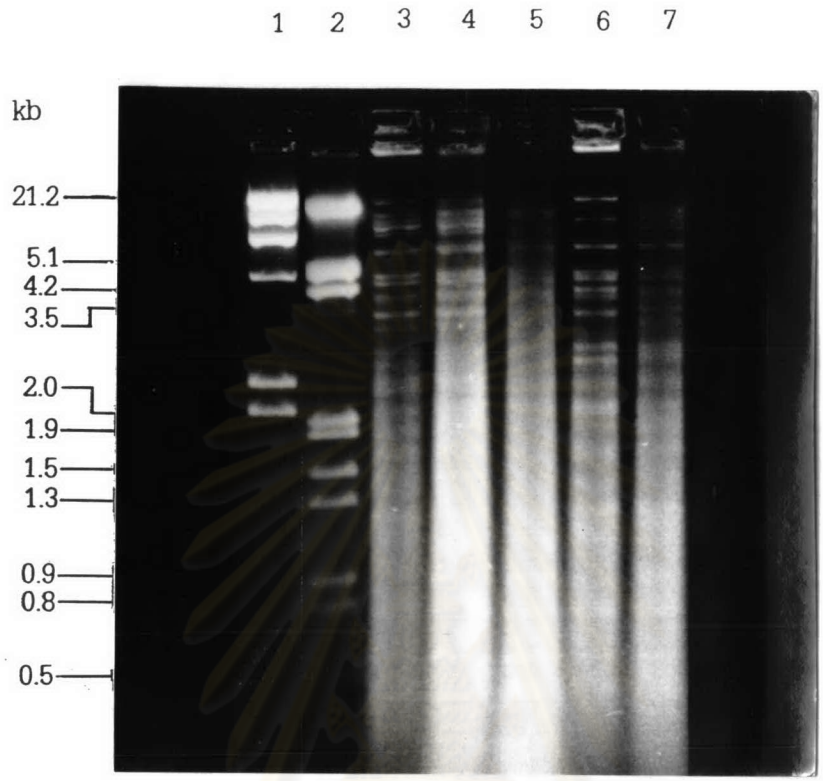
รูปที่ 20 การศึกษาแถบดีเอ็นเอเห็ดหอมที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วย *Eco*RI

ย่อยดีเอ็นเอเห็ดหอมปริมาณ 1 ไมโครกรัมอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ *Eco*RI บ่มที่ 37°ซ นานประมาณ 12 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส ที่ความเข้มข้นเจล 1.0 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2
ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4
ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5
ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12
ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 7 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ HY

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

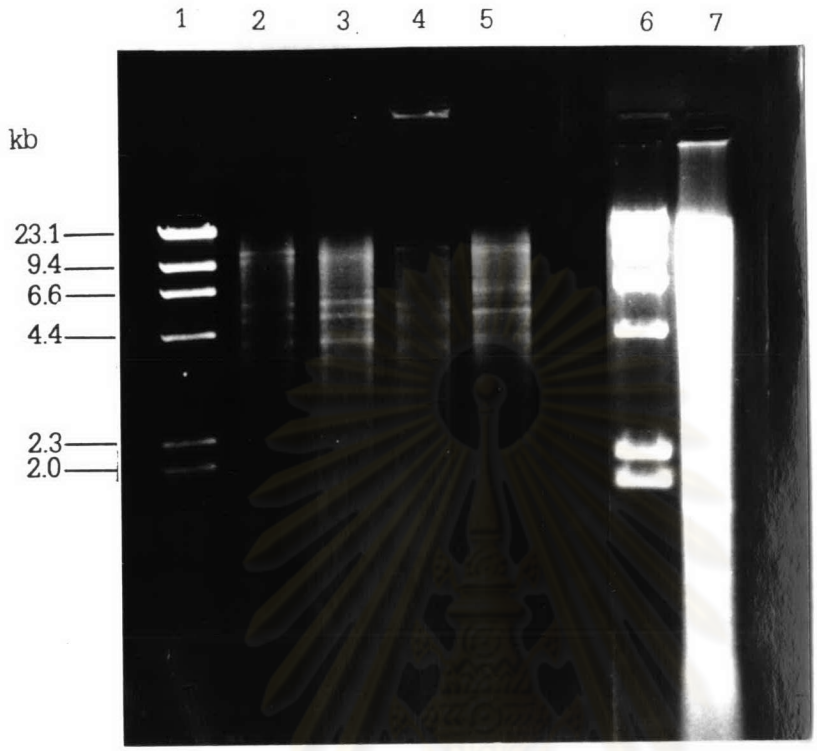


รูปที่ 21 การศึกษาแถบดีเอ็นเอเห็ดหอมที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วย *Hae*III

ย่อยดีเอ็นเอเห็ดหอมปริมาณ 1 ไมโครกรัมอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ *Hae*III บ่มที่ 37°ซ นาน ประมาณ 12 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส ที่ความเข้มข้นเจล 1.5 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 4 ชั่วโมง

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III, *Eco*RI)
ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2
ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4
ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5
ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12
ช่องที่ 7 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ HY

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

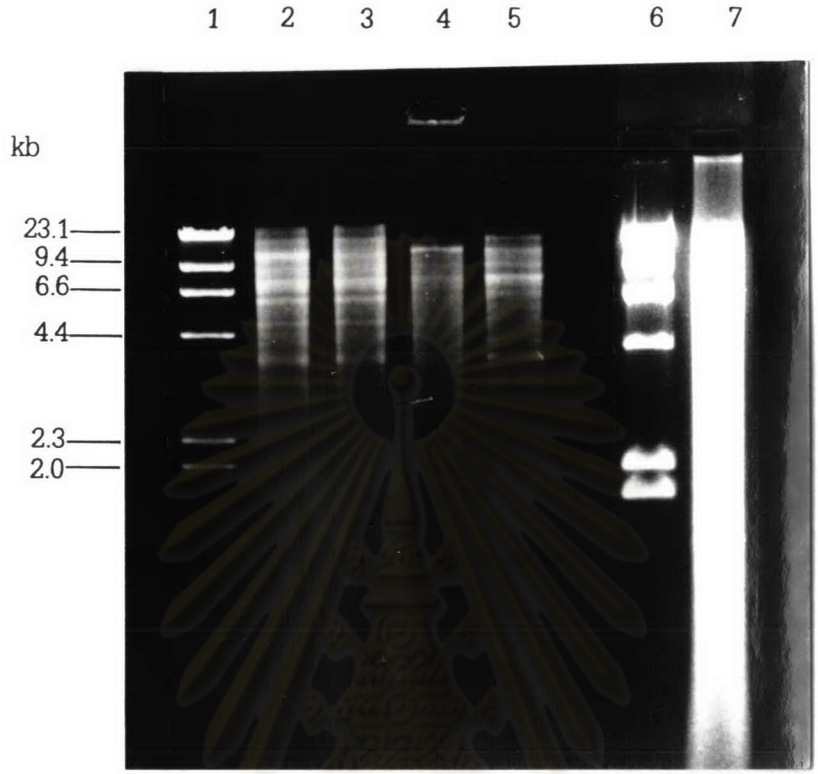


รูปที่ 22 การศึกษาแถบดีเอ็นเอเห็ดหอมที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วย *Hind*III

ย่อยดีเอ็นเอเห็ดหอมปริมาณ 1 ไมโครกรัมอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ *Hind*III บ่มที่ 37°ซ นาน ประมาณ 12 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส ที่ความเข้มข้นเจล 1.0 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2
ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4
ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5
ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12
ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 7 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ HY

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

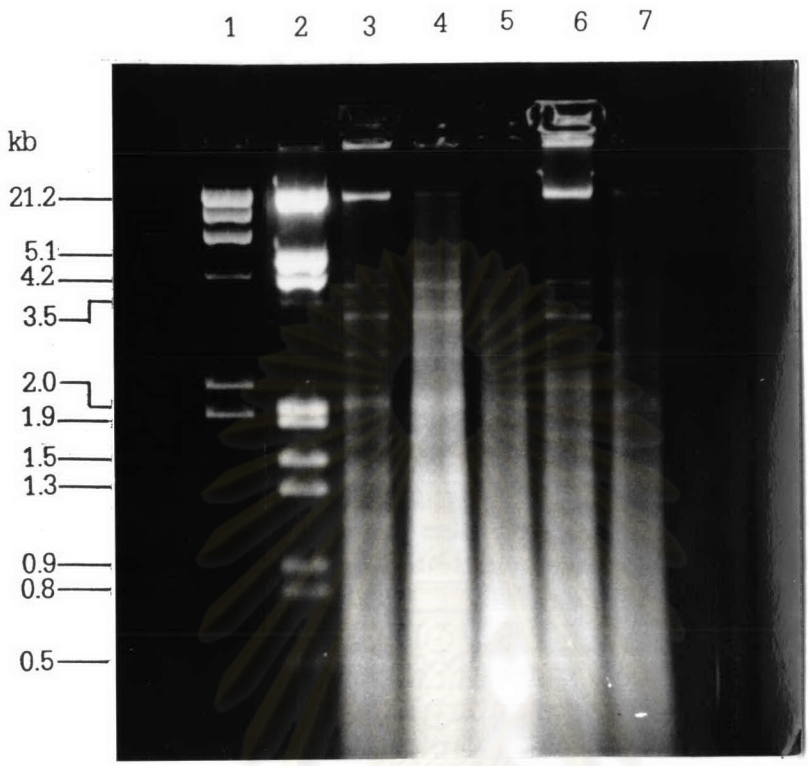


รูปที่ 23 การศึกษาแถบดีเอ็นเอเห็ดหอมที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วย *Pvu*II

ย่อยดีเอ็นเอเห็ดหอมปริมาณ 1 ไมโครกรัมอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ *Pvu*II บ่มที่ 37°ซ นาน ประมาณ 12 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส ที่ความเข้มข้นเจล 1.0 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2
ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4
ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5
ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12
ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 7 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ HY

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

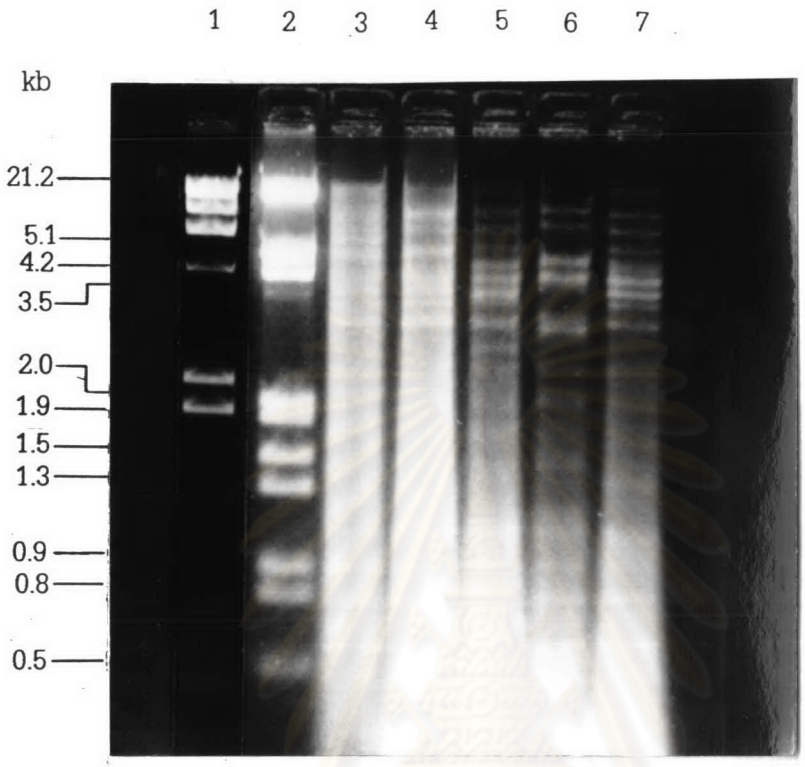


รูปที่ 24 การศึกษาแถบดีเอ็นเอเห็ดหอมที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วย *Sau*3AI

ย่อยดีเอ็นเอเห็ดหอมปริมาณ 1 ไมโครกรัมอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ *Sau*3AI บ่มที่ 37°ซ นาน ประมาณ 12 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส ที่ความเข้มข้นเจล 1.5 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 4 ชั่วโมง

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III, *Eco*RI)
ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2
ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4
ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5
ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12
ช่องที่ 7 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ HY

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 25 การศึกษาแถบดีเอ็นเอเห็ดหอมที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วย *Tag*I

ย่อยดีเอ็นเอเห็ดหอมปริมาณ 1 ไมโครกรัมอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ *Tag*I บ่มที่ 37°ซ นาน ประมาณ 12 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลด้วยอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส ที่ความเข้มข้นเจล 1.5 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 4 ชั่วโมง

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III, *Eco*RI)
ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2
ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4
ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5
ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12
ช่องที่ 7 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ HY

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 แสดงการจัดกลุ่มของเห็ดหอมสายพันธุ์ที่ทำการทดลองโดยใช้ความแตกต่างของลักษณะแถบดีเอ็นเอที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ

เอนไซม์	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3	กลุ่มที่ 4	กลุ่มที่ 5
*Bam*HI	MU2,MU4 MU5,MU12	-	-	-	-
*Eco*RI	MU2	MU4	MU5	MU12	-
*Hae*III	MU2, MU4 HY	MU5	MU12	-	-
*Hind*III	MU2, MU4 MU5	MU12	-	-	-
*Pvu*II	MU2, MU4	MU5	MU12	-	-
*Sau*3AI	MU2	MU4	MU12	MU5, HY	-
*Tag*I	MU2	MU4	MU5	MU12	HY

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(สายพันธุ์ HY ไม่สามารถเห็นแถบดีเอ็นเอได้), เอนไซม์ *Sau*3AI ไม่ให้ความแตกต่างในสายพันธุ์ MU5 และสายพันธุ์ HY แต่ให้ความแตกต่างกันในสายพันธุ์ MU2, MU4 และ MU12 , *Tag*I ให้ความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอในทุกสายพันธุ์ที่ใช้ทดลอง และเนื่องจากเอนไซม์ *Alu*I ได้ย่อยดีเอ็นเอจนมีขนาดเล็กมาก ทำให้ไม่สามารถสังเกตุแถบดีเอ็นเอได้ชัดเจน จึงไม่สามารถจัดกลุ่มความ แตกต่างของแถบดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์นี้ได้

2. ผลการวิเคราะห์การผันแปรของสายพันธุ์เห็ดหอมที่ใช้ในการทดลอง จากการศึกษาการเกิดไฮบริไดเซชันกับตัวติดตามที่เตรียมได้

เมื่อคัดเลือกได้ดีเอ็นเอติดตามและเรสทริกชันเอนไซม์ที่เหมาะสมแล้ว จึงศึกษาความผันแปรของสายพันธุ์เห็ดหอมที่ใช้ในการทดลอง ด้วยการติดตามสัญญานการเกิดไฮบริไดเซชันกับตัวติดตามที่สร้างขึ้น โดยนำแผ่นเมมเบรนที่มีการตรึงดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์และผ่านการทำ Southern-blot Transfer แล้ว มาทำไฮบริไดเซชันกับตัวติดตามและตรวจหาสัญญานการไฮบริไดซ์ที่เกิดขึ้น เอนไซม์ที่ใช้ในการศึกษานี้ได้แก่ *Alu*I, *Bam*HI, *Eco*RI, *Hae*III, *Hind*III, *Pvu*II, *Sau*3AI และ *Tag*I ตัวติดตามที่ใช้ได้แก่ตัวติดตามที่สร้างขึ้นจากชิ้นดีเอ็นเอ #50.1, #50.2 และชิ้น ดีเอ็นเอ #21 (ใช้สัญญลักษณ์เป็น *50.1, *50.2 และ *21 ตามลำดับ) ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 26-35 จากผลการทดลองสามารถคำนวนขนาดของแถบดีเอ็นเอได้ดังตารางที่ 5, 6 และ 7 แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่พบสัญญานการไฮบริไดซ์ระหว่างดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ที่ใช้ทดลอง ซึ่งถูกย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ กับดีเอ็นเอติดตาม *50.1, *50.2 และ *21 ตามลำดับ

จากตารางแสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ตรวจพบสัญญานการไฮบริไดซ์ สามารถจัดกลุ่มสายพันธุ์เห็ดหอมที่ใช้ในการทดลองตามความเหมือนและความแตกต่างของสัญญานที่ปรากฏ ได้ดังที่รวบรวมไว้ในตารางที่ 8 คือ

1) ไม่สามารถจัดกลุ่มความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ ได้แก่

1.1) *Bam*HI/*50.1(ดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์*Bam*HI และไฮบริไดซ์กับตัวติดตาม *50.1)

1.2) *Pvu*II/*50.1 (ดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *Pvu*II และไฮบริไดซ์กับตัวติดตาม *50.1)

1.3) *Pvu*II/*50.2 (ดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *Pvu*II และไฮบริไดซ์กับตัวติดตาม *50.2)

1.4) *Eco*RI/*21 (ดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และไฮบริไดซ์กับตัวติดตาม *21)

2) สามารถจัดกลุ่มความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ 2 กลุ่ม ได้แก่

2.1) *Eco*RI/*50.1 (ดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *Eco*RI และไฮบริไดซ์กับตัวติดตาม *50.1) แยกได้กลุ่มที่ 1 คือสายพันธุ์ MU2, MU4, HY กลุ่มที่ 2 คือสายพันธุ์ MU5, MU12

2.2) *Bam*HI/*50.2 (ดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *Bam*HI และไฮบริไดซ์กับตัวติดตาม *50.2) แยกได้กลุ่มที่ 1 คือสายพันธุ์ MU2, MU12 กลุ่มที่ 2 คือสายพันธุ์ MU4, MU5, HY

2.3) *Sau*3AI/*50.2 (ดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *Sau*3AI ไฮบริไดซ์กับตัวติดตาม *50.2) แยกได้กลุ่มที่ 1 คือสายพันธุ์ MU2, MU4, MU5, HY กลุ่มที่ 2 คือสายพันธุ์ MU12

2.4) *Hae*III/*21 (ดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *Hae*III และไฮบริไดซ์กับตัวติดตาม *21) แยกได้กลุ่มที่ 1 คือสายพันธุ์ MU2, MU4, MU5, HY กลุ่มที่ 2 คือสายพันธุ์ MU12

3) สามารถจัดกลุ่มความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ 3 กลุ่ม ได้แก่

3.1) *Alu*I/*50.1 (ดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *Alu*I ไฮบริไดซ์กับตัวติดตาม *50.1) แยกได้กลุ่มที่ 1 คือสายพันธุ์ MU2, HY กลุ่มที่ 2 คือสายพันธุ์ MU4, MU5 และกลุ่มที่ 3 คือสายพันธุ์ MU12

3.2) *Alu*I/*50.2 (ดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *Alu*I และไฮบริไดซ์กับตัวติดตาม *50.2) แยกได้กลุ่มที่ 1 คือสายพันธุ์ MU2 กลุ่มที่ 2 คือสายพันธุ์ MU4, MU5, HY และกลุ่มที่ 3 คือสายพันธุ์ MU12

3.3) *Hind*III/*50.1 (ดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *Hind*III ไฮบริไดซ์กับตัวติดตาม *50.1) แยกได้กลุ่มที่ 1 คือสายพันธุ์ MU2, MU4 กลุ่มที่ 2 คือสายพันธุ์ MU5, HY และกลุ่มที่ 3 คือสายพันธุ์ MU12

3.4) *Hind*III/*50.2 (ดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *Hind*III ไฮบริไดซ์กับตัวติดตาม *50.2) แยกได้กลุ่มที่ 1 คือสายพันธุ์ MU2, MU4 กลุ่มที่ 2 คือสายพันธุ์ MU5, HY และกลุ่มที่ 3 คือสายพันธุ์ MU12

3.5) *Eco*RI/*50.2 (ดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *Eco*RI ไฮบริไดซ์กับตัวติดตาม *50.2) แยกได้กลุ่มที่ 1 คือสายพันธุ์ MU2, HY กลุ่มที่ 2 คือสายพันธุ์ MU4 และกลุ่มที่ 3 คือสายพันธุ์ MU5, MU12

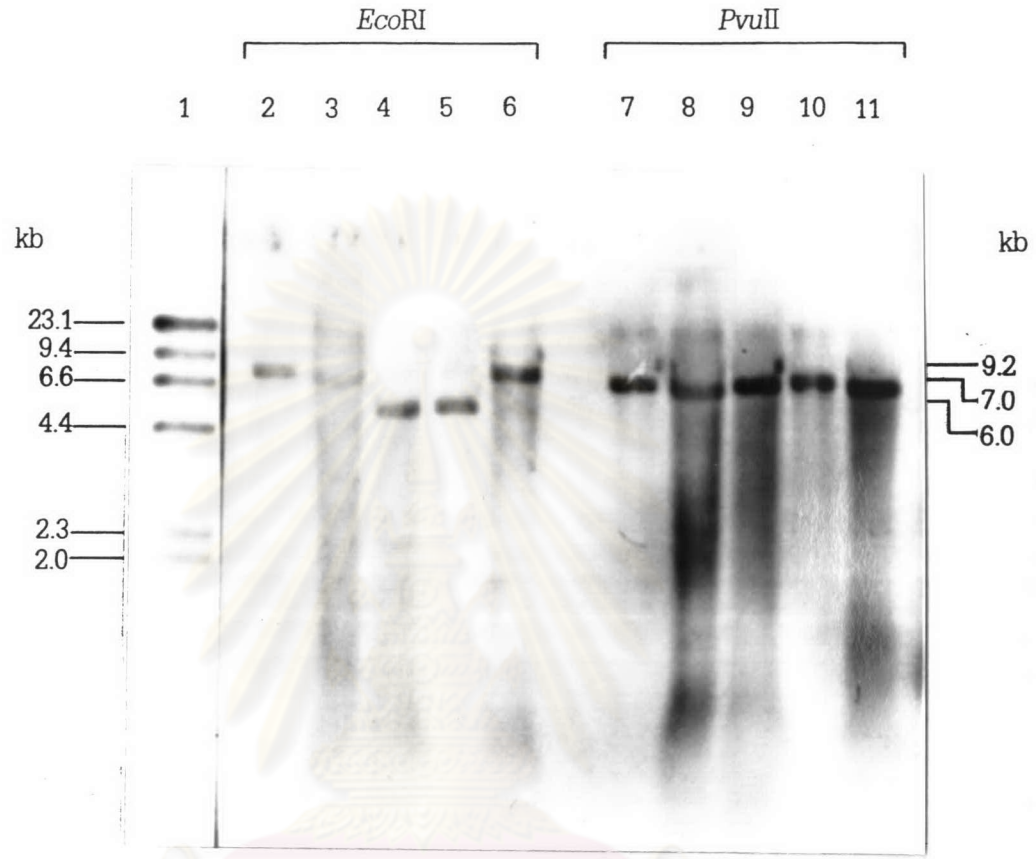
3.6) *Tag*I/*50.2 (ดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *Tag*I และไฮบริไดซ์กับตัวติดตาม *50.2) แยกได้กลุ่มที่ 1 คือสายพันธุ์ MU2, MU5, HY กลุ่มที่ 2 คือสายพันธุ์ MU4 และกลุ่มที่ 3 คือสายพันธุ์ MU12

3.7) Sau3AI/*21 (ดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ Sau3AI และไฮบริไดซ์กับตัวติดตาม *21) แยกได้กลุ่มที่ 1 คือสายพันธุ์ MU2, MU5, HY กลุ่มที่ 2 คือสายพันธุ์ MU4 และกลุ่มที่ 3 คือสายพันธุ์ MU12

4) สามารถจัดกลุ่มความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ 4 กลุ่ม ได้แก่

4.1) HaeIII/*50.1 (ดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ HaeIII และไฮบริไดซ์กับตัวติดตาม *50.1) แยกได้กลุ่มที่ 1 คือสายพันธุ์ MU2 กลุ่มที่ 2 คือสายพันธุ์ MU4 กลุ่มที่ 3 คือสายพันธุ์ MU5, HY และกลุ่มที่ 4 คือสายพันธุ์ MU12

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 26

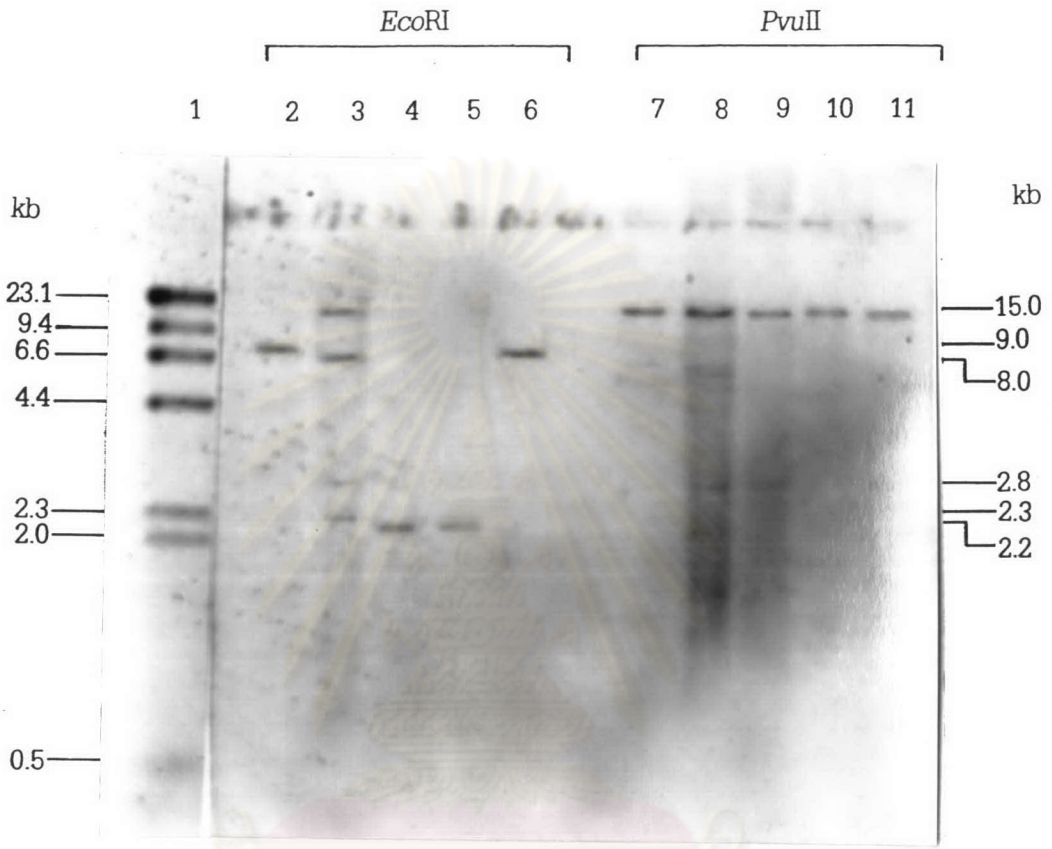
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 26 Southern-blot hybridization ระหว่างดีเอ็นเอเห็ดหอมที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI และ *Pvu*II กับดีเอ็นเอติดตาม *50.1

ย่อยดีเอ็นเอเห็ดหอมด้วย *Eco*RI และ *Pvu*II บ่มที่ 37°ซ นานประมาณ 12 ชั่วโมงแล้ว แยกบนอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีสที่ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง ตรึงสู่แผ่นไนล่อนเมมเบรน และไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามที่สร้างจากชิ้นดีเอ็นเอ #50.1 ด้วยวิธี Southern-blot hybridization จากนั้นจึงวิเคราะห์สัญญานการไฮบริไดซ์ที่เกิดขึ้น

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2 ที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI
ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4 ที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI
ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5 ที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI
ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI
ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ HY ที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI
ช่องที่ 7 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2 ที่ถูกย่อยด้วย *Pvu*II
ช่องที่ 8 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4 ที่ถูกย่อยด้วย *Pvu*II
ช่องที่ 9 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5 ที่ถูกย่อยด้วย *Pvu*II
ช่องที่ 10 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ถูกย่อยด้วย *Pvu*II
ช่องที่ 11 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ HY ที่ถูกย่อยด้วย *Pvu*II

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 27

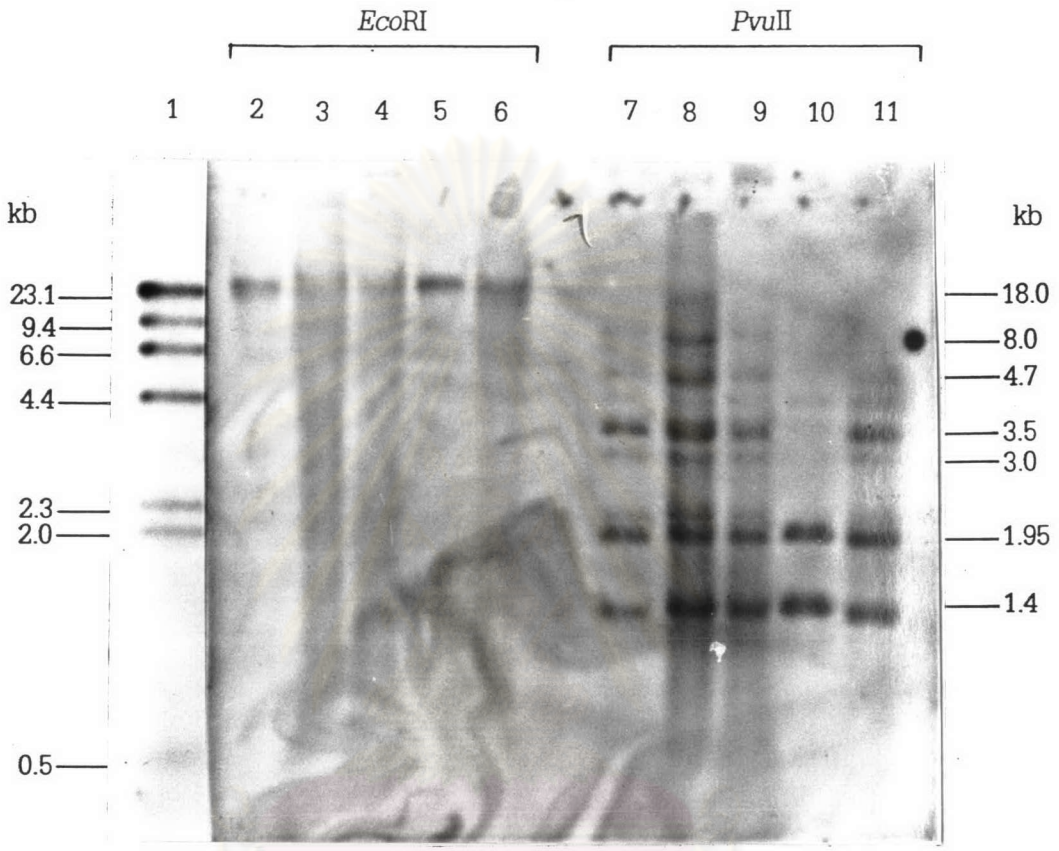
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 27 Southern-blot hybridization ระหว่างดีเอ็นเอเห็ดหอมที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI และ *Pvu*II กับดีเอ็นเอติดตาม *50.2

ย่อยดีเอ็นเอเห็ดหอมด้วย *Eco*RI และ *Pvu*II บ่มที่ 37°ซ นานประมาณ 12 ชั่วโมงแล้วแยกบนอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส ที่ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง ตรึงสู่แผ่นไนล่อนเมมเบรนและไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามที่สร้างจากชิ้นดีเอ็นเอ #50.2 ด้วยวิธี Southern-blot hybridization จากนั้นจึงวิเคราะห์สัญญานการไฮบริไดซ์ที่เกิดขึ้น

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2 ที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI
ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4 ที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI
ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5 ที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI
ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI
ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ HY ที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI
ช่องที่ 7 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2 ที่ถูกย่อยด้วย *Pvu*II
ช่องที่ 8 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4 ที่ถูกย่อยด้วย *Pvu*II
ช่องที่ 9 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5 ที่ถูกย่อยด้วย *Pvu*II
ช่องที่ 10 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ถูกย่อยด้วย *Pvu*II
ช่องที่ 11 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ HY ที่ถูกย่อยด้วย *Pvu*II

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 28

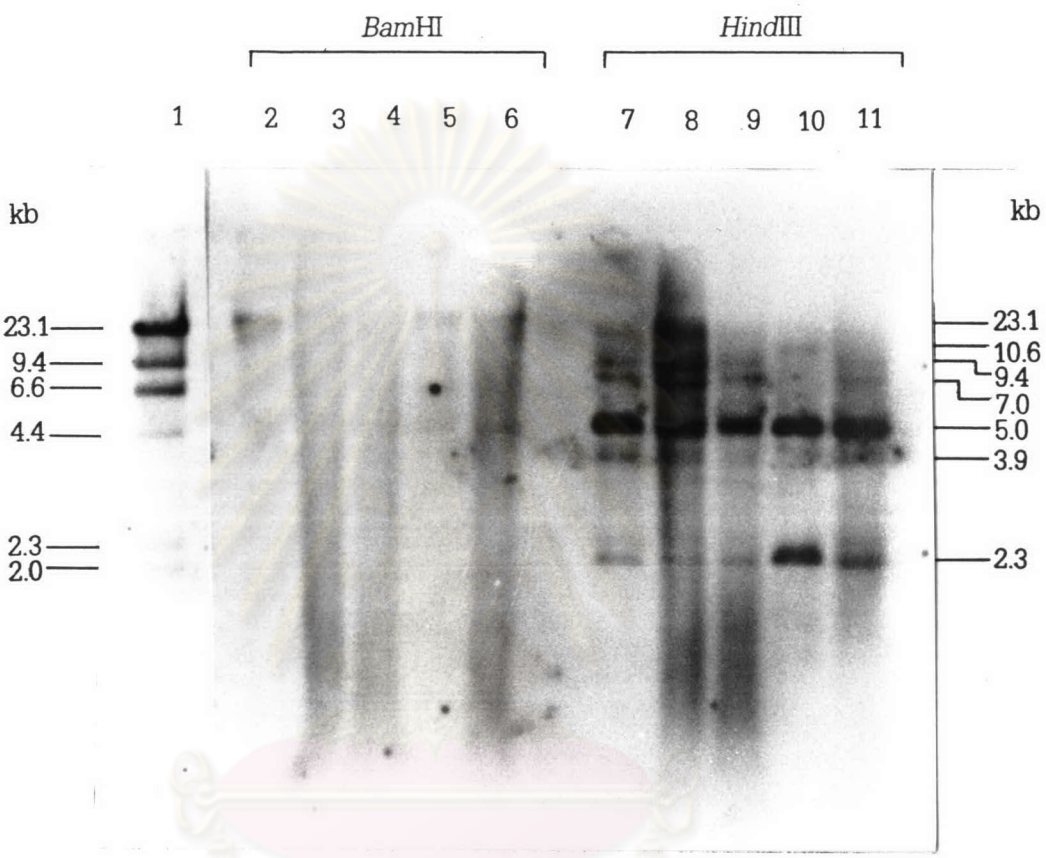
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 28 Southern-blot hybridization ระหว่างดีเอ็นเอเห็ดหอมที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI และ *Pvu*II กับดีเอ็นเอติดตาม *21

ย่อยดีเอ็นเอเห็ดหอมด้วย *Eco*RI และ *Pvu*II บ่มที่ 37°ซ นานประมาณ 12 ชั่วโมงแล้วแยกบนอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส ที่ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง ตรึงสู่แผ่นไนล่อนเมมเบรนและไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามที่สร้างจากชิ้นดีเอ็นเอ #21 ด้วยวิธี Southern-blot hybridization จากนั้นจึงวิเคราะห์สัญญานการไฮบริไดซ์ที่เกิดขึ้น

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2 ที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI
ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4 ที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI
ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5 ที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI
ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI
ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ HY ที่ถูกย่อยด้วย *Eco*RI
ช่องที่ 7 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2 ที่ถูกย่อยด้วย *Pvu*II
ช่องที่ 8 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4 ที่ถูกย่อยด้วย *Pvu*II
ช่องที่ 9 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5 ที่ถูกย่อยด้วย *Pvu*II
ช่องที่ 10 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ถูกย่อยด้วย *Pvu*II
ช่องที่ 11 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ HY ที่ถูกย่อยด้วย *Pvu*II

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 29

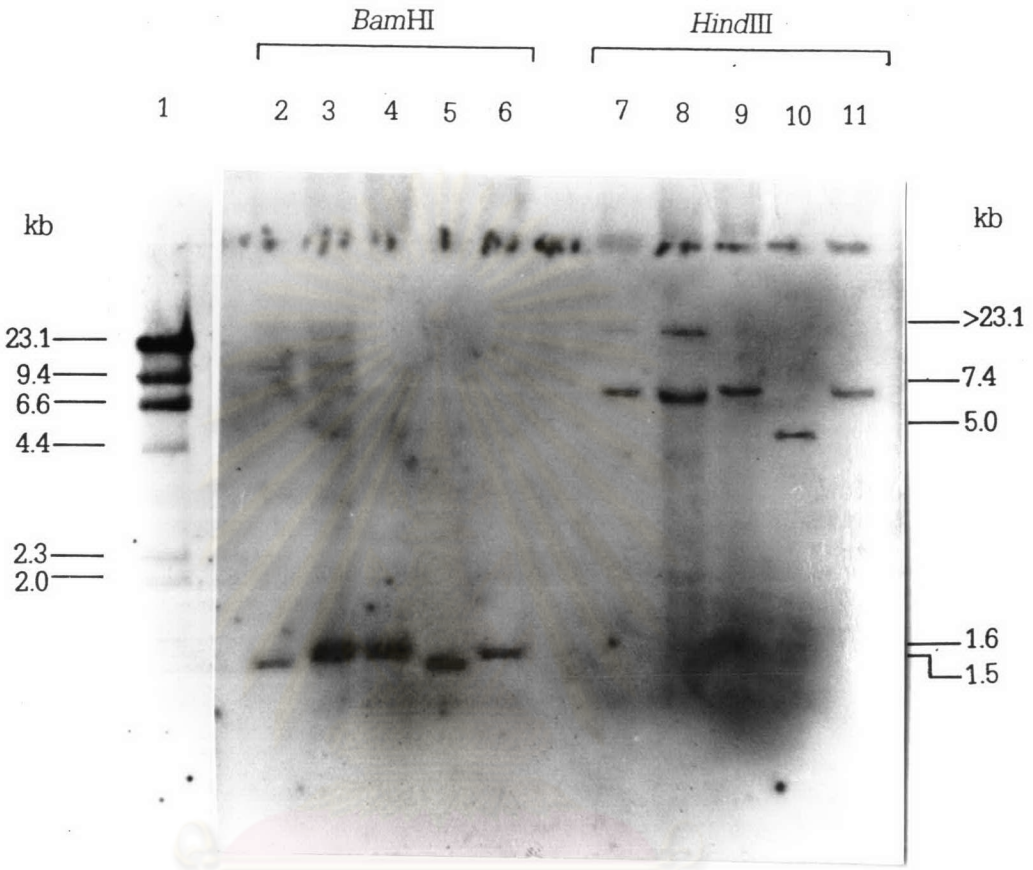
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 29 Southern-blot hybridization ระหว่างดีเอ็นเอเห็ดหอมที่ถูกย่อยด้วย *Bam*HI และ *Hind*III กับดีเอ็นเอติดตาม *50.1

ย่อยดีเอ็นเอเห็ดหอมด้วย *Bam*HI และ *Hind*III บ่มที่ 37°ซ นานประมาณ 12 ชั่วโมงแล้วแยกบนอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส ที่ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง ตรึงสู่แผ่นไนล่อนเมมเบรนและไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามที่สร้างจากชิ้นดีเอ็นเอ #50.1 ด้วยวิธี Southern-blot hybridization จากนั้นจึงวิเคราะห์สัญญานการไฮบริไดซ์ที่เกิดขึ้น

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2 ที่ถูกย่อยด้วย *Bam*HI
ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4 ที่ถูกย่อยด้วย *Bam*HI
ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5 ที่ถูกย่อยด้วย *Bam*HI
ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ถูกย่อยด้วย *Bam*HI
ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ HY ที่ถูกย่อยด้วย *Bam*HI
ช่องที่ 7 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2 ที่ถูกย่อยด้วย *Hind*III
ช่องที่ 8 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4 ที่ถูกย่อยด้วย *Hind*III
ช่องที่ 9 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5 ที่ถูกย่อยด้วย *Hind*III
ช่องที่ 10 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ถูกย่อยด้วย *Hind*III
ช่องที่ 11 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ HY ที่ถูกย่อยด้วย *Hind*III

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 30

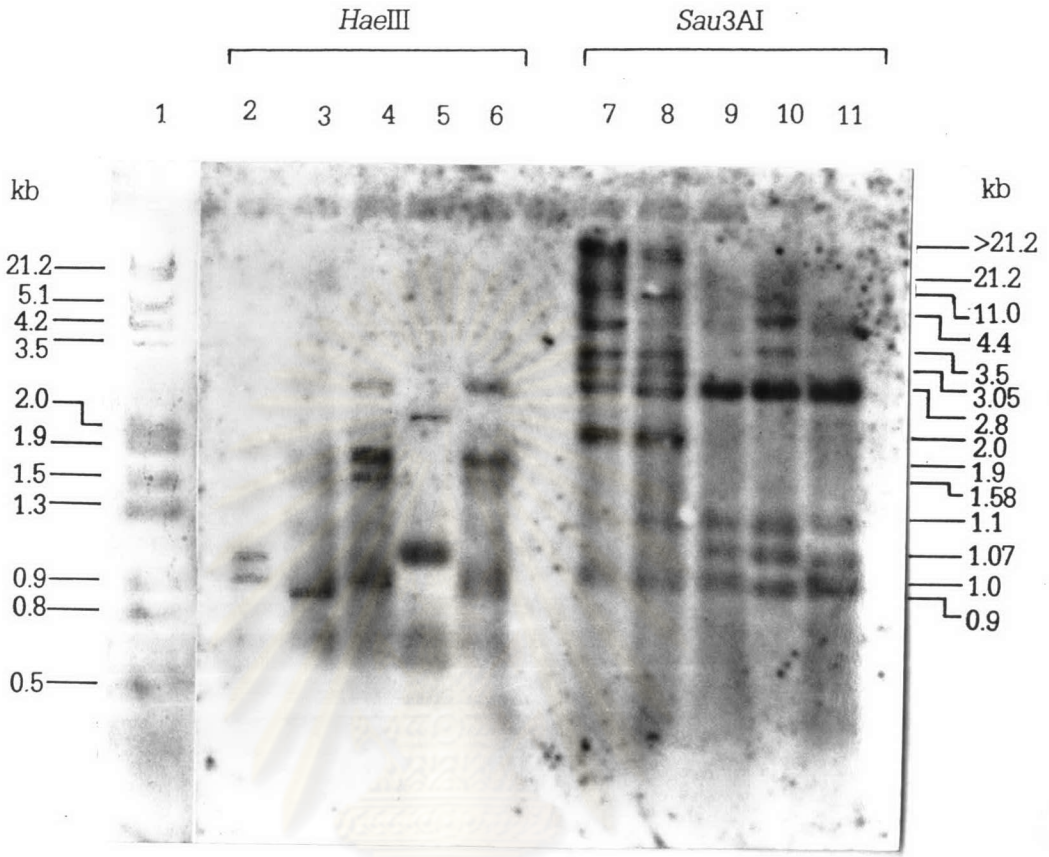
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 30 Southern-blot hybridization ระหว่างดีเอ็นเอเห็ดหอมที่ถูกย่อยด้วย *Bam*HI และ *Hind*III กับดีเอ็นเอติดตาม *50.2

ย่อยดีเอ็นเอเห็ดหอมด้วย *Bam*HI และ *Hind*III บ่มที่ 37°ซ นานประมาณ 12 ชั่วโมงแล้วแยกบนอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส ที่ความเข้มข้นเจล 1 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 3 ชั่วโมง ตรึงสู่แผ่นไนล่อนเมมเบรนและไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามที่สร้างจากชิ้นดีเอ็นเอ #50.2 ด้วยวิธี Southern-blot hybridization จากนั้นจึงวิเคราะห์สัญญานการไฮบริไดซ์ที่เกิดขึ้น

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III)
ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2 ที่ถูกย่อยด้วย *Bam*HI
ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4 ที่ถูกย่อยด้วย *Bam*HI
ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5 ที่ถูกย่อยด้วย *Bam*HI
ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ถูกย่อยด้วย *Bam*HI
ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ HY ที่ถูกย่อยด้วย *Bam*HI
ช่องที่ 7 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2 ที่ถูกย่อยด้วย *Hind*III
ช่องที่ 8 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4 ที่ถูกย่อยด้วย *Hind*III
ช่องที่ 9 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5 ที่ถูกย่อยด้วย *Hind*III
ช่องที่ 10 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ถูกย่อยด้วย *Hind*III
ช่องที่ 11 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ HY ที่ถูกย่อยด้วย *Hind*III

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 31

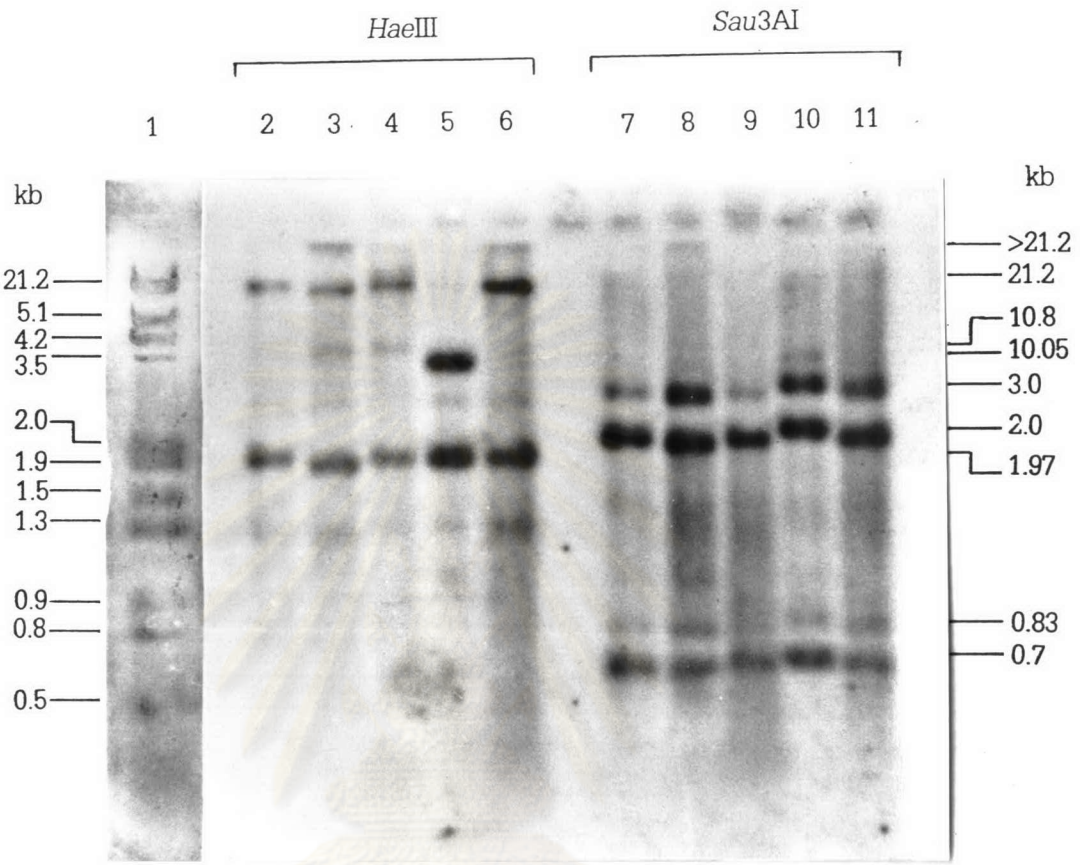
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 31 Southern-blot hybridization ระหว่างดีเอ็นเอเห็ดหอมที่ถูกย่อยด้วย *Hae*III และ *Sau*3AI กับดีเอ็นเอติดตาม *50.1

ย่อยดีเอ็นเอเห็ดหอมด้วย *Hae*III และ *Sau*3AI บ่มที่ 37°ซ นานประมาณ 12 ชั่วโมงแล้วแยกบนอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส ที่ความเข้มข้นเจล 1.5 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 4 ชั่วโมง ตรึงสู่แผ่นไนล่อนเมมเบรนและไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามที่สร้างจากชิ้นดีเอ็นเอ #50.1 ด้วยวิธี Southern-blot hybridization จากนั้นจึงวิเคราะห์สัญญานการไฮบริไดซ์ที่เกิดขึ้น

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III,*Eco*RI)
ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2 ที่ถูกย่อยด้วย *Hae*III
ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4 ที่ถูกย่อยด้วย *Hae*III
ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5 ที่ถูกย่อยด้วย *Hae*III
ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ถูกย่อยด้วย *Hae*III
ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ HY ที่ถูกย่อยด้วย *Hae*III
ช่องที่ 7 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2 ที่ถูกย่อยด้วย *Sau*3AI
ช่องที่ 8 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4 ที่ถูกย่อยด้วย *Sau*3AI
ช่องที่ 9 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5 ที่ถูกย่อยด้วย *Sau*3AI
ช่องที่ 10 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ถูกย่อยด้วย *Sau*3AI
ช่องที่ 11 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ HY ที่ถูกย่อยด้วย *Sau*3AI

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 32

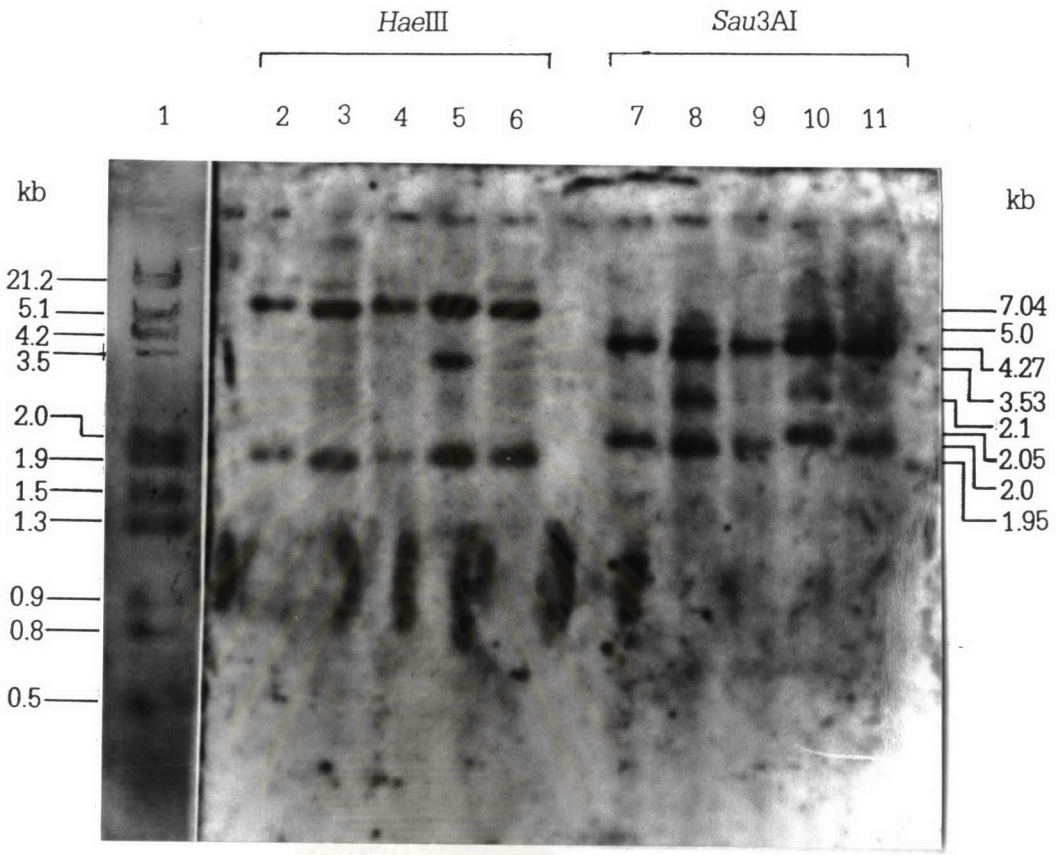
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 32 Southern-blot hybridization ระหว่างดีเอ็นเอเห็ดหอมที่ถูกย่อยด้วย *Hae*III และ *Sau*3AI กับดีเอ็นเอติดตาม *50.2

ย่อยดีเอ็นเอเห็ดหอมด้วย *Hae*III และ *Sau*3AI บ่มที่ 37°ซ นานประมาณ 12 ชั่วโมงแล้วแยกบนอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส ที่ความเข้มข้นเจล 1.5 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 4 ชั่วโมง ตรึงสู่แผ่นไนล่อนเมมเบรนและไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามที่สร้างจากชิ้นดีเอ็นเอ #50.2 ด้วยวิธี Southern-blot hybridization จากนั้นจึงวิเคราะห์สัญญานการไฮบริไดซ์ที่เกิดขึ้น

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III,*Eco*RI)
ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2 ที่ถูกย่อยด้วย *Hae*III
ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4 ที่ถูกย่อยด้วย *Hae*III
ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5 ที่ถูกย่อยด้วย *Hae*III
ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ถูกย่อยด้วย *Hae*III
ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ HY ที่ถูกย่อยด้วย *Hae*III
ช่องที่ 7 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2 ที่ถูกย่อยด้วย *Sau*3AI
ช่องที่ 8 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4 ที่ถูกย่อยด้วย *Sau*3AI
ช่องที่ 9 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5 ที่ถูกย่อยด้วย *Sau*3AI
ช่องที่ 10 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ถูกย่อยด้วย *Sau*3AI
ช่องที่ 11 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ HY ที่ถูกย่อยด้วย *Sau*3AI

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 33

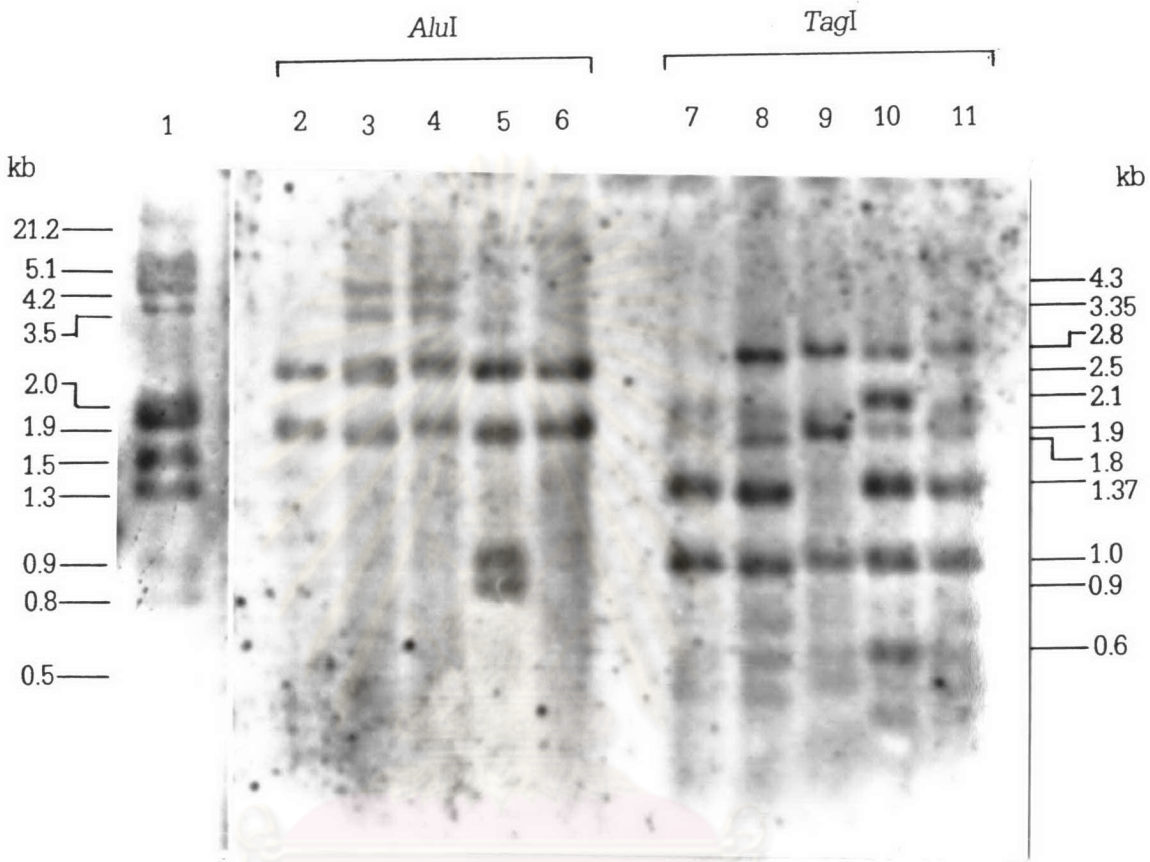
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 33 Southern-blot hybridization ระหว่างดีเอ็นเอเห็ดหอมที่ถูกย่อยด้วย *Hae*III และ *Sau*3AI กับดีเอ็นเอติดตาม *21

ย่อยดีเอ็นเอเห็ดหอมด้วย *Hae*III และ *Sau*3AI บ่มที่ 37°ซ นานประมาณ 12 ชั่วโมงแล้วแยกบนอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส ที่ความเข้มข้นเจล 1.5 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 4 ชั่วโมง ตรึงสู่แผ่นไนล่อนเมมเบรนและไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามที่สร้างจากชิ้นดีเอ็นเอ #21 ด้วยวิธี Southern-blot hybridization จากนั้นจึงวิเคราะห์สัญญานการไฮบริไดซ์ที่เกิดขึ้น

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III,*Eco*RI)
ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2 ที่ถูกย่อยด้วย *Hae*III
ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4 ที่ถูกย่อยด้วย *Hae*III
ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5 ที่ถูกย่อยด้วย *Hae*III
ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ถูกย่อยด้วย *Hae*III
ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ HY ที่ถูกย่อยด้วย *Hae*III
ช่องที่ 7 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2 ที่ถูกย่อยด้วย *Sau*3AI
ช่องที่ 8 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4 ที่ถูกย่อยด้วย *Sau*3AI
ช่องที่ 9 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5 ที่ถูกย่อยด้วย *Sau*3AI
ช่องที่ 10 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ถูกย่อยด้วย *Sau*3AI
ช่องที่ 11 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ HY ที่ถูกย่อยด้วย *Sau*3AI

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 34

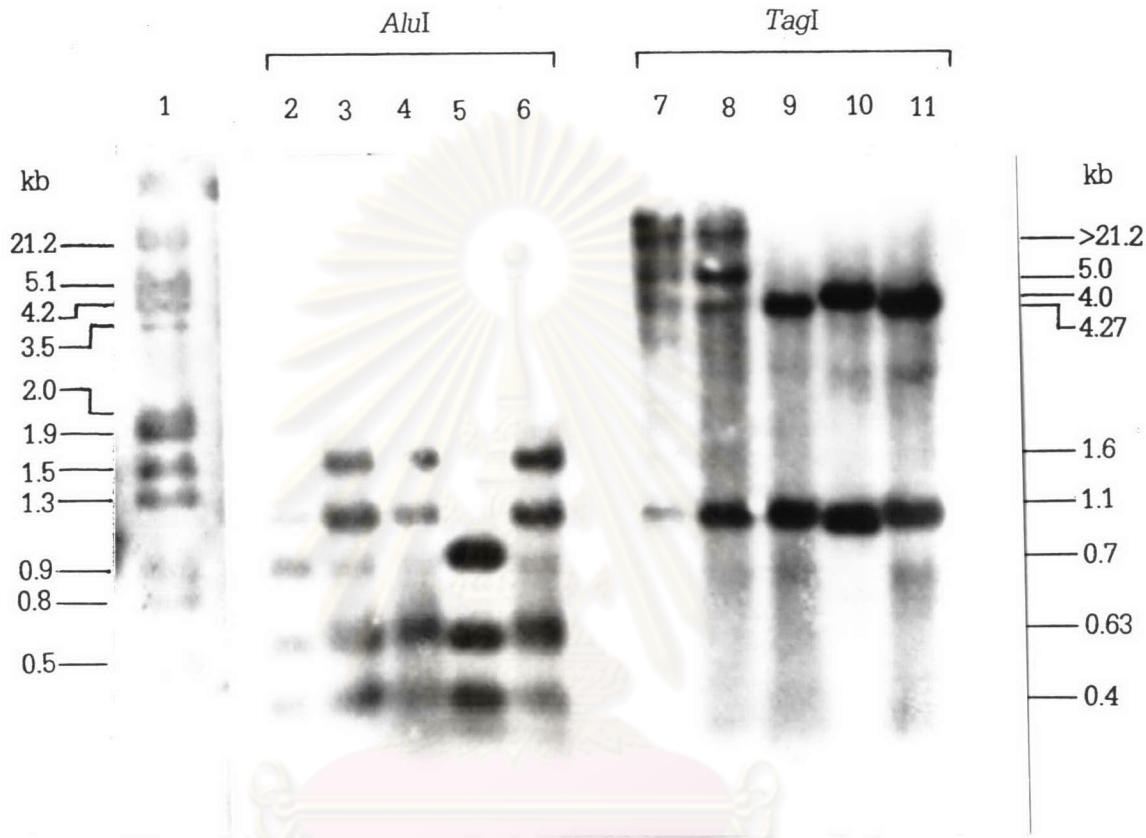
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 34 Southern-blot hybridization ระหว่างดีเอ็นเอเห็ดหอมที่ถูกย่อยด้วย *Alu*I และ *Tag*I กับดีเอ็นเอติดตาม *50.1

ย่อยดีเอ็นเอเห็ดหอมด้วย *Alu*I และ *Tag*I บ่มที่ 37°ซ นานประมาณ 12 ชั่วโมงแล้วแยกบนอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส ที่ความเข้มข้นเจล 1.5 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 4 ชั่วโมง ตรึงสู่แผ่นไนล่อนเมมเบรนและไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามที่สร้างจากชิ้นดีเอ็นเอ #50.1 ด้วยวิธี Southern-blot hybridization จากนั้นจึงวิเคราะห์สัญญานการไฮบริไดซ์ที่เกิดขึ้น

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III,*Eco*RI)
ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2 ที่ถูกย่อยด้วย *Alu*I
ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4 ที่ถูกย่อยด้วย *Alu*I
ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5 ที่ถูกย่อยด้วย *Alu*I
ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ถูกย่อยด้วย *Alu*I
ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ HY ที่ถูกย่อยด้วย *Alu*I
ช่องที่ 7 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2 ที่ถูกย่อยด้วย *Tag*I
ช่องที่ 8 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4 ที่ถูกย่อยด้วย *Tag*I
ช่องที่ 9 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5 ที่ถูกย่อยด้วย *Tag*I
ช่องที่ 10 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ถูกย่อยด้วย *Tag*I
ช่องที่ 11 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ HY ที่ถูกย่อยด้วย *Tag*I

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 35

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 35 Southern-blot hybridization ระหว่างดีเอ็นเอเห็ดหอมที่ถูกย่อยด้วย *Alu*I และ *Tag*I กับดีเอ็นเอติดตาม *50.2

ย่อยดีเอ็นเอเห็ดหอมด้วย *Alu*I และ *Tag*I บ่มที่ 37°ซ นานประมาณ 12 ชั่วโมงแล้วแยกบนอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟรีซีส ที่ความเข้มข้นเจล 1.5 เปอร์เซนต์ กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 4 ชั่วโมง ตรึงสู่แผ่นไนล่อนเมมเบรนและไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอติดตามที่สร้างจากชิ้นดีเอ็นเอ #50.2 ด้วยวิธี Southern-blot hybridization จากนั้นจึงวิเคราะห์สัญญานการไฮบริไดซ์ที่เกิดขึ้น

ช่องที่ 1 ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ/*Hind*III,*Eco*RI)
ช่องที่ 2 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2 ที่ถูกย่อยด้วย *Alu*I
ช่องที่ 3 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4 ที่ถูกย่อยด้วย *Alu*I
ช่องที่ 4 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5 ที่ถูกย่อยด้วย *Alu*I
ช่องที่ 5 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ถูกย่อยด้วย *Alu*I
ช่องที่ 6 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ HY ที่ถูกย่อยด้วย *Alu*I
ช่องที่ 7 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU2 ที่ถูกย่อยด้วย *Tag*I
ช่องที่ 8 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU4 ที่ถูกย่อยด้วย *Tag*I
ช่องที่ 9 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU5 ที่ถูกย่อยด้วย *Tag*I
ช่องที่ 10 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ MU12 ที่ถูกย่อยด้วย *Tag*I
ช่องที่ 11 ดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ HY ที่ถูกย่อยด้วย *Tag*I

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ตรวจพบสัญญาณการไฮบริไดซ์ระหว่างดีเอ็นเอเห็ดหอม สายพันธุ์ที่ใช้ทดลองซึ่งถูกย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ กับดีเอ็นเอติดตาม *50.1

เอนไซม์	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (กิโลเบส)				
	MU2	MU4	MU5	MU12	HY
*Eco*RI	9.2	9.2	6.0	6.0	9.2
*Pvu*II	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0
*Bam*HI	23.1	23.1	23.1	23.1	23.1
*Hind*III	23.1 9.4 7.0 5.0 3.9 2.3	23.1 9.4 7.0 5.0 3.9 2.3	9.4 7.0 5.0 3.9 2.3	10.6 5.0 3.9 2.3	9.4 7.0 5.0 3.9 2.3
*Hae*III	1.1 1.0	0.9	2.8 1.9 1.58 1.0	2.05 1.1	2.8 1.9 1.58 1.0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5(ต่อ) แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ตรวจพบสัญญานการไฮบริไดซ์ระหว่างดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ที่ใช้ทดลองซึ่งถูกย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ กับดีเอ็นเอติดตาม *50.1

เอนไซม์	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (กิโลเบส)				
	MU2	MU4	MU5	MU12	HY
*Sau*3AI	>21.2	>21.2			
	21.2				
		11.0			
	4.4			4.4	
	3.5	3.5		3.5	
	3.05	3.05			
	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8
	2.0	2.0			
		1.1	1.1	1.1	1.1
			1.07	1.07	1.07
	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
*Alu*I		4.3	4.3		
		3.35	3.35		
	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
	1.9	1.9	1..9	1.9	1.9
				1.01	
				0.9	
*Tag*I		2.8	2.8	2.8	2.8
				2.1	
		2.0			2.0
			1.9		
		1.8			1.8
	1.37	1.37		1.37	1.37
	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
				0.6	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ตรวจพบสัญญาณการไฮบริไดซ์ระหว่างดีเอ็นเอเห็ดหอม สายพันธุ์ที่ใช้ทดลองซึ่งถูกย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ กับดีเอ็นเอติดตาม *50.2

เอนไซม์	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (กิโลเบส)				
	MU2	MU4	MU5	MU12	HY
*Eco*RI	9.0	15.0 8.0 2.8 2.3	2.2	2.2	9.0
*Pvu*II	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0
*Bam*HI	1.5	1.6	1.6	1.5	1.6
*Hind*III	>23.1 7.4	>23.1 7.4	7.4	5.0	7.4
*Hae*III	21.2 1.97	>21.2 21.2 10.8 1.97	21.2 10.8 1.97	10.05 3.0 1.97	>21.2 21.2 3.0 1.97
*Sau*3AI	3.0 2.0 0.83 0.7	3.0 2.0 0.83 0.7	3.0 2.0 0.83 0.7	3.0 2.0 0.83 0.7	3.0 2.0 0.83 0.7

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 (ต่อ) แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ตรวจพบสัญญาณการไฮบริไดซ์ระหว่างดีเอ็นเอเห็ดหอมสายพันธุ์ที่ใช้ทดลองซึ่งถูกย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ กับดีเอ็นเอติดตาม *50.2

เอนไซม์	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (กิโลเบส)				
	MU2	MU4	MU5	MU12	HY
AluI		1.6	1.6		1.6
	1.1	1.1	1.1		1.1
	0.7	0.7		0.7	
	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63
	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
TagI	>21.2	>21.2			
	5.0	5.0			
				4.27	
	4.0	4.0	4.0		4.0
	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ตรวจพบสัญญาณการไฮบริไดซ์ระหว่างดีเอ็นเอเห็ดหอม สายพันธุ์ที่ใช้ทดลองซึ่งถูกย่อยด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ต่างๆ กับดีเอ็นเอติดตาม *21

เอนไซม์	ขนาดของแถบดีเอ็นเอ (กิโลเบส)				
	MU2	MU4	MU5	MU12	HY
*Eco*RI	>23.1	>23.1	>23.1	>23.1	>23.1
*Pvu*II		8.0			
		4.7			
	3.5	3.5	3.5		3.5
	3.0	3.0	3.0		3.0
	1.95	1.95	1.95	1.95	1.95
	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4
*Hae*III	7.04	7.04	7.04	7.04	7.04
				3.53	
	1.95	1.95	1.95	1.95	1.95
*Sau*3AI		5.0		5.0	
	4.27	4.27	4.27	4.27	4.27
		2.05		2.05	
				2.1	
	2.0	2.0	2.0		2.0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 แสดงการจัดกลุ่มของเห็ดหอมสายพันธุ์ที่ทำการทดลอง โดยใช้ความแตกต่างของขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดสัญญานการไฮบริไดซ์กับตัวติดตามที่สร้างขึ้น

เอนไซม์	ตัวติดตาม	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3	กลุ่มที่ 4
*Alu*I	*50.1	MU2,HY	MU4,MU5	MU12	-
	*50.2	MU2	MU4,MU5, HY	MU12	-
*Bam*HI	*50.1	-	-	-	-
	*50.2	MU2, MU12	MU4,MU5, HY	-	-
*Eco*RI	*50.1	MU2,MU4, HY	MU5, MU12	-	-
	*50.2	MU2,HY	MU4	MU5, MU12	-
	*21	-	-	-	-
*Hae*III	*50.1	MU2	MU4	MU5,HY	MU12
	*50.2	MU2	MU4,MU5	MU12	HY
	*21	MU2,MU4, MU5,HY	MU12	-	-
*Hind*III	*50.1	MU2,MU4	MU5,HY	MU12	-
	*50.2	MU2,MU4	MU5,HY	MU12	-
*Pvu*II	*50.1	-	-	-	-
	*50.2	-	-	-	-
	*21	MU2,MU5,	MU4	MU12	HY

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 (ต่อ) แสดงการจัดกลุ่มของเห็ดหอมสายพันธุ์ที่ทำการทดลอง โดยใช้ความแตกต่างของขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดสัญญานการไฮบริไดซ์กับตัวติดตามที่สร้างขึ้น

เอนไซม์	ตัวติดตาม	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3	กลุ่มที่ 4
*Sau*3AI	*50.1	MU2	MU4	MU5,HY	MU12
	*50.2	MU2,MU4, MU5,HY	MU12	-	-
	*21	MU2,MU5, HY	MU4	MU12	-
*Tag*I	*50.1	MU2	MU4,HY	MU5	MU12
	*50.2	MU2,MU4	MU5,HY	MU12	-

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2) *Sau*3AI/*50.1 (ดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *Sau*3AI ไฮบริไดซ์กับตัวติดตาม*50.1) แยกได้กลุ่มที่ 1 คือสายพันธุ์ MU2 กลุ่มที่ 2 คือสายพันธุ์ MU4 กลุ่มที่ 3 คือสายพันธุ์ MU5, HY และกลุ่มที่ 4 คือสายพันธุ์ MU12

4.3) *TagI*/*50.1 (ดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *TagI* และไฮบริไดซ์กับตัวติดตาม*50.1) แยกได้กลุ่มที่ 1 คือสายพันธุ์ MU2 กลุ่มที่ 2 คือสายพันธุ์ MU4, HY กลุ่มที่ 3 คือสายพันธุ์ MU5 และกลุ่มที่ 4 คือสายพันธุ์ MU12

4.4) *Hae*III/*50.2 (ดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ *Hae*III และไฮบริไดซ์กับตัวติดตาม *50.2) แยกได้กลุ่มที่ 1 คือสายพันธุ์ MU2 กลุ่มที่ 2 คือสายพันธุ์ MU4, MU5 กลุ่มที่ 3 คือสายพันธุ์ MU12 และกลุ่มที่ 4 คือสายพันธุ์ HY

4.5) PvuII/*21 (ดีเอ็นเอที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ PvuII และไฮบริไดซ์กับตัวติดตาม *21) แยกได้กลุ่มที่ 1 คือสายพันธุ์ MU2, MU5 กลุ่มที่ 2 คือสายพันธุ์ MU4 กลุ่มที่ 3 คือสายพันธุ์ MU12 และกลุ่มที่ 4 คือสายพันธุ์ HY

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย