รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์และกิตติพงษ์ ศิริวานิชกุล. 2538. **ปริมาณธาตุอาหารในวัสดุเพาะ. เทคโนโลยีการเพาะเห็ด**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์รั้วเขียว,

ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์. 2549. ไบโอเซ็นเซอร์กับการตรวจวิเคราะห์อาหารด้วยโมเลกุลดีเอ็นเอใน **สัมมนาเชิงปฏิบัติการการวิเคราะห์ดีเอ็นเอกับการเสริมศักยภาพในอุตสาหกรรมอาหาร** , หน้า 1-7. หน่วยปฏิบัติการชีววิทยาโมเลกุล ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ธีระ เยี่ยมไพศาล. 2549. คุยกันเรื่องเห็ดกับลุงลี. **เทคโนโลยีการเกษตร**. 18(382): 50 น.

ธีระ เยี่ยมไพศาล. 2549. วิจัยปรับโครงสร้างที่เหมาะสมกับสภาพอากาศไทยในเห็ดยานาง. **เทคโนโลยีการเกษตร**. 18 (391): 34 น.

ศจิษฐา ประเสริฐกุล. 2547. **ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเห็ดโคน** *Termitomyces sp.* **บนพื้นฐานของการวิเคราะห์ลำดับพันธุกรรมบริเวณไอทีเอส** (GENETIC DIVERSITY OF TERMITE MUSHROOM *Termitomyces sp.* BASED ON ITS SEQUENCE ANALYSIS). วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อัจฉรา พยัพพานนท์. 2535. ยานาง เห็ดเศรษฐกิจชนิดใหม่. **หนังสือพิมพ์กสิกร** 65: 155 – 157.

อัจฉราวรรณ น้อยกล่ำ และ ประสิทธิ์ วัฒนวงศ์วิจิตร. 2542. ผลของอุณหภูมิและวัสดุเพาะต่อการเกิดดอกของเห็ดยานาง. **วารสารเกษตร** 15(3): 25 น.

อนุสรณ์ เชิดทอง. 2549. **การใช้เทคนิค** Real Time Polymerase Chain Reaction **ในการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน**. สัมมนาระดับบัณฑิตศึกษา. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ภาษาอังกฤษ

Altschul, S. F., *et al.*, 1997. Gappde blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res** 25: 3389-3402.

Ausubel, F., *et al.* 1995. Short protocols in molecular biology. **John Wiley and Sons, Inc.**, New York City

Bell, A. A., and Wheeler, M. H. 1986. Biosynthesis and functions of fungal melanins. **Annual Review of Phytopathology** 24: 411-451.

Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., and Wheeler, D. L. 2004. **GenBank:update[Online].Availablefrom:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/ [2004,Jan 1]**

Burton, K. S. 1988. The effects of pre- and post-harvested development on mushroom tyrosinase. **Journal of Horticultural Science** 63: 255-260.

Chaumpluk, P., Chikae, M., Takamura, Y., and Tamiya, E. 2006. Novel electrochemical identification and semi quantification of bovine constituents in feedstuffs. **Sci. Tech. Of Adv. Mat** 7: 263-269.

Chaumpluk, P., Kerman, K., Takamura, Y., and Tamiya, E. 2007. Accumulation of amplified target DNAs using thio/biotin labeling, S1 nuclease, and ferrocenestreptavidin-magnetic system and direct detection of specific DNA signals with screen printed gold electrode. **Sci. Tech. Of Adv. Mat.** (accepted)

Chomezynski, P., and Sacchi, N. 1987. single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal. Biochem** 162:156-159.

Espin, J. C., Jolivet, S., Overeem, A., and Wichers, H. J. 1999. Agaritine from *Agaricus bisporus* is capable of preventing melanin formation. **Phytochemistry** 50: 555-563.

FASTA format (www.cmbi.kun.nl/bioinf/tools/crab_fasta.html).

Hayward, A. L., Oefner, P. J., Sabatini, S., Kainer, D. B., Hinojos, C. A., and Doris, P. A. 1998. Modeling and analysis of competitive RT–PCR. **Nucleic Acids Research** 26: 2511-2518.

Obata, H., *et al.* 2004. Cloning of a Novel Tyrosinase-Encoding Gene (*mel B*) from *Aspergillus oryzae* and Its Overexpression in Solid-State Culture (Rice Koji). **Journal of Bioscience and Bioengineering** 97(6): 400-405.

Huber, M., Hintermann, G., and Lerch, K. 1985. Primary structure of tyrosinase from *Streptomyces glaucescens*. **Biochemistry** 24: 6038-6044.

Huber, M., and Lerch, K. 1988. Identification of two histidines as copper ligands in *Streptomyces glaucescens* tyrosinase. **Biochemistry** 27: 5610-5615.

Hunt, M. D., Eanetta, N. T., Yu, H., Newman, S. M., and Steffens, J. C. 1993. cDNA cloning and expression of potato polyphenol oxidase. **Plant Mol Biol** 21: 59-68.

Jolivet, S., Arpin, N., Wichers, H. J., and Pellon, G. 1998. *Agaricus bisporus* browning. **Mycological Research** 102: 1459 -1483.

Kanda, K., Sata, T., Ishii, S., Enei, H., and Ejiri, S. 1996. Purification and properties of tyrosinase isozymes from the gill of *Lentinus edodes* fruiting body. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** 60: 1273 -1278.

Kiho, T. 1996. Polysaccharides in fungi XXXVI Hypoglycemic activity of a polysaccharide (CS-F30) from the cultural mycelium of *Cordyceps sinensis* and its effect on glucose metabolism in mouse liver. **Biol Pharm Bull** 19(2): 294-296.

Kitamoto, N., Kimura, T., Kito, Y., Ohmiya, K., and Tsukagoshi, N. 1995. The nitrate reductase gene from a shoyu koji mold, *Aspergillus oryzae* KBN616. **Biotech. Biochem** 56: 1849-1853.

Kupper, U., Niedermann, M. D., Travaglini, G., and Lerch, K. 1989. Isolation and Characterization of the Tyrosinase Gene from *Neurospora crassa*. **The Journal of Biological Chemistry** 264(29): 17250-17258.

Kwon, B. S., Haq, A. K., Pomerantz, S. H., and Halaban, K. 1987. Isolation and sequence of a cDNA clone for human tyrosinase that maps at the mouse c-albino locus. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A** 84: 7473-7477.

Kwon, B. S., Wakulchik, M., Haq, A. K., Halaban, R., and Kestler, D. 1988. Sequence analysis of mouse tytosinase cDNA and the effect of melanotropin on its gene expression. **Biochem Biophys Res Comm** 153: 1301–1309.

Leeuwen, V. J., and Wichers, J. H. 1997. Tyrosinase activity and isoform composition in separate tissues during development of *Agraricus bisporus* fruit bodies. **Mycological Research** 101 (3): 375-382.

Leng, W. H., and van Holde, K. E. 1991. Cloning and sequencing of *Octopus dofleini* hemocyanin cDNA: Derived sequences of functional units Ode and Odf. **Proceeding of the National Academy of Sciencese of the United State of America** 88: 244-248.

Lerch, K. 1978. Amino acid sequence of tyrosinase from *Neurospora crassa*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A** 75: 3635-3639.

Lerch, K. 1982. Complete Amino Acid Sequence and Chemical Structure of a Tripeptide Containing an Unusual Thioether. **J. Biol. Chem** 257: 6414-6419.

Lerch, K. 1987. Monophenol monooxygenase from *Neurospora. Crassa*. **Methods Enzymol** 142: 165-169.

Lerch, K., and Hider, C. 1989. The inhibition of tyrosinase by pyridinones. **Biochem. J.** 257: 289-290.

Lerch, K. 1998. Copper monooxygenases: Tyrosinase and dopamine-monooxygenases. In **Metal Ions in Biological Systems** Sigel, H., Ed.; Dekker: New York. pp: 143-186.

Lerch, K., and Germann, U. A. 1988. Evolutionary relationships among copper proteins containing coupled binuclear copper sites. **Prog. Clin. Biol. Res** 274: 331-348.

Marone, M., Mozzetti, S., Ritis, D. D., Pierelli L., and Scambia, G. 2001. Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. **Biol. Proced. Online** 3(1): 19-25.

Mason, H. S. 1965. **Oxidases. Annu.Rev. Biochem** 34:595-634.

Meinhardt, F., and Leslie, J. F. 1982. Mating types of *Agrocybe aegerita*. **Curr. Genet** 5: 65-68.

Muller, G., Ruppert, S., Schmid, E., and Schutz, G. 1988. Functional analysis of alternatively spliced tyrosinase gene transcripts. **EMBO** 7: 2723–2730.

Murcia, M. A., *et al.* 2002. Local staging of pancreatic carcinoma with multi-detector row CT: use of surved planar reformations- initial experience. **Radiology** 225: 759-765.

Nagai, M., Kawata, M., Watanabe, H., *et al.* 2003. Important role of fungal intracellular laccase for melanin synthesis: purification and characterization of an intracellular laccase from *Lentinula edodes* fruit bodies. **Microbiology** 149: 2455-2462.

Norton, C. F. 1989. **Microbiology** Addison-wesley Publishing company.

Pantone maching system color chart. **http://www.mfa-uk.co.uk/images/colorchart.htm.**

Rajagopal, R., Thamilarasi, K., Venkatesh, R. G., Srinivas, P., and Bhatnagar K. R. 2005. Immune cascade of Spodoptera litura: Cloning, expression, and characterization of inducible prophenol oxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 339: 394-400.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. NY.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. 1997. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Biotechnology** 1992: 104-108.

Shahar, T., Hennig, N., Gutfinger, T., Hareven, D., and Lifschitz, E. 1992. The tomato 66.3-kilodalton protein susceptible to proteolytic cleavage. **Plant Physiol** 99:317-323.

Seo, S. Y., Sharma, V. K., and Sharma, N. 2003. Mushroom tyrosinase: Recent prospects. **J Agric Food Chem** 55: 2837-2853.

Serra, B., Morales, M. D., Reviejo, A. J., Hall, E. H., and Pingarron, J. M. 2005. Rapid and highly sensitive electrochemical determination of alkaline phosphatase using a composite tyrosinase biosensor. **Anal Biochem** 336: 289-294.

Shibahara, S., *et al.* 1986. Cloning and expression of cDNA encoding mouse tyrosinase. **Nucleic Acids Res** 14(6): 2413-2427.

Shindo, T., *et al.* 2002. Contents of barbaloin-related compounds in aloe drinks and their change during storage. **Shokuhin Eiseigaku Zasshi** 43(3):122-6.

Soler-Rivas, C., Jolivet, S., Arpin, N., Olivier, J. M., and Wichers, H. J. 1999. Biochemical and physiological aspects of brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. **FEMS Microbiology Reviews** 23: 591-614.

Taira, K., *et al.* 2005. Navel antimutagenic factor derived from the edible mushroom *Agrocybe cylindracea*. **Mutation Research** 586: 115-123.

Tatusova, T. A., Madden, T. L. 1999. BLAST 2 Sequence, a new tool for comparing protein and mucleotide sequences. **FEMS Microbiol Lett** 174: 247-250.

Thompson, C. J., Ward, J. M., and Hopwood, D. A. 1982. Cloning of antibiotic resistance and nutritional genes in streptomycetes. **J. Bacteriol** 151:668-677.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research** 22: 4673-4680.

Turner, E. M. 1974. Phenoloxidase activity in relation to substrate and development stage in the mushroom, *Agraricus bisporus*. **Trans Brit Mycol Sic** 63: 541-547

Wichers, H. J., Gerritsen, Y. A. M., and Chapelon, C. G. J. 1996. Tyrosinase isoforms from the fruitbodies of *Agaricus bisporus*. **Phytochemistry** 43: 333-337.

Wichers, H. J., *et al.* 2003. Cloning, expression and characterisation of two tyrosinase cDNAs from *Agaricus bisporus*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 61: 336-341.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สารเคมี

Phenol (water Sat) (TE Sat) (Tris pH)

Distil Phenol 500 ml

8-Hydroxyquinolinol 0.6 g

DW 300 ml

Use Tris. HCl non adj. For Tris non adjust

TE

Tris.HCl pH adjusted

In equal volume

Phenol: Chloroform (Phenochor)

Phenol 1000 ml

Chloroform 960 ml

Isomyl alcohol 40ml

8-Hydroxyquinoline 2 g

β-(or 2) Mercaptoethanal 4 ml

1 M Tris.HCl non adj pH 600 ml

0.5 M EDTA Stock

EDTA 186.1 g

DW up to 800 ml

Adj pH to 8.0 (by NaOH~ 20 g)

Autoclave

Rnase TE

10x TE Stock 1 ml

1000x Rnase Stock 10 ไมโครลิตร

TE Stock (10x TE Stock)

1 M Tris. HCl pH 8.0 (100x)	5 ml
0.5 M EDTA Stock (500x)	1 ml
DW up to	500 ml
Autoclave	

10x TE Stock

1 M Tris. HCl pH 8.0 (100x)	5 ml
0.5 M EDTA Stock (500x)	1 ml
DW up to	50 ml
Autoclave	

RNase Stock (1000x)

Ribonuclease A R5000 Type II A(pfs) SIGMA 100 mg

Add 5 ml of

10mM Tris.HCl pH 7.5

15 mM NaCl

adj. Volume to 10 ml

autoclave at 100°C, 15 min

Lysozyme buffer

working

50 mM Tris. HCl pH 8.0

50 mM Sucrose (342.342. MW)

10 mM EDTA

1 M Tris.HCl pH 8.0 50 ml

Sucrose 17.1 g

0.5 M EDTA Stack 20 ml

without autoclave

3 M CH_3 COOK pH 4.8 (for ALK neutralize)

CH_3 COOK (5 Mj stock)	254.4 g in 600 ml
CH_3 COOK (cd. 002-12)	115 ml
H_2O	285 ml

3 M CH_3 COONa pH 5.2

Sodium acetate. 3 H_2O 408.2 g/800 ml

And Adj pH to 5.2 by Acetic acid

Adj volume to 1 lite with DW

Autoclave

10 M Ammonium Acetate for precipitation of DNA

Ammonium Acetate	770 g	
DW	800 ml	} autoclave
Adj volume to 1 lite with H_2O		

7.9 M Ammonium Acetate

Ammonium Acetate	577.5 g
DW	800 ml

50x TAE

Tris	121 g
Acetic acid	28.5 ml
EDTA	9.3 g/500 ml

5x TBE

Tris	54 g
Borate	27.5 g
0.5 EDTA	20 ml (7.44 g)

DW up to 1 lite

SOB medium

Bacto trypton	2.0 g
Bacto yeast extract	0.5 g
5 M NaCl Solution	200 ไมโครลิตร
2 M KCl	125 ไมโครลิตร
add DW	99 ml
autoclave	
add 2M $MgCl_2$ solution	0.5 ml

SOC medium (100 ml)

SOB medium	100 ml
1 M glucose	20 ml

LB broth (1000 ml)

Bacto-tryptone	10 g
Bacto-yeast extract	5 g
NaCl	10 g
Add H_2O to	1000 ml
Adjust pH 7.5	

1 M Glucose

Glucose	1.8 g
H_2O	9 ml

5 M NaCl (500 ml)

NaCl	146.1 g
H_2O to	500 ml
Autoclave	

Tris-buffer (1.0 M Tris. HCl, pH 7.5)

Tris	60.7 g
H_2O to	500 ml
Adjust pH 7.5	

3 M LiCl (500 ml)

Licl	118.36 g
Add H_2O to	500 ml

1 เปอร์เซ็นต์ TAE Agarose gel (w/v)

Agarose	1 g
1X TAE	99 ml

Phenol:Chloroform(1:1,v/v)

Phenol	250 ml
Chloroform	250 ml
0.1 M Tris-HCl,PH 7.6	
เตรียมเสร็จแล้วเก็บในขวดสีชา	

Chloroform:Isoamylalcoho (24:1,v/v)

Chloroform	24 ml
Isoamylalcohol	1 ml

CTAB extraction buffer

CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide)	4 g
1 M Tris-HCl,PH 8.0	20 ml
0.5 M EDTA	8 ml
5 M NaCl	56 ml
Adjust water up to 200 ml *** CTAB can not autoclave	

Alkaline solution (10 ml)

2 N NaOH	1 ml
10เปอร์เซ็นต์ SDS	1 ml
DW	8 ml

DEPC water (0.01เปอร์เซ็นต์ v/v)

H_2O	1000 ml
DEPC	100 ml

ภาคผนวก ข

วิธีการสกัดอาร์เอ็นเอด้วยฟีนอล

1. นำตัวอย่างเห็ดยานางิในส่วนของครีบและวงแหวน ปริมาณ 250 และ 100 มิลลิกรัม ตามลำดับ ใส่ลงในโกร่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เติม extraction buffer และ phenol ในอัตราส่วน 2:1 บดให้ละเอียดแล้วถ่ายลงในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
2. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 3 นาที เพื่อแยกชั้น phenol และ extraction buffer
3. ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายส่วนใสชั้นบนใส่ในหลอดใหม่
4. เติม phenol:chloroform ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ต่อหลอด ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการกลับหลอดไปมา
5. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลานาน 5 นาที เพื่อแยกชั้น phenol
6. ใช้ไมโครปิเปตดูดส่วนใสชั้นบนใส่ในหลอดใหม่ สกัดซ้ำด้วยการเติม phenol chloroform: isoamyl (24:1) ในอัตราส่วนเท่ากับปริมาตรของสารละลาย ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการกลับหลอดไปมา
7. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที
8. ใช้ไมโครปิเปตค่อยๆ ดูดสารละลายส่วนใสชั้นบนใส่หลอดใหม่ ระวังอย่าให้มีสารละลายของคลอโรฟอร์มติดมา
9. เติมสารละลายโซเดียมอะซิเตด เข้มข้น 3 โมลต่อลิตร pH 5.2 ปริมาตร 1 ใน 10 ของปริมาตรสารละลาย และ absolute ethanol 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียสเซลเซียส เป็นเวลา 15-30 นาที
10. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
11. เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm เป็นเวลานาน 5 นาที
12. เทส่วนใสทิ้ง นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง lyophilizer แล้วละลายตะกอนด้วย น้ำ DEPC ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เก็บอาเอ็นเอที่ละลายแล้วที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียสเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

การสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรีย

1. เลี้ยงแบคทีเรียในขวดเลี้ยงเชื้อ ซึ่งบรรจุอาหาร LB broth 3 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่มีเครื่องเขย่า อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเซลเซียส เป็นเวลานาน 12-24 ชั่วโมง
2. ดูดอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย 1.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 rpm เป็นเวลา 2 นาที แล้วเทอาหารเลี้ยงแบคทีเรียทิ้งไป
3. ใส่สารละลาย Lysosyme ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำให้เซลล์กระจายโดยใช้เครื่องผสมสาร (vortex)
4. เติมสารละลาย alkaline (2N NaOH, 10เปอร์เซ็นต์ SDS, DW; เตรียมก่อนใช้) 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการ vortex หรือกลับหลอดไปมาเบาๆ แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที
5. เติมสารละลายโปแตสเซียมอะซีเตต ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการ vortex หรือกลับหลอดไปมาเบาๆ แล้วแช่ในน้ำแข็ง 15 นาที
6. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลายชั้นบนมาใส่หลอดเซ็นตริฟิวจ์ใหม่ ระวังอย่าให้ตะกอนสีขาวติดมาด้วย
7. เติมฟีนอลคลอโรฟอร์ม (1:1) ลงไป 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันโดยการ vortex
8. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm เป็นเวลานาน 5 นาที แล้วดูดสารละลายชั้นบนมาใส่หลอดเซ็นตริฟิวจ์ใหม่
9. เติม propanol ลงไป 2.5 เท่าของปริมาตรของสารละลาย ปิดฝาให้แน่น ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
10. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm นาน 15 นาที แล้วเท propanol ทิ้งไป ระวังอย่าให้ตะกอนหลุดออกมา
11. เติมแอลกอฮอล์ 70เปอร์เซ็นต์ ลงไป 1000 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12000 rpm เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทเอทานอลทิ้งไป
12. ทำให้ตะกอนแห้งโดยเครื่อง Lyophilizer เป็นเวลา10-15 นาที สังเกตตะกอนแห้งจะใสขึ้นกว่าเดิม
13. ละลายตะกอนใน TE-Rnase buffer 30 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่ตู้ incubate 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และนำพลาสมิดส่วนหนึ่งไปเช็คผลด้วยเจลอิเล็คโทรฟอเรซิส ที่เหลือเก็บไว้ในตู้อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

การแยกโมเลกุลของดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็คโทรฟอเรซิส

1. เตรียมถาดสำหรับเทเจลในแนวราบและหวีให้เรียบร้อย
2. ชั่งผงอะกาโรส 1 กรัม เติมบัฟเฟอร์สำหรับทำอิเล็คโทรฟอเรซิส (1x TAE และ1x TBE) 100 ไมโครลิตร
3. หลอมอะกาโรสโดยการอุ่นให้ร้อนด้วยเตาไมโครเวฟ เขย่าเป็นครั้งคราว ให้อะกาโรสละลายจนหมด
4. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลง แล้วจึงเทลงในถาดที่เตรียมไว้ ให้เจลหนาครึ่งหนึ่งของถาดรันเจล เสียบหวีลงไปในตำแหน่ง เพื่อทำให้เกิดช่องสำหรับหยอดตัวอย่างดีเอ็นเอและปล่อยให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง
5. เมื่อเจลแข็งตัวแล้วค่อยๆ ดึงหวีออก นำเจลใส่ลงในเครื่องสำหรับทำอิเลคโทรฟอเรซีส เติมบัฟเฟอร์ให้ท่วมเจล
6. ดูดสารละลายดีเอ็นเอประมาณ 2-5 ไมโครลิตร (ตามความเข้มข้นของดีเอ็นเอ) ผสมกับ loading buffer 1 ไมโครลิตร แล้วหยอดลงไปในช่องของแผ่นเจลที่เตรียมไว้
7. ต่อกระแสไฟฟ้าเข้ากับเครื่องอิเล็คโทรฟอเรซิสแล้วเปิดกระแสไฟฟ้า ใช้แรงเคลื่อนไฟฟ้าประมาณ 100 โวลต์ เป็นเวลานาน 30 นาที
8. นำเจลมาย้อมด้วยสารเรืองแสง (เอธิเดียมโบรไมด์) ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 15 ไมโครลิตร เป็นเวลา 10-15 นาที ขั้นนี้ระวังอย่าให้สารสัมผัสกับผิวหนังหรือส่วนของร่างกาย ควรสวมถุงมือ เนื่องจากเอธิเดียมโบรไมด์เป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen)
9. นำเจลมาล้างเอธิเดียมโบรไมด์ออกด้วยน้ำเปล่า
10. นำเจลที่ล้างเอธิเดียมโบรไมด์แล้วไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต
11. ถ่ายภาพเก็บไว้ด้วยกล้องดิจิตอล

การนำดีเอ็นเอเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์

1. เติมสารละลายดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร ลงในหลอดเซ็นตริฟิวจ์ที่มีคอมพีเทนต์เซลล์ 60 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลานาน 15 นาที
2. นำมาทำ heat shock โดยจุ่มลงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที แล้วย้ายมาแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที
3. เติมอาหาร SOC ลงไป 800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง เขย่าทุกๆ 15 นาที
4. ดูดอาหารเลี้ยงแบคทีเรียในข้อ 3 มาเกลี่ย (spread) ให้ทั่วผิวหน้าอาหาร LM ที่มีแอมพิซิลิน 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและแมกนีเซียมซัลเฟต (1M $MgSO_4$) ผสมอยู่โดยดูดอาหารในข้อ 3 มาใส่ในจานอาหาร LM ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วใช้แท่งแก้วปลายงอ (glass spreader) เกลี่ยแบคทีเรียให้กระจายทั่วจานอาหารเพาะเลี้ยง
5. นำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มในตู้ incubate อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง ตรวจดูโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร LM

การตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยลิเธียมคลอไรด์ (LiCl)

1. เติมสารละลายลิเธียมคลอไรด์เข้มข้น 3 โมลต่อลิตร ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงในหลอดที่มีดีเอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตร และเติมแอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรของสารละลายอาร์เอ็นเอ
2. ผสมให้เข้ากันโดยเคาะหลอดเบาๆ ถ้าปริมาตรไม่มากพอใช้วิธีการกลับหลอดไปมา แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือตู้ –20 ข้ามคืน
3. นำไปปั่นเหวี่ยงในเครื่อง microcentrifuge ที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 10 นาที จะเห็นตะกอนสีขาวที่ก้นหลอด แต่ถ้าปริมาณดีเอ็นเอน้อยมาก (< 2 ไมโครกรัม) อาจจะมองไม่เห็นตะกอน
4. ใช้ปิเปตต์ดูดเอธานอบทิ้ง ระวังอย่าให้ไปโดนตะกอนหรือบริเวณที่น่าจะเป็นตะกอนดีเอ็นเอ
5. เติมเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เคาะหลอดเพื่อละลายเกลือที่ติดอยู่ที่ตะกอนอาร์เอ็นเอออกมา
6. นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งหนึ่งเป็นเวลา 5 นาที ดูดแอลกอฮอล์ออก
7. ทำให้ตะกอนแห้งโดยใช้ lyophilizer หรือ vacuum desiccator นาน 10 นาที

8. ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอใน DEPC water ปริมาตร 30 ไมโครลิตร
9. นำอาร์เอ็นเอส่วนหนึ่งไปตรวจเช็คด้วย gel electrophoresis และส่วนที่เหลือเก็บไว้ในตู้เย็น –20 องศาเซลเซียส เพื่อทำ RT-PCR ต่อไป

ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเห็ดยานางิ

1.การเพาะหัวเชื้อ

นำชิ้นส่วนของเห็ดยานางิมาเลี้ยงในอาหารพี ดี เอ เส้นใยมีสีขาว และเจริญเติบโตเต็มจานแก้วเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ในเวลาประมาณ 8-9 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในบริเวณที่มีแสงหรือไม่มีแสงก็ได้ จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อในอาหารที่มีเส้นใยเจริญเต็มจานแล้วลงในขวดแม่โขงแบนที่บรรจุเมล็ดข้าวฟ่างที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาณ 100 กรัมต่อขวด ปิดจุกฝาขวดแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสความชื้นสัมพัทธ์ 80-90 เปอร์เซ็นต์ ในที่ที่มีแสงหรือไม่มีแสงก็ได้

2. การเพาะเห็ด

เห็ดยานางิเริ่มจากการทำถุงก้อนเชื้อ ซึ่งจะใช้ขี้เลื่อยยางพาราและอาหารเสริมต่าง ๆ ในอัตราส่วน ขี้เลื่อยยางพารา 100 กิโลกรัม รำละเอียด 6-8 กิโลกรัม ปูนโดโลไมค์ 2 กิโลกรัม ปูนยิบซั่ม 1 กิโลกรัม ดีเกลือ 0.5 กิโลกรัม ภูไมค์ 2 กิโลกรัม ปุ๋ยดับเบิ้ลซูเปอร์ฟอสเฟส 0.2 กิโลกรัม แป้งข้าวเหนียว 1 กิโลกรัม ชาเขียวหรือกระถินป่น 1 กิโลกรัม ส่าเหล้า 0.5 กิโลกรัม และน้ำ 60 กิโลกรัม จากนั้นนำมาผสมเข้าด้วยกัน เริ่มด้วยการนำขี้เลื้อยไม้ยางพารามาผสมกับส่วนต่าง ๆ โดยพยายามคลุกเคล้าส่วนต่าง ๆ ให้เข้ากันจนเนียนเป็นเนื้อเดียวกันแล้วจึงเติมน้ำลงไป จนกระทั่งมีความชื้นพอดี การทดสอบโดยนำขี้เลื่อยมากำและบีบ ถ้าพบว่ามีน้ำไหลออกตามง่ามมือแสดงว่าวัสดุมีความชื้นมากเกินไปให้นำขี้เลื่อยแห้งมาคลุกเพิ่ม แต่ถ้าขณะที่กำและบีบไม่มีน้ำไหลออกตามง่ามมือ พอแบมือออกขี้เลื่อยไม่จับกันเป็นก้อนหรือแตกออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ แสดงว่าในวัสดุเพาะมีความชื้นไม่เพียงพอต้องเพิ่มน้ำเข้าไปอีกเหมาะสม เมื่อส่วนผสมต่าง ๆ และปรับความชื้นให้เหมาะสมแล้วก็นำส่วนผสมขี้เลื่อยบรรจุลงในถุงพลาสติกทนความร้อนประมาณ 3 ใน 4 ส่วนของความสูงถุงแล้วทุบอัดให้แน่นพอประมาณ จากนั้นให้สวมคอขวดและอุดจุกสำลี จากนั้นนำถุงก้อนเชื้อที่บรรจุขี้เลื่อยเรียบร้อยแล้วไปนึ่งฆ่าเชื้อปนเปื้อนให้ได้ถึง 100 องศาเซลเซียสและสามารถ

ทนความร้อนได้นาน 3 ชั่วโมง หลังจากนึ่งก้อนเชื้อแล้วให้นำก้อนเชื้อลงจากหม้อนึ่งนำไปพักไว้ในห้องต่อเชื้อ ซึ่งห้องดังกล่าวควรมีลักษณะมิดชิด ไม่มีกระแสลมแรงและที่สำคัญต้องสะอาดปราศจากแมลงและเชื้อโรคศัตรูเห็ดต่างๆ ไป จากนั้นให้นำหัวเชื้อบริสุทธิ์ถ่ายเชื้อลงในปากถุงอาหารที่นึ่งเสร็จโดยเร็ว ใส่หัวเชื้อลงไปประมาณ 15-20 เมล็ด แล้วปิดปากถุงตามเดิม หลังจากใส่หัวเชื้อเห็ดโคนแล้วนำไปบ่มในห้องบ่มเชื้อหรือโรงเรือนสำหรับเปิดดอกเลย ในระยะที่บ่มเชื้อนั้นไม่มีการรดน้ำ ไม่ต้องการแสง ดังนั้น ภายในโรงบ่มมีเพียงแสงสลัว ไม่โดนแสงแดดโดยตรง ไม่โดนน้ำฝน ไม่อับชื้น เพราะหากแสงมากเกินไปเส้นใยเห็ดจะเจริญช้า และอุณหภูมิต้องอยู่ระหว่าง 24-30 องศาเซลเซียส โดยในการบ่มจะใช้ระยะเวลาประมาณ 50 วันเมื่อเส้นใยเห็ดเดินเต็มถุงดีแล้วให้สังเกตเส้นใยเห็ดจะรัดตัวและมีการสะสมอาหารให้ทำการย้ายก้อนเห็ดไปไว้ในโรงเรือนเปิดดอกทันที พร้อมกับเปิดปากถุง และเร่งการออกดอก

3. **การเปิดดอก**

เริ่มแรกให้ถอดจุกสำลีและคอขวดออก จากนั้นรดน้ำเข้าหน้าก้อนให้ชุ่มวันละ 3 ครั้ง พร้อมทั้งควบคุมความชื้นในโรงเรือนให้ได้ 80 เปอร์เซ็นต์ ใช้เวลาประมาณ 3-5 วันเพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างดอกเห็ดและเริ่มเห็นกลุ่มดอกเห็ดขึ้นเป็นจุดสีขาวบริเวณหน้าก้อน เมื่อดอกเห็ดเริ่มขึ้นเป็นหน่อแล้ว ต้องพยายามรักษาความชื้นให้คงที่ 70-80 เปอร์เซ็นต์ โดยการเปิดสปริงเกอร์ประมาณ 5-7 รอบต่อวัน ใช้เวลาประมาณ 5-7 วันก็จะเริ่มเก็บดอกเห็ดได้

ภาคผนวก ค

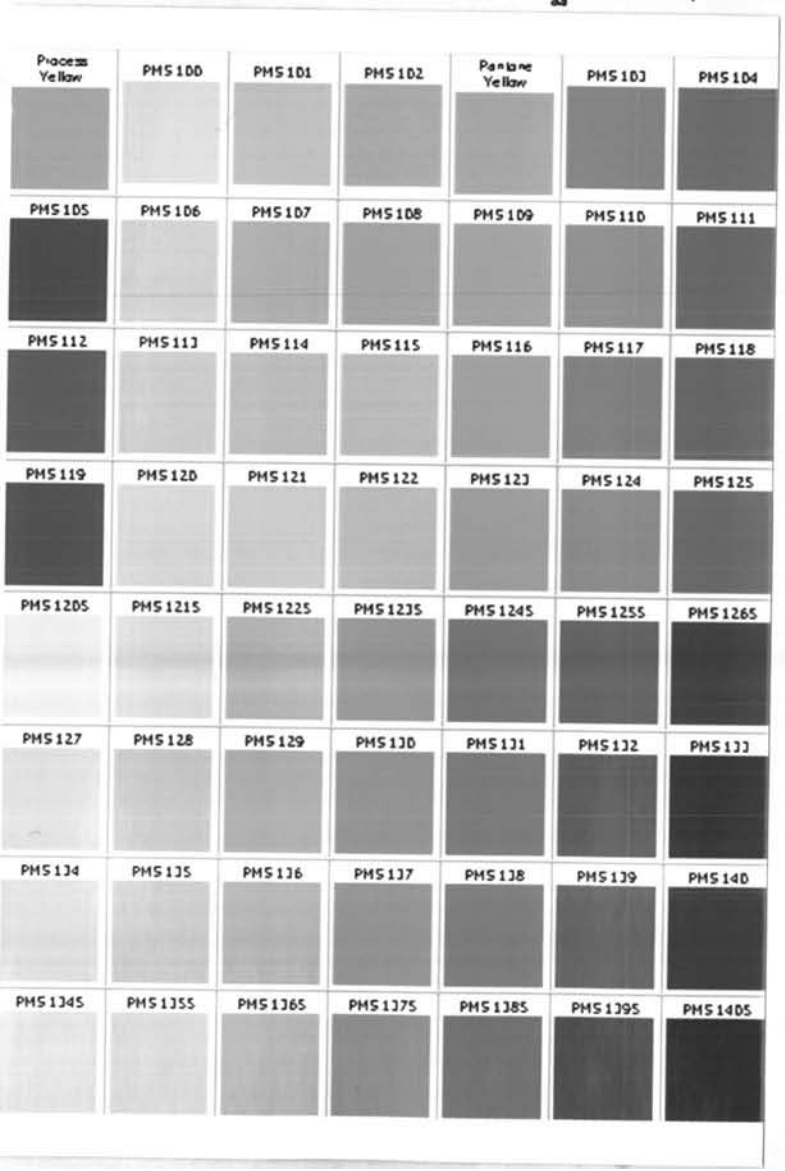
เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนส

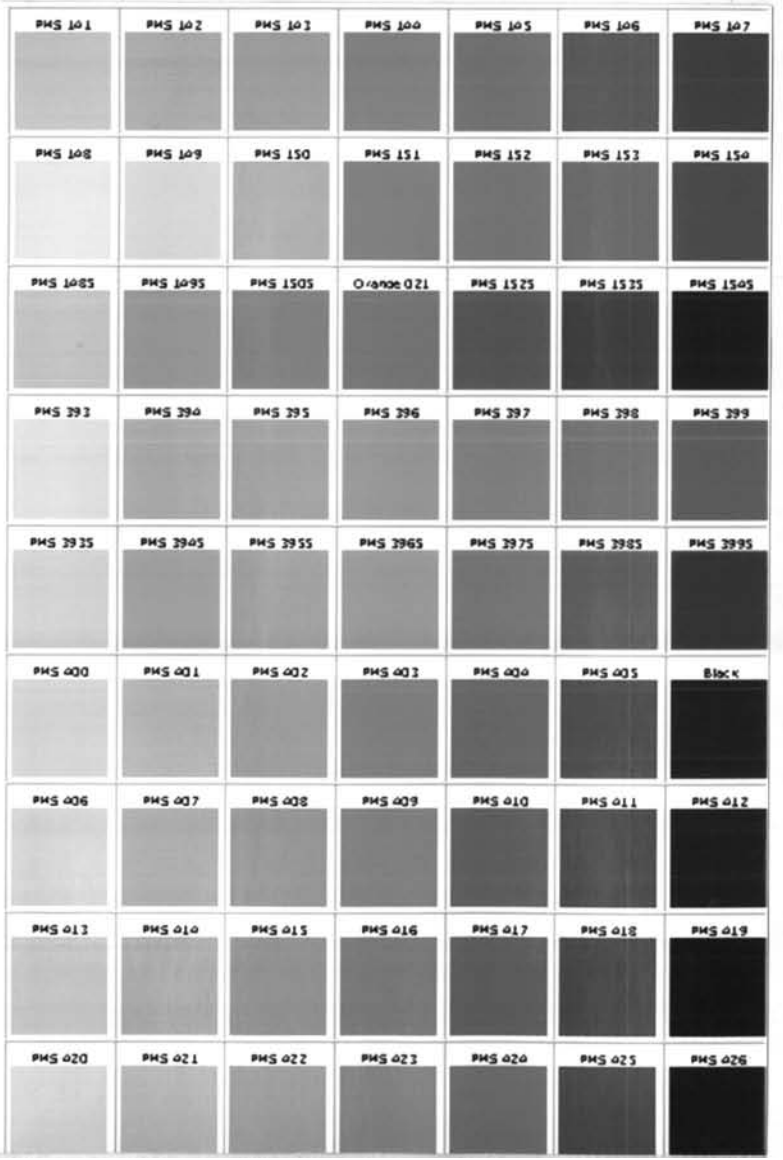
```
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

AJ 223816          ------------------------ATGTCGCTGATTGCTACTGTCGGACCTACTGGCG 34
AW444069           CTCGATGTCTACCCACGCGYCCGAGGATGTCGCTGATTGCTACTGTCGGACCTACTGGCG 60
                                            *********************************

AJ 223816          GAGTCAAGAACCGTCTGAACATCGTTGATTTTGTGAAGAATGAAAAGTTTTTCACGCTTT 94
AW444069           GAGTCAAGAACCGTCTGAACATCGTTGATTTTGTGAAGAATGAAAAGTTTTTCACGCTTT 120
                   ************************************************************

AJ 223816          ATGTACGCTCCCTCGAACTTCTACAAGCCAAGGAACAGCATGACTACTCGTCTTTCTTCC 154
AW444069           ATGTACGCTCCCTCGAACTTCTACAAGCCAAGGAACAGCATGACTACTCGTCTTTCTTCC 180
                   ************************************************************

AJ 223816          AACTAGCCGGCATTCATGGTCTACCCTTTACTGAGTGGGCCAAAGAGCGACCTTCCATGA 214
AW444069           AACTAGCCGGCATTCATGGTCTACCCTTTACTGAGTGGGCCAAAGAGCGACCTTCCATGA 240
                   ************************************************************

AJ 223816          ACCTATACAAGGCTGGTTATTGTACCCATGGGCAGGTTCTGTTCCCGACTTGGCATAGAA 274
AW444069           ACCTATACAAGGCTGGTTATTGTACCCATGGGCAGGTTCTGTTCCCGACTTGGCATAGAA 300
                   ************************************************************

AJ 223816          CGTACCTTTCTGTGTTGGAGCAAATACTTCAAGGAGCTGCCATCGAAGTTGCTAAGAAGT 334
AW444069           CGTACCTTTCTGTGTTGGAGCAAATACTTCAAGGAGCTGCCATCGAAGTTGCTAAGAAGT 360
                   ************************************************************

AJ 223816          TCACTTCTAATCAAACCGATTGGGTCCAGGCGGCGCAGGATTTACGCCAGCCCTACTGGG 394
AW444069           TCACTTCTAATCAAACCGATTGGGTCCAGGCGGCGCAGGATTTACGCCAGCCCTACTGGG 420
                   ************************************************************

AJ 223816          ATTGGGGTTTCGAACTTATGCCTCCTGATGAGGTTATCAAGAACGAAGAGGTCAACATTA 454
AW444069           ATTGGGGTTTCGAACTTATGCCTCCTGATGAGGTTATCAAGAACGAAGAGGTCAACATTA 480
                   ************************************************************

AJ 223816          CGAACTACGATGGAAAGAAGATTTCCGTCAAGAACCCTATCCTCCGCTATCACTTCCATC 514
AW444069           CGAACTACGATGGAAAGAAGATTTCCGTCAAGAACCCTATCCTCCGCTATCACTTCCATC 540
                   ************************************************************

AJ 223816          CGATCGATCCTTCTTTCAAGCCATACGGGGACTTTGCAACCTGGCGAACAACAGTCCGAA 574
AW444069           CGATCGATCCTTCTTTCAAG---------------------------------------- 560
                   ********************

AJ 223816          ACCCCGATCGTAATAGGCGAGAGGATATCCCTGGTCTAATCAAAAAAATGAGACTTGAGG 634
AW444069           ------------------------------------------------------------

AJ 223816          AAGGTCAGATTCGTGAGAAGACCTACAATATGTTGAAGTTCAACGATGCTTGGGAGAGAT 694
AW444069           ------------------------------------------------------------

AJ 223816          TCAGTAACCACGGCATATCTGATGATCAGCATGCTAACAGCTTGGAGTCTGTTCACGATG 754
AW444069           ------------------------------------------------------------

AJ 223816          ACATTCATGTTATGGTTGGATACGGCAAAATCGAAGGACATATGGACCACCCTTTCTTTG 814
AW444069           ------------------------------------------------------------

AJ 223816          CTGCCTTCGACCCGATTTTCTGGTTACATCATACCAACGTCGACCGTCTACTATCCCTTT 874
AW444069           ------------------------------------------------------------

AJ 223816          GGAAAGCAATCAACCCCGATGTGTGGGTTACGTCGGGACGTAACCGGGATGGTACCATGG 934
AW444069           ------------------------------------------------------------
```

```
AJ 223816   GCATCGCAGCCAACGCTCAGATCAACAGCGAGACCCCTCTTGAGCCATTCTACCAATCTG 994
AW444069    ------------------------------------------------------------

AJ 223816   GGGATAAAGTGTGGACCTCGGCCTCTCTCGCTGATACTGCTCGGCTCGGCTACTCCTACC 1054
AW444069    ------------------------------------------------------------

AJ 223816   CCGATTTCGACAAGTTGGTTGGAGGAACAAAGGAGTTGATTCGCGACGCTATCGACGACC 1114
AW444069    ------------------------------------------------------------

AJ 223816   TCATCGATGAGCGGTATGGAAGCAAACCTTCGAGTGGGGCTCGCAATACTGCCTTTGATC 1174
AW444069    ------------------------------------------------------------

AJ 223816   TCCTCGCCGATTTCAAGGGCATTACCAAAGAGCACAAGGAGGATCTCAAAATGTACGACT 1234
AW444069    ------------------------------------------------------------

AJ 223816   GGACCATCCATGTTGCCTTCAAGAAGTTCGAGTTGAAAGAGAGTTTCAGTCTTCTCTTCT 1294
AW444069    ------------------------------------------------------------

AJ 223816   ACTTTGCGAGTGATGGTGGCGATTATGATCAGGAGAATTGCTTTGTTGGATCAATTAACG 1354
AW444069    ------------------------------------------------------------

AJ 223816   CCTTCCGTGGGACTGCTCCCGAAACTTGCGCGAACTGCCAAGATAACGAGAACTTGATTC 1414
AW444069    ------------------------------------------------------------

AJ 223816   AAGAAGGCTTTATTCACTTGAATCATTATCTTGCTCGTGACCTTGAATCTTTCGAGCCGC 1474
AW444069    ------------------------------------------------------------

AJ 223816   AGGACGTGCACAAGTTCTTAAAGGAAAAAGGACTGTCATACAAACTCTACAGCAGGGGAG 1534
AW444069    ------------------------------------------------------------

AJ 223816   ATAAACCTTTGACATCGTTGTCAGTTAAGATTGAAGGACGTCCCCTTCATCTACCGCCCG 1594
AW444069    ------------------------------------------------------------

AJ 223816   GAGAGCATCGTCCGAAGTACGATCACACTCAGGCCCGAGTAGTGTTTGATGATGTCGCGG 1654
AW444069    ------------------------------------------------------------

AJ 223816   TGCATGTTATTAACTGA 1671
AW444069    ----------------
```

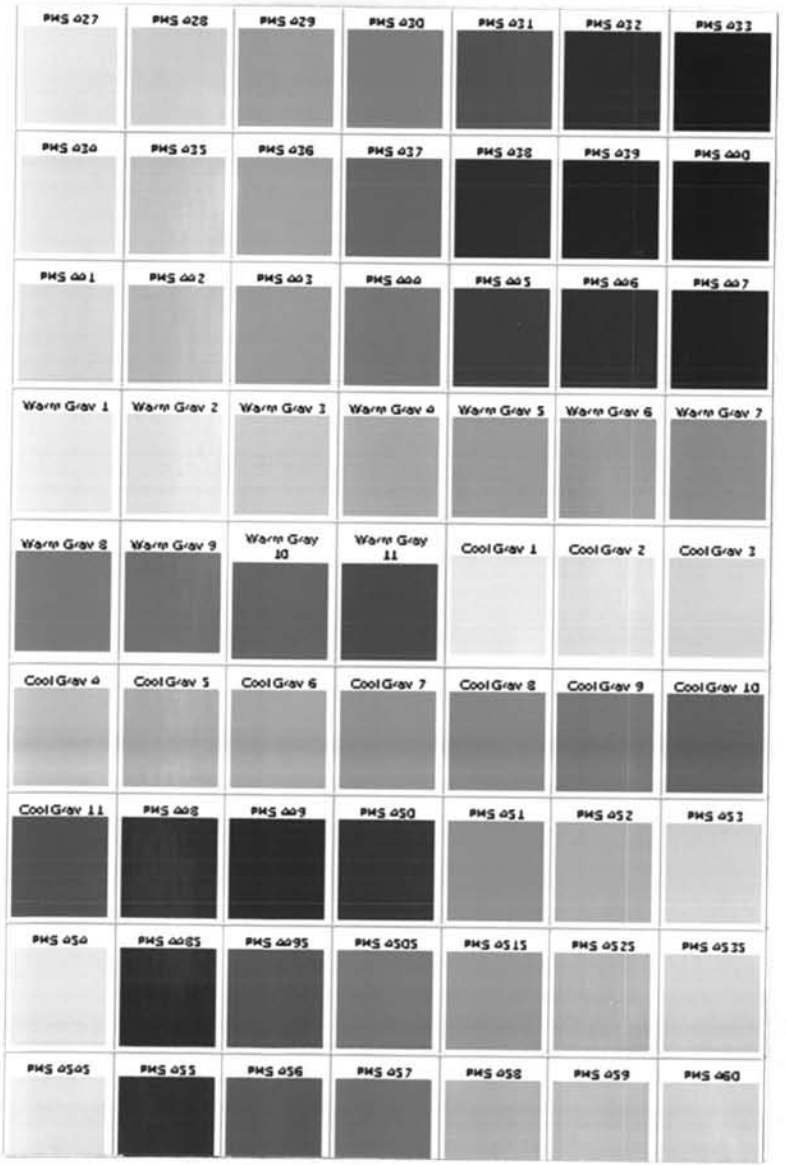
ภาคผนวก ง

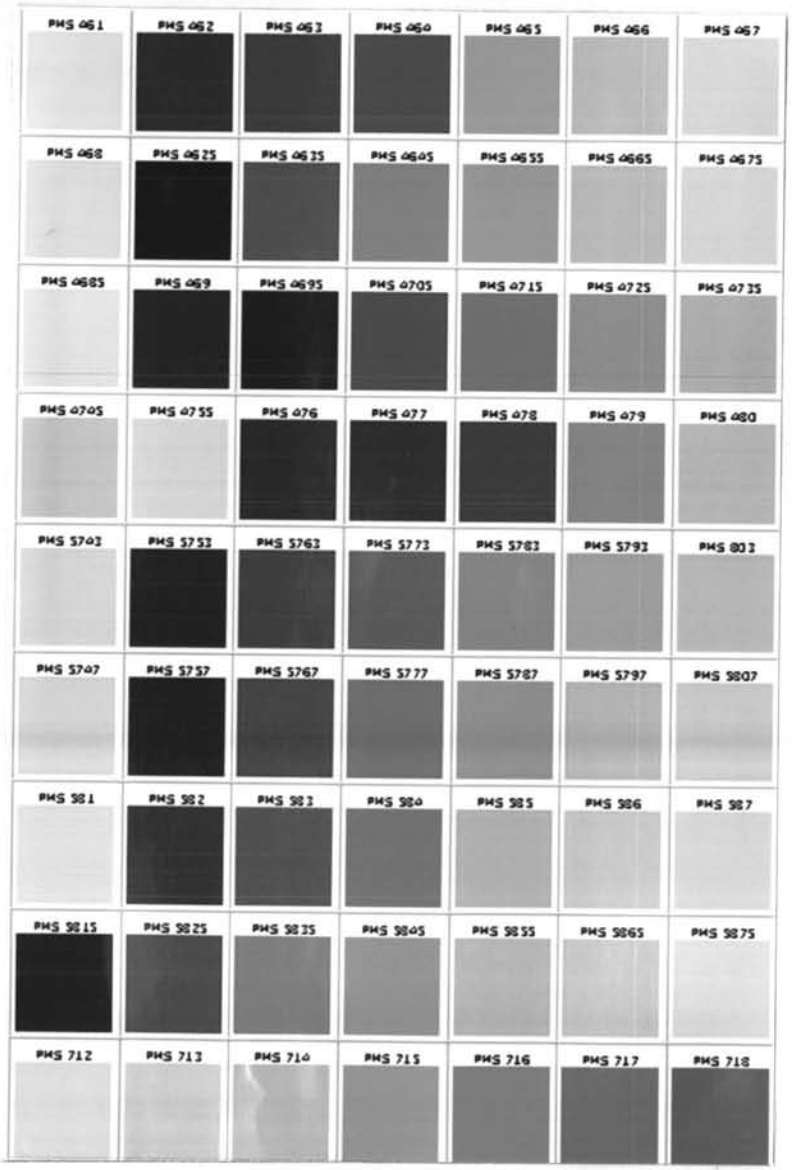
ตารางค่าสีมาตรฐาน PMS (Pantone maching system color chart)



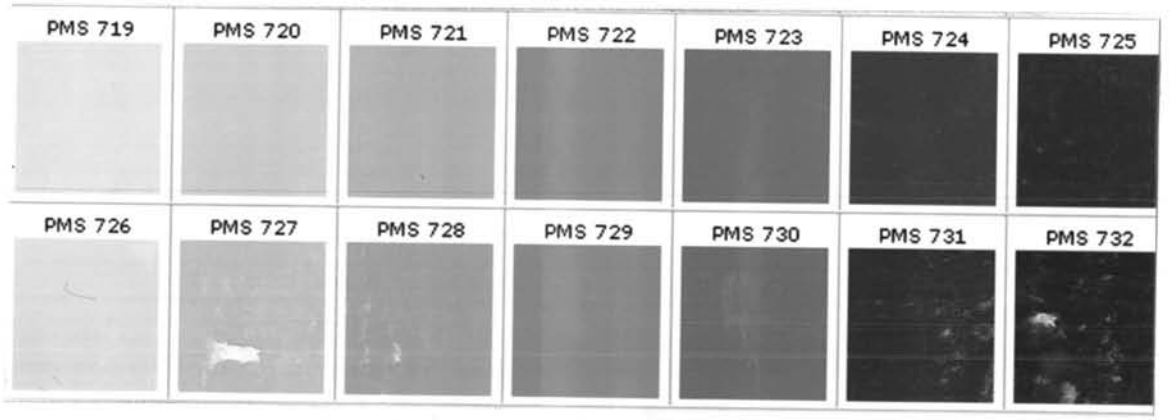


ตารางค่าสีมาตรฐาน PMS (Pantone maching system color chart)



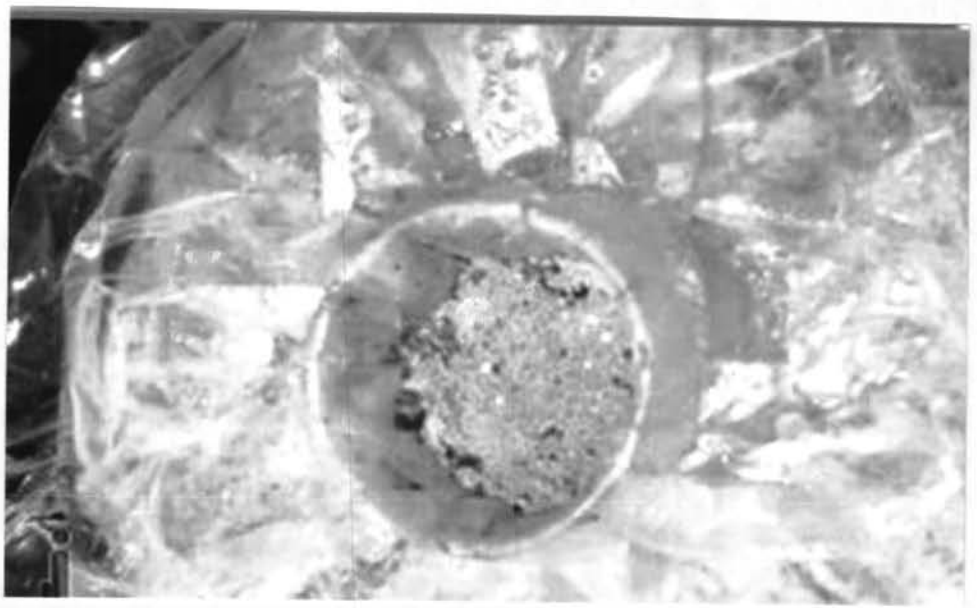


ตารางค่าสีมาตรฐาน PMS (Pantone maching system color chart)



ภาคผนวก จ

ตัวอย่างรูปเห็ดยานางิ

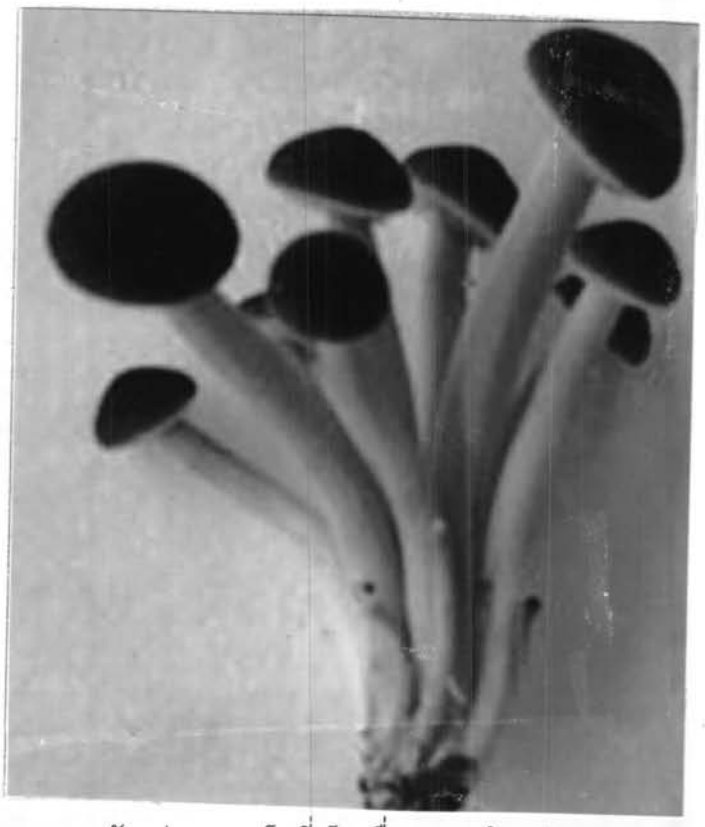


ลักษณะเห็ดยานางิระยะตุ่ม

ดอกเห็ดที่เจริญเติบได้ประมาณ 2 วันตั้งแต่เกิดตุ่ม

ตัวอย่างรูปเห็ดยานางิ

ดอกเห็ดที่เจริญได้ประมาณ 3 วัน



ตัวอย่างดอกเห็ดที่เก็บเพื่อรอการจำหน่าย

ตัวอย่างรูปเห็ดยานางิ

ดอกเห็ดยานางิที่พร้อมจะบรรจุหีบ

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวมัลลิกา แก้วดี เกิดวันที่ 20 พฤษภาคม พ.ศ. 2523 สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพืชศาสตร์-พืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสานวิทยาเขตสุรินทร์ เกียรตินิยมอันดับ 1 ปี พ.ศ.2545 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย