



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง พันธุศาสตร์โมเลกุลและการวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์ของเห็ดกระดุม
Agaricus bitorquis KPS1

Molecular Genetics and Proteomic Analysis of Button Mushroom,
Agaricus bitorquis KPS1

นามผู้วิจัย นางสาวสุธิดา ไตรบุตร

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์มาลี ศรีสัตตสุข, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชวลิต องประยูร, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์กรรณิการ์ สัจจาพันธ์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครชนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สิขสิขงิ มตวทยสยเกษตรศำสร

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

พันธุศาสตร์โมเลกุลและการวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์ของเห็ดกระดุม
Agaricus bitorquis KPS1

Molecular Genetics and Proteomic Analysis of Button Mushroom,
Agaricus bitorquis KPS1

โดย

นางสาวสุธิดา ไตรบุตร

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุธิดา ไตรบุตร์ 2553: พันธุศาสตร์โมเลกุลและการวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์ของเห็ด
กระดุม *Agaricus bitorquis* KPS1 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ
เกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา
ประธานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์มาลี ศรีสตุสุข, Ph.D. 78 หน้า

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดกระดุมเขตร้อนที่พบบริเวณ
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน (KPS1) ร่วมกับการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอ
ไทด์บริเวณ ITS ของ rDNA พบว่าเห็ดที่ศึกษานี้ คือ เห็ดกระดุมเขตร้อน *Agaricus bitorquis* และ
จากการโคลนยีน *hypA* พบว่ามีขนาด 646 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วย coding sequence จำนวน
4 exon แปลรหัสได้โปรตีนที่ประกอบด้วย 114 กรดอะมิโน และพบบริเวณอนุรักษ์ที่เป็นกรด
อะมิโน cysteine จำนวน 8 เรซิดิวส์ จากการศึกษาลำดับทั้งหมดที่พบในส่วนของคนกเห็ดในเห็ด
กระดุม *A. bitorquis* เปรียบเทียบกับ *A. bisporus* ด้วยเทคนิค 2D-PAGE โดยใช้ช่วง
pH 3-10 พบโปรตีนทั้งหมดในเห็ด *A. bitorquis* และ *A. bisporus* เท่ากับ 590 และ 651 ชนิด โดย
มีค่า pI อยู่ในช่วง 4.5-7.5 และ 4.4-8.7 ตามลำดับ ซึ่งโปรตีนทั้งหมดที่พบในเห็ดทั้ง 2 ชนิด
มีความเหมือนกัน 43.32 เปอร์เซ็นต์

ลายมือชื่อนิติ

ลายมือชื่อประธานกรรมการ

Suthida Traibut 2010: Molecular Genetics and Proteomic Analysis of Button Mushroom, *Agaricus bitorquis* KPS1. Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Assistant Professor Malee Srisodsuk, Ph.D. 78 pages.

Morphological and molecular characterization of internal transcribed spacer (ITS) of rDNA sequences in tropical button mushroom isolated from Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus was found to be *Agaricus bitorquis*. From *hypA* gene cloning in *A. bitorquis*, it was found to have 646 nucleotides, consisted of 4 coding sequences and translated to 114 amino acid with 8 conserved cysteine residues. Total protein found in fruiting body of tropical (*A. bitorquis*) and temperate (*A. bisporus*) button mushrooms were analysed and compared by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE). The results showed that 590 and 651 proteins, with pI 4.5-7.5 and pI 4.4-8.7, were found in *A. bitorquis* and *A. bisporus*, respectively. The total proteins showed 43.32% similarity among the two mushrooms.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.มาลี ศรีเสตสุข ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้ช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนการให้คำปรึกษาแนะนำและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.ชวลิต ฮงประยูร กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก และ ผศ.ดร.กรรณิการ์ สัจจาพันธ์ กรรมการที่ปรึกษาวิชาการ ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำรวมทั้งช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.ประภาพร ตั้งกิจโชติ ที่ได้กรุณาเป็นผู้แทนจากบัณฑิตวิทยาลัย ช่วยให้คำแนะนำและแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และผู้ร่วมงานทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือชี้แนะและเป็นกำลังใจทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

สุธิดา ไตรบุตร
เมษายน 2553

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญภาพ	(2)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	26
อุปกรณ์	26
วิธีการ	27
ผลและวิจารณ์	39
สรุป	61
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	62
ภาคผนวก	72
ประวัติการศึกษา	78

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างและวงจรชีวิตของเห็ด	5
2	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดกระดุม	6
3	เห็ดกระดุม <i>Agaricus arvensis</i> Schaeff. ex Fr.	7
4	เห็ดกระดุม <i>Agaricus bisporus</i> (Lange) Imbach.	8
5	เห็ดกระดุม <i>Agaricus bitorquis</i> (Quél.) Sacc.	9
6	เห็ดกระดุม <i>Agaricus campestris</i> L. ex Fr.	10
7	เห็ดกระดุม <i>Agaricus silvaticus</i> Schaeff. ex Secr.	11
8	เห็ดกระดุมทองเหลือง <i>Agaricus trisulphuratus</i> Berk.	12
9	โครงสร้างสามมิติของโปรตีน hydrophobin แถบลูกศรสีแดง คือ โครงสร้าง β -sheet และเส้นสีเหลือง คือการเกิดพันธะ disulfide ของกรดอะมิโนซิสเทอีน	15
10	เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน hydrophobin ใน class I และ class II	15
11	primary structure ของไฮโดรโฟบิน class I และ class II (A) และการสร้างพันธะ disulfide ของไฮโดรโฟบิน class I และ class II (B)	17
12	แบบจำลองบทบาทของไฮโดรโฟบินในการสร้าง aerial structure ของรา	19
13	บริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) ใน ribosomal DNA	21
14	การศึกษาโปรตีโอมิกส์ในแต่ละประเภท	22
15	pGEM [®] -T Easy vector แสดง promoter และ multiple cloning sequence	32
16	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดกระดุมเขตร้อน KPS1 ซึ่งพบภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม	39
17	ลักษณะสปอร์ของเห็ดกระดุมเขตร้อน KPS1 ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์	40
18	แถบดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของ rDNA ของเห็ดกระดุมเขตร้อน KPS (1) โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder plus (M)	41
19	ลำดับนิวคลีโอไทด์จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ของ rDNA ของเห็ดกระดุมเขตร้อน KPS1 โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4	42

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
20	เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ rDNA ของเห็ดกระดุมเขตร้อน KPS1 กับเห็ดกระดุม <i>A. bitorquis</i> ซึ่งมีความเหมือนกัน 98%	43
21	เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ rDNA ของเห็ดกระดุมเขตร้อน KPS1 กับเห็ดกระดุม <i>A. bisporus</i> ซึ่งมีความเหมือนกัน 95%	44
22	Phylogenetic tree โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ rDNA ของเห็ดกระดุมเขตร้อน KPS1 เปรียบเทียบกับเห็ดสกุล <i>Agaricus</i> ต่างๆ	45
23	แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 คู่เบส ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน <i>hypA</i> ของเห็ดกระดุม <i>A. bitorquis</i> KPS1 (1) โดยใช้ไพรเมอร์ <i>hypAF</i> และ <i>hypAR</i> เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder plus (M)	46
24	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>hypA</i> ของเห็ดกระดุม <i>A. bitorquis</i> KPS1 โดยใช้ไพรเมอร์ <i>hypAF</i> และ <i>hypAR</i> แถบสีเหลือง คือ start codon (ATG) แถบสีฟ้า คือ coding sequence แถบสีแดง คือ stop codon (TAG) อักษรตัวพิมพ์เล็ก คือ intron	47
25	เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>hypA</i> ของเห็ดกระดุม <i>A. bitorquis</i> KPS1 และเห็ดกระดุม <i>A. bisporus</i> แถบสีฟ้า คือ start codon (ATG) แถบสีแดง คือ stop codon (TAG)	48
26	coding sequence ของยีน <i>hypA</i> ของเห็ดกระดุม <i>A. bitorquis</i> (KPS1) วิเคราะห์โดยโปรแกรม FGESH	51
27	ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>hypA</i> ของเห็ดกระดุม <i>A. bitorquis</i> KPS1 โดยโปรแกรม FGESH	51
28	เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>hypA</i> ของเห็ดกระดุม <i>A. bitorquis</i> KPS1 กับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน hydrophobin ที่สร้างจากยีน <i>hypA</i> ของเห็ดกระดุม <i>A. bisporus</i> แถบสีฟ้า คือกรดอะมิโน cysteine อนุรักษ์ 8 เรซิดิวส์	52

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
29	โครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ของโปรตีน hydrophobin (HYPA) จากเห็ดกระดุมเขตร้อน <i>A. bitorquis</i> KPS1	52
30	โครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ของโปรตีน hydrophobin (HYPA) จากเห็ดกระดุม <i>A. bisporus</i>	52
31	โครงสร้างสามมิติ (3D structure) ของโปรตีน hydrophobin (HYPA) จากเห็ดกระดุมเขตร้อน <i>A. bitorquis</i> KPS1	53
32	โครงสร้างสามมิติ (3D structure) ของโปรตีน hydrophobin (HYPA) จากเห็ดเห็ดกระดุม <i>A. bisporus</i>	53
33	SDS-PAGE ของโปรตีนจากส่วนดอก (1) และเส้นใย (2) ของเห็ดกระดุม <i>A. bitorquis</i> KPS1 เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (M)	55
34	2D-PAGE ของโปรตีนทั้งหมดของเห็ดกระดุม <i>A. bitorquis</i> KPS1 ตำแหน่งลูกศรสีแดง คือโปรตีนหลักที่พบในเห็ดกระดุม <i>A. bitorquis</i> KPS1 ตำแหน่งลูกศรสีเหลือง คือโปรตีนขนาดประมาณ 38 กิโลดาลตัน	58
35	2D-PAGE ของโปรตีนทั้งหมดของเห็ดกระดุม <i>A. bisporus</i> ตำแหน่งลูกศรสีเขียว คือโปรตีนหลักที่พบในเห็ดกระดุม <i>A. bisporus</i> ตำแหน่งลูกศรสีเหลือง คือโปรตีนขนาดประมาณ 38 กิโลดาลตัน	59
36	2D-PAGE ของโปรตีนทั้งหมดของเห็ดกระดุม <i>A. bitorquis</i> KPS1 และเห็ดกระดุม <i>A. bisporus</i> ตำแหน่งลูกศรสีแดง คือโปรตีนที่พบเฉพาะในเห็ดกระดุม <i>A. bitorquis</i> KPS1 ตำแหน่งลูกศรสีดำ คือโปรตีนที่พบในเห็ดทั้ง 2 ชนิด	60

พันธุศาสตร์โมเลกุลและการวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์ของเห็ดกระดุม

Agaricus bitorquis KPS1

Molecular Genetics and Proteomic Analysis of Button Mushroom,

Agaricus bitorquis KPS1

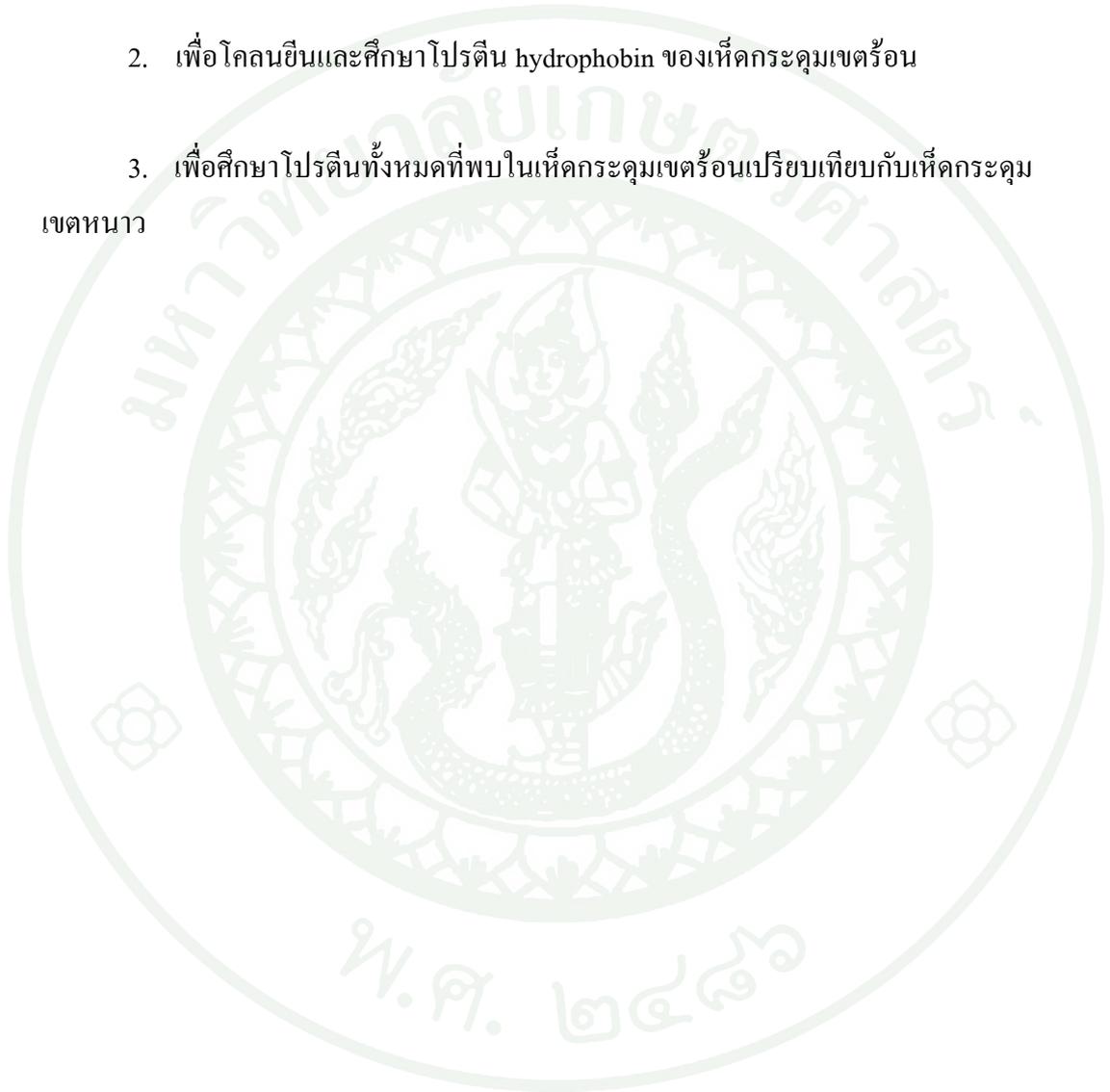
คำนำ

เห็ด (Mushroom) เป็นสิ่งมีชีวิตประเภทรา มีเส้นใยรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนเกิดเป็นดอก เห็ดอยู่เหนือพื้นดินหรือสิ่งที่อาศัยอยู่ เห็ดจึงจัดเป็นราที่มีวิวัฒนาการสูงกว่าราอื่นๆ ซึ่งปัจจุบันประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงเห็ดอย่างแพร่หลายและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเห็ดที่นิยมรับประทานมีอยู่หลายชนิด เช่น เห็ดกระดุมหรือเห็ดแชมปิญอง เห็ดฟาง เห็ดเข็มทอง เห็ดหอม เห็ดนางรม เห็ดหูหนู และเห็ดหลินจือ ฯลฯ ซึ่งมีทั้งแบบสด บรรจุกระป๋อง หรือแม้แต่เห็ดตากแห้ง ความนิยมในการรับประทานเห็ดมีมากขึ้นเรื่อยๆ ด้วยรูปแบบและรสชาติเฉพาะตัว รวมทั้งการที่คนหันมานิยมรับประทานอาหารแบบมังสวิรัตกันมากขึ้นทำให้เห็ดถูกนำมาใช้ปรุงอาหารแทนเนื้อสัตว์มากขึ้นตามไปด้วย

เห็ดกระดุม (*Agaricus bisporus*) หรือเห็ดแชมปิญองเป็นเห็ดสกุล *Agaricus* ที่มีการเพาะเป็นการค้าในประเทศเขตนานามากที่สุดชนิดหนึ่ง สำหรับประเทศไทยซึ่งเป็นประเทศเขตร้อนสามารถพบเห็ดกระดุมสกุล *Agaricus* ได้ในช่วงต้นฤดูฝนแต่เป็นคนละสปีชีส์กับเห็ดกระดุม *Agaricus bisporus* ที่เพาะเลี้ยงเป็นการค้าในประเทศเขตนานาได้แก่ เห็ดกระดุม *Agaricus bitorquis*, *Agaricus arvensis* (เห็ดชานหมากวงแหวน 1 ชั้นหรือเห็ดจี่ม้า), *Agaricus silvaticus* (เห็ดกระดุมป่าสน) และ *Agaricus campestris* ซึ่งเป็นเห็ดกินได้ และเนื่องจากเห็ดกระดุมเป็นเห็ดที่มีรสชาติดี มีผู้นิยมบริโภคและมีราคาสูง ดังนั้นจึงน่าสนใจที่จะศึกษาเห็ดกระดุมเขตร้อนและเขตนานา รวมทั้งพันธุศาสตร์โมเลกุลของเห็ดกระดุมเขตร้อนเปรียบเทียบกับเห็ดกระดุมเขตนานา เพื่อเป็นข้อมูลในการปรับปรุงสายพันธุ์ของเห็ดกระดุมเขตนานาให้สามารถเจริญได้ในเขตร้อนหรือสามารถพัฒนาการเพาะเห็ดกระดุมเขตร้อนในเชิงพาณิชย์ได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีการจำแนกชนิดของเห็ดกระดุม โดยใช้ลำดับเบสบริเวณ ITS ของ rDNA
2. เพื่อโคลนยีนและศึกษาโปรตีน hydrophobin ของเห็ดกระดุมเขตร้อน
3. เพื่อศึกษาโปรตีนทั้งหมดที่พบในเห็ดกระดุมเขตร้อนเปรียบเทียบกับเห็ดกระดุมเขตหนาว



การตรวจเอกสาร

1. โครงสร้างของเห็ดและวงจรชีวิต

เห็ด (Mushroom) เป็นสิ่งมีชีวิตประเภทที่มีวิวัฒนาการสูงกว่าราชนิดอื่นๆ มีเส้นใยรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนเกิดเป็นดอกเห็ดอยู่เหนือพื้นดินหรือสิ่งที่อาศัยอยู่ โดยเห็ดไม่ได้หมายถึงดอกเห็ดที่มีหมวก มีเนื้อและมีก้านเท่านั้น แต่ยังรวมถึงราอีกหลายชนิดที่มีการรวมตัวของเส้นใยเกิดเป็นดอกเห็ด ซึ่งอาจมีเนื้อนุ่ม แข็ง หรือเหนียว มีหมวกหรือไม่มีหมวกก็ได้ ส่วนใหญ่อยู่ใน subdivision Basidiomycotina ที่สร้างสปอร์บนเบซิดิอิมและ Ascomycotina ที่สร้างสปอร์ในแอสคัส โครงสร้างโดยทั่วไปของเห็ดประกอบด้วย (ราชบัณฑิตยสถาน, 2539)

1.1 หมวกเห็ด (pileus หรือ cap) เป็นส่วนบนของดอกเห็ดที่เจริญเติบโตขึ้นไปในอากาศ โดยเมื่อเห็ดเจริญเติบโตเต็มที่จะกางออกคล้ายร่ม รูปร่างและลักษณะของหมวกอาจแตกต่างกัน เช่น เป็นรูปกรวยลึก รูประฆัง ผิวด้านบนอาจเรียบ ขรุขระ มีเกล็ดหรือมีขน สีหมวกอาจแตกต่างจากส่วนอื่นๆ ของดอกเห็ด

1.2 ครีบ (lamella หรือ gill) เป็นแผ่นบางๆ ที่อยู่ด้านล่างของหมวก เรียงรัศมีออกไปรอบก้าน บางชนิดเชื่อมติดกันบางตอน ครีบมีความหนาบางและการเรียงระยะถี่ห่างแตกต่างกัน จำนวนครีบและความยาวแตกต่างกันในเห็ดแต่ละชนิด เป็นแหล่งกำเนิดสปอร์โดยมีชั้นเยื่อกำเนิดสปอร์อยู่โดยรอบ (เห็ดบางชนิดไม่มีครีบแต่มีรูพรุน (pore) หรือซี่ฟัน (teeth) เป็นแหล่งกำเนิดสปอร์แทนครีบ เห็ดบางชนิดมีสปอร์เกิดอยู่ในเปลือกหุ้มที่เป็นก้อนกลม เช่น เห็ดเผาะ และเห็ดบางชนิดสปอร์เกิดฝังอยู่ในก้อนวุ้น เช่น เห็ดหูหนู เป็นต้น)

1.3 ก้าน (stipe หรือ stalk) มีขนาด รูปร่าง และสีแตกต่างกัน ตอนบนยึดติดกับหมวกหรือยึดติดกับครีบ มีทั้งผิวเรียบ ขรุขระ มีขน หรือมีเกล็ด บางชนิดมีวงแหวนหรือเยื่อบางๆ คล้ายวงแหวนติดรอบก้านตอนบน และเห็ดบางชนิดไม่มีก้าน

1.4 แอนนูลัส (annulus หรือ ring) เป็นวงแหวนหรือม่านที่ยึดก้านดอกและขอบหมวกไว้เมื่อเป็นดอกอ่อน เมื่อหมวกบานเยื่อดังกล่าวจะขาดแยกจากขอบหมวก คงเหลือส่วนที่ยึดติดกับก้าน

เป็นวงแหวน เรียกว่า เชื้อขอบหมวก เมื่อดอกโตเต็มที่แอนนูลัสของเห็ดบางชนิดจะหลุดเป็นปลอก เห็ดหลายชนิดไม่มีแอนนูลัส

1.5 เชื้อหุ้มดอกเห็ด (volva หรือ outer veil) เป็นเชื้อชั้นนอก เมื่อดอกเห็ดเจริญขึ้นตอนบนของเชื้อจะแตกออกเพื่อให้หมวกและก้านยึดตัวสูงขึ้น เชื้อหุ้มคงค้างเป็นรูปถ้วยอยู่ที่โคน แต่บางชนิดเชื้อหุ้มไม่เป็นรูปถ้วยแต่เป็นเกล็ดรอบ โคนก้าน

1.6 เนื้อในเห็ด (context) เป็นเนื้อที่อยู่ใต้ผิวหมวกและเนื้อในก้าน

1.7 เชื้อหุ้มส่วนสร้างสปอร์ (peridium) เป็นเชื้อหุ้มอับสปอร์หรือเชื้อหุ้มดอกเห็ด

1.8 สปอร์ของเห็ดส่วนมากจะมีจำนวนโครโมโซมเพียงชุดเดียว (haploid) อาจเกิดบนฐานหรือก้านรูปกระบอง ได้แก่ เบซิเดียมเป็นเซลล์ที่ทำให้กำเนิดเบซิไดโอสปอร์ รูปร่างมีได้หลากหลายแต่ที่พบบ่อย คือ รูปกระบอง (clavate) ถึงรูปกระบองกว้าง (broadly clavate) ผงัก่อนข้างบาง โดยปกติ 1 เบซิเดียม สร้างก้านชูสปอร์ (sterigma) 4 ก้าน แต่ละก้านให้กำเนิด 1 เบซิไดโอสปอร์ แต่ก็มีเห็ดบางกลุ่ม เช่น กลุ่มเห็ดมันปู สามารถพบก้านชูสปอร์ได้ 6 ถึง 8 ก้านใน 1 เบซิเดียม หรืออาจเกิดแอสโคสปอร์ภายในอับหรือถุง (แอสคัส) ซึ่งปกติแอสคัส 1 ถุงจะมี 8 แอสโคสปอร์ซึ่งเรียงกันอย่างมีระเบียบ โดยสปอร์ของเห็ดต่างๆ จะมีรูปร่าง ขนาดและสีแตกต่างกัน

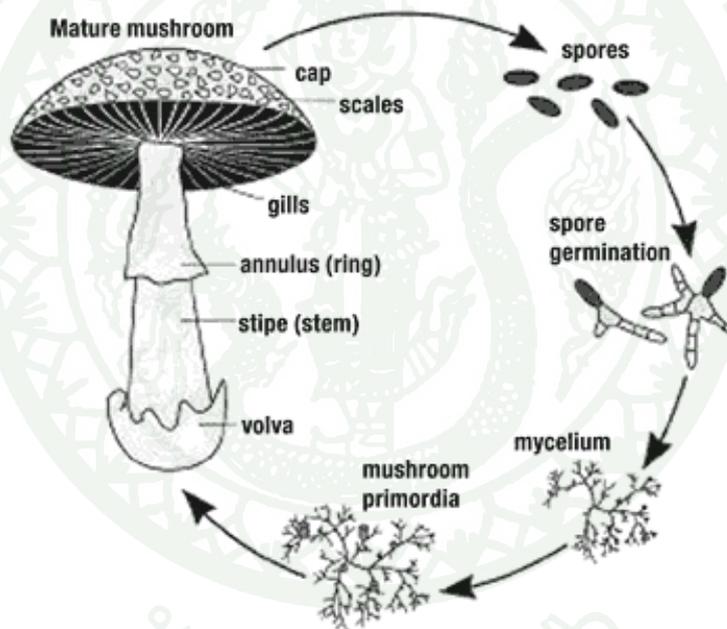
กลุ่มรา (mycelium) ของเห็ดจะมีเส้นใยแบบมีผนังกัน มี 3 ระยะ คือ

1. กลุ่มใยปฐมภูมิ (primary mycelium) เป็นเส้นใยที่เจริญออกมาจากสปอร์ของเห็ด โดยแต่ละเซลล์จะมีเพียง 1 นิวเคลียส

2. กลุ่มใยทุติยภูมิ (secondary mycelium) เกิดขึ้นได้ 2 ทาง คือ เกิดจากเส้นใยราปฐมภูมิที่พัฒนาเจริญเป็นเส้นใยราทุติยภูมิได้เอง คือเกิดโดยไม่ผสม (parthenogenesis) และเกิดจากการรวมกันของเส้นใยราปฐมภูมิจากสปอร์ที่เข้ากันได้ (compatible) ซึ่งการพัฒนาทั้ง 2 ทางนั้นทำให้แต่ละเซลล์มี 2 นิวเคลียส

3. กลุ่มใยตติยภูมิ (tertiary mycelium) คือเส้นใยราทุติยภูมิที่พัฒนารวมตัวกันแน่นเป็นดอกเห็ด (fruiting body)

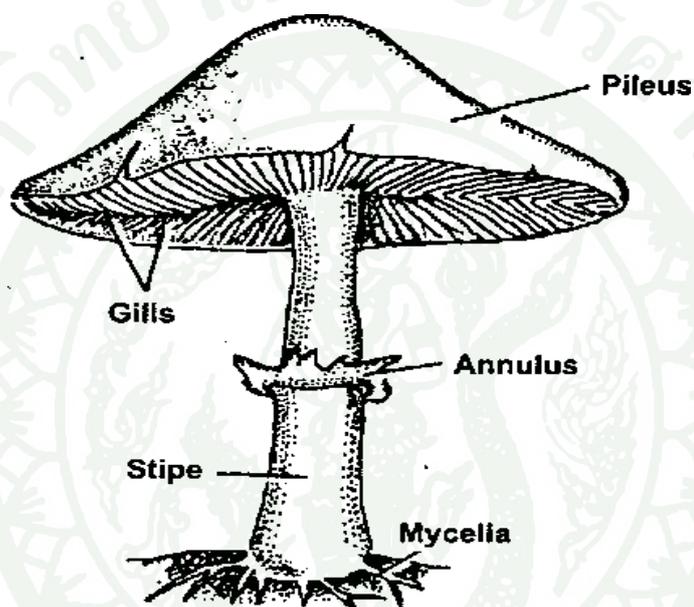
วงจรชีวิตของเห็ดเริ่มจากสปอร์ของเห็ดตกไปอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมก็จะสามารถงอกเป็นเส้นใย (hypha) และกลุ่มใย (mycelium) แล้วมีการรวมเป็นกลุ่มก้อนเกิดเป็นดอกเห็ด โดยดอกเห็ดที่เจริญเติบโตก็จะสามารถสร้างสปอร์ซึ่งจะปลิวหรือหลุดไปงอกเป็นเส้นใยได้อีก และเกิดการหมุนเวียนเช่นนี้เรื่อยไป การสืบพันธุ์ของเห็ดแบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ แบบต่างเพศร่วมทัลลัส (homothallic) เกิดจากเส้นใยปฐมภูมิมีการพัฒนาเจริญจนครบวงจรจนถึงขั้นเป็นดอกเห็ดและสามารถผลิตสปอร์ใหม่ได้ และแบบต่างเพศต่างทัลลัส (heterothallic) เกิดจากเส้นใยปฐมภูมิต่างเพศที่เข้ากันได้และมีการผสมกันจนพัฒนาเป็นเส้นใยทุติยภูมิก่อนที่จะมีการเจริญต่อไปจนครบวงจรชีวิตถึงขั้นเป็นดอกเห็ดและสร้างสปอร์ใหม่ (ภาพที่ 1) โดยวงจรชีวิตของเห็ดประกอบด้วยส่วนสำคัญ คือ สปอร์และกลุ่มใยรา (ราชบัณฑิตยสถาน, 2539)



ภาพที่ 1 โครงสร้างและวงจรชีวิตของเห็ด
ที่มา: Ontario Woodlot Association (2008)

2. ชนิดของเห็ดกระดุม

เห็ดกระดุม (*Agaricus* sp.) มีการกระจายพันธุ์อยู่ทั่วโลกโดยเห็ดในสกุล *Agaricus* ที่สำคัญ และมีการผลิตเพื่อการค้าเป็นปริมาณมากได้แก่ เห็ดกระดุมหรือเห็ดแชมปิญอง (*Agaricus bisporus*) ซึ่งเป็นเห็ดที่เจริญในเขตหนาว เห็ดกระดุมมีโครงสร้างที่สำคัญ ดังแสดงในภาพที่ 2 และประกอบด้วยหลายสปีชีส์ดังนี้



ภาพที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดกระดุม

ที่มา: Anonymous (2008)

2.1 เห็ดกระดุม *Agaricus arvensis* Schaeff. ex Fr. (เห็ดชานหมากวางแหวน 1 ชั้น, เห็ดขี้ม้า)

หมวกเห็ดรูปไข่ สีขาว ผิวหมวกเรียบหรือมีเกล็ดบาง มีสีเหลืองปนเมื่อช้ำ เส้นผ่านศูนย์กลาง 7-15 เซนติเมตร ครีบหมวกมีสีขาวแล้วเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ มีลักษณะกว้าง เรียงถี่ และไม่ยึดติดกับก้าน ก้านสีขาว ขนาด 7-10 x 1-1.5 เซนติเมตร ลักษณะก้านเกือบเป็นทรงกระบอก เรียบหรือมีเกล็ดเล็กน้อยบริเวณโคนก้าน บนก้านมีแอนนูลัสสีขาว 1 วง สปอร์รูปรี ผิวเรียบ สีน้ำตาลเข้ม (ภาพที่ 3) เกิดเป็นกลุ่มตามทุ่งหญ้า สามารถกินได้ (อนงค์ และคณะ, 2551)



ภาพที่ 3 เห็ดกระดุม *Agaricus arvensis* Schaeff. ex Fr.

ที่มา: Wood and Stevens (2004)

2.2 เห็ดกระดุม *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. (เห็ดแชมปิญอง, เห็ดฝรั่ง)

หมวกเห็ดรูปครึ่งวงกลมแล้วบานออกเป็นรูปร่ม สีขาว เส้นผ่านศูนย์กลาง 5-10 เซนติเมตร ผิวมีเกล็ดและขนบางๆ สีน้ำตาลอ่อนกระจายออกไปจากกลางหมวก เนื้อสีขาวละเอียด แน่น ครีบสีชมพูอ่อนอมม่วงแล้วเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม ไม่ยึดติดกับก้าน ส่วนที่อยู่ใกล้ก้านกว้างกว่าส่วนที่ติดขอบหมวก ก้านสีขาว ยาว 3.5-5 เซนติเมตร เมื่อโตเต็มที่ก้านจะกลวง บนก้านมี แอวนูลัส 1 วง สปอร์รูปร่างค่อนข้างกลม สีน้ำตาลเข้ม ผิวเรียบ ผนังบาง มีเพียง 2 สปอร์ต่อ 1 เบซิเดียม (ภาพที่ 4) มีการเพาะเลี้ยงกันเป็นอุตสาหกรรมทั้งในยุโรปและอเมริกา (ราชบัณฑิตยสถาน, 2550) เป็นเห็ดที่มีถิ่นกำเนิดในเขตอบอุ่นและเขตหนาว กินได้และมีรสดี จึง ปลูกได้ทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่มีอากาศหนาวไม่น้อยกว่า 3 เดือน (กรมวิชาการเกษตร, 2541)



ภาพที่ 4 เห็ดกระดุม *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach.

ที่มา: Wood and Stevens (2004)

2.3 เห็ดกระดุม *Agaricus bitorquis* (Quél.) Sacc.

หมวกเห็ดรูปกระทะคว่ำ สีขาว เมื่อบานเต็มที่หมวกเห็ดจะแบนราบ เส้นผ่านศูนย์กลาง 9-11 เซนติเมตร ผิวมีขนคล้ายเกล็ดสีขาวซึ่งเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อนกระจายไปยังขอบหมวก ขอบหมวกเรียบหรือมีเชื้อสีขาวติดอยู่บางส่วน ครีบสีชมพูอมม่วงแล้วเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม ก้านสีขาว ยาว 3.5-4 เซนติเมตร เมื่อโตเต็มที่ก้านจะกลวงเล็กน้อย บนก้านมีแอนนูลัสสีขาว 2 วงซ้อนติดกัน วงล่างขอบบางขนาดเล็กกว่าวงบน เนื้อในเห็ดสีขาวละเอียด แข็งกว่าชนิด *A. bisporus* (Lange) Imbach. สปอร์รูปรี สีน้ำตาลเข้ม ผิวเรียบ มี 4 สปอร์ต่อ 1 เบซิเดียม (ภาพที่ 5) มีการกระจายพันธุ์ในทั่วทุกภาคประเทศไทย มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อน สามารถเพาะเลี้ยงได้ในอุณหภูมิ 23-28 องศาเซลเซียส ทนทาน ไม่บอบช้ำง่าย เก็บรักษาไว้ได้นาน กินได้และเหมาะสำหรับเพาะเลี้ยงเป็นการค้าพบได้ทั่วโลก (ราชบัณฑิตยสถาน, 2550)



ภาพที่ 5 เห็ดกระดุม *Agaricus bitorquis* (Quél.) Sacc.

ที่มา: Gruppo Micologico Cebano (2010)

2.4 เห็ดกระดุม *Agaricus campestris* L. ex Fr.

หมวกเห็ดรูปร่ม สีขาว เส้นผ่านศูนย์กลาง 10-12 เซนติเมตร ผิวเรียบ มีขนสีน้ำตาลอ่อน กระจายอยู่ทั่วไป ขอบไม่เรียบมีเศษเยื่อสีขาวติดอยู่โดยรอบ ครีบสีชมพูสดแล้วเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล เรียงชิดแต่ไม่ติดกับก้าน ก้านสีขาว ยาว 8-10 เซนติเมตร ตั้งตรง ผิวเรียบ เนื้อแน่น ตรงกลางมีรู กลวง บนก้านมีแอนนูลัสสีขาว 1 วง สปอร์รูปรี สีน้ำตาลเข้ม ผิวเรียบ มี 4 สปอร์ต่อ 1 เบซิเดียม (ภาพที่ 6) มีการกระจายพันธุ์ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย มีลักษณะคล้ายชนิด *A. bisporus* (Lange) Imbach. สามารถกินได้และพบได้ทั่วโลก (ราชบัณฑิตยสถาน, 2550)



ภาพที่ 6 เห็ดกระดุม *Agaricus campestris* L. ex Fr.

ที่มา: Wood and Stevens (2004)

2.5 เห็ดกระดุม *Agaricus silvaticus* Schaeff. ex Secr. (เห็ดกระดุมป่าสน)

หมวกเห็ดสีขาวนวล ขอบหมวกมีสีอ่อนกว่า ผิวหมวกมีขนและเกล็ดละเอียดสีน้ำตาลแดง เส้นผ่านศูนย์กลาง 3-5 เซนติเมตร ครีบหมวกสีขาวแล้วเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อนและสีน้ำตาลดำ เมื่อดอกแก่ มีลักษณะแคบเล็กน้อย เรียงถี่ และไม่ยึดติดกับก้าน ก้านสีน้ำตาลอ่อน ขนาด 3-5 x 0.5-1 เซนติเมตร ลักษณะก้านทรงกระบอก เรียบ และกลวง บนก้านมีแอนนูลัสสีขาว 1 วง สปอร์รูปรี ยาว ผิวเรียบ สีน้ำตาลดำ (ภาพที่ 7) พบในป่าดิบแล้ง โดยขึ้นเป็นกลุ่มบนพื้นดิน สามารถกินได้ (อนงค์ และคณะ, 2551)



ภาพที่ 7 เห็ดกระดุม *Agaricus silvaticus* Schaeff. ex Secr.

ที่มา: Bartho (2009)

2.6 เห็ดกระดุม *Agaricus trisulphuratus* Berk. (เห็ดกระดุมทองเหลือง)

หมวกเห็ดรูปร่ม สีส้ม เส้นผ่านศูนย์กลาง 3-4 เซนติเมตร มีขนและเกล็ดสีเดียวกัน ครีบสีขาวแล้วเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้ม ก้านสีส้ม ยาว 3-4 เซนติเมตร มีขนสีส้ม บนก้านมีแอนนูลัสสีส้ม 1 วง สปอร์รูปรี สีน้ำตาลเข้ม ผิวเรียบ (ภาพที่ 8) มีเขตการกระจายพันธุ์ทางภาคใต้ของประเทศไทย พบตามชายหาด ไม่มีหลักฐานว่ากินได้ พบได้ทั่วโลก (ราชบัณฑิตยสถาน, 2550)



ภาพที่ 8 เห็ดกระดุมทองเหลือง *Agaricus trisulphuratus* Berk.
ที่มา: อนงค์ และคณะ (2551)

2.7 เห็ดกระดุม *Agaricus rufolanosus* Heinem. et Gooss.

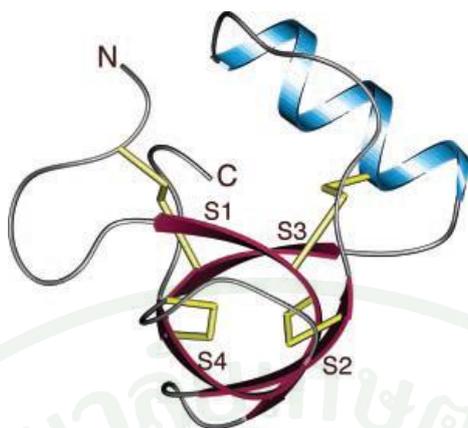
หมวกเห็ดรูปร่ม สีขาว เส้นผ่านศูนย์กลาง 12-20 เซนติเมตร ผิวมีขนคล้ายสำลี ปลายขนรวมกันทำให้มองเห็นเป็นเกล็ดขนาดใหญ่สีเหลืองอมน้ำตาล เมื่อบานเต็มที่จะโค้งงอเล็กน้อย ขอบหมวกมีขนและเยื่อสีขาวติดอยู่โดยรอบ ครีบสีชมพูอมม่วงแล้วเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มอมแดง เรียงถี่ชิดกันมากแต่ไม่ยึดติดกับก้าน ก้านยาว 10-16 เซนติเมตร มีขนสีขาวและเหลือง หลุดง่าย บนก้านมีแอนนูลัสสีขาว 1 วง บอบบางและเป็นขุยคล้ายแป้ง หลุดและขาดง่าย สปอร์รูปรี สีน้ำตาลเข้ม ผิวเรียบ ผ่นบาง มีการกระจายพันธุ์ทางภาคใต้ของประเทศไทย ไม่มีหลักฐานว่ากินได้ ในต่างประเทศพบที่คองโก (ราชบัณฑิตยสถาน, 2550)

3. กระบวนการเกิดดอกในเห็ด

กระบวนการต่างๆ ที่ชักนำให้เกิดโครงสร้างสืบพันธุ์ของเห็ดนั้นถูกควบคุมด้วยปริมาณสารอาหารและปัจจัยทางกายภาพต่างๆ เช่น อุณหภูมิ ความชื้น และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ (Flegg and Wood, 1985) โดยการควบคุมสภาพแวดล้อมเฉพาะเห็ดทั้งในช่วงเริ่มต้นและช่วงที่มีการพัฒนา โครงสร้างเกิดเป็นดอกเห็ดจะสามารถควบคุมผลผลิตของเห็ดให้เหมาะสมได้ จากการศึกษาการเจริญเป็นดอกเห็ดของเห็ดกระดุม *Agaricus bisporus* จะวัดจากกิจกรรมของกลุ่มเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของคาร์บอน โดยพบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ Mannitol dehydrogenase และ glucose-6-phosphate dehydrogenase สูงที่สุดในช่วงเริ่มต้นของการสร้างดอกเห็ด (Hammond and Nichols, 1976; Hammond, 1981) นอกจากนี้ยังพบกลุ่มของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแหล่งอาหารของเห็ด ซึ่งพบว่าเป็นยีนที่สร้างเอนไซม์ laccase ซึ่งมีบทบาทสำคัญในระยะเริ่มต้นของการสร้างดอกเห็ด (Ohga *et al.*, 1999) โดยพบว่ายีนที่สามารถสร้าง laccase ในเห็ดแต่ละชนิดนั้นมีหลายยีน เช่นในเห็ด *Coprinus cinereus* พบว่ามียีนที่สร้าง laccase ได้อย่างน้อย 6 ยีน (Bottoli *et al.*, 1999; Yaver *et al.*, 1999) ในเห็ดหอม (*Lentinus edodes*) พบยีนที่สร้าง laccase 2 ยีน คือ *lac1* และ *lac2* แต่มีการแสดงออกในช่วงหลังของการสร้างดอกเห็ด โดยเฉพาะบริเวณหมวกเห็ด (Zhao and Kwan, 1999) แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาถึงยีนโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงระดับเซลล์ในเชื้อราเส้นใย (filamentous fungi) และเห็ดชนิดต่างๆ พบว่าเป็นยีนในกลุ่มที่สร้างโปรตีนไฮโดรโฟบีน (hydrophobin) (Wessels, 1997)

4. โพรตีนไฮโดรโฟบิน (hydrophobin protein)

ไฮโดรโฟบินเป็นกลุ่มของโปรตีนขนาดเล็กประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 100 กรดอะมิโน มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำประมาณ 7-9 กิโลดาลตัน และมีโครงสร้างสามมิติดังภาพที่ 9 นอกจากนี้ไฮโดรโฟบินยังมีรูปแบบที่เป็นลักษณะเฉพาะตัว คือ มีกรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine) ที่เป็นบริเวณอนุรักษ์จำนวน 8 เรซิดิวส์ และสร้างพันธะ disulfide จำนวน 4 พันธะ (ภาพที่ 10) โดยลำดับกรดอะมิโนของไฮโดรโฟบินแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันและมีส่วนที่เหมือนกัน (homolog) น้อย (Wösten *et al.*, 1999) แต่ก็พบว่าไฮโดรโฟบินมีส่วนของโครงสร้างที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity plot) ที่มีความเหมือนกันมาก (Sunde *et al.*, 2008; Wessels, 1997) โดยการพบไฮโดรโฟบินนั้นมาจากการศึกษายีนที่แสดงออกอย่างสูงขณะที่มีการสร้างดอกเห็ดของเห็ดแครง (*Schizophyllum commune*) (Wessels *et al.*, 1991) ซึ่งต่อมาพบว่าไฮโดรโฟบินนั้นเป็นผลผลิตที่ได้จากการแสดงออกของยีน SC3 ซึ่งจะสามารถเกิดการรวมตัวกันเองบริเวณผิวสัมผัสระหว่างน้ำและอากาศในสารละลาย sodium dodesyl sulfate (SDS) เกิดเป็น amphipathic sheet ซึ่งมีจะแสดงคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) บริเวณผิวที่สัมผัสอากาศและจะแสดงคุณสมบัติที่ชอบน้ำ (hydrophilic) บริเวณผิวที่สัมผัสกับน้ำ (Wösten, 2001)



ภาพที่ 9 โครงสร้างสามมิติของโปรตีน hydrophobin แถบลูกศรสีแดง คือ โครงสร้าง β -sheet และเส้นสีเหลือง คือการเกิดพันธะ disulfide ของกรดอะมิโนซิสเทอีน

ที่มา: Hakanpää *et al.* (2004)

Class I hydrophobins

SC4	CNSG-PVQ--CCNETT--VANAQ-KQGLLG---LLGVV---GPITGLVGLNCSP---ISVVG---LTGNSCTA-QTVCCDHVTQNG----LVN--VGC
PRI2	CNNG-SLQ--CCNSMTQDRGNLQIAQGVLLGGLLGLGGLLDLVDLINALIGVQCSF---ISIVG---NANTCTQ-QTVCCSNNNFNG----LIA--LGC
SC3	CTTG-SLS--CCNQVS---ASSPVTALLG---LLGIV---LDLNLVIGISCSF---LTVIG---VGGSGCSA-QTVCCENTQFNG----LIN--IGC
ABH1	CDVG-EIH--CCDTQQT---PDHTSAAASG---LLGVP---INLGAFLGFDCTP---ISVLG---VGGNCAA-QPVCCCTGNQFTA----LINA-LDC
EAS	CSID-DYKPYCCQSMG---PAGSPGL-----LNLIP---VDLSASLG--C-----VVG---VIGSQCGA-SVKCCDDVTNTGNSFLIINA-ANC
HCF1	CAVGSQIS--CCTTNS-----GSD-----ILGNV-----LGGSCLLDN--VSLISLN-----SNCPAGNTFCCPS-NQDG-----TLNINVSC
MPG1	CGAEKVV--CCNSKELK--NSKSGAE-----IPIDV-----LSGECNIPINILTIQLI--PINNFCS-D-TVSCCSGEQIG-----LVN--IQC
RODA	CGDQAQLS--CCNKATYAG-DVTDIDEGILAGTLKNLIGGGS---GTEGLGLFNQCKSLDLQIPVIGIPIQALVQKCKQ-NIACCQNSPDSASG--SLIGLGLFC

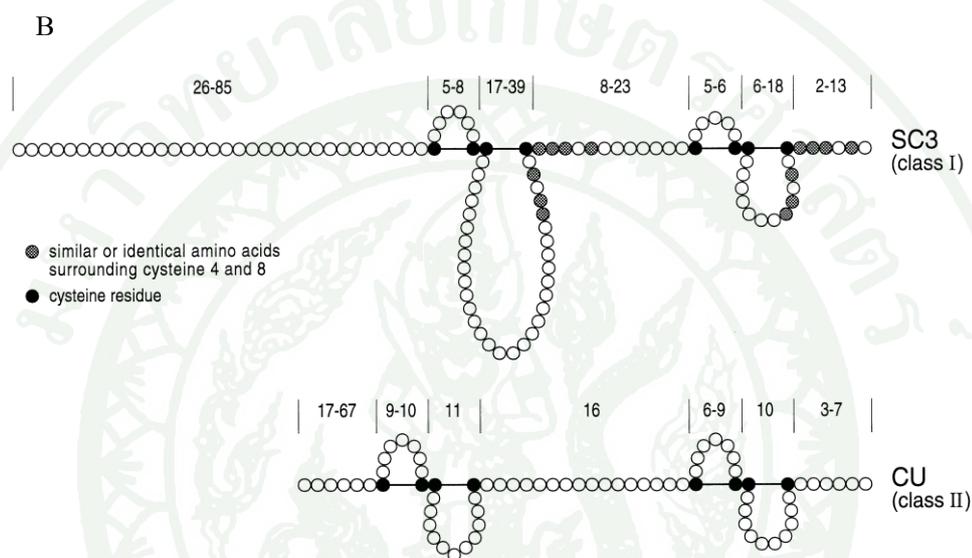
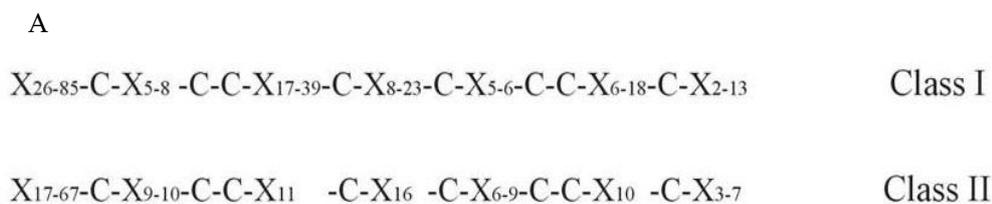
Class II hydrophobins

HFBI	CPPG-LFSNPCCATQVLGLIGLDCVPSQNVYDGTDFRNVCAKTGA-QPLCCVAP-VAGQALLC
HFBI	CPTG-LFSNPLCCATNVLDLIGVDCPTPIAVDTGAIQAHCAKSGS-KPLCCVAP-VADQALLC
SRH1	CPNG-LYSNPCCGANVLGVAALDCHTPRVDVLTGPIFQAVCAEAGKQPLCCVVP-VAGQDLIC
CU	CTGL-LQKSPCCNTDILGVANLDCGPPSPVTPSPSQFQASCVADGGRSARCCTLS-LLGLALVC
CRP	CSST-LYSEAQCCATDVLGVADLDCETVPETPTSASSFESICATSG-RDACCCTIP-LLGQALLC
MGP	CSG--LYGSAQCCATDILGLANLDCGQPSDAPVDADNFSEICAAIG-QRARCCLIP-ILDQGLIC
HCF6	CPAN---RVPQCCQLSVLGVADVTCASPSSGLTSVSAFEADCAAND-TTAQCCLIP-VLGLGLFC
HYD4	CPDGLIGTPCCSLDLGVLSGECSSPSKTPNSAKEFQEICAAASG-QKARCCFLSEVFTLGAF

ภาพที่ 10 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน hydrophobin ใน class I และ class II

ที่มา: Sunde *et al.* (2008)

เนื่องจากคุณสมบัติทางชีวฟิสิกส์และรูปแบบของลักษณะที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ (hydropathy pattern) ในโมเลกุลของไฮโดรโฟบิน ทำให้สามารถแบ่งโปรตีนไฮโดรโฟบิน ได้เป็น 2 class ได้แก่ class I และ class II (Wessels, 1994) โดยโปรตีนไฮโดรโฟบินใน class I นั้น จะพบในกลุ่ม ascomycetes และ basidiomycetes ส่วนไฮโดรโฟบินใน class II พบเฉพาะในกลุ่ม ascomycetes เท่านั้น (Wösten, 2001) จากตัวอย่างของไฮโดรโฟบินใน class I ได้แก่ SC3 และไฮโดรโฟบินใน class II ได้แก่ cerato-ulmin (CU) พบว่ากรดอะมิโนซิสเทอีนที่อยู่ในไฮโดรโฟบิน ทั้ง 2 class นั้นมีการสร้างพันธะ disulfide ที่เหมือนกันและมีโดเมนที่เหมือนกัน โดยกรดอะมิโนซิสเทอีนลำดับที่ 1-4 จะอยู่ในโดเมนที่ 1 ส่วนกรดอะมิโนซิสเทอีนลำดับที่ 5-8 จะอยู่ในส่วนของโดเมนที่ 2 ซึ่งการมีโดเมนทั้ง 2 นี้ แสดงให้เห็นถึง hydropathy pattern (Wessels, 1994, 1997) นอกจากนี้โดเมนทั้ง 2 ในไฮโดรโฟบินยังมีการสร้างเป็น loop จำนวน 4 loop ในบริเวณที่มีการสร้างพันธะ disulfide โดยใน class I จะมีการสร้าง loop ที่ 2 และ 4 ที่มีความยาวแตกต่างกันไปในไฮโดรโฟบินแต่ละตัว ส่วนใน class II ไฮโดรโฟบินจะมีความยาวของ loop ทั้ง 4 loop ไม่แตกต่างกันและช่องว่างระหว่างโดเมนก็ไม่มี ความแตกต่างกันด้วย (ภาพที่ 11) สำหรับ loop ที่ 2 และ loop ที่ 4 ในทั้ง 2 class นั้น จะมีลักษณะเด่น คือไม่ชอบน้ำ ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ เช่น Methionine (M), Isoleucine (I), Leucine (L), Valine (V) และล้อมรอบด้วยกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้ว เช่น Glycine (G) และ Alanine (A) (Kershaw and Talbot, 1998) ไฮโดรโฟบินทั้ง 2 class นี้ มีคุณสมบัติในการรวมตัวได้ที่รอยต่อระหว่างส่วนที่ชอบน้ำและส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophilic-hydrophobic interface) เช่น รอยต่อระหว่างน้ำและอากาศ, รอยต่อระหว่างน้ำกับน้ำมัน หรือรอยต่อระหว่างน้ำและ hydrophobic solid เช่น Teflon ทำให้เกิดเยื่อต่างๆ ที่มีลักษณะเป็น amphipathic membrane โดยไฮโดรโฟบินใน class I สามารถรวมตัวสร้างเป็นเยื่อได้ดีโดยที่ไม่ละลายและสามารถทนต่อการสกัดด้วย SDS และแยกตัวออกจากกันโดยใช้สาร เช่น กรดฟอर्मิกและ trifluoroacetic acid (TFA) (De Vries *et al.*, 1993; Wessels *et al.*, 1991) เท่านั้น ส่วนไฮโดรโฟบินใน class II จะเสถียรเพียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงสามารถแยกตัวออกจากกันได้ง่ายใน 60% เอทานอล และ 2 % SDS (Carpenter *et al.*, 1992)



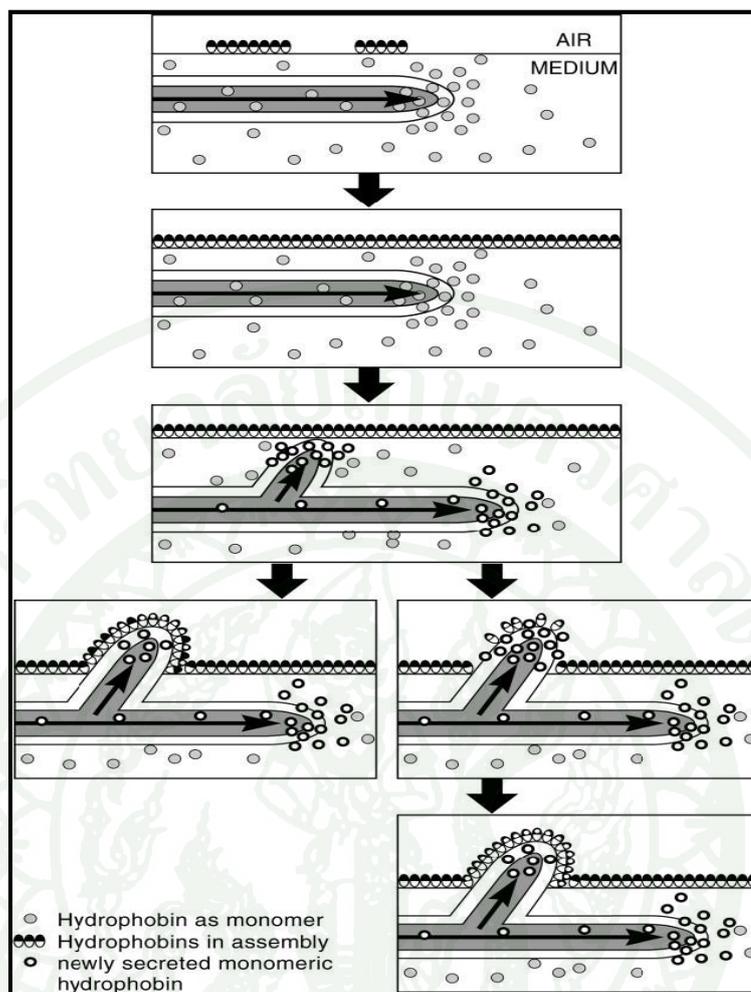
ภาพที่ 11 primary structure ของไฮโดรโฟบิน class I และ class II (A) และการสร้างพันธะ disulfide ของไฮโดรโฟบิน class I และ class II (B)

ที่มา: Yaguchi *et al.* (1993)

5. หน้าที่ของโปรตีนไฮโดรโฟบิน

ไฮโดรโฟบินมีบทบาทที่สำคัญในการเจริญและกระบวนการพัฒนาโครงสร้างต่างๆ ของรา โดยเกี่ยวข้องกับกับการสร้างโครงสร้างที่ไม่ชอบน้ำ เช่น เส้นใย, สปอร์ และดอกเห็ด (Wessels, 1997; Wösten and Wessels, 1997) รวมทั้งช่วยให้เส้นใยสามารถจับยึดกับ hydrophobic surface ต่างๆ ได้ (Wösten *et al.*, 1994) ต่อมาพบว่าไฮโดรโฟบินมีความสำคัญในราสาเหตุโรคพืชที่ใช้ในการยึดจับกับ hydrophobic surface ของพืชอาศัยก่อนที่จะแทงเส้นใยและเข้าทำลายพืช (Talbot *et al.*, 1996)

ในการพัฒนาโครงสร้างต่างๆ ของรา โดยเฉพาะ aerial structure เช่น เส้นใย และดอกเห็ด นั้นจะเริ่มจากการที่เส้นใยราจะเจริญขึ้นสู่อากาศเพื่อหนีจากสภาพแวดล้อมหรือ substrate ที่มีความชื้น โดยบริเวณรอยต่อระหว่างน้ำและอากาศนับว่าเป็นอุปสรรคในการเจริญของ โครงสร้างดังกล่าว (Wösten *et al.*, 1999) ราจึงมีการสร้างไฮโดรโฟบินเพื่อช่วยลดแรงตึงผิวของน้ำบริเวณรอยต่อระหว่างน้ำและอากาศ เพื่อช่วยให้เส้นใยราเจริญขึ้นสู่อากาศได้ ตัวอย่างแบบจำลองแสดงในภาพที่ 12 โดยเริ่มจากการที่เส้นใยราที่อยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีน้ำ มีการสร้างโมโนเมอร์ของไฮโดรโฟบินแล้วส่งออกสู่ภายนอกเซลล์ จากนั้นโมโนเมอร์ของไฮโดรโฟบินจะเกิดการรวมตัวกันบริเวณรอยต่อระหว่างน้ำและอากาศเกิดเป็น amphipathic membrane ซึ่งจะช่วยให้ลดแรงตึงผิวของน้ำ ทำให้เส้นใยสามารถเจริญผ่านรอยต่อระหว่างน้ำและอากาศได้ และเมื่อเส้นใยราเจริญขึ้นสู่อากาศแล้วไฮโดรโฟบินจะช่วยให้เคลือบผิวของเส้นใยเพื่อปกป้องเส้นใยให้สามารถเจริญได้ต่อไป นอกจากนี้พบว่าไฮโดรโฟบินยังสามารถเคลือบผิวของดอกเห็ดของเห็ดกระดุม *Agaricus bisporus* ซึ่งช่วยในการป้องกันดอกเห็ดจากการเข้าทำลายของแบคทีเรีย (de Groot *et al.*, 1996; Lugones *et al.*, 1999) รวมทั้งพบว่าไฮโดรโฟบินยังช่วยในการเคลือบผิวของสปอร์ราในขบวนการสืบพันธุ์ด้วย (Cole *et al.*, 1983)



ภาพที่ 12 แบบจำลองบทบาทของไฮโดรโฟบินในการสร้าง aerial structure ของรา เริ่มจากเส้นใยสร้างโมโนเมอร์ของไฮโดรโฟบินแล้วส่งออกสู่อากาศ จากนั้นโมโนเมอร์ของไฮโดรโฟบินจะเกิดการรวมตัวกันบริเวณรอยต่อระหว่างอาหารและอากาศเกิดเป็น amphipathic membrane ซึ่งจะช่วยในการลดแรงตึงผิวของน้ำ ทำให้เส้นใยสามารถเจริญผ่านรอยต่อระหว่างอาหารและอากาศได้ และเมื่อเส้นใยเจริญขึ้นสู่อากาศแล้วไฮโดรโฟบินจะช่วยในการเคลือบผิวของเส้นใยเพื่อปกป้องเส้นใยให้สามารถเจริญได้ต่อไป

ที่มา: Wösten (2001)

6. การประยุกต์ใช้ไฮโดรโฟบิน

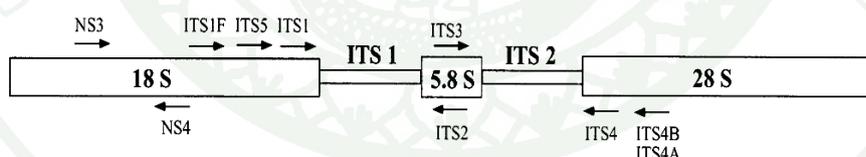
ไฮโดรโฟบินยังสามารถใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมลิ ใช้เป็นชั้นเคลือบเครื่องมือต่างๆ เพื่อป้องกันความเสียหายจากสารเคมี (Yang *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังใช้เป็นตัวกลางในขีตเซลล์หรือโมเลกุลเพื่อให้มีผิวสัมผัสที่มีคุณสมบัติตามที่ต้องการ ใช้ในกระบวนการผลิตอาหาร เช่น ผลิตภัณฑ์ครีม ลูกกวาด เครื่องดื่ม และเบียร์ ฯลฯ ใช้ในการผลิตเครื่องสำอางต่าง ๆ เช่น ยาสระผม ยาทาเล็บ เป็นต้น ใช้ในทางการแพทย์ในการเคลือบผิวของพลาสติกให้เป็นชั้นของโปรตีนธรรมชาติเพื่อใช้ในการผ่าตัดปลูกถ่ายอวัยวะ ใช้ในการเคลือบผิวของยาเพื่อช่วยให้ร่างกายสามารถดูดซับได้ดีขึ้น (Kershaw and Talbot, 1998) และใช้ในการจับยึดกับเอนไซม์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของ biosensors (Zhao *et al.*, 2007)

7. การจำแนกชนิดของเห็ด

การจำแนกชนิดของเห็ดอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาของเห็ดเป็นเกณฑ์ช่วยในการจัดจำแนก แต่วิธีการจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะดังกล่าวเป็นเกณฑ์นั้นมีความไม่แน่นอนและไม่เที่ยงตรงมากพอ จึงทำให้เกิดปัญหาในการจัดจำแนกเห็ดเนื่องจากสภาพแวดล้อมจะมีอิทธิพลอย่างสูงต่อลักษณะสัณฐานวิทยาที่แสดงออก (Petersen and Hughes, 1999) การศึกษาบริเวณ ribosomal DNA (rDNA) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอส่วนที่ถูกถอดรหัสเป็น ribosomal RNA (rRNA) มีคุณสมบัติที่เหมาะสมจะใช้ในการจำแนกชนิดและศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของรา (Takamatsu, 1998) เนื่องจากเป็นบริเวณที่พบในราทุกชนิด สามารถถูกเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ได้ง่าย และมีความหลากหลายเพียงพอในการจัดจำแนกที่ระดับต่างๆ เช่น ระดับ family, genus และ species (Bruns and Gardes, 1993) จึงนิยมใช้ศึกษาเกี่ยวกับอนุกรมวิธานและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของราและเห็ดชนิดต่างๆ อย่างกว้างขวาง เนื่องจากเป็นส่วนที่มีความสำคัญในการดำรงชีวิต ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอบริเวณนี้จะแสดงให้เห็นถึงวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตได้

rDNA เป็นดีเอ็นเอที่มีจำนวนหลายชุดในจีโนมทั้งในโปรคาริโอตและยูคาริโอตจึงทำให้ง่ายในการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR โดย rDNA ประกอบด้วยส่วนต่างๆ คือ ส่วนที่ถูกถอดรหัสเป็น rRNA ได้แก่ 18S rRNA 5.8S rRNA และ 28S rRNA ส่วนที่ไม่ถูกถอดรหัสและแทรกอยู่ระหว่าง rRNA คือ Internal transcribed spacer ซึ่งมี 2 ส่วน ได้แก่ ITS1 และ ITS2 (ภาพที่ 13) นอกจากนี้ยังมีส่วนของ Intergenic spacer (IGS) ที่แทรกอยู่ระหว่างชุดของ rRNA ลำดับเบสใน

rDNA ทั้ง 3 ส่วนนี้มีความหลากหลายแตกต่างกัน โดยส่วนที่ถูกถอดรหัสเป็น ribosomal RNA นั้น จะถูกอนุรักษ์มากที่สุด ลำดับเบสส่วนนี้จึงไม่ค่อยแตกต่างกันในราแต่ละชนิด ส่วนดีเอ็นเอในส่วน ITS จะถูกอนุรักษ์ปานกลาง และดีเอ็นเอในส่วน IGS จะมีความแตกต่างกันมากที่สุดในสิ่งมีชีวิต (Bruns and Gardes, 1993) ซึ่งดีเอ็นเอในส่วน ITS นี้เป็นส่วนที่ถูกนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของราได้เป็นอย่างดี (Bruns *et al.*, 1991) นอกจากนี้ชิ้นส่วน ITS ยังเหมาะสมในการจำแนกชนิดของเห็ดด้วย เนื่องจากความยาวของชิ้นส่วน ITS อยู่ระหว่าง 600-800 คู่เบส ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณได้ง่ายโดยใช้ universal primer ที่จำเพาะกับ rDNA (White *et al.*, 1990) และมีจำนวนซ้ำหลายชุด จึงง่ายต่อการเพิ่มปริมาณจากตัวอย่างที่มีปริมาณน้อยหรืออยู่ในสภาพที่ไม่สมบูรณ์ นอกจากนี้ชิ้นส่วน ITS ยังมีความหลากหลายสูงจนสามารถจำแนกชนิดในระดับสปีชีส์ของเห็ดได้ ซึ่งจากการเพิ่มปริมาณบริเวณ ITS โดยเทคนิค PCR ในเห็ดดัดเต่า (*Boletus edulis*) พบว่าสามารถจำแนกชนิดของเห็ดดัดเต่าและเห็ดที่มีความใกล้เคียงกับเห็ดดัดเต่าได้อย่างเหมาะสม (Moor *et al.*, 2002) และจากการศึกษาชนิดของเห็ดในรัฐราชสถาน ประเทศอินเดียโดยอาศัยลำดับเบสบริเวณ ITS ในการจำแนกชนิดของเห็ดนั้นพบว่าสามารถจำแนกชนิดของเห็ดได้เป็นเห็ด *Podaxis pistillaris*, *Phellinus igniarius*, *Gymnopilus subbearlei* และ *Phelloribia herculea* โดยทำให้เห็ด *G. subbearlei* และ *P. herculea* เป็นเห็ดที่ถูกจำแนกเพิ่มเติมขึ้นมาจากการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของเห็ดในอินเดีย (Singh *et al.*, 2006)

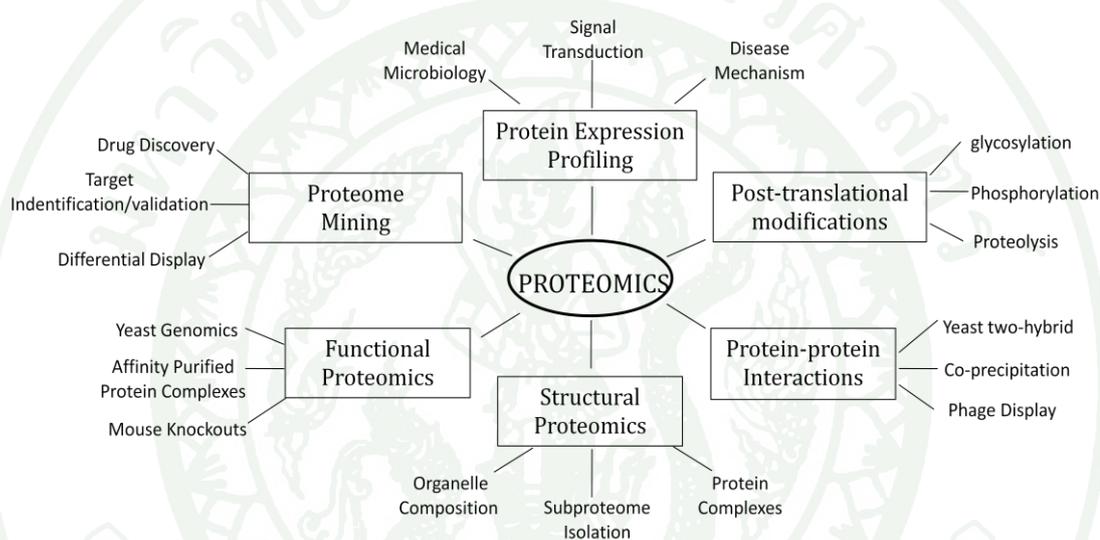


ภาพที่ 13 บริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) ใน ribosomal DNA
ที่มา: Larena *et al.* (1999)

8. โปรตีโอมิกส์ (Proteomics)

โปรตีโอมิกส์ คือการศึกษารูปแบบของโปรตีนทั้งหมดที่แสดงออกโดยจีโนมของสิ่งมีชีวิต ซึ่งครอบคลุมไปถึงการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน (protein-protein interaction) การดัดแปลงโปรตีน (protein modification) หน้าที่ของโปรตีน (protein function) และการศึกษาหา

ตำแหน่งของโปรตีน (protein localization) ดังนั้นจึงอาจจัดประเภทของโปรตีโอมิกส์ออกเป็น 6 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ โปรตีโอมิกส์ที่ศึกษาด้านหน้าที่ของโปรตีน (functional proteomics) โครงสร้างของโปรตีน (structural proteomics) ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับโปรตีน (protein-protein interaction) การดัดแปลงโปรตีนหลังกระบวนการแปลรหัส (Post-translational modifications) รูปแบบการแสดงออกของโปรตีน (protein expression profiling) และ โปรตีโอมิกส์ที่วิเคราะห์ชนิดโปรตีนโดยตรง (mining proteomic) (Graves and Haystead, 2002) ซึ่งตัวอย่างการศึกษาโปรตีโอมิกส์ในแต่ละกลุ่ม แสดงในภาพที่ 14



ภาพที่ 14 การศึกษาโปรตีโอมิกส์ในแต่ละประเภท

ที่มา: Graves and Haystead (2002)

การศึกษาโปรตีโอมิกส์ทำให้ได้ข้อมูลการแสดงออกของเซลล์ในระดับโปรตีน ซึ่งสามารถนำมาเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์กับยีนในจีโนมได้ จึงทำให้โปรตีโอมิกส์มีบทบาทสำคัญในงานวิจัยหลายสาขา เช่น เทคโนโลยีการอาหาร การแพทย์ เทคโนโลยีด้านพืช เป็นต้น การใช้ประโยชน์จากโปรตีโอมิกส์มีในด้านต่างๆ ดังนี้

8.1 ด้านเทคโนโลยีการอาหาร

โปรตีนโอมิกส์ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์โปรตีนในอาหารเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนหรือระหว่างโปรตีนกับองค์ประกอบอื่นๆ ในอาหาร ทำให้สามารถประเมินคุณค่าทางโภชนาการในอาหาร ตรวจวัดสารที่ทำให้เกิดอาการแพ้ และตรวจหาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง bioactive compound ได้ (Carbonaro, 2004) นอกจากนี้ยังสามารถใช้โปรตีนโอมิกส์ร่วมกับเทคนิค Immunolabeling เพื่อตรวจหาสารที่ก่อให้เกิดอาการแพ้ได้ เช่น การตรวจหาโปรตีนในเมล็ดงา พบโปรตีน 4 ชนิดที่เกี่ยวข้องกับการเกิดอาการแพ้ในคนไข้ที่แพ้ซึ่งอาจเป็นแนวทางในการป้องกันการแพ้อาหารได้ (Beyer *et al.*, 2002)

8.2 ด้านการแพทย์

มีการนำเทคนิคทางโปรตีนโอมิกส์มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคต่างๆ ที่ความผิดปกติทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับของโปรตีนในเซลล์ เช่น โรคมาเร็ง โรคติดเชื้อต่างๆ (infection diseases) โรคหัวใจ และโรคทางระบบประสาทส่วนกลาง เช่น อัลไซเมอร์ (alzheimer's disease) และดาวน์ซินโดรม (down syndrome) เป็นต้น (สมปอง, 2545)

8.3 เทคโนโลยีด้านพืช

การศึกษาโปรตีนโอมิกส์ในพืช เช่น การวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนที่มีการแสดงออกในเนื้อสับปะรดพันธุ์ภูเก็ตและสับปะรดตัดแปรพันธุ์กรรมที่ได้รับการถ่ายยีนต้านทานสารกำจัดวัชพืชไบลาฟอส (*bar gene*) ด้วยเทคนิค Difference in Gel Electrophoresis (DIGE) พบว่าเนื้อสับปะรดพันธุ์ภูเก็ต และสับปะรดตัดแปรพันธุ์กรรมมีจุดโปรตีน 730 และ 731 จุด ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบตำแหน่ง และจำนวนจุดของโปรตีนในสับปะรดพันธุ์ภูเก็ต และสับปะรดตัดแปรพันธุ์กรรมที่มีความเข้มของจุดแตกต่างกันมากกว่า 2.5 เท่า พบว่ามีจำนวนโปรตีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกัน 2.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแบ่งเป็น โปรตีนที่มีการแสดงออกลดลงในสับปะรดพันธุ์ตัดแปรพันธุ์กรรมคิดเป็น 1.8 เปอร์เซ็นต์และ โปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในสับปะรดตัดแปรพันธุ์กรรมคิดเป็น 0.7 เปอร์เซ็นต์ โดยโปรตีนในตำแหน่ง pI เท่ากับ 4.07 และมวลโมเลกุลเท่ากับ 12.1 กิโลดาลตัน มีการแสดงออกในสับปะรดตัดแปรพันธุ์กรรมเท่านั้น (ดารณี, 2552)

อภิญา (2551) ศึกษาการหาโปรตีนที่ตอบสนองต่อเชื้อ *Fusarium oxysporum* f. sp. *capsici* ในต้นพริก โดยเปรียบเทียบรูปแบบเจล 2DE ในใบพริก (*Capsicum annuum* Linn.) ที่ได้รับเชื้อกับใบพริกปกติ การโดยใช้พริก 2 สายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์ด้านทาน (Mae Ping 80) และสายพันธุ์ไม่ด้านทาน (Long Chilli 455) หลังได้รับเชื้อ *F. oxysporum* f. sp. *capsici* เป็นเวลา 48 ชั่วโมง รูปแบบโปรตีนของพริกสายพันธุ์ด้านทานและไม่ด้านทานมีความต่างกัน โดยสายพันธุ์ด้านทานมีจุดโปรตีนอย่างน้อย 11 จุด ที่มีการแสดงออกเปลี่ยนไปจากเดิม (เพิ่มขึ้น 2 จุดและลดลง 9 จุด) และเกิดขึ้นใหม่ 1 จุด ในขณะที่สายพันธุ์ไม่ด้านทานมีจุดโปรตีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้น 18 จุด ลดลง 3 จุด และเกิดขึ้นใหม่ 4 จุด เมื่อวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีน พบว่าโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นส่วนใหญ่ได้แก่ serine/threonine phosphatase 2A, superoxide dismutase และ 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase นั้นเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกป้องกันตัวเองของพืช

การศึกษาโปรตีนโอมิกส์ประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 2 ขั้นตอน ได้แก่ ขั้นตอนการแยกโปรตีนออกจากกันตามค่า Isoelectric point (pI) และมวลโมเลกุล (MW) ด้วยวิธี Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) และการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยวิธี Mass Spectrometry (MS) (O' Farrell, 1975; Andersen and Mann, 2000)

9. เทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ 2 มิติ (Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis)

เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส 2 มิติ (Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis หรือ 2D-PAGE) เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโปรตีนออกจากกัน โดยอาศัยคุณสมบัติที่แตกต่างกันของโปรตีนแต่ละชนิด โดยการแยกโปรตีนในมิติแรกจะแยกโปรตีนตามความแตกต่างของค่าไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric point หรือ ค่า pI) และมิติที่สองจะแยกโดยอาศัยความแตกต่างของมวลโมเลกุล (Molecular weight) ของโปรตีน ทำให้สามารถแยกโปรตีนจำนวนมากออกจากกัน มีประสิทธิภาพในการจำแนกและระบุชนิดโปรตีนจากโปรตีนจำนวนมากที่รวมอยู่ในสิ่งมีชีวิต รวมทั้งใช้ในการศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในสิ่งมีชีวิตที่มีการแสดงออกของโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไป (O' Farrell, 1975; Person *et al.*, 2006)

การแยกโปรตีนมิติที่ 1 เป็นการแยกโปรตีนด้วยเทคนิค Isoelectric Focusing (IEF) โดยอาศัยความแตกต่างของค่า pI ซึ่งเป็น pH ที่ทำให้โปรตีนมีประจุรวม (net charge) เป็นศูนย์ โดยโปรตีนจะเคลื่อนที่อยู่ภายในเจลที่เป็น pH gradient ภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้าและหยุดการเคลื่อนที่ในตำแหน่งที่ตรงกับค่า pI เพราะในตำแหน่งนี้ประจุของโปรตีนจะมีค่าเป็นศูนย์ เจลที่แยกได้ในมิติ

ที่ 1 จะถูกเชื่อมเข้ากับ SDS-polyacrylamide gel และใช้เทคนิค SDS-PAGE ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้แยกโปรตีนออกจากกันตามมวลโมเลกุลของโปรตีน เพื่อทำการแยกโปรตีนในมิติที่ 2 โดยโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลมากจะเคลื่อนที่ได้ระยะทางน้อยกว่าโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลน้อย (Garfin, 2003) การตรวจหาจุดโปรตีนที่ได้จากเทคนิค 2D-PAGE ทำโดยการย้อมเจล ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การย้อมด้วยสี Coomassie blue การย้อมด้วยซิลเวอร์ และย้อมด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ เช่น Deep purple และ Sypro Ruby และสามารถศึกษารูปแบบโปรตีนที่แสดงออกในแต่ละเจลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์เข้ามาช่วยวิเคราะห์และเปรียบเทียบตำแหน่งของโปรตีนและความเข้ม (intensity) ของโปรตีนในแต่ละจุด (Wittmann-Liebold *et al.*, 2006)

สำหรับการศึกษาโปรตีนโอมิกส์ในเห็ดนั้นพบว่ามีการใช้เทคนิค 2D-PAGE ในการศึกษาโปรตีนโอมิกส์ในเห็ดหลายชนิด เช่น การศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนจากเส้นใยเจริญและดอกของเห็ดเข็มทอง (*Flammulina velutipes*) ในช่วงที่มีการสร้างดอกเห็ด พบว่ารูปแบบการแสดงออกของโปรตีน 4 ชนิด คือ FBA1, FBA2, FBA3 และ FBA4 ซึ่งคาดว่ามีความสัมพันธ์ในการจับยึดระหว่างเซลล์กับเซลล์ (cell-to-cell attachment) ที่แสดงออกในส่วนของดอกเห็ดและเส้นใยเจริญขณะถูกชักนำให้เกิดดอกเห็ดมีความแตกต่างกัน (Sakamoto *et al.*, 2000) และจากการศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในเห็ดหลินจือ (*Ganoderma lucidum*) 2 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์อิตาลีและจีน ซึ่งเจริญในสภาพได้รับอากาศ (aerial agglomerate) และสภาพจมอยู่ในอาหารเหลว (submerge agglomerate) พบว่าการแสดงออกของโปรตีนในเห็ดทั้ง 2 สายพันธุ์ที่เจริญในสภาพได้รับอากาศมีความแตกต่างกัน โดยสายพันธุ์จีนมีโปรตีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นมากกว่า 21 ชนิด ส่วนสายพันธุ์อิตาลีมีเพียง 8 ชนิด สำหรับการแสดงออกของโปรตีนจากเห็ดที่เจริญในสภาพที่จมในอาหารเหลว พบว่ามีความแตกต่างกันทั้งในเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณในทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์จีนมีการแสดงออกของโปรตีนที่เพิ่มขึ้นมากกว่า 37 ชนิดและมีโปรตีน 26 ชนิดที่แสดงออกอย่างเด่นชัดเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อิตาลี (Saltarelli *et al.*, 2009)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เห็ดกระดุม

เห็ดกระดุมเขตร้อน (*Agaricus sp.*) เก็บจากบริเวณหลังคณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม ส่วนเห็ดกระดุมเขตนาวหรือเห็ดแชมปิญอง (*Agaricus bisporus*) ได้จากเห็ดที่วางขายเป็นการค้า

2. อุปกรณ์และสารเคมี

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วย อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอและการทำปฏิกิริยา PCR ได้แก่ เครื่องทำปฏิกิริยา PCR (Amplifon[®] II, Thermolyne), เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์, ชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส, เครื่องถ่ายภาพเจล (ImageMaster[®] VDS, Pharmacia Biotech), ไมโครปิเปต, หลอดทำปฏิกิริยา PCR แบบผนังบางขนาด 500 ไมโครลิตร, เครื่องปั่นเหวี่ยง, หลอดไมโครเซนตริฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร, ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส, ตู้เย็น -70 องศาเซลเซียส อุปกรณ์ในการทำ 2D gel electrophoresis ได้แก่ Multiphor[®] II Electrophoresis System, Power Supply EPS 3500, MultiTemp III Thermostatic Circulator, Hoefer[®] SE 600 Series (Pharmacia Biotech) และอุปกรณ์ห้องทดลองอื่นๆ

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วย สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอและการทำปฏิกิริยา PCR ได้แก่ ชุดสกัดดีเอ็นเอ Genomic DNA Purification Kit (Fermentas), TE buffer, 2X Go Taq[®] Green Master Mix (Promega), ดีเอ็นเอต้นแบบ, ไพรมเมอร์, ชุดสกัดดีเอ็นเอออกจากเจล GENE CLEAN II Kit (BIO 101), Agarose gel, TBE buffer, Ethidium bromide (EtBr), GeneRuler[™] 100 bp DNA Ladder Plus สารเคมีในการทำ 2D gel electrophoresis ได้แก่ Immobiline[™] DryStrip, pH 3-10 (13 เซนติเมตร), IPG Buffer, pH 3-10, ชุด 2-D Clean-Up Kit, Immobiline DryStrip Cover Fluid, Urea, CHAPS, Dithiothreitol (DTT), Iodoacetamide, Bromophenol blue, Acrylamide, N,N'-methylenebisacrylamide, Sodium dodecyl sulfate,

NNN'N'-Tetrametyletylenediamine (TEMED), Ammonium persulfate (APS), Tris, Glycine, PageSilver™ Silver Staining Kit (Fermentus), PageRuler™ Unstained Protein Ladder, Bovine serum albumin(BSA), Bradford solution และสารเคมีอื่นๆ

วิธีการ

1. การจำแนกชนิดของเห็ด

1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ด

บันทึกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างเห็ดเขตร้อนที่พบบริเวณหลังตึกคณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม ตามรูปร่างและลักษณะต่างๆ ได้แก่ ลักษณะของหมวกเห็ด ก้านดอก ครีบ และสปอร์

การจำแนกชนิดของเห็ด โดยดูจากลักษณะทางกายภาพและใช้แหล่งอ้างอิงต่างๆ (อนงศ์, 2544; ราชบัณฑิตยสถาน, 2550; อนงศ์, 2551; Largent *et al.*, 1977; Arora, 1986) เพื่อนำไปใช้จัดจำแนกตัวอย่างเห็ดในเบื้องต้น

1.2 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Internal transcribed spacer (ITS)

1.2.1 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเห็ด

โดยตัดดอกเห็ดเป็นชิ้นขนาดเล็กแล้วบดใน โกร่งที่เย็นด้วยไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงละเอียดถ่ายใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอต่อไป

การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุด Genomic DNA Purification Kit (Fermentas) ด้วยการเติม TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA) ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อตัวอย่างเห็ด 100 มิลลิกรัม ตามด้วยการเติม lysis solution ปริมาตร 400 ไมโครลิตรเพื่อให้เซลล์แตก บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตกตะกอนโปรตีนโดยใช้คลอโรฟอร์ม ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมโดยกลับหลอด 3-5 ครั้ง บั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที นำส่วนใสมาตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม 1X precipitation solution ปริมาตร 800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดเป็นเวลา 2 นาที นำไปบั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ด้วย NaCl ความเข้มข้น 1.2 โมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติม RNaseA ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อย่อย RNA เติม absolute ethanol แชนเย็น ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอน บั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol แชนเย็น ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำให้ตะกอนแห้ง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

1.2.2 การตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

ตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง UV ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ โดยการหาอัตราส่วนของ A_{260}/A_{280} ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส บน agarose gel ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TBE buffer ที่มี Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus)

1.2.3 การเพิ่มลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Internal transcribed spacer (ITS)

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ซึ่งอยู่ในส่วนของ ribosomal DNA (rDNA) โดยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้โพรบิกดีเอ็นเอของเห็ดจากข้อ 1.2.1 เป็นต้นแบบ และใช้ไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มชิ้นส่วน ITS ในส่วน forward primer เป็น ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') และในส่วน reverse primer เป็น ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White *et al.*, 1990)

หลอดปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 1 ไมโครลิตร 2X Go Taq[®] Green Master Mix 25 ไมโครลิตร 10 μ M primer ITS1 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 10 μ M primer ITS4 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 28 ไมโครลิตร ใช้เครื่อง Thermal Cycler (Amplifon[®] II, Thermolyne) สภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา คือ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นทำปฏิกิริยาซ้ำ 30 รอบ โดยกำหนด denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

ตรวจสอบผลผลิต PCR โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส บน agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TBE buffer ที่มี Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที วิเคราะห์ขนาดของแถบดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus) ตรวจสอบผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตและบันทึกภาพ

1.2.4 การแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและการทำให้บริสุทธิ์

แยกดีเอ็นเอจาก agarose gel โดยใช้ชุดสกัด GENECLEAN II Kit (BIO 101) โดยตัดแถบดีเอ็นเอจาก agarose gel ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม TBE modifier 0.5 เท่า และ NaI solution 4.5 เท่าของปริมาตรชิ้นวุ้น ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลาย GLASSMILK ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่อปริมาตรสารละลาย 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที ผสมให้เข้ากันด้วยการกลบหลอดทุก 1-2 นาที บั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วินาที เทส่วนใสทิ้ง เติม New

Wash Solution 500 ไมโครลิตร ละลายตะกอนด้วยการปั่นขึ้น-ลง บั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วินาที ล้างตะกอนด้วย New Wash Solution อีกครั้งตามขั้นตอนเดิม เท ส่วนใสทิ้งแล้วปล่อยให้ตะกอนแห้ง เติมน้ำปราศจากเชื้อปริมาณเท่ากับปริมาตรสารละลาย GLASSMILK กระจายตะกอนให้ทั่วด้วยการปั่นขึ้น-ลง บั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เก็บส่วนใสที่มีดีเอ็นเอละลายอยู่ในใส่หลอดใหม่ เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในขั้นตอนการวิเคราะห์หาลำดับเบสต่อไป

1.2.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง Automated DNA Sequencer โดยห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม เปรียบเทียบข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GENBANK, DDBJ และ EMBL ด้วยโปรแกรม BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) และ ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>) และสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA package version 4.0.2

2. การศึกษายีนที่สร้าง hydrophobin (*hypA*) ในเห็ดกระดุมเขตร้อน

2.1 การออกแบบและสังเคราะห์ไพรเมอร์สำหรับยีน *hypA*

ออกแบบไพรเมอร์จากข้อมูลลำดับเบสของยีน *hypA* ของเห็ดกระดุม *Agaricus bisporus* ซึ่งเป็นเห็ดกระดุมเขตนาวที่อยู่ในสกุลเดียวกับตัวอย่างเห็ดที่ศึกษาจากฐานข้อมูล GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ได้ไพรเมอร์สำหรับ forward primer hypAF (5' CTCATTCTTAGCTCTTACAAC3') และ reverse primer hypAR (5' AACGAAAGATAATACCAAGGC 3') สังเคราะห์ไพรเมอร์โดยห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม

2.2 การโคลนยีน *hypA*

โคลนยีน *hypA* ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอ จากข้อ 1.2.1 เป็นต้นแบบ ส่วนผสมของปฏิกิริยาเช่นเดียวกับข้อ 1.2.3 โดยใช้ 10 μ M primer *hypAF* ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ 10 μ M primer *hypAR* ปริมาตร 1 ไมโครลิตร

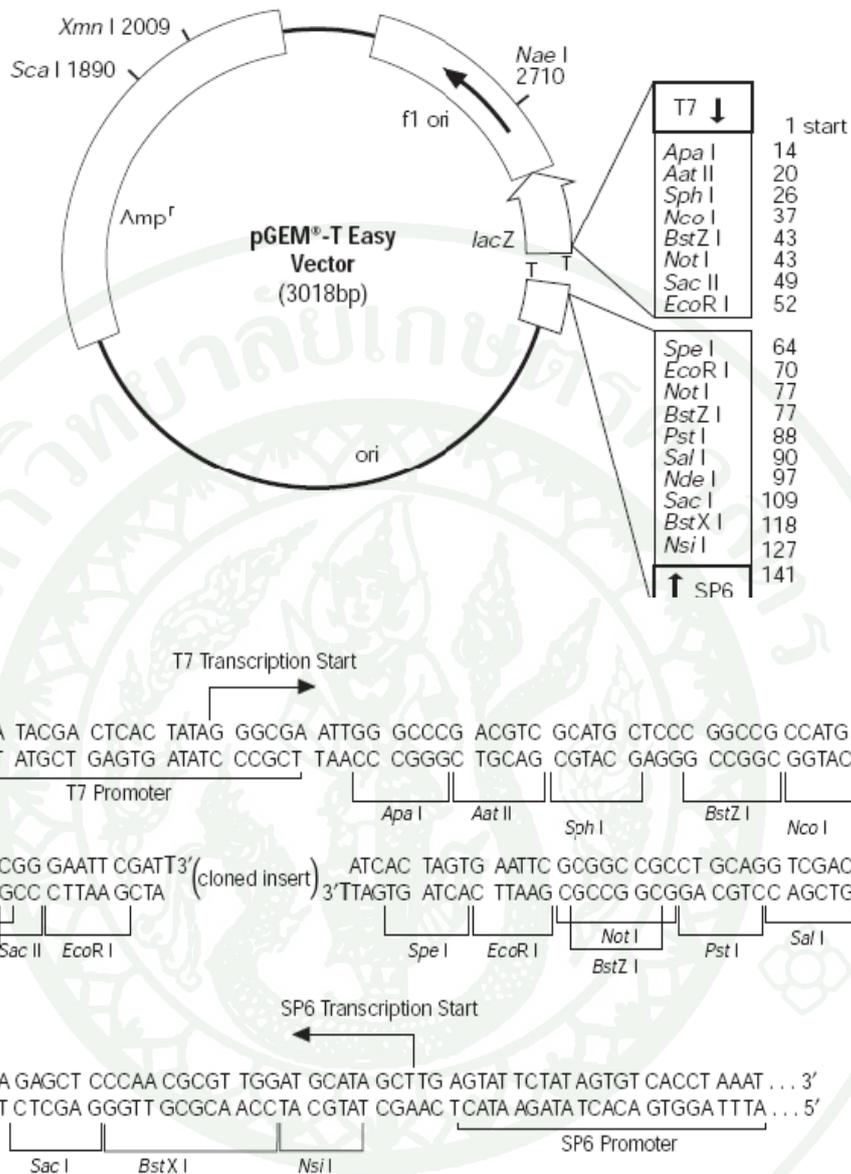
ตรวจสอบผลผลิต PCR โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสบน agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 1X TBE buffer ที่มี Ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที วิเคราะห์ขนาดของแถบดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus)

2.3 การแยกชิ้นส่วนของยีน *hypA* จากเจลและการทำให้บริสุทธิ์

สกัดดีเอ็นเอออกจาก agarose gel โดยใช้ชุดสกัด GENECLEAN II Kit (BIO 101) ตามวิธีการในข้อ 1.3 และนำสารละลายดีเอ็นเอที่ได้มาทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์อีกครั้งด้วยชุด QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) โดยเติม PB buffer ปริมาตรเป็น 5 เท่าของสารละลายดีเอ็นเอ และผสมให้เข้ากันบรรจุลงในคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้ง ล้างด้วย PE buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นนำคอลัมน์วางลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่แล้วชะดีเอ็นเอที่จับกับเรซินอยู่โดยใช้ EB buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที นำดีเอ็นเอบริสุทธิ์เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

2.4 การเชื่อมต่อชิ้นส่วนของยีน *hypA* กับพลาสมิด

ในการเชื่อมต่อชิ้นส่วนของยีน *hypA* ใช้พลาสมิด pGEM[®]-T Easy vector (Promega) และใช้อัตราส่วนของยีน *hypA* : พลาสมิด เท่ากับ 3:1 โดยส่วนประกอบของปฏิกิริยา 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2X rapid ligation buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร pGEM[®]-T Easy Vector (50 นาโนกรัม) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ชิ้นส่วนยีน *hypA* (insert) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร T4 DNA ligase (3 Weiss Units/ μ l) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และน้ำปราศจากประจุปริมาตร 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน



ภาพที่ 15 pGEM[®]-T Easy vector แสดง promoter และ multiple cloning sequence
 ที่มา: Promega (1998)

2.5 การเตรียมเซลล์แบคทีเรีย (competent cell) สำหรับกระบวนการถ่ายยีน

เตรียม competent cell ตามวิธีของ Sambrook และคณะ (1989) โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* DH5 α ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน คู่เชื้อแบคทีเรียใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อแบคทีเรียใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาทีปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนเซลล์ด้วย CaCl₂ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่แช่เย็น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนเซลล์ด้วย CaCl₂ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่แช่เย็น ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แบ่งสารละลายเซลล์ที่ได้ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ หลอดละ 100 ไมโครลิตร นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เพื่อเอาไว้ใช้ในการถ่ายยีนต่อไป

2.6 การถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (transformation)

การถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* DH5 α ใช้วิธี Heat-shock โดยเติมพลาสมิด pGEM[®]-T Easy ที่มียีน *hypA* ปริมาตร 4 ไมโครลิตรใส่ในหลอดที่มี competent cell ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกหลอดไปมาเบา ๆ แช่หลอดในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที ถ่ายยีนโดยการจุ่มในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที และแช่ในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 2 นาที เติมอาหาร SOC ปริมาตร 900 ไมโครลิตร เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง นำเซลล์แบคทีเรียปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB ที่มี ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เพื่อคัดเลือกโคโลนีสีขาวซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ได้รับการถ่ายยีนเพื่อใช้ในการสกัดพลาสมิดในขั้นตอนต่อไป

2.7 การสกัดพลาสมิด

คัดเลือกโคโลนีของ *E. coli* DH5 α ที่มีสีขาว นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มี ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เชื้อเชื้อปริมาณ 1.5 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที นำตะกอนเซลล์มาสกัดพลาสมิดโดยใช้ชุด QIAprep Miniprep (QIAGEN) โดยละลายตะกอนเซลล์ด้วย Buffer P1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วถ่ายสารละลายเซลล์ที่ได้ใส่หลอดใหม่ เติม Buffer P2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการคว่ำหลอดเบาๆ 4-6 ครั้ง เติม Buffer N3 ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทันทีด้วยการคว่ำหลอดเบาๆ 4-6 ครั้ง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ใส่ลงใน QIAprep spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้ง ล้างคอลัมน์ด้วยการเติม Buffer PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทของเหลวทิ้ง ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเป็นเวลา 1 นาที นำคอลัมน์ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

2.8 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน *hypA*

วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดสายผสมที่คัดเลือกได้ด้วยเครื่อง Automated DNA Sequencer โดยห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม และเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจากฐานข้อมูล GENBANK, DDBJ และ EMBL ด้วยโปรแกรม BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hypA* จากฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>)

2.9 การศึกษาลำดับกรดอะมิโนและโครงสร้างของยีน *hypA*

วิเคราะห์โครงสร้างยีนจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้และทำนายลำดับกรดอะมิโนของยีน *hypA* จากหีตक्रमเซตร้อน KPS1 ด้วยโปรแกรม FGESH (www.softberry.com) วิเคราะห์หาโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ด้วยโปรแกรม CLC Protein Workbench 5.4 และทำนายโครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) ด้วยโปรแกรม Cn3D 4.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/CN3D/cn3d.shtml>)

3. การศึกษาโปรตีนจากหีตक्रम

3.1 การวิเคราะห์โปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGE

สกัดโปรตีนจากดอกและเส้นใยของหีตक्रम *A. bitorquis* KPS1 โดยใช้ Lysis solution (ดูในภาคผนวก) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที วิเคราะห์สารละลายโปรตีนที่ได้โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE (10% separating gel และ 4% stacking gel) วิเคราะห์แถบโปรตีนโดยย้อมด้วย Coomassie brilliant blue-R250 เปรียบเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน

3.2 การวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 2 มิติ (2D-PAGE)

3.2.1 การสกัดและการเตรียมตัวอย่างโปรตีนจากดอกหีต

นำดอกหีตมาตัดให้เป็นชิ้นขนาดเล็กแล้วบดในโกร่งที่แช่เย็นด้วยไนโตรเจนเหลวจนเป็นผงละเอียด ถ่ายใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Lysis solution (ดูในภาคผนวก) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อตัวอย่างหีต 100 มิลลิกรัม ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ใส่น้ำใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์โดยใช้ชุด 2-D Clean-up Kit (GE Healthcare) โดยเตรียมสารละลายโปรตีนปริมาตร 1-100 ไมโครลิตรที่มีความเข้มข้น 1-100 ไมโครกรัมใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ตกตะกอนโปรตีนโดยเติม Precipitant 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที เติม Co-precipitant 300 ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใสทิ้งด้วยความระมัดระวัง เติม Co-precipitant 40 ไมโครลิตรโดยไม่ให้รับกวนตะกอน แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใสทิ้ง เติมน้ำปราศจากประจุปริมาณ 25 ไมโครลิตร กระจายตะกอนด้วยการ vortex เป็นเวลา 5-10 วินาที เติม Wash buffer (แช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ Wash additive ปริมาตร 5 ไมโครลิตร กระจายตะกอนด้วยการ vortex จนสมบูรณ์ แช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที กระจายตะกอนด้วยการ vortex เป็นเวลา 20-30 วินาที ทุกๆ 10 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใสทิ้งด้วยความระมัดระวัง ปล่อยให้ตะกอนแห้งในอากาศไม่เกิน 5 นาที ละลายตะกอนด้วย Rehydration solution ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสซึ่งเป็นสารละลายโปรตีนเก็บที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.2.2 การวัดปริมาณโปรตีน

วัดปริมาณโปรตีนในตัวอย่างหัด โดยใช้วิธีเบรดฟอร์ด (Bradford, 1976) เปรียบเทียบกับสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA (Bovine serum albumin) วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 595 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

3.2.3 การเตรียม Immobiline DryStrip

เป็นการเตรียมเพื่อแยกโปรตีนในมิติที่ 1 ตามค่า pI (isoelectric point) โดยใช้ Immobiline DryStrip ที่มีช่วง pH 3-10 ความยาว 13 เซนติเมตร ทำโดย reswell Immobiline DryStrip (GE Healthcare) โดยใช้ปริมาณโปรตีนตัวอย่าง 100 ไมโครกรัม ผสมสารละลายโปรตีนกับ Rehydration solution โดยให้มีปริมาตรสุทธิเท่ากับ 250 ไมโครลิตร ใส่สารละลายทั้งหมดลงใน reswelling tray แล้ววาง Immobiline DryStrip ลงไปใน tray โดยคว่ำด้านที่เป็นเจลลงและไม่เกิดฟองอากาศ หลังจากนั้นใช้ Immobiline DryStrip Cover Fluid จำนวน 3 มิลลิลิตร ปิดทับด้านบนเพื่อป้องกันการระเหยของสารละลายโปรตีน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10-24 ชั่วโมง เพื่อให้สารละลายโปรตีนดูดซึมเข้าไปในเจล

3.2.4 การแยกโปรตีนในมิติที่ 1

นำ Immobiline DryStrip ที่ผ่านการ reswell และใส่สารละลายโปรตีน ตัวอย่างเรียบร้อยแล้วมาแยกภายใต้สนามไฟฟ้า โดยใช้เครื่อง Multiphor[®] II Electrophoresis System ใช้ความต่างศักย์ 300 โวลต์ เป็นเวลา 1 นาที , ความต่างศักย์ 1000 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง, ความต่างศักย์ 2500 โวลต์ เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง และความต่างศักย์ 500 โวลต์ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่อง MultiTemp III Thermostatic Water Circulator เมื่อแยกโปรตีนในมิติที่ 1 เรียบร้อยแล้วสามารถเก็บรักษา Immobiline DryStrip ไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

3.2.5 การแยกโปรตีนในมิติที่ 2

แยกโปรตีนในมิติที่ 2 ตามน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยนำ Immobiline DryStrip ที่ผ่านการแยกในมิติที่ 1 มา Equilibrate โดยการแช่ในสารละลาย Equilibration buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มี Dithiothreitol (DTT) 100 มิลลิกรัม เขย่าที่ความเร็ว 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เติสารละลายทิ้ง หลังจากนั้นเติมสารละลาย Equilibration buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มี Iodoacetamide (IAA) 250 มิลลิกรัม เขย่าที่ความเร็วรอบ 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เติสารละลายทิ้ง แล้วนำ Immobiline DryStrip ไปแยกโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยนำ Immobiline DryStrip มาวางบนแผ่น polyacrylamide gel ความเข้มข้น 12.5 เปอร์เซ็นต์ ใช้ PageRuler[™] Unstained Protein Ladder (Fermentas) เป็นโปรตีนมาตรฐาน หลังจากนั้นใส่ agarose gel ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเชื่อมเจลทั้งสองเข้าด้วยกันด้วย แยกโปรตีนในมิติที่ 2 โดยใช้กระแสไฟฟ้า 15 มิลลิแอมแปร์และความต่างศักย์ 300 โวลต์ เป็นเวลา 15 นาที และเปลี่ยนเป็นกระแสไฟฟ้า 40 มิลลิแอมแปร์และความต่างศักย์ 300 โวลต์ เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง ควบคุมอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส

3.2.6 การย้อมสีโปรตีน

ใช้ชุดย้อมโปรตีนสำเร็จรูป PageSilver[™] Silver Staining Kit (Fermentas) โดยนำแผ่น polyacrylamide gel มาล้างด้วยน้ำปราศจากประจุ แล้วแช่ลงในสารละลาย Gel fixing solution 1 (ดูในภาคผนวก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24

ชั่วโมง เทสสารละลายทิ้ง แล้วแช่แผ่นเจลลงในสารละลาย Gel fixing solution 2 (ดูในภาคผนวก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็ว 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เทสสารละลายทิ้ง ทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง ล้างแผ่นเจลด้วยน้ำปราศจากประจุ 2 ครั้งๆ ละ 20 วินาที เติม Sensitizing solution ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าด้วยมือเป็นเวลา 1 นาที เทสสารละลายทิ้ง ล้างแผ่นเจลด้วยน้ำปราศจากประจุ 2 ครั้งๆ ละ 20 วินาที เทสสารละลายทิ้ง เติม Staining solution เขย่าที่ความเร็ว 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เทสสารละลายทิ้ง ล้างแผ่นเจลด้วยน้ำปราศจากประจุ 2 ครั้งๆ ละ 20 วินาที เทสสารละลายทิ้ง เติม Developing solution เขย่าจนกว่าจุดของโปรตีนจะปรากฏตามต้องการ ใช้เวลาประมาณ 5 นาที เทสสารละลายทิ้ง หยุดปฏิกิริยาด้วย Stop solution เขย่าที่ความเร็ว 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทสสารละลายทิ้ง แช่เจลใน 4% glycerol ทำให้เจลแห้งโดยใช้ gel dryer

3.2.7 การวิเคราะห์จุดโปรตีนจาก 2D-PAGE

สแกนภาพเจลที่ได้จากการย้อมโปรตีนนำมาวิเคราะห์ตำแหน่งและจำนวนของจุดโปรตีนจากแผ่นเจล ด้วยโปรแกรม Dymension Revolutionary 2DGE

3.3 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วย LC-MS/MS

นำจุดโปรตีนที่คัดเลือกมาหามวลโมเลกุลของเปปไทด์ โดยส่งตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ณ ห้องปฏิบัติการโปรตีโอมิกส์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ แล้วนำผลการวิเคราะห์มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน โดยใช้โปรแกรม MASCOT (<http://www.matrixscience.com/>)

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

ระยะเวลาในการทดลอง

เริ่มทำการวิจัยตั้งแต่ เดือนมิถุนายน 2550 ถึง เดือนเมษายน 2553

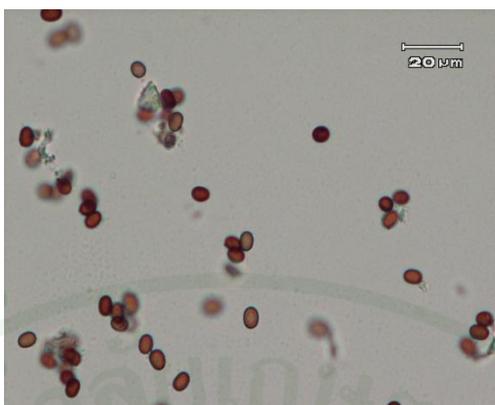
ผลและวิจารณ์

1. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ด

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอย่างเห็ดกระดุมเขตร้อน KPS1 ที่พบบริเวณ หลังคณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม พบว่า หมวกเห็ดเป็นรูปกระทะคว่ำและมีสีขาว ขอบหมวกเรียบ ก้านดอกสีขาวติดตรงกลางหมวกเห็ด มี ส่วนของวงแหวน (ring) 2 ชั้นติดอยู่ที่ก้านดอก ครีบหมวกไม่ยึดติดกับก้านดอกและไม่มีส่วนของ เปลือกหุ้มโคนดอก (volva) (ภาพที่ 16) สปอร์ของเห็ดมีจำนวน 4 สปอร์ต่อ 1 เบซิเดียม ลักษณะ เรียบ รูปรีและมีสีน้ำตาล (ภาพที่ 17) และพบในสภาพอากาศเขตร้อน ซึ่งจากลักษณะสัณฐานวิทยา ดังกล่าวตรงกับลักษณะของเห็ดกระดุม *Agaricus bitorquis* ซึ่งเป็นเห็ดกระดุมที่กินได้ รสชาติดี และพบในเขตร้อน (อนงค์, 2544; ราชบัณฑิตยสถาน, 2550; อนงค์, 2551; Largent *et al.*, 1977; Arora, 1986)



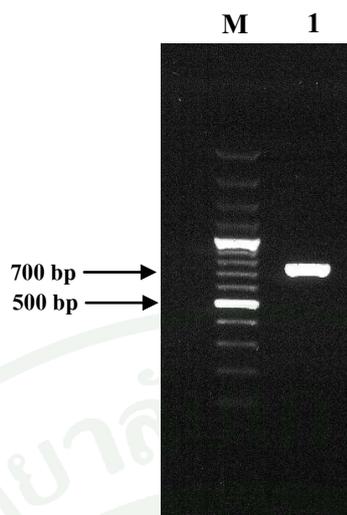
ภาพที่ 16 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดกระดุมเขตร้อน KPS1 ซึ่งพบภายใน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม



ภาพที่ 17 ลักษณะสปอร์ของเห็ดกระดุมเขตร้อน KPS1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2. การจัดจำแนกเห็ดกระดุมโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) ของ rDNA

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของตัวอย่างเห็ดกระดุมเขตร้อน KPS1 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 แล้วตรวจสอบผลด้วย 1% agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส (ภาพที่ 18)



ภาพที่ 18 แถบดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของ rDNA ของเห็ดกระดุม
เขตร้อน KPS1 (1) โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน
100 bp DNA ladder plus (M)

เมื่อนำแถบดีเอ็นเอที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 689 คู่เบส (ภาพที่ 19) ซึ่งเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปวิเคราะห์โดยเปรียบเทียบความเหมือน (identity) กับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GENBANK, DDBJ และ EMBL ด้วยโปรแกรม BLASTN และทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทีละคู่ด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ที่ได้จากเห็ดกระดุม KPS1 มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของเห็ดกระดุม *A. bitorquis* มากที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) 98% (ภาพที่ 20) ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของเห็ดกระดุม *A. bisporus* พบว่ามีความเหมือนกันเพียง 95% (ภาพที่ 21) ซึ่งแสดงว่าบริเวณ ITS ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความแปรปรวนสูงในเห็ดราแต่ละชนิด สามารถใช้จัดจำแนกชนิดของเห็ดในระดับสปีชีส์ได้เป็นอย่างดี (Gardes *et al.*, 1991) และเมื่อนำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS จากเห็ดสกุล *Agaricus* ที่รายงานในฐานข้อมูลเพื่อนำมาวิเคราะห์ Phylogenetic tree โดยโปรแกรม MEGA 4.0.2 พบว่าเห็ดกระดุมเขตร้อน KPS1 มีความใกล้เคียงกับเห็ดกระดุมเขตร้อน *A. bitorquis* มากที่สุดและแตกต่างจาก *A. bisporus* (ภาพที่ 22) เมื่อพิจารณาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล พบว่าเห็ดกระดุมเขตร้อน KPS1 ที่ศึกษา คือ เห็ดกระดุม *A. bitorquis* ซึ่งเป็นเห็ดกระดุมเขตร้อนที่อยู่ในสกุลเดียวกับเห็ดกระดุม *A. bisporus* ซึ่งเป็นเห็ดกระดุมเขตนาว (Elliott, 1982)

1 TTTTCTAGAT GGGTTGTAGC TGGCTCTTCG GAGCATGTGC ACGCCTGTCT
 51 GGACTTCATT TTCATCCACC TGTGCACTTT TTGTAGTCTT TTTCAGGTAT
 101 TGAAGGAAGT GGTCAAGTTA TCAGCCCTTG CTGGATATAA GGACTTGCAG
 151 TGTGTAATCA GTGCTGTTCT TTACCCCTGA CTATGGAATC TCTTTCCTGT
 201 CGGAGACTAT GTTATTCATT ATACTCTGTA GAATGTCATT GAATGTCTTT
 251 ACGTGGGCTT GTATGCCTAT GAAAATTATT ATACAACCTT CAGCAACGGA
 301 TCTCTTGGCT CTCGCATCGA TGAAGAACGC AGCGAAATGC GATAAGTAAT
 351 GTGAATTGCA GAATTCAGTG AATCATCGAA TCTTTGAACG CATCTTGCAG
 401 TCCTTGGTAT TCCGAGGAGC ATGCCTGTTT GAGTGTCAAT ATATTCTCAA
 451 CTCCCCAATA CTTTGTGTA AAGGAGAGCT TGGATTGTGG AGGCTTGCTG
 501 GCTACTTGCT TGCAGTCAGC TCCTCTGAAA TGCATTAGCA GAACCGTCTG
 551 TGATCTGCCA CAAGTGTGAT AAATTATCTA CACTAGCGAG GGGATTGCTT
 601 TCTGTGATGT TCAGCTTCTA ATCGTCTTAG GACAATTTCT TGAATGCTTG
 651 ACCTCAAATC AGGTAGGACT ACCCGCTGAA CTTAAGCAT

ภาพที่ 19 ลำดับนิวคลีโอไทด์จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS1 ของ rDNA
 ของเห็ดกระดุมเขตร้อน KPS1 โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4

```

KPS1          -----TTTTCTAGATGGGTTGTAGCTGGCTCTTCGGAGCATGTGCACGCCTGTCT 50
A.bitorquis  TTGAATTATGTTTTCTAGATGGGTTGTAGCTGGCTCTTCGGAGCATGTGCACGCCTGTCT 60
                *****

KPS1          GGACTTCATTTTCATCCACCTGTGCACCTTTTTGTAGTCTTTTTTCAGGTATTGAAGGAAGT 110
A.bitorquis  GGACTTCATTTTCATCCACCTGTGCACCTTTTTGTAGTCTTTTTTCAGGTATTGAAGGAAGT 120
                *****

KPS1          GGTCAGTTTATCAGCCCTTGTGCGATATAAGGACTTGCAGTGTGTAATCAGTGCTGTCT 170
A.bitorquis  GGTCAGTTTATCAGCCCTTGTGCGATATAAGGACTTGCAGTGTGTAATCAGTGCTGTCT 180
                *****

KPS1          TTACCCTTGACTATGGAATCTCTTTCTGTGCGAGACTATGTTATTCACTACTCTGTA 230
A.bitorquis  TTACCCTTGACCATGGAATCTCTTTCTGTGCGAGACTATGTTATTCACTACTCTGTA 240
                *****

KPS1          GAATGTCATTGAATGTCTTTACGTGGGCTTGTATGCCTATGAAAATTATTACAACCTT 290
A.bitorquis  GAATGTCATTGAATGTCTTTACGTGGGCTTGTATGCCTATGAAAATTATTACAACCTT 300
                *****

KPS1          CAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT 350
A.bitorquis  CAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAAT 360
                *****

KPS1          GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGGCTCCTTGGTAT 410
A.bitorquis  GTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGGCTCCTTGGTAT 420
                *****

KPS1          TCCGAGGAGCATGCCTGTTTGTAGTGCATTATATTCTCAACTCCCCAATACTTTGTTGTA 470
A.bitorquis  TCCGAGGAGCATGCCTGTTTGTAGTGCATTATATTCTCAACTCCCCAATACTTTGTTGTA 480
                *****

KPS1          AAGGAGAGCTTGGATTGTGGAGGCTTGCTGGCTACTTGCTTGCAGTCAGCTCCTCTGAAA 530
A.bitorquis  AAGGAGAGCTTGGATTGTGGAGGCTTGCTGGCCACTTGCTTGGCGTACGCTCCTCTGAAA 540
                *****

KPS1          TGCATTAGCAGAACCGTCTGTGATCTGCCACAAGTGTGATAAATTATCTACACTAGCGAG 590
A.bitorquis  TGCATTAGCAGAACCGTCTGTGATCTGCCACAAGTGTGATAAATTATCTACACTAGCGAG 600
                *****

KPS1          GGGATTGCTTTCTGTGATGTTTCAGCTTCTAATCGTCTTAGGACAATTTCTTGAATGCT 648
A.bitorquis  GGGATTGCTTTCTGTGATGTTTCAGCTTCTAATCGTCTTAGGACAATTTCTTGAATGCT 658
                *****

```

ภาพที่ 20 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ rDNA ของเห็ดกระดุมเขตร้อน KPS1 กับเห็ดกระดุม *A. bitorquis* ซึ่งมีความเหมือนกัน 98%

```

KPS1 -----TTTTCTAGATGGGTTGTAGCTGGCTCTTCGGAGCATGTGC 40
A.bisporus AGGATCATTATTGAATTATGTTTTCTAGATGGGTAGTAGCTGGCTCTTCGGAGCATGTGC 60
*****

KPS1 ACGCCTGTCTGGACTTCATTTTCATCCACCTGTGCACTTTTTGTAGCTTTTTTCAGGTAT 100
A.bisporus ACGCCTGTCTGGACTTCATTTTCATCCACCTGTGCACTTTTTGTAGCTTTTTTCAGGTAT 120
*****

KPS1 TGAAGGAAGTGGTCAGTTTATCAGCCCTTGCTGGATATAAGGACTTGCAGTGTGTAATCA 160
A.bisporus TGAAGGAAGTGGTCAGTTTATCAGCCCTTGCTGGATATAAGGACTTGCAGTGTGTAATCA 180
*****

KPS1 GTGCTGTTCTTTACCCTTGACTATGGAATCTCTTTCTGTCGGAGACTATGTTATTTCATT 220
A.bisporus GTGCTGTTCTTTACCCTTGACTATGGAATCTCTTTCTGTCGGAGACTATGTTATTTCATT 240
*****

KPS1 ATACTCTGTAGAATGTCATTGAATGTCTTTTACGTGGGCTTGTATGCCTATGAAAATTATT 280
A.bisporus ATACTCTGTACAATGTCATTGAATGTCTTTTACGTGGGCTTGTATGCCTATGAAAATTATT 300
*****

KPS1 ATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC 340
A.bisporus ATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC 360
*****

KPS1 GATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCGC 400
A.bisporus GATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCGC 420
*****

KPS1 TCCTTGGTATTCAGGAGCATGCCTGTTTGTAGTGCATTATATTCTCAACTCCCCAATA 460
A.bisporus TCCTTGGTATTCAGGAGCATGCCTGTTTGTAGTGCATTATATTCTCAACTCCCCGATA 480
*****

KPS1 CTTTGTGTAAAGGAGAGCTTGGATTGTGGAGGCTTGTGCTACTTGCTTGCAGTCAGC 520
A.bisporus CTTTGTGTAAAGGAGAGCTTGGATTGTGGAGGCTTGTGCTACTTGCTTGCAGTCAGC 540
*****

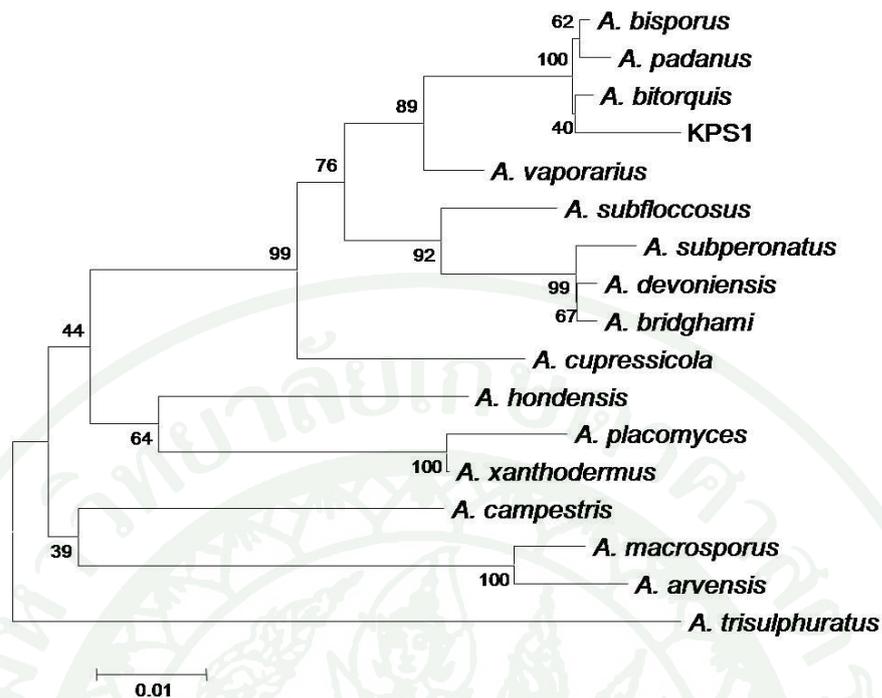
KPS1 TCCTCTGAAATGCATTAGCAGAACCGTCTGTGATCTGCCACAAGTGTGATAAATTATCTA 580
A.bisporus TCCTCTGAAATGCATTAGCAGAACCGTCTGTGATCTGCCACAAGTGTGATAAATTATCTA 600
*****

KPS1 CACTAGCGAGGGGATTGCTTTCTGTGATGTTTCAGCTTCTAATCGTCTTAGGACAATTTCT 640
A.bisporus CACTAGCGAGGGGATTGCTTTCTGTGATGTTTCAGCTTCTAATCGTCTTAGGACAATTTCT 660
*****

KPS1 TGAATGCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCAT 689
A.bisporus TGAATGCTTGACCTCAA----- 677
*****

```

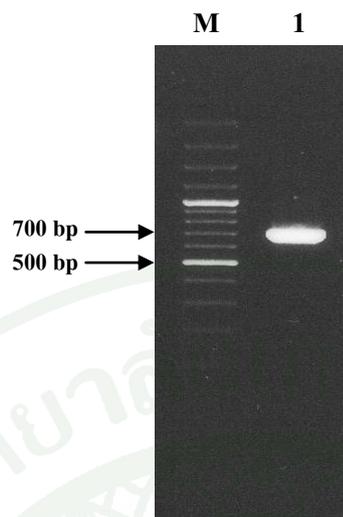
ภาพที่ 21 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ rDNA ของเห็ดกระดุมเขตร้อน KPS1 กับเห็ดกระดุม *A. bisporus* ซึ่งมีความเหมือนกัน 95%



ภาพที่ 22 Phylogenetic tree โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของ rDNA ของเห็ดกระดุมเขตร้อน KPS1 เปรียบเทียบกับเห็ดสกุล *Agaricus* ต่างๆ

2. การโคลนยีน *hypA* ในเห็ดกระดุม *A. bitorquis*

เนื่องจาก hydrophobin เป็น โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างดอกเห็ด การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง hydrophobin ของเห็ดกระดุมเขตร้อนเปรียบเทียบกับเห็ดกระดุมเขตหนาว อาจนำไปสู่ความเข้าใจเกี่ยวกับการสร้างดอกเห็ดและสามารถควบคุมให้เห็ดสร้างดอกในสภาพอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมหรือนอกฤดูกาลได้ ในงานวิจัยนี้ได้ทดลองโคลนยีน *hypA* ซึ่งเป็นยีนที่สร้างโปรตีน hydrophobin ในเห็ดกระดุม *A. bitorquis* KPS1 ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *hypAF* และ *hypAR* และทำการวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 1% agarose gel electrophoresis เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถโคลนยีน *hypA* ได้โดยแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดประมาณ 700 คู่เบส (ภาพที่ 23) และเมื่อนำมาวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าชิ้นส่วนของยีน *hypA* จากเห็ดกระดุม *A. bitorquis* KPS1 ที่ได้มีขนาด 646 คู่เบส (ภาพที่ 24) จากการเปรียบเทียบกับยีน hydrophobin ของเห็ดชนิดต่างๆ ในฐานข้อมูล GENBANK, DDBJ และ EMBL โดยใช้โปรแกรม BLASTN และ ClustalW พบว่ายีน *hypA* ของ *A. bitorquis* KPS1 มีความเหมือนกับยีน *hypA* ของเห็ดกระดุม *A. bisporus* มากที่สุด เท่ากับ 80% (ภาพที่ 25)



ภาพที่ 23 แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 คู่เบส ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน *hypA* ของเห็ดกระดุม *A. bitorquis* KPS1 (1) โดยใช้ไพรเมอร์ *hypAF* และ *hypAR* เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder plus (M)

1 **ATGTTCTCTC GCGTCCTTGT CGCTGCTCTT GTTGCTCTCC CCGTTCTCGT**
 51 **TTCT**gtgagt cgttgaccgc atgcgcctca ttgacttact caccgcgttt
 101 cgca**GCAAC TCCGGCCCC GGAAAGCCTC ACACCGGTGC GGCTAGTCAA**
 151 **TGCAACGTCG GTGAACTTCA TTGCT**gtaag tataatctcca tggcatcagc
 201 gcactccata ttctcagcga ctctcttcca g**GCAACACTC AGCAAACCCC**
 251 **CGACCACACC AGCGCCGCCG CATCTGGCTT GCTTGGTATT CCCATCAACC**
 301 **TTGGTGCTTT CCTCGGTTTC GACTGTACCC CCATTTCCGT CCTTGGCATC**
 351 **GGTGGCAATA ACTGTGCTGC TCAGCCTGTC TGCTGTGAAC AAAACCAATT**
 401 **C**gtgagctag agctttcggc cttttgactt acatttaaca cttttttca
 451 ttttag**ACTG GTTTGATTAA TGCTCTTGAC TGTTCTCCTG TCAATGTCAA**
 501 **CCTCTAG**AGA GGCTGATAGT TCCTTTCATT GACTCGAGAT TACTCGTAGG
 551 CTTGGAAAAG TAGTTCTAGT TTCATCGTCA GTATTCTCCG TGAAACAGGT
 601 TTTTCTTGTT CGTTTATGGG CCTCCGGATT GTTGTTTCCT CTTTTT

ภาพที่ 24 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hypA* ของเห็ดกระดุม *A. bitorquis* KPS1

โดยใช้ไพรเมอร์ hypAF และ hypAR แถบสีเหลือง คือ start codon (ATG) แถบสีฟ้า คือ coding sequence แถบสีแดง คือ stop codon (TAG) อักษรตัวพิมพ์เล็ก คือ intron

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนส่วนยีน *hypA* ที่ได้จากเห็ดกระดุม *A. bitorquis* KPS1 ไปวิเคราะห์โครงสร้างของยีนและทำนายลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม FGNSH พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นั้นประกอบด้วย coding sequence จำนวน 4 exon (ภาพที่ 26) โดย exon ที่ 1 ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 1-54, exon ที่ 2 ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 106-175, exon ที่ 3 ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 232-401 และ exon ที่ 4 ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 457-507 เมื่อเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนส่วนยีน *hypA* เป็นลำดับกรดอะมิโนพบว่า hydrophobin A (HYPA) เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วย 114 กรดอะมิโน ซึ่งใกล้เคียงกับโปรตีนที่ผลิตได้จากเห็ดกระดุม *A. bisporus* (ภาพที่ 26 และ 27)

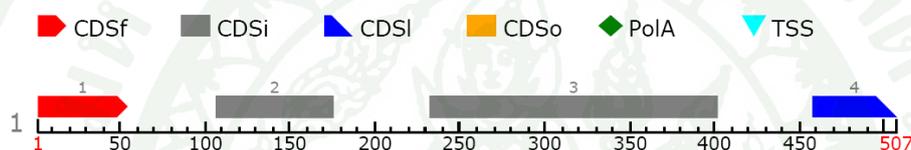
เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hypA* ของเห็ดกระดุม *A. bitorquis* KPS1 มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีนด้วยโปรแกรม BLASTP และ ClustalW พบว่าลำดับกรดอะมิโนของ hydrophobin จากเห็ดกระดุม *A. bitorquis* KPS1 มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน hydrophobin ที่สร้างจากยีน *hypA* ในเห็ดกระดุม *A. bisporus* มากที่สุด 88% (ภาพที่ 28) และพบบริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโน cysteine จำนวน 8 เรซิดิวส์ ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะที่พบในโปรตีน hydrophobin (Wessels, 1997)

เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ของโปรตีน hydrophobin (HYPA) โดยนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hypA* ของเห็ดกระดุม *A. bitorquis* KPS1 และลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน hydrophobin (HYPA) ของเห็ดกระดุม *A. bisporus* มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CLC Protein Workbench 5.4 พบว่าโปรตีน HYPA ที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของเห็ดกระดุม *A. bitorquis* KPS1 ประกอบด้วย 7 β -strand และ 1 α -helix มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 11.5 กิโลดาลตัน และมีค่า pI ประมาณ 5.5 ในขณะที่ HYPA จากเห็ดกระดุม *A. bisporus* ประกอบด้วย 6 β -strand และ 2 α -helix มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 11.19 กิโลดาลตัน และมีค่า pI ประมาณ 5.14 (ภาพที่ 29 และ 30) และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้ไปทำนายโครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) ด้วยโปรแกรม Cn3D 4.1 โดยใช้โครงสร้างสามมิติของโปรตีน EAS ของรา *Neurospora crassa* ซึ่งเป็นโปรตีน hydrophobin ใน class I เป็นฐานข้อมูลเพื่อใช้ในการทำนายโครงสร้างสามมิติของโปรตีน พบว่าสามารถทำนายโครงสร้างสามมิติของโปรตีน hydrophobin (HYPA) จากเห็ดกระดุม *A. bitorquis* KPS1 และเห็ดกระดุม *A. bisporus* ได้ซึ่งประกอบด้วย 6 β -strand ที่เหมือนกัน (ภาพที่ 31 และ 32)

เมื่อเปรียบเทียบทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากยีน *hypA* ของเห็ด
 กระจุกเขตร้อน *A. bitorquis* KPS1 กับเห็ดกระจุก *A. bisporus* ซึ่งเป็นเห็ดเขตหนาวนั้นเห็นได้ว่ามี
 ความเหมือนกันมากทั้งในส่วน โครงสร้างของยีนและการแสดงออกของ โปรตีน เนื่องจากยีนที่สร้าง
 โปรตีน hydrophobin เป็นกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกอย่างสูงและเกี่ยวข้องกับการพัฒนาโครงสร้าง
 ต่างๆ ของรา (De Groot *et al.*, 1996; Lugones *et al.*, 1999) ทำให้มีการนำยีนที่สร้าง hydrophobin
 มาใช้ในการศึกษาการพัฒนาโครงสร้างต่างๆ ของเห็ดซึ่งจัดเป็นราชันสูง (Wösten and Wessels,
 1997) โดย hydrophobin HYPA/ABH1 ที่พบในดอกเห็ดกระจุก *A. bisporus* สร้างมาจากยีน *hypA*
 ประกอบด้วย coding region 4 exon และกรดอะมิโน 112 เรซิดิวส์ มีบริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโน
 cysteine จำนวน 8 เรซิดิวส์ และมีรูปแบบของ hydrophobicity อยู่ใน class I hydrophobin สำหรับ
 โปรตีน hydrophobin ที่สร้างจากยีนนี้จะพบเฉพาะในดอกเห็ดที่อยู่ในช่วงยืดขยายหมวกเห็ดและ
 เป็นโปรตีนหลักที่พบมากที่สุดบริเวณผิวของหมวกเห็ด ซึ่งควบคุมการยืดขยายของดอกเห็ดหรือคง
 สภาพดอกเห็ดให้สมบูรณ์ เนื่องจากโปรตีน hydrophobin ที่ถูกสร้างขึ้นช่วยในการสร้าง
 hydrophobic layer ที่เกิดจากการคุณสมบัติของ hydrophobin ที่สามารถรวมตัวกันเองจาก โมโน
 เมอร์ของ hydrophobin เกิดเป็น amphipathic layer ที่บริเวณรอยต่อระหว่าง hydrophobic-
 hydrophilic (Wösten *et al.*, 1993) ซึ่งเคลือบรอบๆ ดอกเห็ด โดยเฉพาะหมวกเห็ดเพื่อปกป้องดอก
 เห็ดจากสภาพแวดล้อมต่างๆ เช่น การไหลของน้ำเข้าสู่ดอกเห็ดและเชื้อโรคต่างๆ เช่นรา และ
 แบคทีเรียในกระบวนการสร้างดอกเห็ด (De Groot *et al.*, 1996; Lugones *et al.*, 1996; De Groot
et al., 1999) การสร้างดอกเห็ดของเห็ดกระจุกเขตร้อนและเขตหนาว นอกจาก hydrophobin ยังมี
 ปัจจัยอื่นเกี่ยวข้อง จากการศึกษาอื่นที่เกี่ยวข้องกับการสร้างดอกเห็ดในเห็ดกระจุก *A. bisporus*
 พบว่ามีการแสดงออกของยีน glucose-6-phosphate dehydrogenase และ mannitol dehydrogenase
 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีการสร้างในช่วงเริ่มต้นของการสร้างดอกเห็ดและการพัฒนาโครงสร้างต่างๆ
 ของเห็ด (Stoop and Mooibroek, 1998) รวมทั้ง ยีน *atpD*, *cypA* และ *sepA* ที่สร้าง ATP synthase
 subunit, cytochrome p450 และ septin ที่มีการแสดงออกอย่างสูงในขณะที่สร้างดอกเห็ด (De Groot
et al., 1997) ตลอดจนพบกลุ่มของยีนที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายแหล่งอาหารของเห็ด ซึ่งพบว่าเป็น
 ยีนที่สร้างเอนไซม์ laccase ซึ่งมีบทบาทสำคัญในระยะเริ่มต้นของการสร้างดอกเห็ด (Ohga *et al.*,
 1999) นอกจากนี้ปัจจัยทางกายภาพยังเป็นปัจจัยที่สำคัญในการควบคุมการสร้างดอกของเห็ด ได้แก่
 อุณหภูมิ ความชื้น ธาตุอาหาร และสภาพความเป็นกรด-ด่าง เป็นต้น (Kaul, 1997)

FGENESH 2.6 Prediction of potential genes in Coprinus genomic DNA
 Seq name: *A. bitorquis hypA*
 Length of sequence: 646
 Number of predicted genes 1: in +chain 1, in -chain 0.
 Number of predicted exons 4: in +chain 4, in -chain 0.
 Positions of predicted genes and exons: Variant 1 from 1,
 Score:39.872723

G	Str	Feature	Start	End	Score	ORF	Len
1	+	1 CDSf	1 -	54	12.06	1 - 54	54
1	+	2 CDSi	106 -	175	14.77	106 - 174	69
1	+	3 CDSi	232 -	401	19.69	234 - 401	168
1	+	4 CDSl	457 -	507	5.07	457 - 507	51



ภาพที่ 26 coding sequence ของยีน *hypA* ของเห็ดกระดุม *A. bitorquis* (KPS1) วิเคราะห์โดยโปรแกรม FGENESH

```

1  MFSRVLVAAL VALPVLVSAT PAPGKPHTGA ASQCNVGE LH CCNTQQTPDH
51  TSAAASGLLG IPINLGAFLG FDCTPISVLG IGGNNCAAQP VCCEQNQFTG
101 LINALDCSPV NVNL

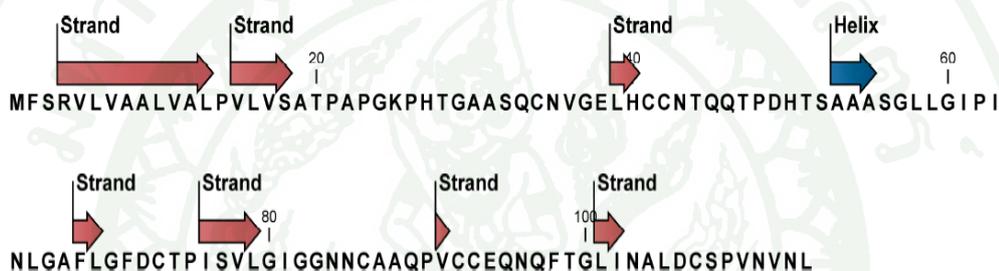
```

ภาพที่ 27 ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hypA* ของเห็ดกระดุม *A. bitorquis* KPS1 โดยโปรแกรม FGENESH

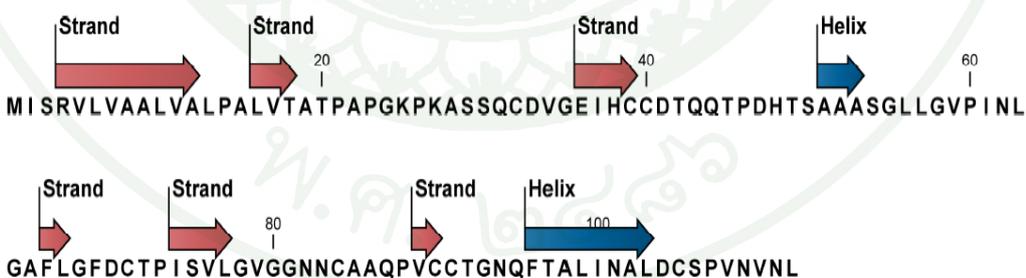
```

A.bitorquis      MFSRVLVAALVALPVLVSATPAPGKPHTGAASQCNVGEIHCNTQQTDPHTSAAASGLLG 60
A.bisporus      MISRVLVAALVALPALVTATPAPGKPK--ASSQCDVGEIHCCTDQQTDPHTSAAASGLLG 58
*:*****.**:*****:  *:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
A.bitorquis      IPINLGAFLGFDCTPISVLGIGGNNCAAQPVCEQNQFTGLINALDCSPVNVNL 114
A.bisporus      VPINLGAFLGFDCTPISVLGVGGNNCAAQPVCCCTGNQFTALINALDCSPVNVNL 112
    
```

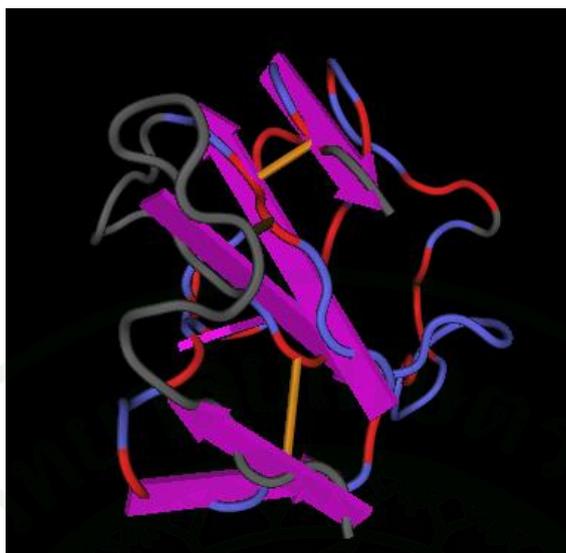
ภาพที่ 28 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *hypA* ของเห็ดกระดุม *A. bitorquis* KPS1 กับลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน hydrophobin ที่สร้างจากยีน *hypA* ของเห็ดกระดุม *A. bisporus* แถบสีฟ้าคือกรดอะมิโน cysteine อนุรักษ์ 8 เรซิดิวส์



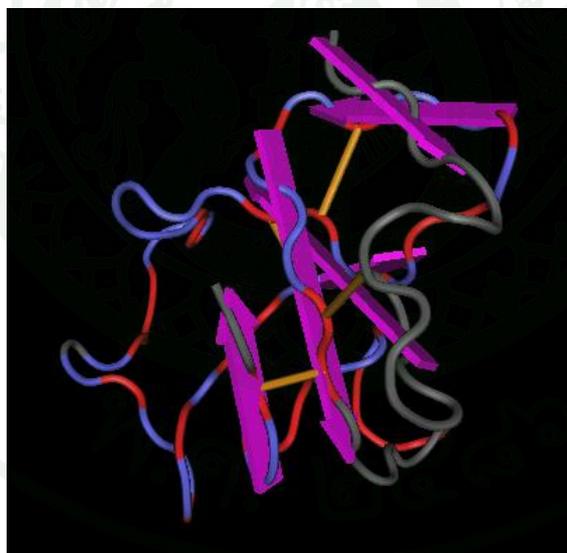
ภาพที่ 29 โครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ของโปรตีน hydrophobin (HYPA) จากเห็ดกระดุมเขตร้อน *A. bitorquis* KPS1



ภาพที่ 30 โครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ของโปรตีน hydrophobin (HYPA) จากเห็ดกระดุม *A. bisporus*



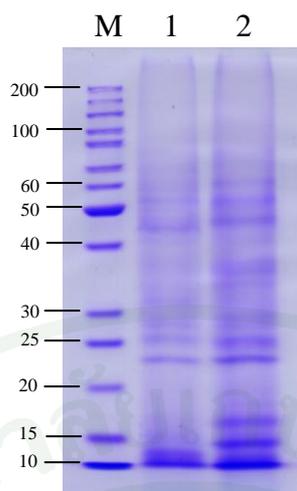
ภาพที่ 31 โครงสร้างสามมิติ (3D structure) ของโปรตีน hydrophobin (HYPA) จากเห็ด
กระดุมเขตร้อน *A. bitorquis* KPS1



ภาพที่ 32 โครงสร้างสามมิติ (3D structure) ของโปรตีน hydrophobin (HYPA) จากเห็ด
เห็ดกระดุม *A. bisporus*

3. การศึกษาโปรตีนจากเห็ดกระดุมเขตร้อน KPS1 ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

จากการวิเคราะห์โปรตีนจากเส้นใยและดอกเห็ดกระดุมเขตร้อน *A. bitorquis* KPS1 ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าโปรตีนที่แสดงออกในส่วนของดอกจะต่างจากส่วนของเส้นใย โดยทั้งในส่วนของเส้นใยและดอกจะมีการแสดงออกของโปรตีนบางชนิดที่ไม่พบในส่วนอื่น และพบการแสดงออกของโปรตีนหลักขนาดเล็กที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10 กิโลดาลตัน ทั้งในส่วนของเส้นใยและดอกเห็ดกระดุม *A. bitorquis* KPS1 (ภาพที่ 33) ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของโปรตีน hydrophobin (ABH3) ที่พบในส่วนของเส้นใยปฐมภูมิ (primary mycelium) และเส้นใยทุติยภูมิ (secondary mycelium) ของเห็ดกระดุม *A. bisporus* ซึ่งมีขนาดประมาณ 9 กิโลดาลตัน และมีบทบาทสำคัญในการชักนำให้เกิดเส้นใยเหนืออากาศ (aerial hyphae) โดย ABH3 จะเกิดการรวมตัวกันระหว่างบริเวณรอยต่อของ hydrophilic-hydrophobic และสร้างชั้นของ hydrophobic rodlets ที่บริเวณผิวของเส้นใยเหนืออากาศช่วยในการเคลือบเส้นใยที่เจริญบนแหล่งอาหารให้สามารถแทงเส้นใยผ่านแหล่งอาหารและเจริญต่อไปได้ (Lugones *et al.*, 1998) และโปรตีน hydrophobin (HYPA/ABH1) ในดอกเห็ดกระดุม *A. bisporus* ซึ่งมีขนาดประมาณ 8-9 กิโลดาลตัน สามารถสร้างชั้นของ hydrophobic rodlets ที่บริเวณผิวเพื่อหุ้มดอกเห็ด โดยเฉพาะส่วนของหมวกเห็ดและเป็นช่องอากาศ (air channels) ภายในดอกเห็ดด้วย (De Groot *et al.*, 1996; Lugones *et al.*, 1996) ซึ่งโปรตีน hydrophobin มีบทบาทสำคัญในการเจริญและกระบวนการพัฒนาโครงสร้างต่างๆ ของรา ได้แก่ เส้นใย สปอร์ และดอกเห็ด (Wessels, 1997; Wösten and Wessels, 1997) แต่เนื่องจากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาด้วยเทคนิค SDS-PAGE นั้นยังไม่ชัดเจนเพียงพอในการศึกษาโปรตีนทั้งหมด ดังนั้นจึงได้ศึกษาโปรตีนทั้งหมดโดยเทคนิค 2D-PAGE ซึ่งจะทำให้ทราบถึงรูปแบบของโปรตีนทั้งในส่วนของน้ำหนักโมเลกุล (MW) และค่า pI (isoelectric point)



ภาพที่ 33 SDS-PAGE ของโปรตีนจากส่วนดอก (1) และเส้นใย (2) ของเห็ดกระดุม *A. bitorquis* KPS1 เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (M)

4. การศึกษาโปรตีนจากเห็ดกระดุมด้วยเทคนิค 2D-PAGE

เนื่องจากเห็ดกระดุมเป็นเห็ดกินได้รสชาติดี โดยเฉพาะเห็ดกระดุมหรือเห็ดแชมปิญอง (*A. bisporus*) ซึ่งเป็นเห็ดกระดุมเขตหนาวที่จัดเป็นเห็ดเศรษฐกิจที่มีความสำคัญมากที่สุดชนิดหนึ่งของโลก และในประเทศไทยซึ่งเป็นประเทศเขตร้อนสามารถพบเห็ดกระดุมหลายชนิดที่สามารถรับประทานได้และมีรสชาติดี เช่น เห็ดกระดุม *A. bitorquis*, *A. campestris*, *A. arvensis* (เห็ดขานหมากวงแหวน 1 ชั้น หรือเห็ดขี้ม้า) และ *A. silvaticus* (เห็ดกระดุมป่าสน) เป็นต้น (ราชบัณฑิตยสถาน, 2550; อนงค์ และคณะ, 2551) ทำให้เป็นที่น่าสนใจในการศึกษาหาโปรตีนที่แสดงออกในเห็ดกระดุมทั้งในเขตร้อนและเขตหนาวเพื่อเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดดอกของเห็ดกระดุมที่เจริญในสภาพอากาศเขตร้อนและเขตหนาว เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์สายพันธุ์เห็ดกระดุมเขตหนาวให้สามารถเจริญได้ในสภาพอากาศเขตร้อนหรือสามารถพัฒนาการเพาะเห็ดกระดุมเขตร้อนในเชิงพาณิชย์ได้

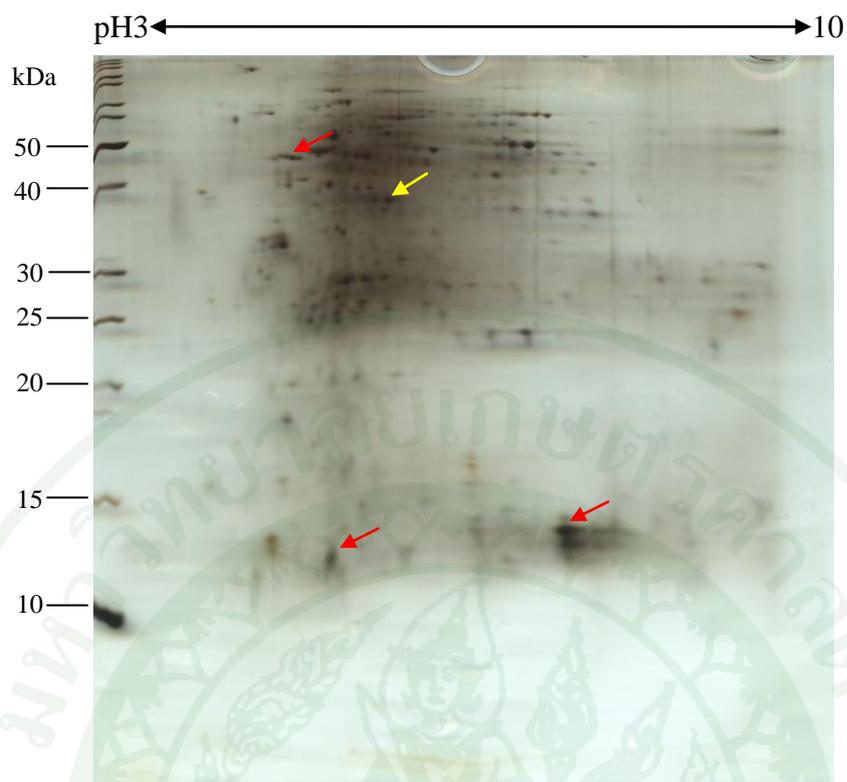
เมื่อนำเห็ดกระดุมทั้ง *A. bitorquis* KPS1 และ *A. bisporus* มาศึกษาโปรตีนทั้งหมดด้วยเทคนิค 2D-PAGE โดยใช้ช่วง pH 3-10 แล้วย้อมเจลด้วย silver stain พบว่าเมื่อวิเคราะห์และเปรียบเทียบรูปแบบของโปรตีนในแต่ละเจล โดยใช้โปรแกรม Dymension Revolutionary 2DGE พบจำนวนจุดของโปรตีนทั้งหมดที่สามารถวิเคราะห์ได้ในเห็ดกระดุม *A. bitorquis* KPS1 590 ชนิด เมื่อดูการกระจายตัวของโปรตีนที่ค่า pH ต่างๆ พบว่าโปรตีนส่วนใหญ่มีค่า pI 4.5-7.5 (ภาพที่ 34)

ส่วนเห็ดกระดุม *A. bisporus* มีโปรตีนทั้งหมด 651 ชนิด โดยค่า pI ของโปรตีนอยู่ในช่วง 4.4-8.7 (ภาพที่ 35) โดยที่โปรตีนทั้งหมดของเห็ดทั้ง 2 ชนิดเหมือนกัน 282 ชนิดหรือ 43.32 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 36)

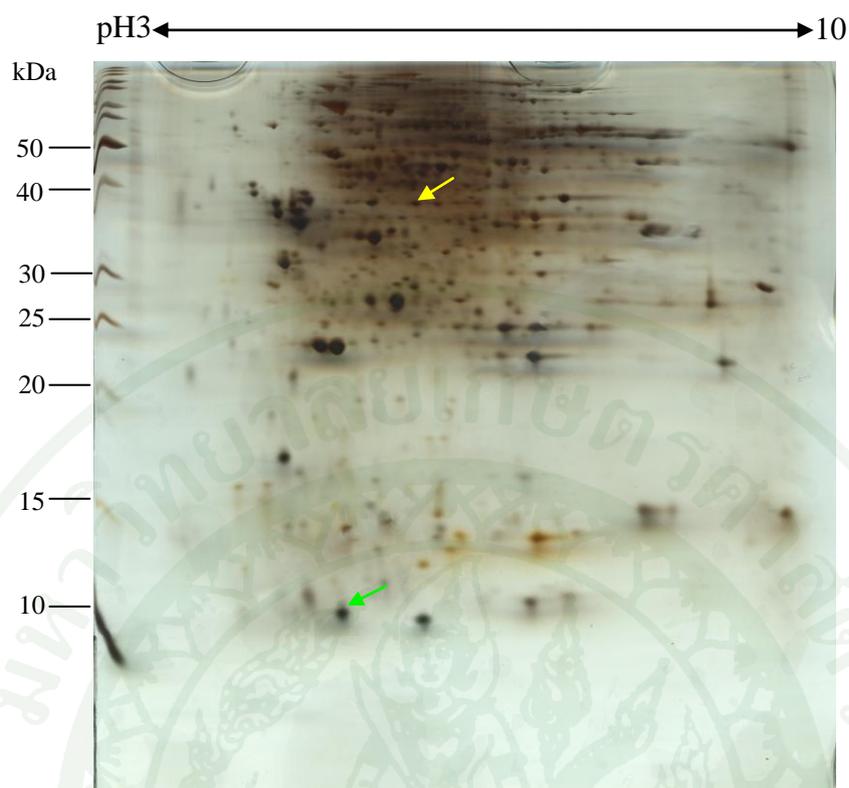
ได้คัดเลือกโปรตีนที่ผลิตเป็นปริมาณมากซึ่งเป็นโปรตีนหลักและคาดว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดดอกของเห็ดและพบในเห็ดกระดุมทั้ง 2 ชนิด จำนวน 1 ชนิด และโปรตีนที่ผลิตเป็นปริมาณมากแต่พบเฉพาะในเห็ดกระดุม *A. bitorquis* KPS1 จำนวน 2 ชนิด รวม 3 ชนิด ไปวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์โดยใช้เทคนิค LC-MS/MS ข้อมูลที่ได้จะถูกใช้ในการวิเคราะห์ผลร่วมกับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม MASCOT พบว่าไม่สามารถระบุชนิดของโปรตีนจากทั้ง 3 ชนิดได้ อาจเนื่องมาจากฐานข้อมูลโปรตีนในเห็ดยังไม่เพียงพอในการใช้ระบุชนิดของโปรตีนที่ต้องการหรือปริมาณของโปรตีนที่ใช้ในการวิเคราะห์มีปริมาณน้อยหรือเจือจางเกินไปจึงไม่เพียงพอในการระบุชนิดของโปรตีนได้ เนื่องจากเทคนิค Mass spectrometry (MS) มีหลักการคือ ทำการแยกแล้ววิเคราะห์โปรตีนหรือเปปไทด์ที่อยู่ในรูปการแตกตัวเป็นไอออน (ionization) โดยเครื่องจะวัดสัดส่วนของมวลต่อประจุของไอออน (mass charge ratio, M/Z) มีความไวสูงสามารถศึกษาโปรตีนในระดับถึง femtogram (10^{-15} g) โดยทั่วไปจะแสดงผลในรูปร้อยละสัมพัทธ์ (relative abundance (%)) กับ M/Z (mass charge ratio) เทคนิคนี้จะมีการเปรียบเทียบน้ำหนักของเปปไทด์ที่วิเคราะห์ได้กับเปปไทด์ที่คำนวณได้ตามทฤษฎีที่มีอยู่ในฐานข้อมูล ทำให้ทราบข้อมูลของลำดับกรดอะมิโนในโปรตีน (Henzel *et al.*, 1993) สามารถนำไปค้นหาเปรียบเทียบกับโปรตีนต่างๆ ที่มีในฐานข้อมูล เพื่อระบุชนิดและหน้าที่ของโปรตีน ซึ่งการกำหนดความถูกต้องในการระบุชนิดของโปรตีนนั้นขึ้นอยู่กับระบบของ Mass Spectrometry (MS) ที่เหมาะสมและฐานข้อมูลที่ใช้ในการสืบค้น (database search) (Gaevart and Vandekerckhove, 2000) ถึงแม้ว่าเทคนิค Mass spectrometry (MS) จะเป็นเทคนิคที่มีความก้าวหน้าโดยตรง และมีความไวสูงในการจำแนกชนิดโปรตีนแต่ลำดับกรดอะมิโนเพียงบางส่วน (partial sequences) ที่ได้จากเทคนิคนี้อาจจะยังคงจำกัดและทำให้ไม่สามารถจำแนกชนิดของโปรตีนได้ ดังนั้นการใช้เทคนิค N-terminal Edman sequencing เพื่อหาลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน จึงมีประโยชน์และเป็นทางเลือกในการจำแนกและระบุชนิดของโปรตีนอีกวิธีหนึ่ง (Wittmann-Liebold *et al.*, 2006)

จากการวิเคราะห์จุดโปรตีนที่แสดงออกทั้งหมดในเห็ดทั้ง 2 ชนิด พบว่ามีความแตกต่างกันมากเนื่องจากเห็ดทั้ง 2 ชนิดนั้น ถึงแม้ว่าจะอยู่ในสกุลเดียวกันแต่ก็เป็นเห็ดต่างสายพันธุ์ที่ขึ้นในสภาพภูมิอากาศที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน การศึกษาเพิ่มเติมในกลุ่มของโปรตีนที่มีความแตกต่างกันนี้จะทำให้เข้าใจถึงโปรตีนและยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดดอกเห็ดในสภาวะอากาศร้อนและ

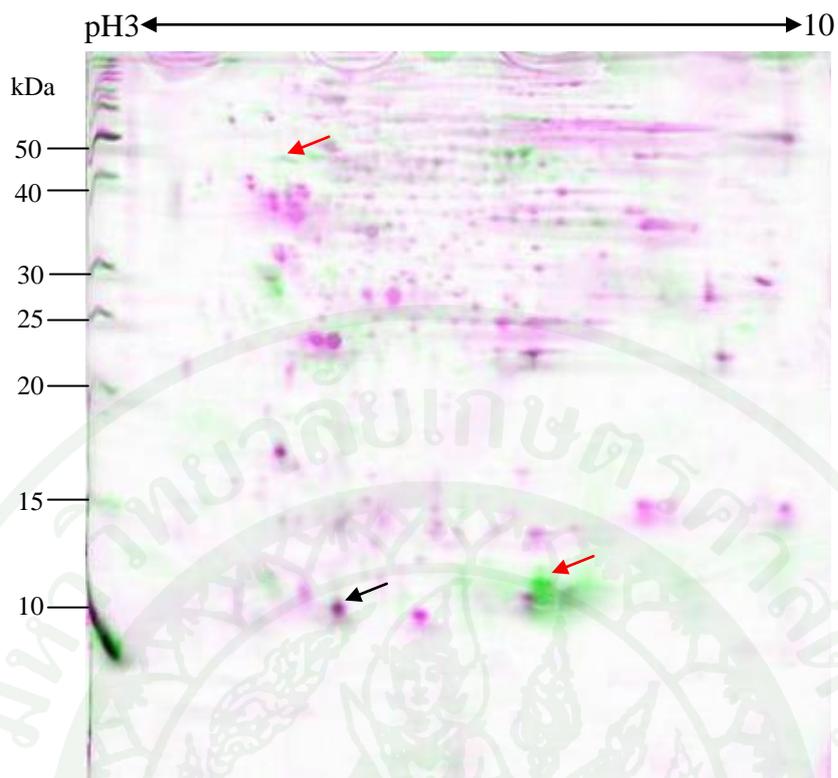
อากาศหนาวได้ ส่วนโปรตีนที่เหมือนกันนั้นเป็น โปรตีนทั่วไปที่เกี่ยวข้องกับการเจริญและ ขบวนการเมแทบอลิซึมของเห็ด Pierleoni และคณะ (2004) ได้ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนใน เห็ดทรัฟเฟิล (*Tuber borchii*) พบโปรตีนขนาดประมาณ 37.5 กิโลดาลตัน ค่า pI 5.95 เมื่อวิเคราะห์ ลำดับกรดอะมิโนจาก N-terminal พบว่าเป็นเอนไซม์ endoglucanase ซึ่งพบในเชื้อรากลุ่ม *Fusarium, Aspergillus, Agaricus* and *Emericella* เอนไซม์ endoglucanase เป็นเอนไซม์ที่ช่วยย่อย เซลลูโลสให้เป็นกลูโคส ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ endoglucanase ทำให้เส้นใยรา สามารถเจริญบนแหล่งอาหารและพัฒนาจนสร้างดอกเห็ดได้ นอกจากนี้ยังพบว่าในเห็ดหอมและ เห็ดกระดุม *A. bisporus* มีกิจกรรมของเอนไซม์ endoglucanase สูง ในขณะที่มีการสร้างดอกเห็ด (Ohga and Royse, 2001, Manning and Wood, 1983) นอกจากนี้ยังพบโปรตีนชนิดอื่นๆในช่วงการ สร้างดอก เช่น โปรตีนที่ทำหน้าที่ช่วยในการจับยึดระหว่างเซลล์กับเซลล์ cell adhesion molecule ในเห็ดเข็มทอง (Sakamoto *et al.*, 2000) การศึกษาโปรตีนที่แสดงออกในเห็ดกระดุม *A. bitorquis* KPS1 และเห็ดกระดุม *A. bisporus* พบโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 38 กิโลดาลตัน และมีค่า pI ประมาณ 6 ในเห็ดทั้ง 2 ชนิดเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 34 และ 35 ตรงลูกศรสีเหลือง) Horie และคณะ (2007) ได้ศึกษาโปรตีนทั้งหมดในเห็ด *Sparassis crispa* และ *Hericium erinaceum* โดยใช้เทคนิค 2D-PAGE พบโปรตีนทั้งหมด 480 และ 570 ชนิด ตามลำดับ โดยพบโปรตีนที่เหมือนกันในเห็ดทั้ง 2 ชนิด จำนวน 21 ชนิด ดังนั้นการใช้เทคนิค 2D-PAGE ในการศึกษาโปรตีนทั้งหมดของเห็ดจะช่วย ให้เข้าใจถึงกระบวนการสร้างดอกเห็ดและการเจริญของเห็ดในช่วงระยะเวลาต่างๆ จึงเป็นเทคนิคที่มี ประโยชน์และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาโปรตีนของเห็ดที่เกิดในสภาพอากาศที่ แตกต่างกัน เช่นเห็ดเขตร้อนและเขตกึ่งหนาวได้เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์เห็ด ต่อไป



ภาพที่ 34 2D-PAGE ของโปรตีนทั้งหมดของเห็ดกระดุม *A. bitorquis* KPS1 ตำแหน่งลูกศรสีแดง คือโปรตีนหลักที่พบในเห็ดกระดุม *A. bitorquis* KPS1 ตำแหน่งลูกศรสีเหลือง คือโปรตีนขนาดประมาณ 38 กิโลดาลตัน



ภาพที่ 35 2D-PAGE ของโปรตีนทั้งหมดของเห็ดกระดุม *A. bisporus* ตำแหน่งลูกศรสีเขียว คือโปรตีนหลักที่พบในเห็ดกระดุม *A. bisporus* ตำแหน่งลูกศรสีเหลือง คือโปรตีนขนาดประมาณ 38 กิโลดาลตัน



ภาพที่ 36 2D-PAGE ของ โปรตีนทั้งหมดของเห็ดกระดุม *A. bitorquis* KPS1 และเห็ดกระดุม *A. bisporus* ตำแหน่งลูกศรสีแดง คือโปรตีนที่พบเฉพาะในเห็ดกระดุม *A. bitorquis* KPS1 ตำแหน่งลูกศรสีดำ คือโปรตีนที่พบในเห็ดทั้ง 2 ชนิด

สรุป

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดกระดุม KPS1 ที่พบภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS ของ rDNA พบว่าเห็ดที่ศึกษานี้ คือ เห็ดกระดุมเขตร้อน *Agaricus bitorquis*

การโคลนยีน *hypA* ในเห็ดกระดุมเขตร้อน *Agaricus bitorquis* พบว่ามีขนาด 646 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วย coding sequence จำนวน 4 exon แปลรหัสได้โปรตีนที่ประกอบด้วย 114 กรดอะมิโน และพบบริเวณอนุรักษ์ของกรดอะมิโน cysteine จำนวน 8 เรซิดิวส์

การศึกษาโปรตีนทั้งหมดในเห็ดกระดุมทั้ง *A. bitorquis* KPS1 และ *A. bisporus* ด้วยเทคนิค 2D-PAGE สามารถวิเคราะห์จำนวนโปรตีนทั้งหมดได้ในเห็ดกระดุม *A. bitorquis* KPS1 590 ชนิด ซึ่งมีค่า pI อยู่ในช่วง 4.5-7.5 ส่วนเห็ดกระดุม *A. bisporus* สามารถวิเคราะห์จำนวนโปรตีนทั้งหมดได้ 651 ชนิด โดยมีค่า pI อยู่ในช่วง 4.4-8.7 ซึ่งโปรตีนทั้งหมดของเห็ดกระดุมทั้ง 2 ชนิดมีความเหมือนกัน 43.32 เปอร์เซ็นต์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2541. ข้อมูลเชื้อพันธุ์เห็ดบริการ. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

คารณี ศรีสิทธินาม. 2552. การศึกษาโปรตีนชนิดใหม่ในสับปะรดตัดแปรพันธุกรรม โดยเทคนิค เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส 2 มิติ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ราชบัณฑิตยสถาน. 2539. เห็ดกินได้และเห็ดมีพิษในประเทศไทย ฉบับราชบัณฑิตยสถาน. บริษัทอมรินทร์พริ้นติ้งแอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด, กรุงเทพฯ.

ราชบัณฑิตยสถาน. 2550. เห็ดในประเทศไทย ฉบับราชบัณฑิตยสถาน. พิมพ์ครั้งที่ 2. บริษัท ทีพีลัม จำกัด, นนทบุรี.

สมปอง ธรรมศิริรักษ์. 2545. Proteomics: ศาสตร์ของการแปลความหมายจากยีนสู่โปรตีน. ว. วิทย. มข. 30 (3): 160-168.

อนงค์ จันทร์ศรีกุล. 2544. เห็ดเมืองไทย: เทคโนโลยีการเพาะเห็ด. สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช จำกัด, กรุงเทพฯ.

อนงค์ จันทร์ศรีกุล, พูนพิไล สุวรรณฤทธิ, อุทัยวรรณ แสงวนิช, T. Morinaga, Y. Nishizawa and Y. Murakami. 2551. ความหลากหลายของเห็ดและราขนาดใหญ่ในประเทศไทย. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อภิญา วงศ์เปี้ย. 2551. การศึกษาโปรตีนโอมิกส์ของโปรตีนป้องกันที่ตอบสนองต่อโรคเหี่ยวพืชในพริกชี้ฟ้า (*Capsicum annuum* Linn.). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

- Andersen, J.S. and M. Mann. 2000. Functional genomics by mass spectrometry. **FEBS Lett.** 480: 25-31.
- Anonymous. 2008. **A Study Algae and Fungi**. Available Source: <http://www.tutornext.com/study-algae-fungi/12838>, June 13, 2010.
- Arora, D. 1986. **Mushrooms demystified: a comprehensive guide to the fleshy fungi**. Ten Speed Press., Berkeley.
- Bartho, L. 2009. The mushrooms *Agaricus sylvaticus*. Available Source: <http://www.rogersmushrooms.com/gallery/DisplayBlock~bid~5500.asp>, March 30, 2010.
- Beyer, K., L. Bardina, G. Grishina and H.A. Sampson. 2002. Identification of sesame seed allergens by 2-dimensional proteomics and Edman sequencing: seed storage proteins as common food allergens. **J. Allergy Clin. Immunol.** 110: 154-159.
- Bottoli, A.P.F., K. Kertesz-Chaloupková, R.P. Boulianne, J.D., Granado, M. Aebi and U. Kües. 1999. Rapid isolation of genes from an indexed genomic library of *C. cinereus* in a novel *pab1*⁺ cosmid. **J. Microbiol Methods** 35: 129-141.
- Bruns, T.D. and M. Gardes, 1993. Molecular tools for the identification of ectomycorrhizal fungi-taxon-specific oligonucleotide probes for suilloid fungi. **Mol. Ecol.** 2: 233-242.
- _____, T.J. White and J.W. Taylor. 1991. Fungal molecular systematic. **Annu. Rev. Ecol. Syst.** 22: 525-564.
- Carbonaro, M. 2004. Proteomics: present and future in food quality evaluation. **Trends Food Sci. Technol.** 15: 209-216.

- Carpenter, C.E., R.J. Mueller, P. Kazmierczak, L. Zhang, D.K. Villalon and N.K. Van Alfen. 1992. Effect of a virus on accumulation of a tissue-specific cell surface protein of the fungus *Cryphonectria (Endothia) parasitica*. **Mol. Plant-microbe Interact.** 4: 55-61.
- Cole, G.T., L.M. Pope, M. Huppert, S.H. Sun and P. Starr. 1983. Ultrastructure and composition of conidial wall fractions of *Coccidioides immitis*. **Exp. Mycol.** 7: 297-318.
- De Groot, P.W.J. 1997. Isolation of developmentally regulated genes from the edible mushroom *Agaricus bisporus*. **Microbiol** 143: 1993-2001.
- _____. 1999. Different temporal and spatial expression of two hydrophobin-encoding genes of the edible mushroom *Agaricus bisporus*. **Microbiol** 145: 1105-1113.
- _____, P.W.J., P.J. Schaap, A.S.M. Sonnenberg, J. Visser and L.J.L.D. Van Griensven. 1996. The *Agaricus bisporus hypA* gene encodes a hydrophobin and specifically accumulates in peel tissue of mushroom caps during fruit body development. **J. Mol. Biol.** 257: 1008-1018.
- De Vries, O.M.H., M.P. Fekkes, H.A.B. Wösten, J.G.H. Wessels. 1993. Insoluble hydrophobin complexes in the walls of *Schizophyllum commune* and other filamentous fungi. **Arch. Microbiol** 159: 330-335.
- Elliott, T.J. 1989. Genetics and Breeding of Cultivated mushrooms, pp. 11-30. In S.T. Chang and T.H. Quimio, eds. **Tropical Mushrooms Biological Nature and cultivation Methods**. Polydesign Printing Co., Ltd., Hong Kong.
- Flegg, P.B. and D.A. Wood. 1985. Growth and fruiting, pp. 141-177. In P.B. Flegg, D.M. Spencer and D.A. Wood, eds. **The biology and Technology of Cultivated Mushroom**. Wiley, Chichester.

- Gardes, M., T.J. White, J.A. Fortin, T.D. Burns and J.W. Taylor. 1991. Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial ribosomal DNA. **Can. J. Bot.** 69: 180-190.
- Gevaert, K. and J. Vandekerckhove. 2000. Protein identification methods in proteomics. **Electrophoresis** 21: 1145-1154.
- Grafin, D.E. 2003. Two-dimensional gel electrophoresis: an overview. **Trends in Anal. Chem.** 22 (5): 263-272.
- Graves, P.R. and T.A.J Haystead. 2002. Molecular biologist's guide to proteomics. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 66: 39-63.
- Gruppo Micologico Cebano. 2010. **Mushrooms**. Available Source: <http://www.fungoceva.it/funghicebano.htm>, August 22, 2010.
- Hakanpää, J., A. Paananen, S. Askolin, T. Nakari-Setälä, T. Parkkinen, M. Penttilä, M.B. Linder and J. Rouvinen. 2004. Atomic resolution structure of the HFBII hydrophobin, a self-assembling amphiphile. **J. Biol. Chem.** 279: 534-539.
- Hammond, J.B.W. 1981. Variations in enzyme activity during periodic fruiting of *Agaricus bisporus*. **New Phytol.** 89: 419-428.
- _____ and R. Nichols. 1976. Carbohydrate metabolism in *Agaricus bisporus* (Lange) Sing: changes in soluble carbohydrates during growth of mycelium and sporophore. **J. Gen. Microbiol.** 93: 309-320.

- Henzel, W.J., T.M. Billeci, J.T. Stults, S.C. Wong, C. Grimley and C. Watanabe. 1993. Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 90(11): 5011-5015.
- Horie, K., R. Rakwal, M. Hirano, J. Shibato, H.W. Nam, Y. S.Kim, Y. Kouzuma, G.K. Agrawal, Y. Masuo and M. Yonekura. 2007. Proteomics of two cultivated mushrooms *Sparassis crispa* and *Hericium erinaceum* provides insight into their numerous functional protein components and diversity. **J. Proteome Res.** 7: 1819-1835.
- Kaul, T.N. 1997. **Introduction to Mushroom Science.** Science Publisher, Inc., New Dalhi.
- Kershaw, M.J. and N.J. Talbot. 1998. Hydrophobins and repellents: proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. **Fungal Genet Biol** 23: 18-33.
- Larena, I., O. Salazar, V. Gonzáles, M. C. Julián and V. Rubio. 1999. Design of primer for ribosomal DNA internal transcribed spacer with enhanced specificity for ascomycetes. **J. Biotechnol** 75: 187-194.
- Largent, L.D., D.E. Stuntz and S. Hadley. 1977. **How to Identify Mushrooms to Genus I: Macroscopic Features.** Mad River Press, California.
- Lugones, L.G., J.S. Bosscher, K. Scholtmeijer, O.M.H. de Vries and J.G.H. Wessels. 1996. An abundant hydrophobin (ABH1) forms hydrophobic rodlet layers in *Agaricus bisporus* fruiting bodies. **Microbiol** 142: 1321-1329.
- _____, H.A.B. Wösten and J.G.H. Wessels. 1998. A hydrophobin (ABH3) specifically secreted by vegetatively growing hyphae of *Agaricus bisporus* (common white button mushroom). **Microbiol** 144: 2345-2353.

- Lugones, L.G., H.A.B. Wösten, K.U. Birkenkamp, K.A. Sjollema, J. Zagers and J.G.H. Wessels. 1999. Hydrophobins line air channels in fruiting bodies of *Schizophyllum commune* and *Agaricus bisporus*. **Mycol. Res.** 103: 635-640.
- Manning, K. and D.A. Wood. 1983. Production and regulation of cellulose of *Agaricus bisporus*. **J. Gen Microbiol.** 129: 1839–1847.
- Moor, D., P. Brodmann, G. Nicholas and A. Eugster. 2002. Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of king bolete (*Boletus edulis*) and slippery jack (*Suillus luteus*) in food samples. **Eur Food Res Technol** 214: 340-345.
- O' Farrell, P.H. 1975. High resolution two-dimensionalelectrophoresis of proteins. **J. Biol. Chem.** 250 (10): 4007-4021.
- Ohga, S. and D.J. Royse. 2001. Transcriptional regulation of laccase and cellulase genes during growth and fruiting of *Lentinula edodes* on supplemented sawdust. **FEMS Microbiol Lett.** 201: 111–115.
- _____, M. Smith, C. Thurston, D.A. Wood. 1999. Transcriptional regulation of laccase and cellulase genes in the mycelium of *Agaricus bisporus* during fruit body development on a solid substrate. **Mycol. Res.** 103: 1557-1560.
- Ontario Woodlot Association. 2008. **Forest Mushrooms: Part II-Common Edible Species.** Available Source: http://www.ont-woodlot-assoc.org/sw_mushrooms_2.html#anchor, April 23, 2010.
- Person, M.D., J. Shen, A. Traner, S.C. Hensley, H. Lo, J.L. Abbruzzese and D. Li. 2006. Protein Fragment domains identified using 2D gel electrophoresis/MALDI-TOF. **J. Biomol Tech** 17 (2): 145-156.

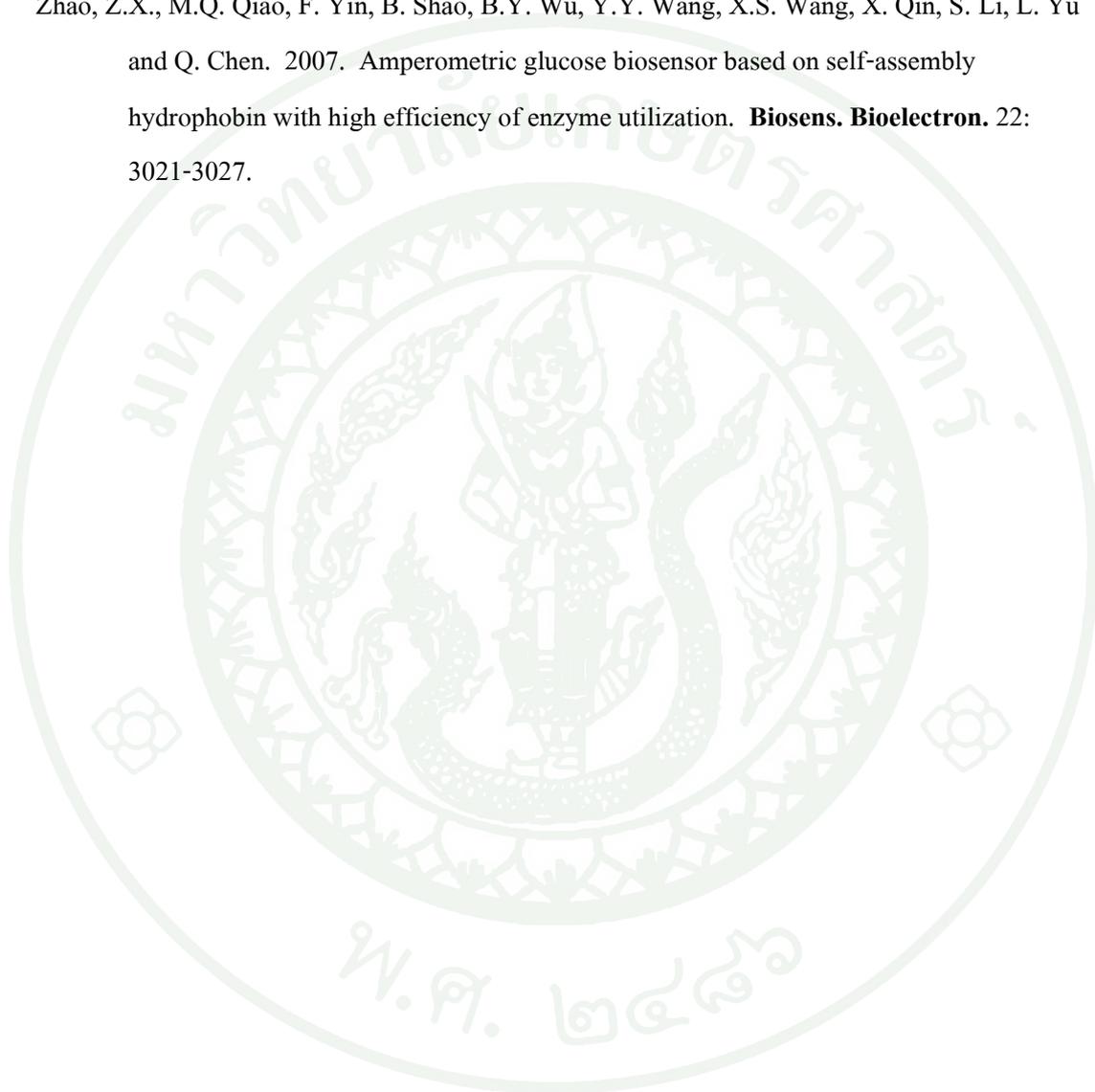
- Peterson, R.H. and K.W. Hughes. 1999. Species and speciation in mushroom? Development of species concept poses difficulties. **Bio. Sci.** 49: 440-452
- Pierleoni, R., M. Buffalini, L. Vallorani, C. Guidi, S. Zeppa, C. Sacconi, P. Pucci, A. Amoresano, A. Casbarra and V. Stocchi. 2004. *Tuber borchii* fruit body: 2-dimensional profile and protein identification. **Phytochem.** 65: 813-820.
- Sakamoto, Y., T. Azuma, A. Ando, Y. Tamai and K. Miura. 2000. Characterization of proteins expressed abundantly in the fruit-body of *Flammulina velutipes*. **Mycosci** 41: 279-282.
- Saltarelli, R., P. Ceccaroli, M. Iotti, A. Zambonelli, M. Buffalini, L. Casadei, L. Vallorani and V. Stocchi. 2009. Biochemical characterization and antioxidant activity of mycelium of *Ganoderma lucidum* from Central Italy. **Food Chem** 116: 143-151.
- Sambrook, J., E.F. Fritsoh and T. Maniatis. 1989. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Singh, S.K., A. Doshi, M.C. Yadav and S. Kamal. 2006. Molecular characterization of specialty mushrooms of western Rajasthan, India. **Curr. Sci.** 91: 1225-1230.
- Stoop, J.M. and H. Mooibroek. 1998. Cloning and characterization of NADP-mannitol dehydrogenase cDNA from the button mushroom *Agaricus bisporus*, and its expression in response to NaCl stress. **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 4689-4696.
- Sunde, M., A.H.y> Kwan, M.D. Templeton, R. E. Beever and J.P. Mackay. 2008. Structural analysis of hydrophobins. **Micron** 39: 773-784.

- Takamatsu, S. 1998. PCR applications in fungal phylogeny, pp. 125-152. In P.D. Bridge, D.K. Aroma, C.A. Reddy and R.P. Elander, eds. **Applications of PCR in Mycology**. CAB International, Wallingford.
- Talbot, N.J., M. Kershaw, G.E. Wakley, O.M.H. de Vries, J.G.H. Weaels and J.E. Hammer. 1996. *Mpg1* encodes a fungal hydrophobin involved in surface interactions during infection-related development of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Plant Cell** 8: 985-999.
- Wessels, J.G.H., 1994. Developmental regulation of fungal cell-wall formation. **Ann. Rev. Phytopathol** 32: 413-437.
- _____. 1997. Hydrophobins: proteins that change the nature of the fungal surface. **Adv. Microbial Physiol.** 38: 1-45.
- _____, O.M.H. de Vries, S.A. Ásgeirsdóttir, F.H.J. Schuren. 1991. Hydrophobin genes involved in formation of aerial hyphae and fruit bodies in *Schizophyllum*. **Plant Cell** 3: 793-99
- White, T.J., T. Burns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315-322. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White, eds. **PCR Protocols: A guide to Methods and Applications**. Academic Press., San Diego.
- Wittmann-Liebold, B., H.R. Graack and T. Pohl. 2006. Two dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. **Proteomics** 6: 4688-4703.
- Wood, M. and F. Stevens. 2004. **Edible Fungi**. Available Source: <http://www.mykoweb.com/CAF/edible.html>, June 19, 2009.

- Wösten, H.A.B. 2001. Hydrophobins: multipurpose proteins. **Annu. Rev. Microbiol.** 55: 625-46.
- _____, O.M.H. de Vries and J.G.H. Wessels. 1993. Interfacial self-assembly of a fungal hydrophobin into a rodlets layer. **Plant Cell** 5: 1567-1574.
- _____, F.H.J. Schuren and J.G.H. Wessels. 1994. Interfacial self-assembly of a hydrophobin into an amphipathic membrane mediates fungal attachment to hydrophobic surface. **EMBO J.** 13: 5848-5854.
- _____, M.A. van Wetter, L.G. Lugones, H.C. van der Mei, H.J. Busscher and J.G.H. Wessels. 1999. How a fungus escapes the water to grow into the air. **Curr. Biol.** 9: 85-88
- _____ and J.G.H. Wessels. 1997. Hydrophobins, from molecular structure to multiple functions in fungal development. **Mycosci** 38: 364-374.
- Yaguchi M., M. Pusztai-Carey, C. Roy, W.K. Surewicz, P.R. Carey, K.J. Stevenson, W.C. Richards and S. Takai. 1993. Amino acid sequence and spectroscopic studies of the Dutch-elm disease toxin, cerato-ulmin, pp. 152-170. *In* M.B. Sticklen and J.L. Sherald, eds. **Dutch Elm Disease Research, Cellular and Molecular Approaches**. Springer Verlag, New York.
- Yang, K., Y. Deng, C. Zhang and M. Elasmri. 2006. Identification of new members of hydrophobin family using primary structure analysis. **BMC Bioinformatics** 7 (Suppl 4): 1-7.
- Yaver, D.S., M. del Carmen Overjero, F. Xu, B.A. Nelson, K.M. Brown, T. Halkier, S. Bernauer, S.H. Brown and S. Kauppinen. 1999. Molecular characterization of laccase genes from the basidiomycete *Coprinus cinereus* and heterologous expression of the laccase Lcc1. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 4943-4948.

Zhao, J., H.S. Kwan. 1999. Characterization, molecular cloning and differential expression analysis of laccase genes from the edible mushroom *Lentinula edodes*. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 4908-4913.

Zhao, Z.X., M.Q. Qiao, F. Yin, B. Shao, B.Y. Wu, Y.Y. Wang, X.S. Wang, X. Qin, S. Li, L. Yu and Q. Chen. 2007. Amperometric glucose biosensor based on self-assembly hydrophobin with high efficiency of enzyme utilization. **Biosens. Bioelectron.** 22: 3021-3027.





สารเคมี

1. สารเคมีสำหรับสกัดโปรตีน (Lysis solution)

Urea	4.2	กรัม
CHAPS	0.4	กรัม
IPG Buffer pH 3-10	200	ไมโครลิตร

เติมน้ำปราศจากประจุจนได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. สารเคมีสำหรับ Reswell Immobiline DryStrip

2.1 Rehydration solution

Urea	12	กรัม
CHAPS	1	กรัม
DTT	70	มิลลิกรัม
IPG Buffer pH 3-10	500	ไมโครลิตร
Bromophenol blue (1%w/v)	50	ไมโครลิตร

เติมน้ำปราศจากประจุจนได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (การเติม DTT และ IPG Buffer จะเติมก่อนนำสารละลายมาใช้งาน)

2.2 1% Bromophenol blue stock solution

Bromophenol blue	100	มิลลิกรัม
Tris-base	60	มิลลิกรัม

เติมน้ำปราศจากประจุจนได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. สารละลายสำหรับ SDS-PAGE

3.1 SDS equilibration buffer

Tris-HCl, pH 8.8	10	มิลลิลิตร
Urea	72.07	กรัม
Glycerol (87% v/v)	69	มิลลิลิตร
SDS	4	กรัม
Bromophenol blue (1% w/v)	400	ไมโครลิตร

เติมน้ำปราศจากประจุจนได้ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ
-20 องศาเซลเซียส

3.2 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8

ชั่ง Tris-base 181.6 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากประจุ ปริมาตร 750 มิลลิลิตร ปรับ
ค่า pH ด้วยกรด HCl เข้มข้นจนได้ pH 8.8 แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ
4 องศาเซลเซียส

3.3 Acrylamide stock solution (30%T, 2.6%C monomer stock solution)

Acrylamide	60	กรัม
N,N'-methylenebisacrylamide	1.6	กรัม

เติมน้ำปราศจากประจุจนได้ปริมาตร 200 มิลลิลิตร กรองและเก็บรักษาในที่มืดที่
อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS)

ชั่ง Sodium dodecyl sulfate (SDS) 5 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากประจุ ปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร กรองและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

3.5 10% Ammonium persulfate (APS)

ชั่ง Ammonium persulfate (APS) 0.1 กรัม ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำปราศจากประจุ 1 มิลลิลิตร

3.6 การเตรียม SDS Electrophoresis buffer

Tris-base	30.3	กรัม
Glycine	144	กรัม
SDS	10	กรัม

เติมน้ำปราศจากไอออนจนได้ปริมาตร 10 ลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

3.7 Agarose sealing solution

SDS Electrophoresis buffer	100	มิลลิลิตร
Agarose	0.5	กรัม
Bromophenol blue (1% w/v)	200	ไมโครลิตร

นำไปผ่านความร้อนจนกระทั่ง Agarose ละลายอย่างสมบูรณ์ เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

3.8 12.5% Acrylamide gel

Acrylamide stock (30%T, 2.6%C)	41.7	มิลลิลิตร
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	25.0	มิลลิลิตร
10% SDS	1.0	มิลลิลิตร
น้ำปราศจากประจุ	31.8	มิลลิลิตร

คนสารละลายให้เข้ากันเบาๆ แล้วนำไปไล่อากาศออก แล้วจึงเติม 10% APS ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และ TEMED ปริมาตร 33 ไมโครลิตร

4. สารเคมีสำหรับย้อมเจลด้วยชุด PageSilver™ Silver Staining Kit (Fermentas)

4.1 Gel fixing solution 1

Ethanol	50	มิลลิลิตร
Acetic acid	10	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากประจุจนครบ 100 มิลลิลิตร

4.2 Gel fixing solution 2

Ethanol	90	มิลลิลิตร
---------	----	-----------

ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากประจุจนครบ 300 มิลลิลิตร

4.3 Sensitizing solution

Sensitizing concemtrate	0.4	มิลลิลิตร
-------------------------	-----	-----------

ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากประจุจนครบ 100 มิลลิลิตร

4.4 Staining solution

Staining reagent	4	มิลลิลิตร
------------------	---	-----------

ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากประจุจนครบ 100 มิลลิลิตร (เติม formaldehyde 54 ไมโครลิตรก่อนใช้)

4.5 Developing solution

Sensitizing concentrate	10	ไมโครลิตร
-------------------------	----	-----------

Developing reagent	10	มิลลิลิตร
--------------------	----	-----------

ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากประจุจนครบ 100 มิลลิลิตร (เติม formaldehyde 27 ไมโครลิตรก่อนใช้)

4.6 Stop solution

Stop reagent	8	มิลลิลิตร
--------------	---	-----------

ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากประจุจนครบ 100 มิลลิลิตร

ประวัติการศึกษา

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวสุธิดา ไตรบุตร
วัน เดือน ปี ที่เกิด	4 ธันวาคม พ.ศ. 2523
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	ปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน

