

วิธีการทดลอง

1. การสกัดดีเอ็นเอและวัดปริมาณดีเอ็นเอ

- 1.1 นำตัวอย่างดอกเห็ดสดมาล้างเอาเศษดินออกให้สะอาดด้วยน้ำประปาและน้ำกรอง ใช้กระดาษทิชชูซับน้ำออกให้มากที่สุด แบ่งเห็ดออกเป็น 4 ส่วน แต่ละกลุ่มนำไปผ่านวิธีการปรุงอาหาร 4 แบบ ดังนี้
 - ส่วนที่ 1 คัมในน้ำเดือดนาน 30 นาที
 - ส่วนที่ 2 ผสมกับเครื่องแกงตั้งไฟในน้ำเดือดนาน 30 นาที
 - ส่วนที่ 3 ผัดกับน้ำมันหอยและเครื่องปรุงรส ผัดด้วยไฟร้อนนาน 5 นาที
 - ส่วนที่ 4 ชุปกับผงแป้งทอดกรอบ ทอดในน้ำมันร้อนนาน 3-5 นาที
 นำดอกเห็ดที่ผ่านการปรุงอาหารทั้ง 4 แบบ มาล้างด้วยน้ำสะอาดและ 70% แอลกอฮอล์ ซับน้ำออกจนแห้งด้วยกระดาษกรอง ใส่ถุงพลาสติกเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอต่อไป
- 1.2 การสกัดดีเอ็นเอ นำตัวอย่างที่เก็บแช่แข็งไว้มาบดในโกร่งแช่เย็น บดจนเป็นผงละเอียดระหว่างบดให้เติมในโครเจนเหลวเป็นระยะๆ ขั้นตอนนี้ต้องทำอย่างรวดเร็ว
- 1.3 ตักเนื้อเยื่อที่บดเป็นผงแล้วประมาณ 80-100 มิลลิกรัม ไปสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Nucleospin Plant II kit ดำเนินการตามคู่มือการใช้งาน

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS ยีนและการทำให้สารผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์

- 2.1 นำสารละลายดีเอ็นเอมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของ ITS region โดยใช้ไพรเมอร์ ITS5-Forward (5'→3') GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G และ ITS4-Reverse primer (5'→3') TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC
- 2.2 เตรียมสารเคมีสำหรับปฏิกิริยา PCR ในปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1x PCR buffer, 3mM MgCl₂, 0.2mM dNTPs, ITS4 และ ITS5 ไพรเมอร์ละ 10 picomole, Taq DNA polymerase 1 unit, DNA template 80 nanogram, น้ำบริสุทธิ์ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อ
- 2.3 ตั้งค่าโปรแกรมเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังนี้ Denaturation 94°C 5 นาที จำนวน 1 รอบ Denaturatuion 94°C 1 นาที Annealing 56°C 1 นาที Extention 72°C 1 นาที จำนวน 39 รอบ และ 72°C 10 นาที จำนวน 1 รอบ
- 2.4 นำผลิตภัณฑ์ PCR ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาแยกดูขนาดแถบดีเอ็นเอในแผ่นเจล

ความเข้มข้น 1.5% ด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ใช้เวลา 45 นาที โดยเทียบขนาดแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส ย้อมเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ นำเจลมาส่องใต้แสงอัลตราไวโอเลตและบันทึกภาพ

- 2.5 นำสารละลายผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา PCR จากข้อ 2.4 ปริมาตรทั้งหมด 100 ไมโครลิตรมาผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยา Qiagen Purification kit
- 2.6 นำสารละลายผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มา 3 ไมโครลิตร run ในแผ่นเจลความเข้มข้น 1.5 % ด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ใช้เวลา 45 นาที โดยเทียบขนาดแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 คู่เบส ย้อมเจลด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ นำเจลมาส่องใต้แสงอัลตราไวโอเลตและบันทึกภาพ ตรวจสอบว่าแถบดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์แล้วมีขนาดเท่าเดิม ไม่มีแถบดีเอ็นเอขนาดอื่นปน
- 2.7 นำสารละลายผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวัดปริมาณด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 260/280 นาโนเมตร

3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS

- 3.1 ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริษัท 1First base ประเทศมาเลเซีย โดยใช้ไพรเมอร์ ITS5-forward primer และ ITS4-reverse primer
- 3.2 นำข้อมูลลำดับเบสที่ได้มาแก้ไขด้วยโปรแกรม bioedit vcrsion 7.1.5.0 จากนั้นนำไปเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

4. การออกแบบไพรเมอร์เพื่อให้มีความจำเพาะจำเพาะกับเห็ดพิษแต่ละชนิด

- 4.1 ใช้ข้อมูลลำดับเบสของเห็ดแต่ละตัวอย่างมาใช้ออกแบบไพรเมอร์ การออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อเห็ดแต่ละชนิดที่ศึกษาใช้ 3 วิธีประกอบกันดังนี้

4.1.1 ใช้โปรแกรม primer3

<http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3 WWW.cgi>

4.1.2 ใช้โปรแกรม primer-blast

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

- 4.1.3 ใช้โปรแกรม bio edit ทำ alignment แล้วเลือกบริเวณที่เบสมีความแตกต่างกันมากที่สุดเป็นไพรเมอร์ วิธีที่ 3 นี้ใช้ในกรณีที่ตัวอย่างเห็ดเป็นสกุลเดียวกัน

<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ forward และ reverse primers ที่จำเพาะต่อเห็ดพิษ

ชนิดเห็ด	Sequence (5' > 3')
<i>Amanita pseudoporphyria</i>	F- GGA CCG TTG TTA GAG GGT CA
	R- CAG CGG GTA ATC CTA CCT GA
<i>Scleroderma sinnamariense</i>	F- ACG TCT TCG CTC TCG AAC TC
	R- GGG GTT AAA GGT TTG GTG GT
<i>Russula sp.</i>	F- GCC CGA GCA CTC TTC ATA CA
	R- ATG GAT GCG AGA GCC AAG AG
<i>Russula emetica</i>	F-GAC GGC CTG CGT TTC TTT TT
	R- ATC GAT GCG AGA GCC AAG AG
<i>Chlorophyllum nothorachodes</i>	F- CCT CTG CTG GCT GTG AAT GT
	R- TTC ATC GAT GCG AGA GCC AA
<i>Chlorophyllum molybtides</i>	F-CAA CGG ATC TCT TGG CTC TC
	R- AGA GGA GCT GAA CCC AGT CA
<i>Agaricus subsaharianus</i>	F- CAA CGG ATC TCT TGG CTC TC
	R- AGC AAG CCT CCA TAG TCC AA

5. การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ (specificity)

5.1 การทดสอบความจำเพาะต่อชนิดเห็ดพิษ

นำสารละลายดีเอ็นเอของเห็ดแต่ละชนิดมาทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบ Real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะที่ออกแบบจากข้อ 4 องค์ประกอบของปฏิกิริยาในปริมาตรทั้งหมด 20 ไมโครลิตรประกอบด้วย 1X Thunderbird SYBR master mix, Forward primer 6 picomole, Reverse primer 6 picomole, DNA template 80-120 นาโนกรัม, น้ำ deionized ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ แต่ละไพรเมอร์จะถูกนำมาทดสอบกับตัวอย่างเห็ดพิษทุกๆ ตัวอย่าง ใช้น้ำเป็น negative control ตั้งค่าโปรแกรมการทำงานของเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบ Real-time PCR ดังนี้ Denaturation 95°C 5 นาที จำนวน 1 รอบ Denaturation 95°C 10 วินาที Annealing 55°C 15 วินาที Extension 72°C 30 วินาที จำนวน 30 รอบ จากนั้นทำ melting curve analysis ตั้งแต่อุณหภูมิ 55°C ถึง 95°C อ่านค่าสัญญาณแสงทุก ๆ 0.2°C hold 0.2 วินาที