5.2 การทดสอบความจำเพาะต่อตัวอย่างที่ผ่านการปรุงอาหารทั้ง 4 แบบ

นำสารละลายดีเอ็นเอที่เตรียมจากตัวอย่างเห็ดผ่านการปรุงอาหารทั้ง 4 แบบ ได้แก่ ต้ม แกง ผัดและชุปแป้งทอด มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเห็ดพิษแต่ละชนิด มีองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR แบบ Real-time PCR และโปรแกรมเหมือนข้อ 5.1

ผลการทดลอง

1. การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอตัวอย่างเห็ดพิษทั้งตัวอย่างสดที่เก็บแช่แข็งและจากตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนการปรุงอาหาร 4 แบบ ได้แก่ การต้ม แกง ผัด ทอด ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Nucleospin Plant II โดยใช้ปริมาณของเนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆของดอกเห็ดประมาณ 80-100 มิลลิกรัมพบว่าดีเอ็นเอจากตัวอย่างสดแช่แข็งและตัวอย่างที่ผ่านการปรุงอาหารได้ค่าความเข้มข้นระหว่าง 10 - 222 นาโนกรัม/ไมโครลิตร อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ 260/280 นาโนเมตร อยู่ระหว่าง 1.48-2.01 ตัวอย่างเห็ดไข่หงส์ที่ผ่านการผัดให้ค่ามากที่สุดเท่ากับ 222 นาโนกรัม ขณะที่ตัวอย่างเห็ดไข่ตายฮากที่ผ่านการแกงให้ปริมาณดีเอ็นเอน้อยที่สุดเท่ากับ 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร

ตารางที่ 4 อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ 260/280 นาโนเมตรและความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดจากเห็ดสดและเห็ดที่ผ่านการปรุงอาหารทั้ง 4 แบบ

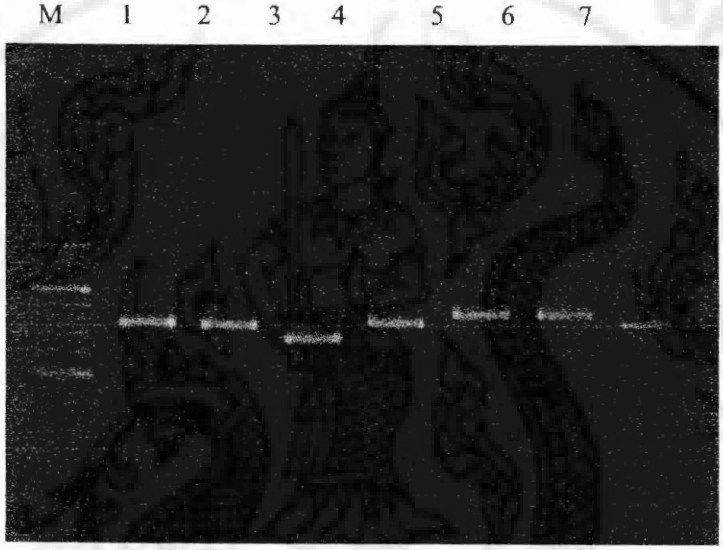
ชนิด	วิธีปรุง	อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260/280 นาโนเมตร	ความเข้มข้น (นาโนกรัม/ไมโครลิตร)
เห็ดไข่ตายฮาก (*A.pseudoporphyria*)	สด	1.93	51.00
	ต้ม	1.68	12.30
	แกง	1.87	10.00
	ผัด	1.93	13.00
	ทอด	1.86	11.00
เห็ดไข่หงส์ (*S. sinnamariense*)	สด	2.01	74.60
	ต้ม	1.87	37.00
	แกง	1.83	55.10
	ผัด	1.87	222.00
	ทอด	1.87	56.20
เห็ดพิษคล้ายเห็ดหล่ม (*Russula* sp.)	สด	1.89	77.40
	ต้ม	1.49	25.00
	แกง	1.48	53.60
	ผัด	1.52	38.50
	ทอด	1.64	44.40
เห็ดแดงน้ำหมาก (*R. emetica*)	สด	1.90	17.20
	ต้ม	2.05	12.70
	แกง	1.95	14.06
	ผัด	1.97	12.60
	ทอด	1.90	10.20

ตารางที่ 4 (ต่อ) อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ 260/280 นาโนเมตรและความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดจากเห็ดสดและเห็ดที่ผ่านการปรุงอาหารทั้ง 4 แบบ

ชนิด	วิธีปรุง	อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น260/280 นาโนเมตร	ความเข้มข้น (นาโนกรัม/ไมโครลิตร)
เห็ดกระโดงตีนต่ำ (*C.nothorachodes*)	สด	1.93	51.00
	ต้ม	1.79	19.80
	แกง	1.82	27.70
	ผัด	1.84	35.50
	ทอด	1.85	36.20
เห็ดหัวกรวดครีบเขียว (*C.molybtides*)	สด	1.72	20.41
	ต้ม	1.54	10.52
	แกง	1.60	14.23
	ผัด	1.58	15.36
	ทอด	1.69	12.65
เห็ดพิษคล้ายเห็ดหอม (*A.subsaharianus*)	สด	1.79	29.30
	ต้ม	1.60	17.56
	แกง	1.72	19.23
	ผัด	1.50	15.36
	ทอด	1.49	15.09

2. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ ITS

เมื่อนำดีเอ็นเอเห็ดพิษแต่ละชนิดที่สกัดจากตัวอย่างเห็ดสดแช่แข็งมาเพิ่มปริมาณในส่วนของ rRNA บริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS5 (forward) และ ITS4 (reverse) พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณได้แถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวมีขนาดตั้งแต่ 700-850 คู่เบส เห็ดพิษคล้ายเห็ดหล่มหรือเห็ดไคมีขนาดแถบดีเอ็นเอเล็กที่สุดขนาด 700 คู่เบส (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณในส่วนของไรโบโซมอล อาร์เอ็นเอยีน บริเวณ ITS ด้วยไพรเมอร์ ITS5 และ ITS 4 (M=100bp DNA ladder,1=เห็ดไข่ตายฮาก, 2=เห็ดไข่หงส์, 3=เห็ดพิษคล้ายเห็ดหล่ม, 4=เห็ดแดงน้ำหมาก, 5=เห็ดกระโดงตีนต่ำ, 6=เห็ดหัวกรวดครีบเขียว, 7=เห็ดพิษคล้ายเห็ดหอม

3. การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rDNA บริเวณ ITS และผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTn

3.1 ผลการหาลำดับเบส (DNA sequencing) ได้ผลดังนี้

3.1.1 เห็ดไข่ตายฮากมีลำดับเบสดังนี้

>1st_BASE_632977_4___4_5__ITS_5.ab1

CTCGTAGGTGACTGCGGAAGGATCATTATTGAAATAAAAACATGGTTGGAGATTTGAGCTGGCC
TCCTGAGGGATGGCATGTGCACGTCTCTTACTGTTTATTATCCCACCGGTGCATAATTTGTAGGC
TACCTATTAGGTGTGTCTATGTGTTTTTTTATACACATTGATTTGCCGGAAAAAGGTTGGAAAAA
AAAAATATTACAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAAAACGCAGCAAAA
TGCGATAAGTAATGTGAATTGCAAAATTCAGTGAATCATCGATTTTTTGAACGCACCTTGCGCTC
CTTGGTACTCTGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAAATTATCAAAATTGTCACGATAGTGG
TGATTTTGGATTATGGGATTTGCAGGACCGTTGTTAGAGGGTCAAGCTCTCCTGAAATGGATTAG
TAGAGCAAAATGAAACTCTGTTGGTGTGATAAGGAAATTGATCGTCAGAAAGAGTAACCAAAA
GGCTTTGCTATGTTGTTATAAAATGATTTAAAAAATTGACCTCAAATCTGGTAGGATTACCCGCT
GAACTTACGCATATCTATAAGCAGAAGAAG

ภาพที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ribosomal RNA gene ของเห็ดไข่ตายฮาก หลังจากทำ DNA sequencing ด้วย sequencing forward primer

3.1.2 เห็ดไข่หงส์มีลำดับเบสดังนี้

>1st_BASE_1176262_00_3_Resend_ITS_5.ab1

CCTTTTGGGGGACTGCGGAGGACATTATCGAAGTCGAACGCTAGGAGGGAGAAGGGGAGCCCGT
CGCTCCTCGGACCTCTCCGAAGCTTCAACCTTCTTCACACCCGTGTGCACCCGCTGTAGGTCCTTC
GGGATCCTACGTCTTCGCTCTCGAACTCGCATGTCTACAGAATGTCCATGTCGTGTCGACCGGCGT
CCGCGTCGGCGACCGCAAACCTTTGTACCACCTTTCACCATGGAATCTCTGGGTCCTCCCATCATT
AAAGGACGCACCGAACCCCAATAATAAAGGGGAATGGAAAATTTCCCTGGAACCACCAAACCTT
TAACCCCCCCTGGGCTTCCCCGGAATTCCAAGAACCAGGCTGGTTGAATGGCCTCCAAATCCCCA
AACCAAACCCTTCAACCCGTCCAAACTTCGGCCCCGAACCGGTGGGGGTCTGCGGGCGGCGACG
TCGGCTCCCCTCAAACGCATCAGCTGTGGGCCGAGCCCTGCGTGGCCGGCCTCCCCGACGTCGTA
ACGATCGTCGTGGGCTGGAAGCGCAGTGATCGGCGATCCCATGCTTTCCAACCTTTTTCTCGAAG
CTTGACCTCAAATCAGGCAGGACTACCCGCCGAACTTAAGCATATCAATAAAGCGGAGGAAA

ภาพที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA gene ของเห็ดไข่หงส์ หลังจากทำ DNA sequencing ด้วย sequencing forward primer

3.1.3 เห็ดพิษคล้ายเห็ดหล่มมีลำดับเบสดังนี้

>1st_BASE_1176264_00_5_Resend_ITS_5_Resend

TGCGGAGGACATTATCGTACAATGGAGGGCGTGAGGGTTGTCGCTGCCCTTTATGAAAATAAAAG
GTTGTGCACGCCCGAGCACTCTTCATACATCCATCTCACCCCTTTGTGCATCGCCGCGTGGGTCTCC
TCTTTGAACGAAGGGAGGGGCTTACGTTCTCACATAAAATCCAATGGAGTGTAATAAAATGTCTT
TTTCTTTTCCCGGTGATACCCGATCAATACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCCAT
GAAAAACGCAACGAAATGCGATACGTAATGGGAATTGCAAAATTCAGTGAATCATCCAATCTTTG
AACGCACCTTGGGCCCCTTGGCATTCCGAGGGGCACACCCGTTTGAATGTCCTGAATATCATCAAA
ACCTTTTCTCCGTTGATCCTTTTTTGGATTCCGGGAAAAAGGATTTTGGACTTGGAGGAACAATGC
TCGCCTTTAAATGCAAAGGGTTGAACTCCTCCCAAATGAATTAATGGGGTTCGCTGTGCTGATCCT
TGACGTGATAAGATGTTTCAACGTCTTGGGATCCGGCACTGTCAACCGCTTATAACTGTCTTATGG
ACAACGATGGTGCTCTGGTCATCACCACCGACATCGGTGGGAAGAGGGCTGGACCCACAAAAAA
AAAAAAAAAAAACCCCTTGACCTAAAATCGGGGGAAACCCCCCGCTAAATTTAACAATATAATAN
NGGGAAAAAA

ภาพที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA gene เห็ดพิษคล้ายเห็ดหล่ม หลังจากทำ DNA sequencing ด้วย sequencing forward primer

3.1.4 เห็ดแดงน้ำหมากมีลำดับเบสดังนี้

>1st_BASE_1176267_00_8_Resend_ITS_5.ab1

AATTTAGGGGACTGCGGGAGGACATTAACGTACAACGGAGGTGCAAGGGCTGTCGCTGACCTTCA
AAGGTCGTGCACGCCCAAGTGCTTTCATACATCCATCTCACCCCTTTGTGCATCACCGCGTGGGTCC
CCTTGAAAGGGACGGCCTGCGTTTCTTTTTCACACAAACCTTGATGTGTCATAGAATGTACATTTCT
TTTTTGCGGTGATACGCAGATCAATACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGA
AGAACGTAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAC
GCACCTTGCGCCCCTTGGCATTCCGAGGGGCACACCCGTTTGAGTGTCGTGAAATCCTCAAAATCC
TTTTTCTTTTGATCGAGATGAAGGATTTTTGGACTTGGAGGAATCGATGCTTGCTTCTCGAAAGCGA
GCTCCTCTCAAAGGAATTAGTGGGGGTTTGCTTTGCCGATCCTTGACGTGATAAGGTGTTTCTACGT
TTTGGATTCAGCACTGTCCCTTGAACACCCGCTTCCAACCGTCTTACGGACAATGATGGTGTTCCGG
TCACCGCCACCTGTGTTGGTGGGGGGAGGCTGGACCCACAAAAAAAACCCTTGACCTCAAATCGG
GTGAGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAA

ภาพที่ 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA gene เห็ดแดงน้ำหมาก หลังจากทำ DNA sequencing ด้วย sequencing forward primer

3.1.5 เห็ดกระโดงตีนต่ำมีลำดับเบสดังนี้

>1st_BASE_1176266_00_6_Resend_ITS_5.ab1

CCTTAGGGACTGCGGAAGACATTATTGAAATTGTCTTGATGGGTTGTCGCTGGCTCCTTGGAGCATGTGCA
CATCTGTCTTGATTTCATTTCATCCACCTGTGCACCATTTGTAGTCTTGGAATGGATATGAGTGGCCAACTC
TCAGGAAGTCATATTCCTGGATGTGAGGACTGCAGTGTGAAAACACGGCTTTTCCTCTGCTGGCTGTGAAT
GTCTGCTTGGGACTATGTATTTATTCATATACCACATAGTATGTTGTAGAATGTATCACATGGGCCATTTGT
GCCTATAGAATGTATATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA
ATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCACTCCTTGG
CATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAAATTCTCAACTCCTCCAGCTCTTGTAGCTGGCTCTGGA
GCTTGGATTATGGAGGTTACTGGCTGCCTTGTATTGGTTGGTCAGCTCCTCTGAAATGCATTAGCGGAACCA
TTTGCAATCTATTATGGGTGTGATAATTATCAACATCTAGTGGACTGCTCTCTGTCTGTTCAGCTGCTAACT
GTCTCTGATTCAAGAGACAATATGTATGAATGCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAA
GCATATCAATAAGCCGGAGGAAA

ภาพที่ 8 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA gene เห็ดกระโดงตีนต่ำ หลังจากทำ DNA sequencing ด้วย sequencing forward primer

3.1.6 เห็ดหัวกรวดครีบเขียวมีลำดับเบสดังนี้

>1st_BASE_1305189_A1_ITS_5.ab1

CCTTAGGTACTGCGGAGGACATTATTGAACTGTGTTTTTCAAAACACTTACTCGATGGGTTGTCGC
TGGCTCCTCTGGAGCATGTGCACGCCTGTCTTGACTTCATTCATCCACCTGTGCACCACTTGTAGT
CTTTGAGGGGTCTGAGAGAGTGGCTGACTTGTCGGGAATTCTCCCGGATGTGAGGACTGCAGTGT
GAAAGCACGGCTCTCTTCTACCTGGCCATGAACCCTGCCCCTCGAGGTCTATGTATTTATTCATAC
ACTATGTAGCATGTTACAGAATGTCTCAATGGGCCTTTGTGCCTATAAAATCATATACAACTTTCA
GCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATT
GCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCAT
GCCTGTTTGAGTGTCATTAAATTCTCAACTCCTCCAGCTTTTGTTAAGTTGGCTTTGGAGCTTGGAT
TGTGGAGGTTTGCTGGCCCTTCTATTGACTGGGTTCAGCTCCTCTGAAATACATTAGCGGAACCGT
TTGCAATCCGCCACAGGTGTGATAATTATCTACGCCAGTGGGTTGCTCTCTGTGTTCGGCTGCCAA
TCGTCTCTGCTTCAAGAGACAATTTTCTGAATGCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGA

ภาพที่ 9 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA gene เห็ดหัวกรวดครีบเขียว หลังจากทำ DNA sequencing ด้วย sequencing forward primer

3.1.7 เห็ดพิษคล้ายเห็ดหอมมีลำดับเบสดังนี้

>1st_BASE_1305190_B1_ITS_5.ab1

CCTTAAGGGACTGCGGAGGACATTATTGATTATGTTTTCTAGATGAGTTGTAGCTGGCTCTTTGGAGC
ATGTGCACGCTTGTCTGGACTTCATTTTCATCCACCTGTGCACATATTGTAGTCTCTGTCGGGTATTGA
GGAAGTGGTCAGCCTATCAGCTCTTGCTGGATGTGAGGATCTGCAGTGTGAAAACATAGCTGTCCTTT
ACTTGGCCATGGAATCTTTTTCCTTCCAGAGTCTATGTCAATCATTATACCCTGTAGAATGTCATTGAA
TGTCTTTACATGGGCTTTTATGCCTATGAAAATTGTAATACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCT
CGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGA
ATCTTTGAACGCATCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAAATTCTC
AACTCTCTTATACTTTGTTGTCAAAGAGAGCTTGGACTATGGAGGCTTGCTGGCCACTTCTTGTGATC
AGCTCCTCTGAAATGCATTAGCGGAACCGTTTGCGATCTGCCACAAGTGTGATATATTATCTACACTG
GCGAGGGGATTGCTCTCTGTTTGTTCAGCTTCTAATCGTCTCAGGACAATTTTTTGAACGCTTGACCTC
AAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCCGGAGGAAA

ภาพที่ 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA gene เห็ดพิษคล้ายเห็ดหอม หลังจากทำ DNA sequencing ด้วย sequencing forward primer

3.2 การเปรียบเทียบลำดับเบสของเห็ดแต่ละชนิดกับฐานข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA บริเวณ ITS ของเห็ดพิษทั้ง 7 ชนิด มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool พบว่าตัวอย่างเห็ดไข่ตายซากมีความเหมือนกับนิวคลีโอไทด์ของ *Amanita pseudoporphyria* ร้อยละ 93 (percent identity) เห็ดไข่หงส์นิวคลีโอไทด์เหมือนของ *Scleroderma sinnamariense* ร้อยละ 89 เห็ดพิษคล้ายเห็ดหล่มมีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับ *Russula* sp. ร้อยละ 91 เห็ดกระโดงตีนต่ำมีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับ *Chlorophyllum nothorachodes* ร้อยละ 92 เห็ดแดงน้ำหมากมีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับ *Russula emetica* ร้อยละ 95 เห็ดหัวกรวดครีบเขียวมีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับ *Chlorophyllum molybtides* ร้อยละ 99 และเห็ดพิษคล้ายเห็ดหอมมีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับ *Agaricus subsaharianus* ร้อยละ 96 มีค่า E-valuc และหมายเลข accession number ที่ใกล้เคียงกันดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ค่า E-value, Accession number และ Percent identity

ตัวอย่างเห็ด	สปีชีส์	E-value	Closest match Accession no.	Percent identity
เห็ดไข่ตายซาก	*A. pseudoporphyria*	0.0	FJ441034.1	93
เห็ดไข่หงส์	*S.sinnamariense*	0.0	FM213364.1	89
เห็ดพิษคล้ายเห็ดหล่ม	*Russula* sp.	6e-141	AB509874.1	91
เห็ดแดงน้ำหมาก	*R. emetica*	0.0	JN969375.1	95
เห็ดกระโดงตีนต่ำ	*C.nothorachodes*	0.0	AF482855.1	92
เห็ดหัวกรวดครีบเขียว	*C.molybdites*	0.0	U85337.1	99
เห็ดพิษคล้ายเห็ดหอม	*A. subsaharianus*	0.0	JF440300.1	96

Basic Local Alignment Search Tool

NCBI/ BLAST/ blastn suite/ **Formatting Results - ZE18Y4DG01N**

1st_BASE_632976_4___4_5__ITS_4.ab1

Query ID lcl|37975
Description 1st_BASE_632976_4___4_5__ITS_4.ab1
Molecule type nucleic acid
Query Length 613

Database Name nr
Description All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS,environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
Program BLASTN 2.2.25+

Descriptions

Legend for links to other resources: UniGene GEO Gene Structure Map Viewer PubChem BioAssay

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
FJ441034.1	Amanita pseudoporphyria isolate A4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	899	899	99%	0.0	98%	
AB015702.1	Amanita pseudoporphyria genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence, isolate: LEM960037a	897	897	99%	0.0	98%	
FJ441046.1	Amanita pseudoporphyria isolate A16 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	890	890	99%	0.0	98%	

ภาพที่ 11 ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสยีน ITS ของตัวอย่างเห็ดไข่ตายฮากด้วยโปรแกรม BLASTn

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้

4. การออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะต่อเห็ดพิษแต่ละชนิด (Primer design)

นำลำดับนิวคลีโอไทด์จากข้อ 3 มาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรมสำหรับออกแบบไพรเมอร์ 3 โปรแกรม ได้แก่ Primer3, Primer-Blast และใช้ Bioedit ในการทำ alignment ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของ forward และ reverse ไพรเมอร์สำหรับเห็ดพิษแต่ละชนิดดังแสดงในภาพที่ 12

4.1 เห็ดไข่ตายซาก (*Amanita pseudoporphyria*)

>1st_BASE_632977_4__4_5__ITS_5.ab1

CTCGTAGGTGACTGCGGAAGGATCATTATTGAAATAAAAACATGGTTGGAGATTTGAGCTGGCCTCCTGAG

GGATGGCATGTGCACGTCTCTTACTGTTTATTATCCCACCGGTGCATAATTTGTAGGCTACCTATTAGGTGT

GTCTATGTGTTTTTTTATACACATTGATTTGCCGGAAAAAGGTTGGAAAAAAAAAATATTACAACTTTCAAC

AATGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAAAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAAAATT

CAGTGAATCATCGATTTTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTACTCTGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGTC

ATTAAATTATCAAAATTGTCACGATAGTGGTGATTTTGGATTATGGGATTTGCAGGACCGTTGTTAGAGGG

TCAAGCTCTCCTGAAATGGATTAGTAGAGCAAAATGAAACTCTGTTGGTGTGATAAGGAAATTGATCGTCA

GAAAGAGTAACCAAAAGGCTTTGCTATGTTGTTATAAAATGATTTAAAAAATTGACCTCAAA

TTTGGTAGGATTACCCGCTCAACTTACGCATATCTATAAGCAGAAGAAG

ภาพที่ 12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ใช้เป็น forward และ reverse primer ที่จำเพาะต่อ *A.pseudoporphyria*

4.2 เห็ดไข่หงส์ (*Scleroderma sinnamariense*)

>1st_BASE_1176262_00_3_Resend_ITS_5.ab1

CCTTTTGGGGGACTGCGGAGGACATTATCGAAGTCGAACGCTAGGAGGGAGAAGGGGAGCCCGTC
GCTCCTCGGACCTCTCCGAAGCTTCAACCTTCTTCACACCCGTGTGCACCCGCTGTAGGTCCTTCGG
GATCCTACGTCTTCGCTCTCGAACTCGCATGTCTACAGAATGTCCATGTCGTGTCGACCGGCGTCCG
CGTCGGCGACCGCAAACCTTTGTACCACCTTTCACCATGGAATCTCTGGGTCCTCCCATCATTAAAG
GACGCACCGAACCCCAATAATAAAGGGGAATGGAAAATTTCCCTGGAACCACCAAACCTTTAACC
CCCCCTGGGCTTCCCCGGAATTCCAAGAACCAGGCTGGTTGAATGGCCTCCAAATCCCCAAACCAA
ACCCTTCAACCCGTCCAAACTTCGGCCCCGAACCGGTGGGGGTCTGCGGGCGGCGACGTCGGCTCC
CCTCAAACGCATCAGCTGTGGGCCGAGCCCTGCGTGGCCGGCCTCCCCGACGTCGTAACGATCGTC
GTGGGCTGGAAGCGCAGTGATCGGCGATCCCATGCTTTCCAACCTTTTTCTCGAAGCTTGACCTCAA
ATCAGGCAGGACTACCCGCCGAACTTAAGCATATCAATAAAGCGGAGGAAA

ภาพที่ 13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ใช้เป็น forward และ reverse primer ที่จำเพาะต่อ *S.sinnamariense*

4.3 เห็ดพิษคล้ายเห็ดหล่ม (*Russula* sp.)

>1st_BASE_1176264_00_5_Resend_ITS_5.ab1

TGCGGAGGACATTATCGTACAATGGAGGGCGTGAGGGTTGTCGCTGCCCTTTATGAAAATAAAA
GGTTGTGCACGCCCCAGTAACTCTTCATACATCCATCTCACCCCTTTGTGCATCGCCGCGTGGGTCT
CCTCTTTGAACGAAGGGAGGGGCTTACGTTCTCACATAAAATCCAATGGAGTGTAATAAAATG
TCTTTTTCTTTTCCCGGTGATACCCGATCAATACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCA
TCCATGAAAAACGCAACGAAATGCGATACGTAATGGGAATTGCAAAATTCAGTGAATCATCCAA
TCTTTGAACGCACCTTGGGCCCCTTGGCATTCCGAGGGGCACACCCGTTTGAATGTCCTGAATAT
CATCAAAACCTTTTCTCCGTTGATCCTTTTTTGGATTCCGGGAAAAAGGATTTTGGACTTGGAGG
AACAATGCTCGCCTTTAAATGCAAAGGGTTGAACTCCTCCCAAATGAATTAATGGGGTTCGCTGT
GCTGATCCTTGACGTGATAAGATGTTTCAACGTCTTGGGATCCGGCACTGTCAACCGCTTATAAC
TGTCTTATGGACAACGATGGTGCTCTGGTCATCACCACCGACATCGGTGGGAAGAGGGCTGGAC
CCACAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCCCTTGACCTAAAATCGGGGGAAACCCCCCGCTAAATTTAA

ภาพที่ 14 ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ใช้เป็น forward และ reverse primer ที่จำเพาะต่อเห็ดพิษคล้ายเห็ดหล่ม *Russula* sp.

4.4 เห็ดแดงน้ำหมาก (*Russula emetica*)

>1st_BASE_1176267_00_8_Resend_ITS_5.ab1

AATTTAGGGGACTGCGGGAGGACATTAACGTACAACGGAGGTGCAAGGGCTGTCGCTGACCT

TCAAAGGTCGTGCACGCCCAAGTGCTTTCATACATCCATCTCACCCCTTTGTGCATCACCGCGT

GGGTCCCCTTGAAAGGGACGGCCTGCGTTTCTTTTTCACACAAACCTTGATGTGTCATAGAAT

GTACATTTCTTTTTTGCGGTGATACGCAGATCAATACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTC

TCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAT

CATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCCCCTTGGCATTCCGAGGGGCACACCCGTTTGAGTGT

CGTGAAATCCTCAAAATCCTTTTTCTTTTGATCGAGATGAAGGATTTTTGGACTTGGAGGAAT

CGATGCTTGCTTCTCGAAAGCGAGCTCCTCTCAAAGGAATTAGTGGGGGTTTGCTTTGCCGAT

CCTTGACGTGATAAGGTGTTTCTACGTTTTGGATTCAGCACTGTCCCTTGAACACCCGCTTCCA

ACCGTCTTACGGACAATGATGGTGTTCCGGTCACCGCCACCTGTGTTGGTGGGGGGAGGCTGG

ACCCACAAAAAAAACCCTTGACCTCAAATCGGGTGAGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATC

ภาพที่ 15 ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ใช้เป็น forward และ reverse primer ที่จำเพาะต่อ *Russula emetica*

4.5 เห็ดกระโดงดินต่ำ (*Chlorophyllum nothorachodes*)

>1st_BASE_1176266_00_6_Resend_ITS_5.ab1

CCTTAGGGACTGCGGAAGACATTATTGAAATTGTCTTGATGGGTTGTCGCTGGCTCCTTGGAG

CATGTGCACATCTGTCTTGATTTCATTTCATCCACCTGTGCACCATTTGTAGTCTTGGAATGGA

TATGAGTGGCCAACTCTCAGGAAGTCATATTCCTGGATGTGAGGACTGCAGTGTGAAAACACG

GCTTTTCCTCTGCTGGCTGTGAATGTCTGCTTGGGACTATGTATTTATTCATATACCACATAGT

ATGTTGTAGAATGTATCACATGGGCCATTTGTGCCTATAGAATGTATATACAACTTTCAGCAAC

GGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCA

GAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCACTCCTTGGCATTCCGAGGAGCATG

CCTGTTTGAGTGTCATTAAATTCTCAACTCCTCCAGCTCTTGTAGCTGGCTCTGGAGCTTGGAT

TATGGAGGTTACTGGCTGCCTTGTATTGGTTGGTCAGCTCCTCTGAAATGCATTAGCGGAACCA

TTTGCAATCTATTATGGGTGTGATAATTATCAACATCTAGTGGACTGCTCTCTGTCTGTTCAGC

TGCTAACTGTCTCTGATTCAAGAGACAATATGTATGAATGCTTGACCTCAAATCAGGTAGGAC

TACCCGCTGAACTTAAGCATA

ภาพที่ 16 ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ใช้เป็น forward และ reverse primer ที่จำเพาะต่อ *Chlorophyllum nothorachodes*

4.6 เห็ดหัวกรวดครีบเขียว (*Chlorophyllum molybtides*)

>1st_BASE_1305189_A1_ITS_5.ab1

CCTTAGGTACTGCGGAGGACATTATTGAACTGTGTTTTTCAAAACACTTACTCGATGGGTTGTCG
CTGGCTCCTCTGGAGCATGTGCACGCCTGTCTTGACTTCATTCATCCACCTGTGCACCACTTGTA
GTCTTTGAGGGGTCTGAGAGAGTGGCTGACTTGTCGGGAATTCTCCCGGATGTGAGGACTGCAG
TGTGAAAGCACGGCTCTCTTCTACCTGGCCATGAACCCTGCCCCTCGAGGTCTATGTATTTATTC
ATACACTATGTAGCATGTTACAGAATGTCTCAATGGGCCTTTGTGCCTATAAAATCATATACAAC
TTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATG
TGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAG
GAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATTAAATTCTCAACTCCTCCAGCTTTTGTTAAGTTGGCTTTGGA
GCTTGGATTGTGGAGGTTTGCTGGCCCTTCTATTGACTGGGTTCAGCTCCTCTGAAATACATTAG
CGGAACCGTTTGCAATCCGCCACAGGTGTGATAATTATCTACGCCAGTGGGTTGCTCTCTGTGTT
CGGCTGCCAATCGTCTCTGCTTCAAGAGACAATTTTCTGAATGCTTGACCTCAAATCAGGTAGGA
CTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCCGGAGGAAA

ภาพที่ 17 ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ใช้เป็น forward และ reverse primer ที่จำเพาะต่อ *Chlorophyllum molybtides*

4.7 เห็ดพิษคล้ายเห็ดหอม (*Agaricus subsahariamus*)

>1st_BASE_1305190_B1_ITS_5.ab1

CCTTAAGGGACTGCGGAGGACATTATTGATTATGTTTTCTAGATGAGTTGTAGCTGGCTCTTTGGAGCATGTGCACGC
TTGTCTGGACTTCATTTTCATCCACCTGTGCACATATTGTAGTCTCTGTCGGGTATTGAGGAAGTGGTCAGCCTATCA
GCTCTTGCTGGATGTGAGGATCTGCAGTGTGAAAACATAGCTGTCCTTTACTTGGCCATGGAATCTTTTTCCTTCCAG
AGTCTATGTCAATCATTATACCCTGTAGAATGTCATTGAATGTCTTTACATGGGCTTTTATGCCTATGAAAATTGTAA
TACAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTG
CAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCATCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCATGCCTGTTTGAGTGT
CATTAAATTCTCAACTCTCTTATACTTTGTTGTCAAAGAGAGCTTGGACTATGGAGGCTTGCTGGCCACTTCTTGTGA
TCAGCTCCTCTGAAATGCATTAGCGGAACCGTTTGCGATCTGCCACAAGTGTGATATATTATCTACACTGGCGAGGG
GATTGCTCTCTGTTTGTTCAGCTTCTAATCGTCTCAGGACAATTTTTTGAACGCTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTA
CCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCCGGAGGAAA

ภาพที่ 18 ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ใช้เป็น forward และ reverse primer ที่จำเพาะต่อ *Agaricus subsaharianus*

ตารางที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ forward และ reverse primers ที่จำเพาะต่อเห็ดพิษ

ชนิดเห็ด	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' > 3')	ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ (คู่เบส)
A.pseudoporphyria	Ap_001-F	GGA CCG TTG TTA GAG GGT CA	170
	Ap_001-R	CAG CGG GTA ATC CTA CCT GA	
S.sinnamariense	Ss_003-F	ACG TCT TCG CTC TCG AAC TC	121
	Ss_003-R	GGG GTT AAA GGT TTG GTG GT	
Russula sp.	Rs_005-F	GCC CGA GCA CTC TTC ATA CA	191
	Rs_005-R	ATG GAT GCG AGA GCC AAG AG	
R.emetica	Re_008-F	GAC GGC CTG CGT TTC TTT TT	149
	Re_008-R	ATC GAT GCG AGA GCC AAG AG	
C.nothorachodes	Cn_006-F	CCT CTG CTG GCT GTG AAT GT	121
	Cn_006-R	TTC ATC GAT GCG AGA GCC AA	
C.molybtides	Cm_A1-F	CAA CGG ATC TCT TGG CTC TC	241
	Cm_A1-R	AGA GGA GCT GAA CCC AGT CA	
A.subsaharianus	As_B1-F	CAA CGG ATC TCT TGG CTC TC	168
	As_B1-R	AGC AAG CCT CCA TAG TCC AA	

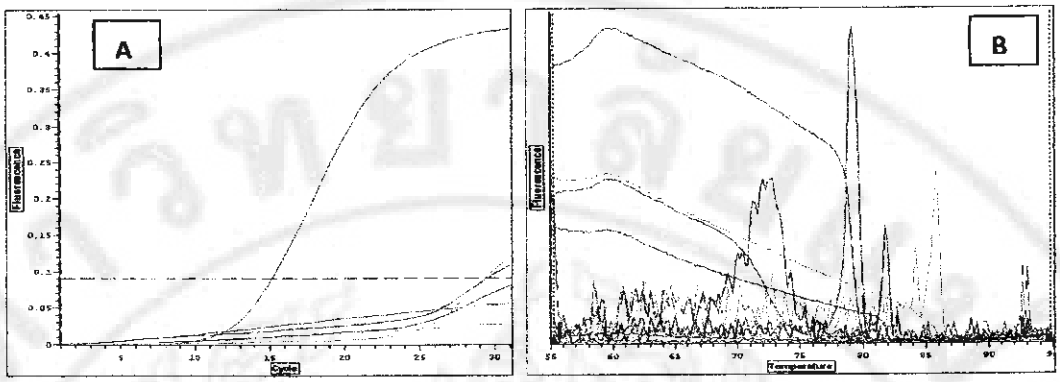
5. การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ (Specificity)

5.1 การทดสอบความจำเพาะต่อชนิดเห็ดพิษ

เมื่อนำดีเอ็นเอแม่แบบของเห็ดพิษทั้ง 7 ชนิด มาทดสอบกับไพรเมอร์ Ap_001 ซึ่งออกแบบให้จำเพาะกับ *A.pseudoporphyria* พบว่าดีเอ็นเอแม่แบบของเห็ด *A.pseudoporphyria* ให้สัญญาณแสง SYBR Green I มีค่า Ct เท่ากับ 14.26 ขณะที่ดีเอ็นเอแม่แบบจากเห็ดชนิดอื่นไม่สามารถตรวจพบยกเว้นดีเอ็นเอแม่แบบจากเห็ด *C.molybtides, C.nothorachodes* และ *Russula* sp. ตรวจพบสัญญาณแสงที่จำนวนรอบ 28.98, 29.77 และ 27.84 ตามลำดับ ไพรเมอร์ Ss_003 พบว่ามีสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนต์กับดีเอ็นเอแม่แบบจากเห็ด *S.sinnamariense* เท่านั้น ณ จำนวนรอบที่ 11.13 ส่วนตัวอย่างดีเอ็นเอจากเห็ดชนิดอื่นไม่พบสัญญาณ เช่นเดียวกับไพรเมอร์ Rs_005, Cn_006, Cm_A1, As_B1 ไพรเมอร์ที่จำเพาะทั้ง 4 ไพรเมอร์นี้ก็ให้ผลในทำนองเดียวกันคือไพรเมอร์ Rs_005 มีความจำเพาะกับ *Russula* sp., ไพรเมอร์ Cn_006 มีความจำเพาะกับเห็ด *C.nothorachodes*, ไพรเมอร์ Cm_A1 มีความจำเพาะกับเห็ด *C.molybtides*, ไพรเมอร์ As_B1 มีความจำเพาะกับเห็ด *A.subsaharianus* เท่านั้น โดยไพรเมอร์ Rs_005, Cn_006, Cm_A1, As_B1 มีค่า Ct เท่ากับ 12.73, 15.39, 13.37 และ 16.75 ตามลำดับ ส่วนไพรเมอร์ Re_008 นอกจากจะตรวจพบสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ที่จำเพาะกับเห็ด *R.emetica* ณ จำนวนรอบที่ 14.00 แล้วยังตรวจพบสัญญาณฟลูออเรสเซนต์กับดีเอ็นเอจากเห็ด *A.pseudoporphyria* ณ จำนวนรอบที่ 27.58 ด้วย (ภาพที่ 19 - 25)

จากการทำ melting curve analysis พบว่าไพรเมอร์ Ap_001 มี peak ของผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการจับแบบจำเพาะจำนวน 1 peak ค่า Tm เท่ากับ 79.20° C และมี peak ที่เกิดจาก non specific อย่างน้อย 3 peak เป็นดีเอ็นเอแม่แบบจากเห็ด *C.molybtides* เห็ด *Russula* sp. และเห็ด *C.nothorachodes* ไพรเมอร์ Rs_005, Cn_006, Cm_A1 และ As_B1 พบว่ามี peak ที่เกิดจากการจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอแม่แบบแบบจำเพาะเพียง 1 peak เท่านั้น มีค่า Tm เท่ากับ 85.00, 82.40, 78.40, และ 82.20° C ตามลำดับ ส่วนไพรเมอร์ Re_008 ค่า Tm เท่ากับ 79.40° C และพบ non specific ซ้อนอยู่ใต้ peak ของ specific product ซึ่งเป็นสัญญาณต่ำๆ มีค่า Tm เท่ากับ 79.40 พบว่าเป็นดีเอ็นเอจากเห็ด *A.pseudoporphyria*

5.1.1 เห็ดไข่ตายซาก (*Amanita pseudoporphyria*)



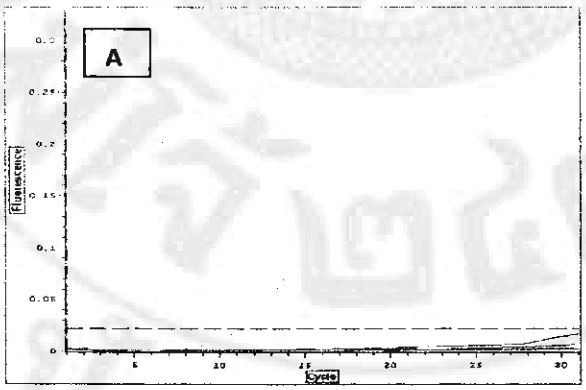
ภาพที่ 19 A) สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนต์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *A.pseudoporphyria* ดีเอ็นเอแม่แบบเป็นเห็ดพิษชนิดต่างๆ ได้แก่

A.pseudoporphyria ▬ *S.sinnsmarien* ▬ *Russula* sp. ▬ *C.nothorachodes* ▬

Russula emetica ▬ *C.molybdites* ▬ *A.subsaharirianus* negative control ▬

(B) melting curve analysis

5.1.2 เห็ดไข่หงส์ (*Scleroderma sinnamariense*)

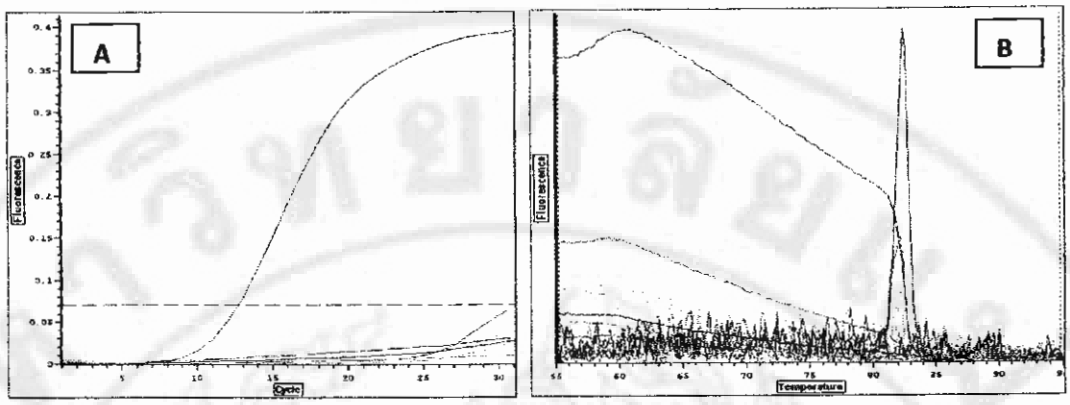


ภาพที่ 20 A) สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนต์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (แกนX) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *S.sinnamariense* ดีเอ็นเอแม่แบบเป็นเห็ดพิษชนิดต่างๆ ได้แก่

A.pseudoporphyria ▬ *S.sinnsmariense* ▬ *Russula* sp. ▬ *C.nothorachodes* ▬

Russula emetica ▬ *C.molybdites* ▬ *A.subsaharirianus* negative control ▬

5.1.3 เห็ดพิษลักษณะคล้ายเห็ดหล่ม (*Russula* sp.)



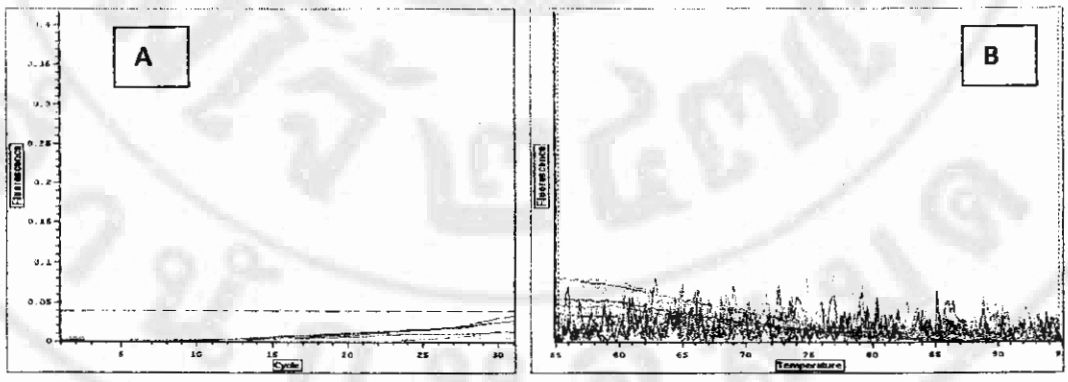
ภาพที่ 21 A) สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนต์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *Russual* sp. ดีเอ็นเอแม่แบบเป็นเห็ดพิษชนิดต่างๆ ได้แก่

A.pseudoporphyria ▬ *S.sinnsmariense* ▬ *Russula* sp. ▬ *C.nothorachodes* ▬

Russula emetica ▬ *C.molybdites* ▬ *A.subsaharirianus* negative control ▬

(B) melting curve analysis

5.1.4 เห็ดกระโดงตีนต่ำ (*Chlorophyllum nothorachodes*)



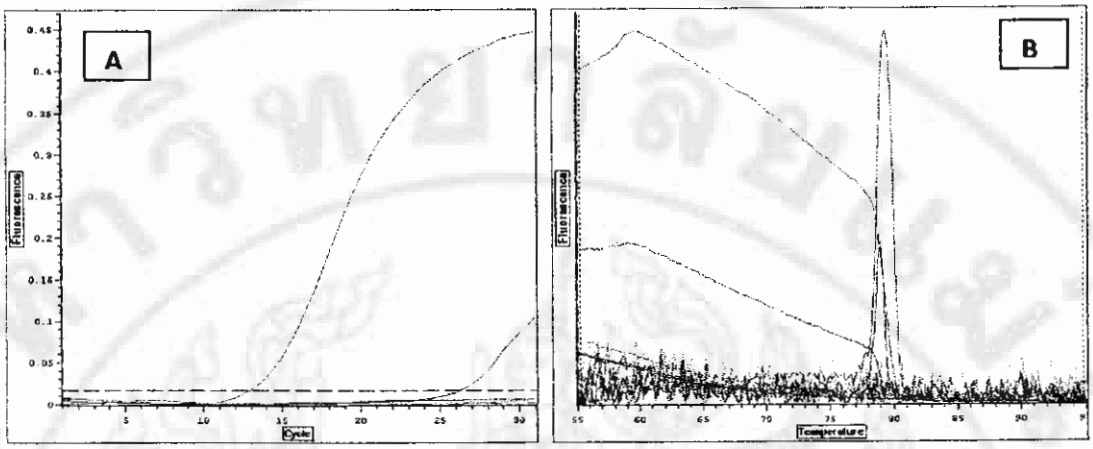
ภาพที่ 22 A) สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนต์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *C.nothorachodes* ดีเอ็นเอแม่แบบเป็นเห็ดพิษชนิดต่างๆ ได้แก่

A.pseudoporphyria ▬ *S.sinnsmarien* ▬ *Russula* sp. ▬ *C.nothorachodes* ▬

Russula emetica ▬ *C.molybdites* ▬ *A.subsaharirianus* negative control ▬

(B) melting curve analysis

5.1.5 เห็ดแดงน้ำหมาก (*Russula emetica)*



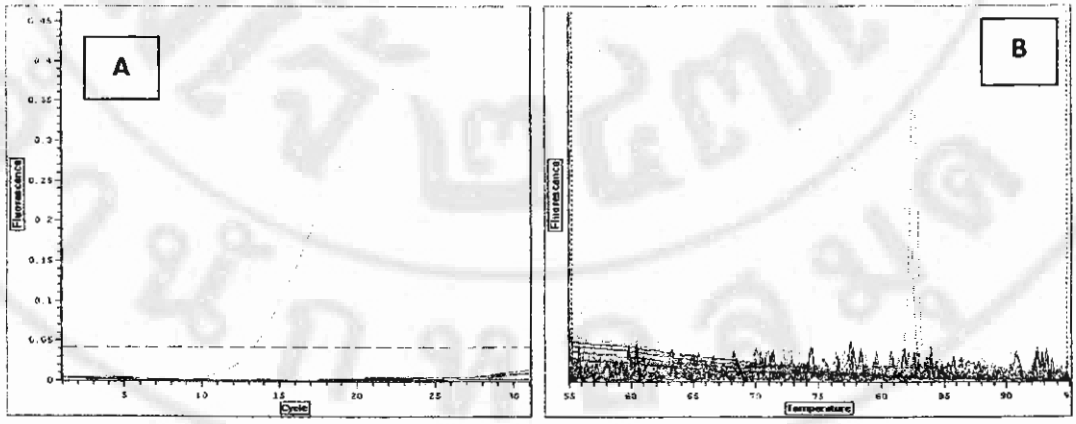
ภาพที่ 23 A) สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนต์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *R.emetica* ดีเอ็นเอแม่แบบเป็นเห็ดพิษชนิดต่างๆ ได้แก่

A.pseudoporphyria *S.sinnsmariense* *Russula* sp. *C.nothorachodes*

Russula emetica *C.molybdites* *A.subsaharirianus* negative control

(B) melting curve analysis

5.1.6 เห็ดหัวกรวดครีบเขียว (*Chlorophyllum molybdites*)



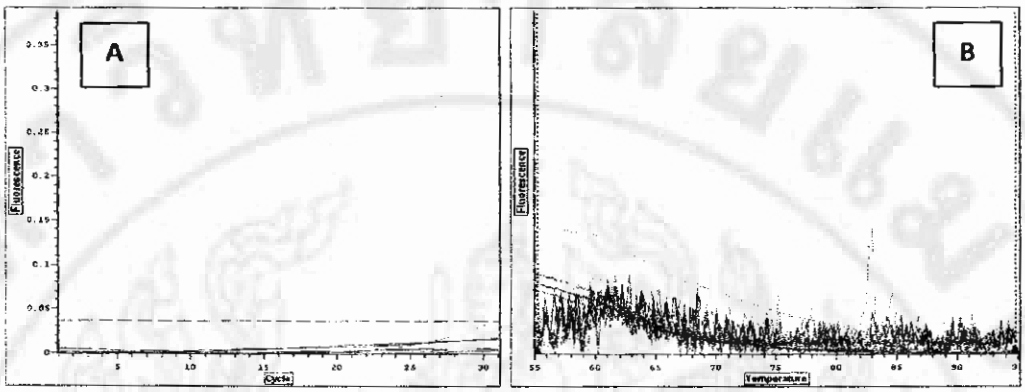
ภาพที่ 24 A) สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนต์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (แกนX) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *C.molybtides* ดีเอ็นเอแม่แบบเป็นเห็ดพิษชนิดต่างๆ ได้แก่

A.pseudoporphyria *S.sinnsmarien* *Russula* sp. *C.nothorachodes*

Russula emetica *C.molybdites* *A.subsaharirianus* negative control

(B) melting curve analysis

5.1.7 เห็ดคล้ายเห็ดหอม (*Agaricus subsaharianus*)



ภาพที่ 25 A) สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนต์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (แกนX) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *A.subsaharianus* ดีเอ็นเอแม่แบบเป็นเห็ดพิษชนิดต่างๆ ได้แก่ *A.pseudoporphyria* *S.sinnsmarien* *Russula* sp. *C.nothorachodes* *Russula emetica* *C.molybdites* *A.subsahariranus* negative control

B) melting curve analysis

ตารางที่ 7 ค่า Threshold cycle (C_T) ของเห็ดพิษชนิดต่างๆที่ทดสอบด้วยไพรเมอร์จำเพาะ

ชนิดเห็ดพิษ	ค่า C_T	ค่า Tm (°C)
A.pseudoporphyria	14.26	79.20
S.sinnamariense	11.13	85.00
Russula sp.	12.73	82.4
R.emetica	14.00	79.4
C.nothrochodes	15.39	78.4
C.molyhtides	13.37	82.6
A.subsaharinus	16.75	82.2

5.2 การทดสอบความจำเพาะต่อตัวอย่างที่ผ่านการปรุงอาหารทั้ง 4 แบบ

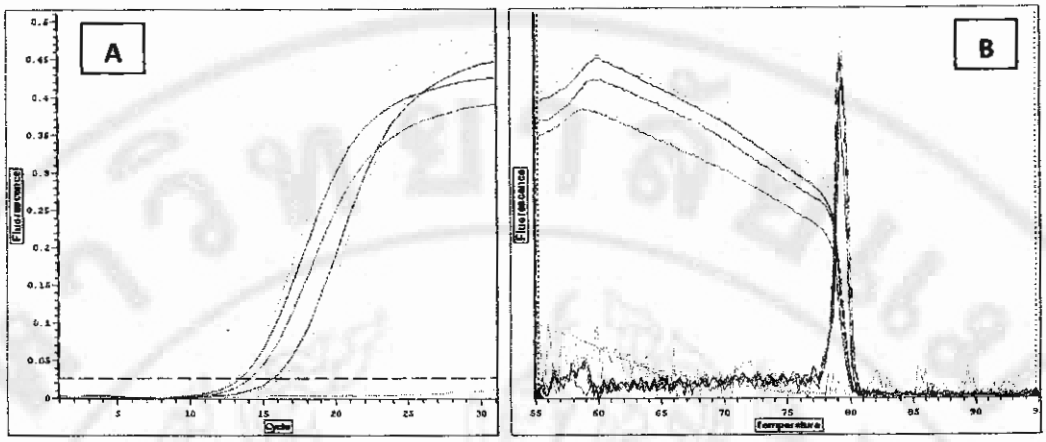
ดีเอ็นเอแม่แบบที่เตรียมจากเห็ดทั้ง 7 ชนิด นำไปผ่านการปรุงอาหารทั้ง 4 วิธี ได้แก่ ต้มในน้ำเดือดนาน 30 นาที, ผสมกับเครื่องแกงตั้งไฟในน้ำเดือดนาน 30 นาที, ผัดกับน้ำน้ำหอยและเครื่องปรุงรส ผัดไฟร้อนนาน 5 นาทีและนำดอกเห็ดมาชุปกับผงแป้งทอดกรอบ ทอดในน้ำมันร้อนนาน 3-5 นาที จากนั้นนำเห็ดมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับปฏิกิริยา PCR แบบ Real-time PCR และตรวจติดตามผลด้วยวัดสัญญาณแสงของ SYBR Green I โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเห็ดแต่ละชนิด ใช้น้ำ deionized ที่ผ่านการฆ่าเชื้อเป็น no template control ผลการทดสอบพบว่าดีเอ็นเอแม่แบบของเห็ดทุกชนิดทั้งตัวอย่างสดและที่เตรียมจากปรุงอาหารทั้ง 4 แบบ สามารถตรวจพบสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนต์ จำนวนรอบที่ตรวจพบอยู่ในช่วง 9.08-16.45 ค่า Tm จากการทำ melting curve analysis อยู่ในช่วง 79.20 – 85.00 ดังแสดงในตารางที่ 8 ภาพที่ 26 - 32

ตารางที่ 8 ค่า Ct ของเห็ดพิษที่ผ่านการปรุงอาหาร 4 แบบ และค่า Tm จากการทำ melting curve analysis

ชนิดเห็ด	วิธีปรุงอาหาร	ค่า Ct (°C)	ค่า Tm (°C)
A.pseudoporphyria	เห็ดสด	13.39	79.20
	ต้มน้ำเดือด 30 นาที	16.12	
	แกงในเครื่องแกง 30 นาที	15.66	
	ผัดในน้ำมันร้อนกับเครื่องปรุงรส 5 นาที	13.05	
	ชุปแป้งทอดในน้ำมันร้อน	14.05	
S.sinnamariense	เห็ดสด	12.41	85
	ต้มน้ำเดือด 30 นาที	12.68	
	แกงในเครื่องแกง 30 นาที	12.68	
	ผัดในน้ำมันร้อนกับเครื่องปรุงรส 5 นาที	11.08	
	ชุปแป้งทอดในน้ำมันร้อน	11.41	
Russula sp.	เห็ดสด	10.63	82.40
	ต้มน้ำเดือด 30 นาที	16.03	
	แกงในเครื่องแกง 30 นาที	16.45	
	ผัดในน้ำมันร้อนกับเครื่องปรุงรส 5 นาที	15.91	
	ชุปแป้งทอดในน้ำมันร้อน	13.30	

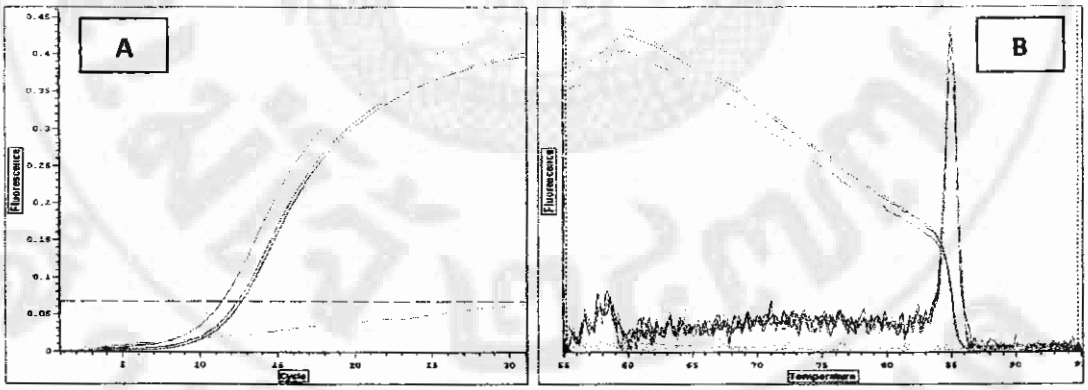
ชนิดเห็ด	วิธีปรุงอาหาร	ค่า Ct (°C)	ค่า Tm (°C)
Russula emetica	เห็ดสด	12.99	
	ต้มน้ำเดือด 30 นาที	13.46	
	แกงในเครื่องแกง 30 นาที	13.18	
	ผัดในน้ำมันร้อนกับเครื่องปรุงรส 5 นาที	15.33	
	ชุปแป้งทอดในน้ำมันร้อน	15.06	
C.nothorachodes	เห็ดสด	15.79	78.4
	ต้มน้ำเดือด 30 นาที	15.88	
	แกงในเครื่องแกง 30 นาที	13.49	
	ผัดในน้ำมันร้อนกับเครื่องปรุงรส 5 นาที	13.39	
	ชุปแป้งทอดในน้ำมันร้อน	13.44	
C.molybtides	เห็ดสด	9.09	82.60
	ต้มน้ำเดือด 30 นาที	11.67	
	แกงในเครื่องแกง 30 นาที	11.04	
	ผัดในน้ำมันร้อนกับเครื่องปรุงรส 5 นาที	9.08	
	ชุปแป้งทอดในน้ำมันร้อน	10.23	
A.subsaharianus	เห็ดสด	10.02	82.20
	ต้มน้ำเดือด 30 นาที	14.45	
	แกงในเครื่องแกง 30 นาที	14.59	
	ผัดในน้ำมันร้อนกับเครื่องปรุงรส 5 นาที	12.63	
	ชุปแป้งทอดในน้ำมันร้อน	12.92	

5.2.1 เห็ดไข่ตายยาก (*A.pseudoporphyria*)



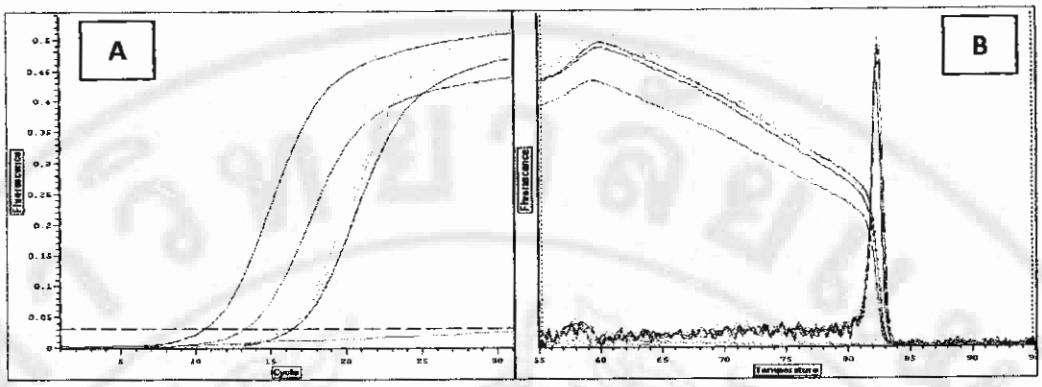
ภาพที่ 26 A) สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนต์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *A. pseudoporphyria* ดีเอ็นเอแม่แบบเตรียมจากดอกสดและที่ผ่านการปรุงอาหาร 4 แบบ (สด) (ต้ม) (แกง) (ผัด) (ทอด) negative control B) melting curve analysis

5.2.2 เห็ดไข่หงส์ (*S. sinnamariense*)



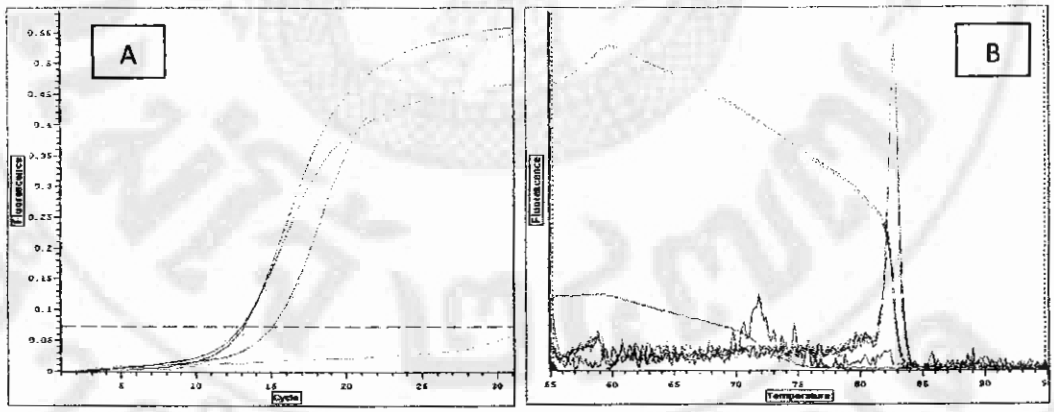
ภาพที่ 27 A) สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนต์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *S.sinnamariense* ดีเอ็นเอแม่แบบเตรียมจากดอกสดและที่ผ่านการปรุงอาหาร 4 แบบ (สด) (ต้ม) (แกง) (ผัด) (ทอด) negative control B) melting curve analysis

5.2.3 เห็ดพิษคล้ายเห็ดหล่ม (*Russula* sp.)



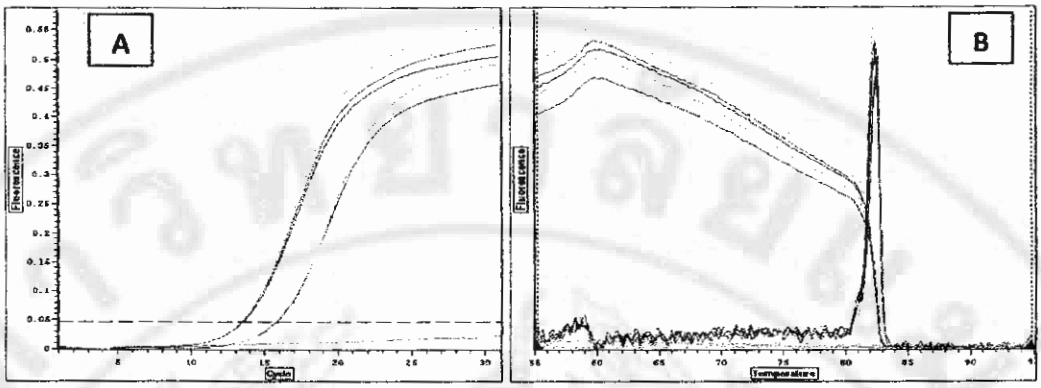
ภาพที่ 28 A) สัญญาณแสงฟลูออเรสเซ็นต์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *Russula* sp ดีเอ็นเอแม่แบบเตรียมจากดอกสดและที่ผ่านการปรุงอาหาร 4 แบบ (สด) (ต้ม) (แกง) (ผัด) (ทอด) negative control B) melting curve analysis

5.2.4 เห็ดแดงน้ำหมาก (*R.emetica*)



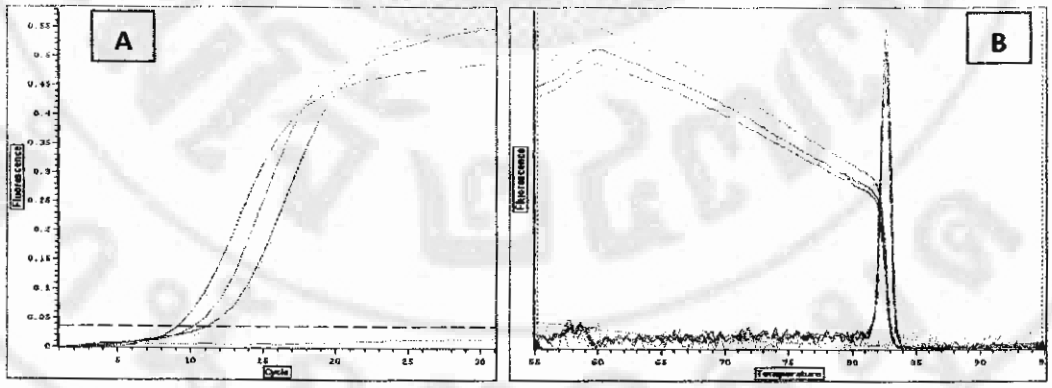
ภาพที่ 29 A) สัญญาณแสงฟลูออเรสเซ็นต์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *Russula emetica* ดีเอ็นเอแม่แบบเตรียมจากดอกสดและที่ผ่านการปรุงอาหาร 4 แบบ (สด) (ต้ม) (แกง) (ผัด) (ทอด) negative control B) melting curve analysis

5.2.5 เห็ดกระโดงตีนต่ำ (*C.nothorachodes*)



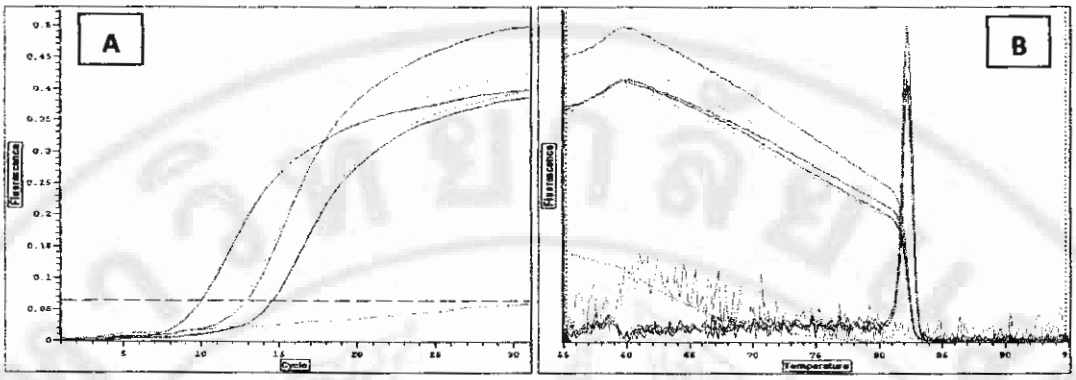
ภาพที่ 30 A) สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนต์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *C.nothorachodes* ดีเอ็นเอแม่แบบเตรียมจากดอกสดและที่ผ่านการปรุงอาหาร 4 แบบ (สด) (ต้ม) (แกง) (ผัด) (ทอด) negative control B) melting curve analysis

5.2.6 เห็ดหัวกรวดครีบเขียว (*C.molybtides*)



ภาพที่ 31 A) สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนต์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *C.molybtides* ดีเอ็นเอแม่แบบเตรียมจากดอกสดและที่ผ่านการปรุงอาหาร 4 แบบ (สด) (ต้ม) (แกง) (ผัด) (ทอด) negative control B) melting curve analysis

5.2.7 เห็ดพิษคล้ายเห็ดหอม (*Agaricus subsaharianus*)



ภาพที่ 32 A) สัญญาณแสงฟลูออเรสเซนต์ (แกน Y) กับจำนวนรอบของปฏิกิริยา (แกน X) ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *A.subsaharianus* ดีเอ็นเอแม่แบบเตรียมจากดอกสดและที่ผ่านการปรุงอาหาร 4 แบบ (สด) (ต้ม) (แกง) (ผัด) (ทอด) negative control B) melting curve analysis