อภิปรายผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. การสกัดดีเอ็นเอ

การศึกษานี้สกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป ข้อดีของการใช้ชุดน้ำยาคือมีขั้นตอนที่ง่าย สะดวกและรวดเร็วเหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยที่ต้องการทราบผลในเวลาที่รวดเร็ว ข้อด้อยคือชุดน้ำยามีราคาค่อนข้างสูง ดังนั้นหากเป็นงานที่ไม่จำเป็นต้องเร่งด่วนควรใช้วิธีการสกัดด้วยสารเคมีที่เตรียมขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ การสกัดด้วยชุดน้ำยาสกัดในการศึกษาครั้งนี้ได้ปริมาณดีเอ็นเอมากเพียงพอ ค่าความบริสุทธิ์ค่อนข้างต่ำมีค่าอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ 260/280 นาโนเมตร ต่ำกว่า 1.8 และเมื่อดูจากลักษณะแถบดีเอ็นเอที่แยกในเจลพบว่าแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการนั้นเป็นแถบบางๆ ซึ่งสอดคล้องกับค่าการดูดกลืนแสงที่มีค่าต่ำนอกจากนี้ยังพบว่าดีเอ็นเอส่วนใหญ่ติดอยู่ในช่องว่างของเจลถึงแม้จะเพิ่มระยะเวลาการทำอิเลคโตรโฟริซีสให้นานขึ้น (ไม่ได้แสดงภาพ) ดีเอ็นเอที่ติดค้างอยู่นี้คาดว่าน่าจะเป็นโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ปนกับสารโพลีแซคคาไรด์เกิดเป็นโครงสร้างของโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ไม่สามารถเคลื่อนผ่านรูพรุนของเจลได้ การสกัดดีเอ็นเอจากเห็ดรามักพบปัญหาการปนเปื้อนสารจำพวกโพลีแซคคาไรด์ซึ่งพบมากในทุกส่วนของดอกเห็ด (Aristóteles et al.,2005; Kabilan et al.,2009) ทำให้ได้ดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์สูงนั้นทำได้ยาก แต่อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองพบว่ามีผลิตภัณฑ์ PCR เกิดขึ้นสามารถยืนยันได้ว่าดีเอ็นเอแม่แบบที่ใช้มีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์ที่ใช้ได้ตามวัตถุประสงค์ของงานถึงแม้ว่าจะมีความบริสุทธิ์ไม่สูงมาก ผลการทดลองพบว่าเห็ดที่มีเนื้อเยื่อแข็งและเหนียว เช่น เห็ดไข่หงส์ให้ปริมาณดีเอ็นเอมากกว่าเห็ดที่มีเนื้อเยื้ออ่อนนิ่ม อาจเนื่องมาจากโครงสร้างของเนื้อเยื่อที่แข็งแรงช่วยป้องกันการถูกทำลายด้วยความร้อนจากขั้นตอนการปรุงอาหารได้ดีกว่าเห็ดที่มีเนื้อเยื่ออ่อนนิ่มซึ่งถูกทำลายได้ง่าย

ตัวอย่างเห็ดที่ผ่านการผัดและทอดจะมีน้ำมันพืชติดมาด้วย น้ำมันที่ติดมาจะทำให้การปั่นแยกชั้นระหว่างส่วนของ supernatant และส่วนของสารละลายดีเอ็นเอแยกชั้นกันได้ไม่ดี ก่อนที่จะเริ่มขั้นตอนการสกัดควรนำตัวอย่างมาล้างเอาน้ำมันออกด้วยน้ำเปล่าตามด้วยแช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นซับของเหลวออกจากเนื้อเยื่อเห็ดให้มากที่สุดด้วยกระดาษกรอง

2. การเพิ่มปริมาณ rDNA บริเวณ ITS และทำให้สารผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อให้ได้ชิ้นส่วนยีนที่สนใจนั้นนอกจากไพรเมอร์และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเกิดปฏิกิริยาแล้ว การเลือกชนิดของเอนไซม์ Taq DNA polymerase ก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญที่มีต่อความสำเร็จของงานด้วยเช่นกัน การศึกษาครั้งนี้ได้ทดลองใช้เอนไซม์ Taq DNA polymerase จาก 2 แหล่งเปรียบเทียบกันพบว่าเมื่อใช้ดีเอ็นเอแม่แบบ ไพรเมอร์และสภาวะการ

ทำ PCR เหมือนกันทุกประการ พบว่าเอนไซม์ Taq DNA polymerase แหล่งที่ 1 เกิดทั้งแถบดีเอ็นเอที่ต้องการและมีแถบของ non specific ส่วนเอนไซม์จากแหล่งที่ 2 นั้นได้แถบดีเอ็นเอที่ต้องการเพียงแถบเดียวเท่านั้น จะเห็นได้ว่าการเลือกชนิดของเอนไซม์มีผลต่อความสำเร็จของงานการได้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะเพียงแถบเดียว ทำให้ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ผลผลิต PCR สามารถทำได้ง่าย ไม่จำเป็นต้องทำการตัดแถบดีเอ็นเอจากเจล สามารถใช้วิธีการสกัดแบบธรรมดาด้วยคลอโรฟอร์มและตกตะกอนด้วยไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (isoamyl alcohol) หรือใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปได้

3. การออกแบบไพรเมอร์

การทดลองนี้ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rDNA บริเวณ ITS ออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อเห็ดพิษแต่ละชนิด ITS เป็นบริเวณที่มีความผันแปรทางพันธุกรรมค่อนข้างสูงจึงเหมาะที่นำมาใช้ออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการแยกความแตกต่างในระดับสปีชีส์ (Bruns et al.,1992; Hibbet.,1992; Vilgalys et al.,1994; White et al.,1990; Turenne et al.,2000) ปัจจุบันมีซอฟแวร์หลายชนิดที่ใช้ออกแบบไพรเมอร์ อาทิ Primer3 (Rozen & Skaletsky,2000) Primer-Blast (Ye et al.,2012) ไพรเมอร์ที่ออกแบบด้วยโปรแกรมชนิดเดียวอาจไม่เกิดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการหรือมีความจำเพาะต่ำอาจต้องเปลี่ยนไปใช้โปรแกรมอื่นด้วย เพราะโปรแกรมอาจถูกพัฒนาจากฐานข้อมูลที่ต่างกัน สำหรับงานวิจัยนี้โปรแกรม primer3 ได้ไพรเมอร์ที่ไม่มีความจำเพาะไม่สามารถแยกเห็ดพิษแต่ละชนิดออกจากกันได้เลย โปรแกรม primer-blast ให้ผลค่อนข้างดีคือมีความจำเพาะสูงขึ้น สำหรับเห็ดพิษ *C.nothorachodes* กับ *C.molybtides* เป็นเห็ดสกุลเดียวกันต่างสปีชีส์กันต้องใช้ทั้งโปรแกรม primer-blast และการทำ alignment แล้วเลือกตำแหน่งที่เบสต่างกันมากที่สุดจึงจะสามารถแยกชนิดได้ การออกแบบไพรเมอร์จำเพาะสำหรับสกุลเดียวกันแต่ต่างชนิดกันควรออกแบบ forward primer ที่ใช้บริเวณอนุรักษ์เดียวกัน และเลือกบริเวณที่มีนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกันมากที่สุดในแต่ละชนิดเป็น reverse primer (อุมารินทร์และอุไรวรรณ,2013) ควรออกแบบไพรเมอร์ไว้อย่างน้อย 2 คู่ โดยใช้โปรแกรมที่แตกต่างกันหรือใช้ฐานข้อมูลในการออกแบบคนละฐานกัน การออกแบบไพรเมอร์สำรองไว้หากคู่แรกให้ความจำเพาะต่ำก็สามารถนำไพรเมอร์คู่สำรองมาใช้ได้ทันทีทำให้สามารถทำงานได้ต่อเนื่องไม่ต้องเสียเวลารอสังเคราะห์ใหม่

4. การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ (specificity)

ดีเอ็นเอแม่แบบของเห็ดทุกตัวอย่างจะถูกนำไปทดสอบกับไพรเมอร์ที่จำเพาะ พบว่าไพรเมอร์ส่วนใหญ่มีความจำเพาะสูงสามารถตรวจพบสัญญาณแสงของ SYBR Green I ที่ค่า Ct อยู่ในช่วง 11-16 ผลการทดสอบแสดงเป็น peak เดี่ยวๆ เฉพาะในหลอดที่ดีเอ็นเอแม่แบบกับไพรเมอร์ที่จำเพาะ

เท่านั้น ส่วนหลอดอื่นไม่เกิดการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอแม่แบบ จากการทำ melting curve analysis พบว่าทุกไพรเมอร์มีเพียง peak เดียวเท่านั้น ยกเว้นไพรเมอร์ Ap_001 ซึ่งจำเพาะต่อ *A.pseudoporphyria* ปรากฏ peak ในตัวอย่างเห็ด *C.nothorachodes, C.molytides* และ *Russula* sp. ณ จำนวนรอบที่ 27-29 เมื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR ไปทำอิเลคโทรโฟรีซีสพบว่าแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะมีขนาด 170 คู่เบส ส่วนแถบดีเอ็นเอที่จับแบบไม่จำเพาะมีขนาดเล็กกว่าแยกจากกันชัดเจน แสดงว่าไพรเมอร์ Ap_001 ยังมีความจำเพาะค่อนข้างต่ำ อาจต้องมีการออกแบบไพรเมอร์ใหม่หรือหาสภาวะที่เหมาะสมกว่านี้ การพัฒนาวิธีตรวจสอบด้วย Real-time PCR ให้มีความจำเพาะมากยิ่งขึ้นก็สามารถทำได้ด้วยใช้ไพรเมอร์ร่วมกับนิวคลีโอไทด์สายสั้นที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (probe) แต่จะมีค่าใช้จ่ายที่สูงขึ้น ซึ่งการนำไปใช้อาจต้องพิจารณาถึงวัตถุประสงค์และความจำเป็นของงานด้วย

การทดสอบกับตัวอย่างเห็ดที่ผ่านการปรุงอาหารทั้ง 4 แบบ การปรุงอาหารที่ให้ความร้อนในแต่ละวิธีนั้นเนื้อเยื่อเห็ดหรือดีเอ็นเอจะถูกทำลายหรือเสียสภาพไปค่อนข้างมากจากความร้อนทำให้ได้ปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับดีเอ็นเอจากตัวอย่างเห็ดสด ซึ่งสอดคล้องกับผลของค่า Ct พบว่าดีเอ็นเอแม่แบบส่วนใหญ่ที่เตรียมจากเห็ดสดสามารถตรวจพบสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนต์เร็วกว่าดีเอ็นเอแม่แบบที่ผ่านการปรุงอาหารแบบต่างๆ ถึงแม้ดีเอ็นเอบางส่วนจะเสื่อมสภาพไปแต่ยังมีปริมาณเพียงพอสำหรับการตรวจสอบแสดงให้เห็นว่าเทคนิค Real-time PCR เป็นเทคนิคที่มีความไวสูง เหมาะอย่างยิ่งที่จะนำมาใช้ระบุชนิดของเห็ดไม่เพียงแต่เห็ดพิษเท่านั้น และจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการระบุชนิดของเห็ดที่ตัวอย่างถูกทำลายหรือตัวอย่างอยู่ในสภาพที่ไม่ครบถ้วนสมบูรณ์และมีปริมาณเพียงเล็กน้อยซึ่งไม่สามารถใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาจำแนกชนิดได้ งานวิจัยนี้นอกจากจะนำไปใช้ด้านอนุกรมวิธานเห็ดราแล้วยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านอื่นๆ เช่น ประกอบการวินิจฉัยของแพทย์ในการรักษาผู้ป่วยที่ได้รับสารพิษจากเห็ดหรืองานด้านนิติวิทยาศาสตร์

สรุปผลการทดลอง

ตัวอย่างเห็ดพิษทั้ง 7 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ถูกนำมาจำแนกสกุลและสปีชีส์ด้วยวิธีการทางอณูชีวโมเลกุลด้วยการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน rDNA บริเวณ ITS แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn พบว่าตัวอย่างเห็ดทั้ง 7 ชนิดนั้นมีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *A.psedoporphyria, S.sinnamariense, Russula* sp, *R.emetica, C.nothorachodes, C.molybdites* และ *A.subsaharianus* ซึ่งให้ผลการจำแนกที่สอดคล้องกับการจำแนกด้วยใช้สัณฐาน