# บทที่ 5

# สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

## 5.1 ระบบตรวจสอบของยีนไทโรซิเนส

จากการศึกษาการรวบรวมข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์ในสิ่งมีชีวิตเห็ดราจากฐานข้อมูลดีเอ็นเอ (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov) จำนวน 13 สายพันธุ์ พร้อมทั้งทำการเปรียบเทียบความเหมือนความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ภายในสายพันธุ์เดียวกันและต่างสายพันธุ์ด้วยโปรแกรม Clustal W พบว่า ในกลุ่มชนิดเดียวกันลำดับนิวคลีโอไทด์มีความคล้ายคลึงกันเกินกว่า 96 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ในต่างชนิดพันธุ์ มีค่าความเหมือนมากที่สุด 4 อันดับแรก ได้แก่สายพันธุ์ E 16407 กับ E 16408 มีค่าความเหมือนที่ระดับ 100 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์ AJ 223816 กับ X 89382 และสายพันธุ์ M 32843 กับ M 33271 มีค่าความเหมือนที่ระดับ 99 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์ M 32843 กับ XM 959839 และ M 33271 กับ XM 959839 มีค่าความเหมือนที่ระดับ 96 เปอร์เซ็นต์ สุดท้ายสายพันธุ์ AJ 223816 กับ AW 444069 มีค่าความเหมือนที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละคู่ดังกล่าวมาออกแบบไพรเมอร์ พร้อมกับตรวจสอบความเฉพาะเจาะจงต่อยีนไทโรซิเนส จะได้ คู่ของไพรเมอร์จากสายพันธุ์ AW 444069 กับ AJ 223816 ซึ่งได้จากการเปรียบเทียบความเหมือนกันลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสสายพันธุ์ AW 444069 กับ AJ 223816 ในบริเวณนั้นในลำดับที่ 34-47 เป็นสาย Forward และลำดับที่ 545-560 เป็นสาย Reverse สามารถนำมาเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนไทโรซิเนสได้เป็นอย่างดีทั้งในทางทฤษฎีและปฏิบัติ โดยชิ้นส่วนของซีดีเอ็นเอดังกล่าวมีขนาด 700 นิวคลีโอไทด์ ผลการตรวจสอบความความเฉพาะเจาะจงต่อยีนไทโรซิเนสด้วยการทำ BLAST n มีความจำเพาะเจาะจงต่อยีนไทโรซิเนสในเห็ดรา ซึ่งไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบครั้งนี้แตกต่างจากไพรเมอร์ที่รายงานใน Wichers และคณะ (2003)

สำหรับการนำชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ซีดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมาเชื่อมกับพลาสมิดดีเอ็นเอ pCR IV เพื่อใช้เป็นโมเลกุลอ้างอิงในการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนพบว่า ได้โคลนที่คาดว่ามีชิ้นส่วนของยีนไทโรซิเนสจำนวน 4 โคลน โดยโคลนทั้ง 4 มีขนาด 700 นิวคลีโอไทด์ นำโคลนที่ได้ทั้งหมดไปตรวจสอบความเฉพาะเจาะจงของยีนซ้ำอีกครั้งด้วยการทำ BLAST n พบว่า โคลนที่ได้มีความจำเพาะต่อยีนไทโรซิเนสที่ได้จากสิ่งมีชีวิตอื่น

**5.2 การเปลี่ยนแปลงของสีและการแสดงออกของยีนไทโรซิเนสในเห็ดยานางิ**

การเปลี่ยนแปลงของสีของดอกเห็ดในระหว่างการเจริญเติบโต พบว่า ดอกเห็ดระยะดอกตูมมีสีขาวนวลเนื่องจากมีการสังเคราะห์รงควัตถุสีน้ำตาลน้อยแต่จะมีการสังเคราะห์เพิ่มมากขึ้นในระยะดอกแก่ซึ่งมีสีน้ำตาลเข้มถึงดำ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเป็นผลอันเนื่องมาจากการทำงานของยีนไทโรซิเนส โดยการทำงานของยีนจะสัมพันธ์กับระยะการเจริญเติบโตในระยะต่างๆ (Kanda, 1996) การศึกษาการแสดงออกของยีนในเบื้องต้น เริ่มจากการออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์จากสิ่งมีชีวิตเห็ดราจำนวน 13 สายพันธุ์ พบว่า ไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ในเห็ดกระดุมสายพันธุ์ AJ 223826 กับ AW 444069 พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของซีดีเอ็นเอที่มีขนาด 700 นิวคลีโอไทด์ สำหรับปริมาณการแสดงออกของยีนไทโรซิเนสในระยะต่างๆ จำนวน 6 ระยะ วัดได้จากระดับการสังเคราะห์ปริมาณ cDNA สายแรกจาก mRNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างของดอกเห็ดในระยะต่างๆ ในบริเวณครีบและวงแหวน พบว่า ปริมาณ cDNA ที่สังเคราะห์ได้เมื่อเปรียบเทียบกับโมเลกุล 12S rRNA ซึ่งเป็นโมเลกุลอ้างอิงมาตราฐาน ปริมาณ cDNA ที่สังเคราะห์ได้ในส่วนครีบระยะแรกมีปริมาณน้อยแต่จะเพิ่มมากขึ้นในระยะที่ 6 (ระยะสุดท้าย) และวงแหวน ปริมาณการสังเคราะห์ cDNA จะมากที่สุดที่ระยะ 2 และ 3 โดยปริมาณการสังเคราะห์ cDNA ในแต่ละระยะสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของสีดอกของดอกเห็ดยานางิ ที่ผ่านมามีผู้ศึกษารูปแบบการแสดงออกในเห็ดยานางินน้อยมาก ดังนั้นการศึกษาการแสดงออกของยีนไทโรซิเนสในครั้งนี้จึงเป็นการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนเป็นครั้งแรก

**5.3 การตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยไบโอเซ็นเซอร์**

การตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีนในระบบไบโอเซ็นเซอร์ เป็นระบบการตรวจจับสัญญาณดีเอ็นเอ โดยหลักการเริ่มจากการสังเคราะห์ cDNA ต้นแบบ จาก mRNA ที่สกัดได้ในระยะต่างๆ ของดอกเห็ด จากนั้นนำ cDNA ที่ได้มาผสมรวมกับโมเลกุลสี Hoechst 33258 ซึ่งเป็นโมเลกุลที่กระตุ้นให้ดีเอ็นเอเกิดการรวมตัวและแปลงสัญญาณดีเอ็นเอเป็นสัญญาณทางไฟฟ้า สามารถตรวจวัดได้จากค่า anodic current peak เมื่อทำการตรวจวัดถ้าปริมาณดีเอ็นเอมีค่าน้อย ค่าที่วัดได้จาก anodic current peak จะมีค่าสูง ในทางกลับกันถ้าดีเอ็นเอมีมากค่า anodic current peak จะมีค่าน้อย (Chaumpluk *et al.*, 2006) ดังนั้นค่าการเปลี่ยนแปลงในรูป anodic current peak จะแปรผกผันกับปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ การตรวจสอบการแสดงออกของยีนไทโรซิเนสด้วยเทคนิคไบโอเซ็นเซอร์ในเห็ดยานางิเป็นการประยุกต์ใช้เป็นครั้งแรก เนื่องจากที่ผ่านมามีรายงานการตรวจวัดด้วยเทคนิคนี้โดยการตรวจสอบปริมาณของคุณภาพสารประกอบฟี

นอลในดอกเห็ดและตรวจความสัมพันธ์ของสารประกอบในตัวอย่างดินและน้ำ (Seo *et al.*, 2003) และรายงานการตรวจสอบการทำงานของกิจกรรมของเอนไซม์ phosphatase ด้วยเทคนิคไบโอเซ็นเซอร์ (Serra *et al.*, 2005) จากการรายงานดังกล่าวเป็นการตรวจสอบทางด้านสรีรวิทยา ไม่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน ดังนั้นในการศึกษาการแสดงออกของยีนไทโรซิเนสในเห็ดยานางิโดยใช้เทคนิคไบโอเซ็นเซอร์ นับว่าเป็นเทคนิคใหม่ที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเห็ดราครั้งแรก โดยเทคนิคนี้จะใช้วัดการสังเคราะห์ cDNA ที่ได้โดยเทียบกับโมเลกุล 12S rRNA พบว่ามีสัดส่วนของการแสดงออกระหว่างยีนไทโรซิเนสกับยีน 12S rRNA ในครีบอยู่ระหว่าง 0.001-26.65 เปอร์เซ็นต์ ในวงแหวนมีสัดส่วนการแสดงออกมาก ในระยะ ที่ 2 กับ 3 มีค่า 1.18 และ 1.38 ตามลำดับ เทคนิคนี้สามารถวิเคราะห์ได้ง่าย รวดเร็ว ไม่จำเป็นต้องใช้ประสบการณ์ในการวิเคราะห์มาก ซึ่งแตกต่างจากเทคนิค Northern blot ซึ่งเป็นที่นิยมมากในอดีต และการเปรียบเทียบปริมาณดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ส่วนใหญ่จะใช้วิธี competitive–quantitative RT-PCR (Marone *et al.*, 2001) หรือ real - time PCR (Rajagopal *et al.*, 2005) วิธีการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอทั้ง 2 ดังกล่าวต้องอาศัยความละเอียดในการวิเคราะห์สูง ใช้เวลานาน ขั้นตอนการวิเคราะห์ยุ่งยาก ซับซ้อน มีต้นทุนในการวิเคราะห์สูง และต้องการความพร้อมของห้องปฏิบัติการรวมทั้งบุคคลากรที่มีความเชี่ยวชาญ (Shindo *et al.*, 2002) ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์ cDNA ด้วยเทคนิคไบโอเซ็นเซอร์พร้อมทั้งเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ cDNA ด้วยโมเลกุล 12S rRNA จึงเป็นที่นิยมมากในการวิเคราะห์ด้านคุณภาพของตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบได้เป็นอย่างดี

## สรุปผลการทดลอง

1. การพัฒนาระบบการตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR และวัดการแสดงออกด้วยวิธีตรวจสอบทางเคมีไฟฟ้า (electrochemical biosensor) โดยการเปรียบเทียบกับโมเลกุล 12S rRNA พบว่าการแสดงออกของยีนเมื่อเปรียบเทียบกับโมเลกุล 12S rRNA การแสดงออกของยีนในครีบมีสัดส่วนมากที่สุดโดยมีสัดส่วนของยีนเท่ากับ 26.65 เปอร์เซ็นต์
2. ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ ของโคลน และเข้าใจโครงสร้างการทำงานของ ยีนไทโรซิเนสในเห็ดยานางิ ปรากฏโคลนที่ได้มีขนาด 700 นิวคลีโอไทด์
3. รูปแบบการแสดงออกของยีนในครีบและวงแหวน พบว่า ในครีบมีการแสดงออกของยีนตั้งแต่ระยะที่ 1 และมีการแสดงออกมากที่สุดในระยะที่ 6 ซึ่งเป็นระยะสุดท้ายและการแสดงออกในส่วนของครีบพบว่ามีรูปแบบการแสดงออกมากในระยะที่ 2 และ 3

4. ได้ข้อมูลพื้นฐานการแสดงออกของดอกเห็ดในระหว่างการพัฒนาในระยะต่างๆ หลังการเก็บเกี่ยวดอกเห็ดนี้จะเป็นประโยชน์เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงคุณภาพของดอกเห็ดยานางิในอนาคตต่อไป

## ข้อเสนอแนะ

ข้อเสนอแนะในการวิจัยครั้งนี้ ควรทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีรวิทยาของเห็ดโดยเน้นทางด้านการปรับปรุงสายพันธุ์เห็ด เนื่องจากที่ผ่านมามีการปรับปรุงสายพันธุ์เห็ดน้อยมาก ซึ่งจะเห็นได้ว่า สายพันธุ์ของดอกเห็ดยานางิมีน้อยเมื่อเทียบกับสายพันธุ์เห็ดชนิดอื่น พร้อมกับศึกษาควบคู่ไปกับการศึกษาด้านชีวโมเลกุล เพื่อให้ได้ข้อมูลของเห็ดยานางิมากขึ้น เพื่อช่วยให้การพัฒนาและปรับปรุงด้านคุณภาพและสร้างสายพันธุ์เห็ดยานางิให้มีปริมาณดอกเห็ดเพิ่มขึ้นต่อไป