

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การศึกษายีนไทโรซิเนสและการวิเคราะห์

4.1.1 การรวบรวมข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในสิ่งมีชีวิตเพื่อออกแบบไพรเมอร์

จากการศึกษารวบรวมข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสในเห็ดจากฐานข้อมูลดีเอ็นเอ (Gene Bank) พบรายงานจำนวนของยีนไทโรซิเนสใน *Agaricus bisporus* 6 สายพันธุ์ *Neurospora crassa* 3 สายพันธุ์ *Lentinus edodes* 2 สายพันธุ์ *Streptomyces glaucescens* 1 สายพันธุ์ และ *Aspergillus oryzae* 1 สายพันธุ์ รายละเอียดต่างดังตารางที่ 1-5

ตารางที่ 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสในเห็ดกระดุม *Agaricus bisporus*

Accession number	Definitions	Nucleotides (bps)	รหัสที่ใช้วิเคราะห์ ตัวอย่าง
AJ 223816	<i>Agaricus bisporus</i> mRNA for tyrosinase	1671	(A)
X 85113	<i>Agaricus bisporus</i> mRNA for polyphenoloxidase	1707	(B)
X 89382	<i>Agaricus bisporus</i> mRNA for polyphenoloxidase	1057	(C)
AW 44426	AB061 Primordium cDNA library <i>Agaricus bisporus</i> cDNA 5- similar to tyrosinase, mRNA sequence	717	(D)
AW 444244	AB001 Primordium cDNA library <i>Agaricus bisporus</i> cDNA 5- similar to tyrosinase, mRNA sequence	582	(E)
AW 444069	AB165 Basidiome cDNA library <i>Agaricus bisporus</i> cDNA 5-, mRNA sequence	560	(F)

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสในรา *Neurospora crassa*

Accession number	Definitions	Nucleotides (bps)	รหัสที่ใช้วิเคราะห์ ตัวอย่าง
M 32843	<i>Neurospora crassa</i> (strain OR) tyrosinase (T) gene, complete cds	1866	(G)
M 33271	<i>Neurospora crassa</i> (strain TS) tyrosinase (T) gene, complete cds	1866	(H)
XM 959839	<i>Neurospora crassa</i> OR74A TYROSINASE PRECURSOR(MONOPHENOL MONOOXYGENASE) (NCU00776.1) partial mRNA	1992	(I)

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสในเห็ดหอม *Lentinus edodes*

Accession number	Definitions	Nucleotides (bps)	รหัสที่ใช้วิเคราะห์ ตัวอย่าง
E 16407	<i>Lentinus edodes</i> mRNA for tyrosinase, complete cds	1881	(J)
E 16408	<i>Lentinus edodes</i> mRNA for tyrosinase, complete cds	2051	(K)

ตารางที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสในรา *Streptomyces glaucescens*

Accession number	Definitions	Nucleotides (bps)	รหัสที่ใช้วิเคราะห์ ตัวอย่าง
M 11302	<i>Streptomyces glaucescens</i> tyrosinase gene, complete cds	825	(L)

ตารางที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสจากรา *Aspergillus oryzae*

Accession number	Definitions	Nucleotides (bps)	รหัสที่ใช้วิเคราะห์ ตัวอย่าง
D 37929	<i>Aspergillus oryzae</i> melO gene for tyrosinase, complete cds (exon1-2)	1620	(M)

จากตารางที่ 1-5 แสดงข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสในเห็ดราจำนวน 13 สายพันธุ์ พบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสในเห็ดกระดุม 6 สายพันธุ์ มีลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ระหว่าง 560-1707 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งมี 1 สายพันธุ์เป็นยีนไทโรซิเนสที่ได้จากส่วนของ mRNA เป็นยีนฟีนอลออกซิเดส จำนวน 2 สายพันธุ์ และ 3 สายพันธุ์ เป็นไทโรซิเนสที่ได้จากส่วนของ cDNA ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของรา *Neurospora crassa* จำนวน 3 สายพันธุ์ มีลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ระหว่าง 1866-1992 นิวคลีโอไทด์ โดย 2 สายพันธุ์เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสที่สมบูรณ์กับอีก 1 สายพันธุ์ เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากบางส่วนของ mRNA ส่วนรา *Streptomyces glaucescens* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสที่สมบูรณ์จำนวน 825 นิวคลีโอไทด์ และ สุตท้ายรา *Aspergillus oryzae* เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสที่สมบูรณ์จำนวน 1620 นิวคลีโอไทด์

จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสดังกล่าวมาวิเคราะห์ความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ในเห็ดราแต่ละชนิดในสายพันธุ์เดียวกันด้วยโปรแกรม Clustal W ได้ค่าคะแนนดังตารางที่ 6-8

ตารางที่ 6 ค่าคะแนนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันของแต่ละสายพันธุ์ในเห็ด

กระดุม *Agaricus bisporus*

	A	B	C	D	E	F
A						
B	30					
C	99	10				
D	3	1	3			
E	25	4	3	2		
F	95	52	30	5	3	

ตารางที่ 7 แสดงคะแนนความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสจากรา

Neurospora crassa

	G	H	I
G			
H	99		
I	96	96	

ตารางที่ 8 แสดงค่าคะแนนความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสจากเห็ดหอม

Lentinus edodes

	J	K
J		
K	100	

จากตารางที่ 6-8 พบว่า ค่าคะแนนที่ได้จากการวิเคราะห์ความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ในเห็ดกระดุม *Agaricus bisporus* มีค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ระหว่าง 1-99 เปอร์เซ็นต์ โดยสายพันธุ์ที่มีความเหมือนมากที่สุด คือ สายพันธุ์ AJ 223816 กับ สายพันธุ์ X 89382 มีค่าเท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ รา *Neurospora crassa* มีค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 96-99 เปอร์เซ็นต์ โดยสายพันธุ์ M 32843 กับ XM 959839 ให้ค่าความเหมือนมากที่สุดที่ 99 เปอร์เซ็นต์ สุดท้ายเห็ดหอม *Lentinus edodes* มีค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ เป็นต้น

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสในเห็ดรา จำนวน 13 สายพันธุ์ มาวิเคราะห์ความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละสายพันธุ์อีกครั้ง พบ ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสจากเห็ดราชนิดต่างๆ

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
A													
B	30												
C	99	10											
D	3	1	3										
E	25	4	3	2									
F	95	52	30	5	3								
G	30	4	16	2	4	28							
H	10	4	16	2	4	27	99						
I	30	4	16	2	4	28	96	96					
J	37	37	41	1	4	50	3	3	2				
K	37	37	41	1	4	50	3	3	2	100			
L	3	6	3	1	9	4	7	7	7	8	8		
M	4	2	4	8	6	14	3	1	3	5	5	6	

จากตารางที่ 9 ความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสมากที่สุด 4 อันดับแรกได้แก่ ค่าความเหมือนกันที่ระดับ 100 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย 1 คู่ คือ (J กับ K) ค่าความเหมือนกันที่ระดับ 99 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย 2 คู่ คือ (A กับ C) (G กับ H) ค่าความเหมือนกันที่ระดับ 96 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย 2 คู่ คือ (G กับ I) (H กับ I) สุดท้ายค่าความเหมือนกันที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย 1 คู่ คือ (A กับ F) และรหัสที่ใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่างเป็นดังต่อไปนี้

A แทน Accession number AJ223816; *Agaricus bisporus*

B แทน Accession number X85113; *Agaricus bisporus*

C แทน Accession number X89382; *Agaricus bisporus*

D แทน Accession number AW444260 ; *Agaricus bisporus*

E แทน Accession number AW444244; *Agaricus bisporus*

F แทน Accession number AW444069; *Agaricus bisporus*

G แทน Accession number M32843; *Neurospora crassa*

H แทน Accession number M33271; *Neurospora crassa*

I แทน Accession number XM 959839; *Neurospora crassa*

J แทน Accession number E 16407; *Lentinus edodes*

K แทน Accession number E 16408; *Lentinus edodes*

L แทน Accession number M 11302; *Streptomyces glaucescens*

M แทน Accession number D 37929; *Aspergillus oryzae*

จากข้อมูลความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสในเห็ดราข้างต้น เลือกข้อมูลลำดับนำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสที่พบในเห็ดกระดุม *Agaricus bisporus* 2 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ AW 444069 มีขนาด 560 ลำดับนิวคลีโอไทด์ และสายพันธุ์ AJ 223816 มีขนาด 1671 นิวคลีโอไทด์ ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสในเห็ดกระดุมจากฐานข้อมูลจีโนม

Accession number	Definition	Nucleotides (bps)
AW 444069	Basidiome cDNA library <i>Agaricus bisporus</i> cDNA 5' similar to Tyrosinase, mRNA sequence	560
AJ 223816	<i>Agaricus bisporus</i> mRNA for tyrosinase	1671

เมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสแล้วนำข้อมูลที่ได้มาจัดเรียงให้อยู่ในรูปแบบเดียวกันโดยการทำ FASTA format และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Clustal W ซึ่งเป็นโปรแกรมจัดรูปแบบในการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อวิเคราะห์ดูความเหมือนและความต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ รายละเอียดดังรูปที่ 3

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

AJ223816 -----ATGTCGCTGATTGCTACTGTCTGGACCTACTGGCG 34
AW444069 CTCGATGTCTACCCACGCGYCCGAGGATGTCGCTGATTGCTACTGTCTGGACCTACTGGCG 60
*****

AJ223816 GAGTCAAGAACCGTCTGAACATCGTTGATTTTGTGAAGAATGAAAAGTTTTTCACGCTTT 94
AW444069 GAGTCAAGAACCGTCTGAACATCGTTGATTTTGTGAAGAATGAAAAGTTTTTCACGCTTT 120
*****

AJ223816 ATGTACGCTCCCTCGAACTTCTACAAGCCAAGGAACAGCATGACTACTCGTCTTTCTTCC 154
AW444069 ATGTACGCTCCCTCGAACTTCTACAAGCCAAGGAACAGCATGACTACTCGTCTTTCTTCC 180
*****

AJ223816 AACTAGCCGGCATTTCATGGTCTACCCTTTACTGAGTGGGCCAAAGAGCGACCTTCCATGA 214
AW444069 AACTAGCCGGCATTTCATGGTCTACCCTTTACTGAGTGGGCCAAAGAGCGACCTTCCATGA 240
*****

AJ223816 ACCTATAACAAGGCTGGTTATTGTACCCATGGGCAGGTTCTGTTCCCGACTTGGCATAGAA 274
AW444069 ACCTATAACAAGGCTGGTTATTGTACCCATGGGCAGGTTCTGTTCCCGACTTGGCATAGAA 300
*****

AJ223816 CGTACCTTTCTGTGTTGGAGCAAATACTTCAAGGAGCTGCCATCGAAGTTGCTAAGAAGT 334
AW444069 CGTACCTTTCTGTGTTGGAGCAAATACTTCAAGGAGCTGCCATCGAAGTTGCTAAGAAGT 360
*****

AJ223816 TCACTTCTAATCAAACCGATTGGGTCCAGGCGGCGCAGGATTTACGCCAGCCCTACTGGG 394
AW444069 TCACTTCTAATCAAACCGATTGGGTCCAGGCGGCGCAGGATTTACGCCAGCCCTACTGGG 420
*****

AJ223816 ATTGGGGTTTCGAACTTATGCCTCCTGATGAGGTTATCAAGAACGAAGAGGTCAACATTA 454
AW444069 ATTGGGGTTTCGAACTTATGCCTCCTGATGAGGTTATCAAGAACGAAGAGGTCAACATTA 480
*****

AJ223816 CGAACTACGATGGAAAGAAGATTTCCGTCAAGAACCCTATCCTCCGCTATCACTTCCATC 514
AW444069 CGAACTACGATGGAAAGAAGATTTCCGTCAAGAACCCTATCCTCCGCTATCACTTCCATC 540
*****

AJ223816 CGATCGATCCTTCTTTCAAGCCATACGGGGACTTTGCAACCTGGCGAACAACAGTCCGAA 574
AW444069 CGATCGATCCTTCTTTCAAG----- 560
*****

```

รูปที่ 3 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence alignment) และความเหมือน (similarity search) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโทโรซิเนสในเห็ดกระดุมที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ (รายละเอียดของข้อมูลที่สมบูรณ์ดูที่ภาคผนวก ง) โดยเครื่องหมาย * แสดงถึงความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Clustal W

ผลการทำ Global alignment ในตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบตลอดทั้งสายของยีนไทโรซิเนส โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสชนิดที่ 1 จะเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสชนิดที่ 2 ตรงตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 34 และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันเหล่านี้จะไปสิ้นสุดตรงตำแหน่งที่ 574 ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสชนิดที่ 2 โดยค่าความเหมือนที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้ง 2 ชนิด มีค่าเท่ากับ 95 เปอร์เซ็นต์ ผลดังกล่าวใช้อ้างอิงเพื่อออกแบบไพรเมอร์ จากการทดลองได้ดำเนินการออกแบบไพรเมอร์โดยไพรเมอร์ในสาย forward เลือกโดเมนที่มีความเหมือนกันที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 34-47 ขณะที่ไพรเมอร์ในสาย reverse เลือกโดเมนที่มีความเหมือนกันที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 545-560 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ได้แสดงข้อมูลดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความเหมือนกันของไพรเมอร์ในสาย forward และ reverse

ชนิดของสายไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	จำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ (bps)
Forward	5'ATGTCGCTGATTGC3'	14
Reverse	3'CTTGAAAGAAGGATCG5'	16

จากตาราง พบว่า สาย forward มีลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 14 นิวคลีโอไทด์ โดยมีค่า Tm เท่ากับ 59.79 และมีค่า เปอร์เซ็นต์ GC content เท่ากับ 50 ขณะที่สาย reverse มีลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 16 นิวคลีโอไทด์ มีค่า Tm เท่ากับ 35.65 และมีค่าเปอร์เซ็นต์ GC content เท่ากับ 43.75 ดังตารางข้างต้น

เมื่อนำโดเมนที่คัดเลือกในสาย forward และ reverse มาทำการตรวจสอบความจำเพาะของยีนด้วยการทำ BLAST n พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสาย forward ให้ผลการค้นหา local similarity ในลำดับแรกเป็นยีนไทโรซิเนสที่ได้จากเห็ดกระดุม *Agaricus bisporus* และสุดท้ายได้จาก DNA sequence from clone DKEY-104P11 ของ Zebrafish สำหรับสาย reverse การวิเคราะห์ด้วย local alignment จากการทำ BLAST n ได้ผลในลำดับแรกเป็นยีนที่ได้จาก *Aspergillus oryzae* RIB40 genomic DNA ลำดับที่สองเป็น *Agaricus bisporus* mRNA for polyphenoloxidase และลำดับสุดท้ายเป็น *Agaricus bisporus* mRNA for tyrosinase เช่นเดียวกัน รายละเอียดดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ยีนไทโรซิเนสด้วย BLAST n

Definitions	Nucleotide	Score (bits)	Identities	Strand	E value
สาย forward					
<i>Agaricus bisporus</i> mRNA for tyrosinase	1770	32.2	100%	Plus/Plus	8.0
Zebrafish DNA sequence from clone DKEY-104P11 in linkage group 23, complete sequence	111773	32.2	100%	Plus/minus	8.0
สาย Reverse					
<i>Aspergillus oryzae</i> RIB40 genomic DNA, SC003	4170692	32.2	100%	Plus/Minus	8.0
<i>Agaricus bisporus</i> mRNA for polyphenoloxidase	1398	32.2	100%	Plus/Plus	8.0
<i>Agaricus bisporus</i> mRNA for tyrosinase	1770	32.2	100%	Plus/Plus	8.0

จากตารางที่ 12 เป็นผลที่ได้จากการตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ พบว่าผลที่ได้มีค่า identities เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และมีค่า E value เท่ากับ 8.0 ผลดังกล่าวชี้ให้เห็นความเฉพาะเจาะจงของไพรเมอร์ทั้ง 2 ต่อยีนไทโรซิเนสที่ได้จาก ส่วนของ mRNA ของยีนไทโรซิเนสและยีนโพลีฟีนอลออกซิเดส และ DNA sequence จากโคลนของ Zebrafish สุดท้ายไพรเมอร์มีความเฉพาะเจาะจงต่อ genomic DNA จากรา *Aspergillus oryzae* ดังตารางข้างต้น

4.1.2 การสกัดอาร์เอ็นเอรวม

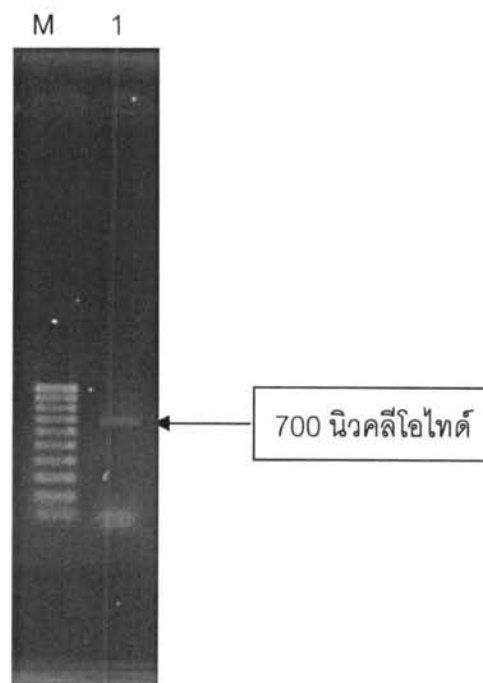
เมื่อนำตัวอย่างเห็ดยานางิในส่วนของหมวกดอกมาสกัดอาร์เอ็นเอรวม โดยใช้ตัวอย่างในปริมาณ 250 มิลลิกรัม ตามวิธีการสกัดด้วยฟีนอล ผลที่ได้มีอาร์เอ็นเอหลายขนาด สังเกตได้จากลักษณะป็นยาว โดยมีสัดส่วนของค่า OD ที่คลื่นแสง 260/280 เท่ากับ 1.5 เมื่อนำมาคำนวณปริมาณความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอได้ค่าเท่ากับ 1.875 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 ผลการสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากบริเวณครีบของเห็ดยานางิ แยกขนาดด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟเรซิส ด้วย 1% agarose ในสารละลาย 1x TBE buffer

4.1.3 ปฏิกริยา reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

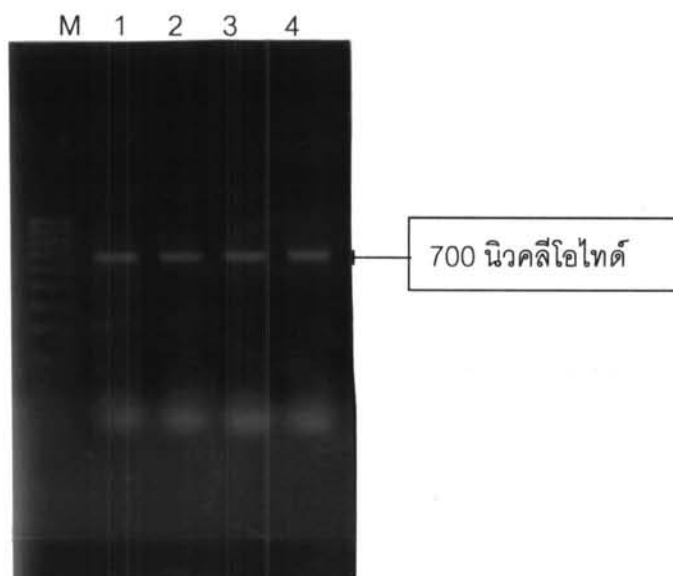
เมื่อนำอาร์เอ็นเอรวมปริมาตร 1 ไมโครลิตร มาสังเคราะห์ cDNA สายแรกด้วยองค์ประกอบของปฏิกริยาโดยเอนไซม์ MMLV reverse transcription และไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบ พบว่าผลการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนด้วยปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาด 700 นิวคลีโอไทด์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความเฉพาะเจาะจง เนื่องจากพบแถบดีเอ็นเอปรากฏเพียงแถบเดียวไม่พบแถบดีเอ็นเออื่น ดังรูป



รูปที่ 5 ผลการตรวจสอบความจำเพาะของวิธีการตรวจสอบจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์หัตถ์ยีนด้วยคูยีนไทโรซิเนส ด้วยหลักการปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส 1% agarose ในสารละลาย 1% TAE buffer ช่องที่ M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 นิวคลีโอไทด์
ช่องที่ 1 ผลจากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RT-PCR

4.1.4 การโคลนชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้

เมื่อนำชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส มาสกัดให้บริสุทธิ์โดยการแยกผ่านคอลัมน์ HiYield™ Gel/PCR DNA Extraction Kit ผลิตภัณฑ์ที่ได้เมื่อเชื่อมต่อกับพลาสมิด pCR IV ด้วยหลักการ TA-Cloning (Superscript II (Invitrogen, USA)) และโคลนเข้าสู่แบคทีเรียแล้วพบว่าสามารถแยกแบคทีเรียโคโลนีที่ปรากฏบนจานเลี้ยงเชื้อประมาณ 10 โคโลนี ซึ่งการคัดเลือกโคโลนีที่ปรากฏ ในเบื้องต้นโดยการทำให้เซลล์แบคทีเรียแตกด้วยสารเคมี (disruption) เปรียบเทียบขนาดของพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอปรากฏกับพลาสมิดปกติที่ไม่มีชิ้นดีเอ็นเอ พบว่า สามารถเลือกพลาสมิดจากโคลนจำนวน 4 โคลน จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียของโคลนทั้ง 4 ตัวอย่าง มาเลี้ยงให้เจริญเติบโตเพื่อเพิ่มจำนวนให้มากขึ้นอีกครั้ง พบว่า สามารถตรวจสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาด 700 นิวคลีโอไทด์ได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การโคลนชิ้นส่วนของยีนไทโรซิเนสน่าจะประสบผลสำเร็จ ซึ่งจากการทดลองได้ดำเนินการตรวจสอบโดยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในขั้นต่อไป



รูปที่ 6 ปริมาณชิ้นส่วนของโคลนที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส 1% agarose ใน 1x TAE buffer
 ช่อง M ดีเอ็นเอมาตรฐานเทียบขนาด (100 นิวคลีโอไทด์ DNA ladder)
 ช่องที่ 1-4 ผลของการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนไทโรซิเนสที่ได้จากโคลนทั้งหมด 4 ตัวอย่าง ตามลำดับ

เมื่อนำโคลนที่ได้มาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค small scale plasmid preparation ได้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์พร้อมส่งไปดำเนินการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ได้

4.1.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ผลการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากโคลนของยีนไทโรซิเนส จำนวน 4 ตัวอย่างตามวิธี dideoxy chain termination กับไพรเมอร์ M 13 F และ M 13 R เป็นดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 จำนวนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการวิเคราะห์โคลน 4 ตัวอย่าง

ตัวอย่างโคลน	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ขนาด (bps)
ตัวอย่างที่ 1	atgtctcattatcttgtcactggcgcaactggaggatcaacctctggggcagcagcaccccaatcgtctcgaaattaatgatttcgtcaaacaagaagaccagttttctctctatattcaggccttggcaatacatttattcaagtaaaaagccaagacgatattgactccttcttccaaatcggagggatccatgggtcttccgtatgtcccttgggacggcgaggaataagccagtagacactgacgcctgggagggatattgcactcatggcagcgtgttatttccaaccttccaccgtccgtatgttctactcatcgagcaagcaatccaggctgcgccgtcgatatcgccgcaacatacatcgtagatagagctcgttaccaggacgcccgttgaatctacgtcagccatactgggattgggcccgaacccagttcctccgcccgaagtaatatctctggacgaggttaccatcgtaaacccaagcggagagaaaaatctctgttcccaacctctccgacggttatacatccaccccatagatccgtccttccctgaacctatcagtccttggctcgactactcttcgacatccttggtcgatgagccaatgcatcggacaatgttccagaattgaaagcgcggttgagaagtgtggtcccccaactcaagaccaagacgtacaacctctga	700
ตัวอย่างที่ 2	cggcacgagggcgccgagcaggtttacgccagccctactgggattggggtttcgaacttatgcctcctgatgaggttatcaagaacgaagaggtcaacattacgaactacgatggaaagaagatttccgtcaagaaccctatcctccgctatcacttccatccgatcgatcctttcaagccatacggggactttgcaacctggcgaaacaacagtcgaaaccccgatcatagggcagagggatccctgggtctaatcaaaaaatgagacttgaggaaggtcagattcgtgagaagacctacaatatgttgaagttcaacgatgttgggagagattcagtaaccacggcatalctgatgatcagcatgctaacagcttggagtctgttcacgatgacattcatgttatgggtggatacggcaaaatcgaaggacatatggaccacccttctttgctgccttcgacccgattttctggttacatcataccgacgctactatccctttggaaagcaatcaaccccgatgtgtgggttacgtcgggacgtaaccgggatgggtaccatgggcatcgacccaacgctcagatcaacagcagagaccctcttgagccattctaccaatctggggataaagtgtggacctcggcctctcctcgctgatactgctcggctcggctactcctaccccgatttcgac	700
ตัวอย่างที่ 3	cggcacgagggcgccgagcaggtttacgccagccctactgggattggggtttcgaacttatgcctcctgatgaggttatcaagaacgaagaggtcaacattacgaactacgatggaaagaagatttccgtccctaaccctatcctccgctatcacttccatccgatcgatccttcttcaagccatacggggactttgcaacctggcgaaacaacagtcgaaaccccgatcgtaaatcttcgagaggatccctgggtctaatcaaaaaatgagacttgaggaaggtcagattcgtgagaagacctacaatatgttgaagttcaacgatgcttgggagagattcagtaaccacggcatalctgatgatcagcatgctaaacagcttggagtctgttcacgatgacattcatgttatgggtggatacggcaaaatcgaaggacatatggaccacccttctttgctgccttcgacccgattttctggttacatcaacatcactgcaacgctcagccgtctactatccctttggaaagcaatcaaccccgatgtgtgggttacgtgtgggttacgtcgggacgtaaccgggatgggtaccatgggcatcgacccaacgctcagatcaacagcagagaccctcttgagccattctaccaatctggggataaagtgtggacctcggcctctcctcgctgatactgctcggctcggctactcctaccccgatttcgac	700

ตัวอย่างที่ 4	<pre> cgatcggaggggcggcgaggtttacgccagccctactgggattgggggtttcga acttatgcctcctgatgaggttatcaagaacgaagaggtcaacattacgaacta cgatggaaagaagatttccgtccctaaccctatcccttgctatcacttccatcc gatcgatccttctttcaagccatacggggactttgcaacctggcgaacaacagt ccgaaaccccgatcgtaatcttcgagaggatccctgggtctaataaaaaaat gagacttgagggaaggtcagattcgtgagaagacctacaatatggtgaagttcaa cattgcttgggagagattcagtaaccacggcatatctgatgatcagcatgctaa cagcttggagctgttccacgatgacattcatggttatggttgatcggcaaaat cgaaggacatatggaccacccttctttgctgccttcgaccgatttctggtt acatcactgcaacgtcgaccgtctactatcccttggaaagcaatcaaccccgga tgtgtgggttacgtcgggacgtaaccgggatggtaccatgggcatcgcaaccaa cgctcagatcaacagcgagaccctcttgagccattctaccaatctggggataa agtgtggacctcggcctctctcgtgatactgctcggctcggctactcctac </pre>	700
---------------	--	-----

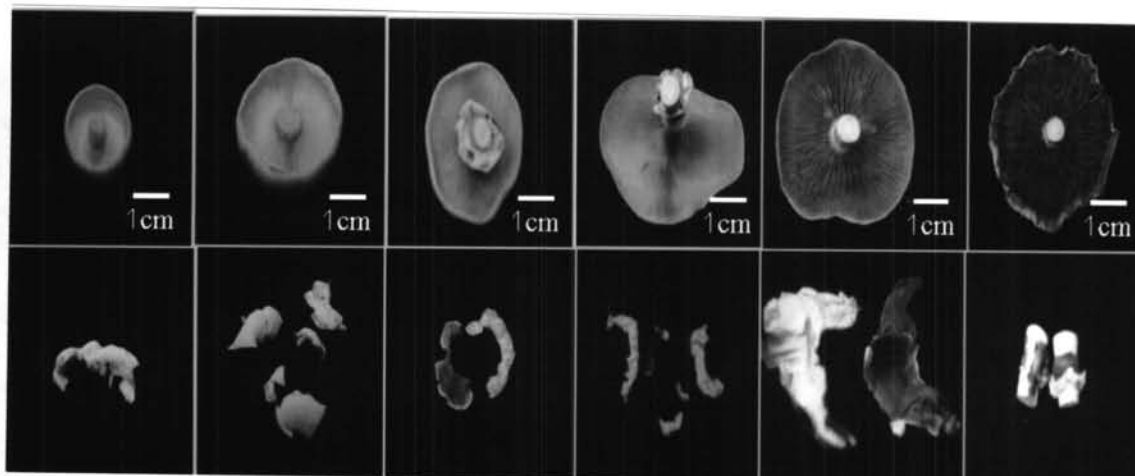
เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนทั้ง 4 ตัวอย่างในตารางที่ 13 มาตรวจสอบความจำเพาะต่อยีนไทโรซิเนสด้วยโปรแกรม BLAST พบว่า โคลนทั้ง 4 ตัวอย่าง มีความเฉพาะเจาะจงต่อ mRNA ของยีน polyphenoloxidase และ mRNA ของยีนไทโรซิเนสในหีตกะดุม โดยมีค่า similarity เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ แสดงว่า ชิ้นส่วนของยีนที่โคลนได้เป็นชิ้นส่วนของยีนไทโรซิเนสจริง

4.2 ศึกษาาระดับการแสดงออกของยีนไทโรซิเนส

4.2.1 ศึกษาการกำหนดระดับการสังเคราะห์รงควัตถุสีน้ำตาลของดอกเห็ด

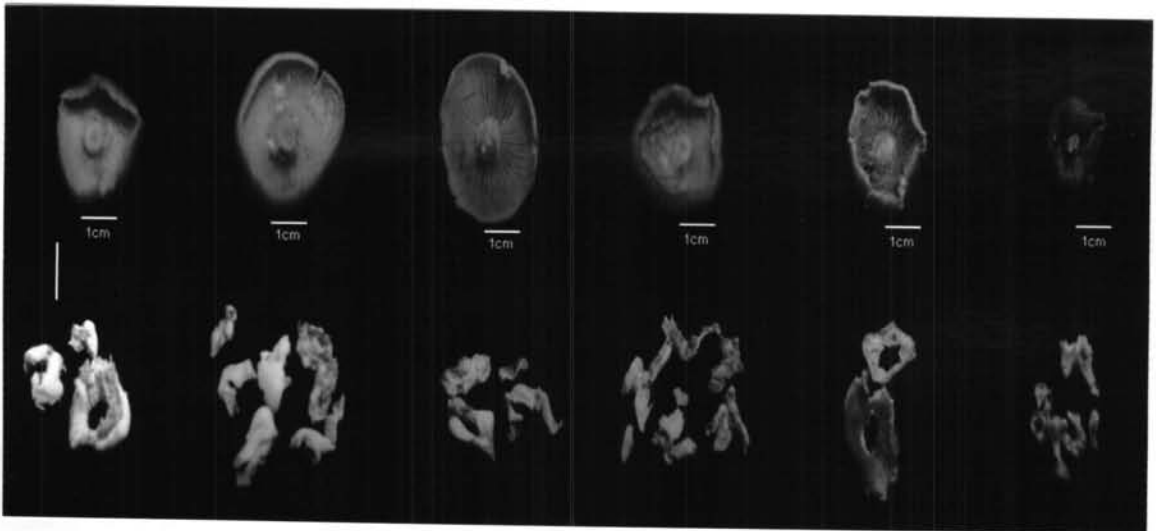
จากการนำก้อนเห็ดยานางิดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงที่มีเชื้อเจริญเต็มก้อนถุง มาเปิดดอกที่อุณหภูมิ 24-30 องศาเซลเซียส ความชื้นประมาณ 80-90% พบว่า ดอกเห็ดมีการรวมตัวของเส้นใยและเจริญเติบโตพัฒนาไปเป็นดอกเห็ดที่จำหน่ายได้ใช้เวลา 6-8 วัน จากนั้นทำการทดลองต่อโดยปล่อยให้ดอกเห็ดมีการเจริญเติบโตต่อไปจนกระทั่งเสื่อมสภาพไป ซึ่งใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 52 ชั่วโมง ในการทดลองครั้งนี้ศึกษาาระดับการสังเคราะห์สีน้ำตาลของดอกเห็ดใน 2 ส่วนคือ ส่วนครีบบริเวณวงแหวน ในแต่ละส่วนจะประกอบไปด้วยระยะทั้งหมด 6 ระยะ ดังนั้นจึงสามารถกำหนดระยะในการแสดงออกได้โดย ระยะที่ 1 (0 ชั่วโมง) ระยะที่ 2 (10 ชั่วโมง) ระยะที่ 3 (20 ชั่วโมง) ระยะที่ 4 (30 ชั่วโมง) ระยะที่ 5 (40 ชั่วโมง) ระยะที่ 6 (50 ชั่วโมง) ตามลำดับ เปลี่ยนแปลงของดอกเห็ดเทียบกับแถบสีจาก ตารางค่าสีมาตรฐาน PMS (Pantone matching system color chart) เป็นดังรูปที่ 8 โดยผลการสังเคราะห์รงควัตถุสีน้ำตาลบริเวณครีบบริเวณวงแหวนมีระดับการสังเคราะห์รงควัตถุสีน้ำตาลตามระยะการเจริญเติบโต ในครีบบจะพบการสังเคราะห์รงควัตถุสีน้ำตาลตรงกับแถบสีหมายเลข PMS393 PMS459 PMS460 PMS465 PMS731 และ PMS1405 ตามลำดับ นั่นหมายถึงพบการเปลี่ยนแปลงของสีของดอกเห็ดจากสีขาวเป็นสีน้ำตาลเข้ม ส่วนบริเวณวงแหวนพบการสังเคราะห์รงควัตถุสีน้ำตาลตั้งแต่ระยะที่ 3 เป็นต้นไป ซึ่งตรงกับแถบสีหมายเลข PMS141 PMS143 PMS464 และ PMS469 ตามลำดับดังรูป ซึ่งหมายถึง พบการ

เปลี่ยนแปลงของสีของดอกเห็ดจากสีขาวเป็นสีน้ำตาลเข้มเช่นเดียวกับครีบ แต่การเปลี่ยนแปลงของสีของดอกในครีบเกิดด้วยอัตราที่ช้ากว่าการเปลี่ยนแปลงของสีที่พบในวงแหวน (รายละเอียดของแถบเทียบสี PMS ดังในตาราง ภาคผนวก จ)



รูปที่ 7 ผลของการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสีน้ำตาลของดอกเห็ดในแต่ละระยะในส่วนของครีบ และวงแหวน โดยการเทียบกับแถบสีจาก ตารางค่าสีมาตรฐาน PMS (Pantone matching system color chart)

สำหรับดอกเห็ดที่ได้จากท้องตลาด พบว่า ดอกเห็ดบริเวณครีบและวงแหวนมีการเปลี่ยนแปลงระดับการสังเคราะห์รงควัตถุสีน้ำตาลจากน้อยไปมาก ตามระยะเวลาในการเก็บรักษาเช่นเดียวกันและเมื่อนำดอกเห็ดในบริเวณครีบแต่ละระยะเทียบกับแถบสี PMS พบว่า ค่าที่ได้จากการเทียบตรงกับแถบสีรหัส PMS393 PMS459 PMS129 PMS136 PMS146 และ PMS1545 ตามลำดับซึ่งหมายถึงการเปลี่ยนแปลงของสีของดอกเห็ดจากสีขาวเป็นสีน้ำตาลดำ ส่วนบริเวณวงแหวนในแต่ละระยะมีการเปลี่ยนแปลงการสังเคราะห์รงควัตถุ เมื่อเทียบกับแถบสี พบว่า ค่าที่ได้ในแต่ละระยะตรงกับแถบสีรหัส PMS127 PMS128 PMS130 PMS131 PMS138 และ PMS139 ตามลำดับ ซึ่งหมายถึงการเปลี่ยนแปลงของสีของดอกเห็ดจากสีขาวปนน้ำตาลอ่อนเป็นสีน้ำตาลเข้มถึงดำ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเหมือนกับดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยงเพียงแต่ในดอกเห็ดที่ได้จากท้องตลาดมีอัตราในการเปลี่ยนแปลงสีได้เร็วกว่าดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยง ดังรูปที่ 8 (รายละเอียดของแถบสี PMS ดังตารางใน ภาคผนวก จ)

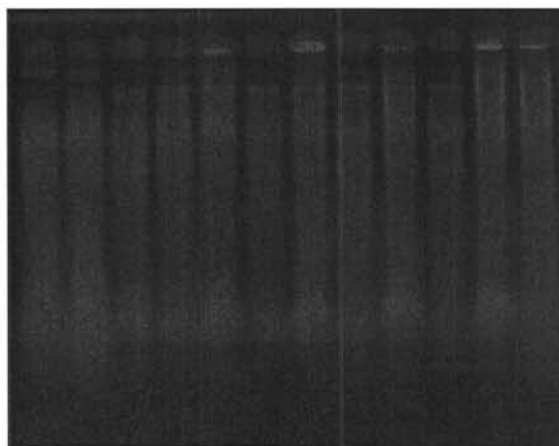


รูปที่ 8 ผลการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสีน้ำตาลของดอกเห็ดที่ได้จากตลาดในแต่ละระยะ
ในส่วนของครีบและวงแหวนเทียบกับแถบสีจาก ตารางค่าสีมาตรฐาน
PMS (Pantone matching system color chart)

4.2.2 สกัดอาร์เอ็นเอรวมจากตัวอย่างเห็ดยานางิ

อาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้จากตัวอย่างดอกเห็ดตัวอย่างละ 300 มิลลิกรัมในครีบและ 100 มิลลิกรัมในวงแหวนที่เพาะเลี้ยง ในแต่ละระยะ เมื่อนำมาแยกขนาดด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ตัวอย่างปริมาตร 3 ไมโครลิตรแสดงได้ดังรูปที่ 9

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



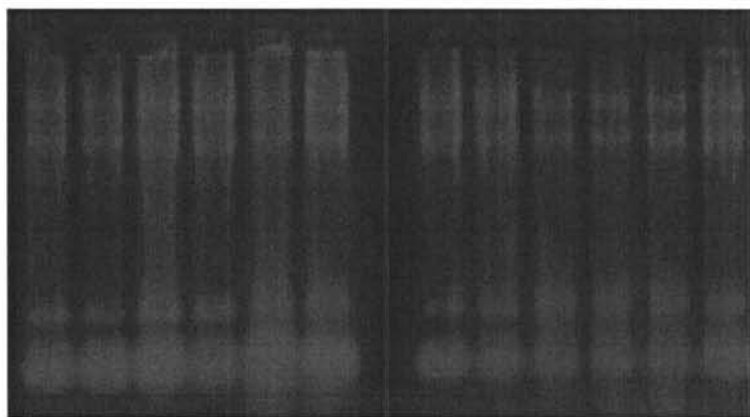
รูปที่ 9 ผลปริมาณอาร์เอ็นเอที่สกัดด้วยวิธีฟินอล ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ตามด้วย

เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส 1x agarose ใน 1x TBE buffer ช่องที่ 1-6 ผลของอาร์เอ็นเอ

ในส่วนของครีบจำนวน 6 ระยะตามลำดับ ช่องที่ 7-12 ผลของอาร์เอ็นเอในส่วนของวงแหวนจำนวน 6 ระยะตามลำดับ

อาร์เอ็นเอที่ได้มีความสม่ำเสมอในระหว่างตัวอย่างและมีขนาดขององค์ประกอบอาร์เอ็นเอคล้ายกัน เมื่อดูจากแถบอาร์เอ็นเอที่เป็นป็นยาวคล้ายกัน จากนั้นนำอาร์เอ็นเอดังกล่าว ภายหลังจากทำความสะอาดด้วยการตกตะกอนในลิเธียมคลอไรด์ (LiCl) ที่ความเข้มข้น 3 โมลต่อลิตร และตรวจสอบปริมาณซ้ำอีกครั้ง พบว่ากระบวนการตกตะกอนด้วยลิเธียมคลอไรด์ช่วยให้ตัวอย่างดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์ ตรวจสอบได้จากการทดลองทำปฏิกิริยา RT-PCR โดยไม่พบ inhibitor ใดๆ ที่จะทำให้กระบวนการสังเคราะห์ RT-PCR หยุดลง ทำนองเดียวกันการนำตัวอย่างดอกเห็ดที่ได้จากห้องตลาดมาตรวจสอบในแต่ละระยะโดยสกัดอาร์เอ็นเอจากส่วนของครีบและวงแหวนตามวิธีการข้างต้น พบว่า อาร์เอ็นเอที่สกัดได้ไม่แตกต่างจากที่ได้จากตัวอย่างที่เพาะเลี้ยง (รูปที่ 10) อาร์เอ็นเอที่ได้มีรูปแบบเป็นปกติครอบคลุมขนาดของอาร์เอ็นเอหลากหลายขนาด อาร์เอ็นเอที่ได้นำมาทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยตกตะกอนด้วยสารละลายลิเธียมคลอไรด์ได้ผลเช่นเดียวกัน

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12



รูปที่ 10 ผลอาร์เอ็นเอที่ได้จากการตกตะกอนด้วยลิเธียมคลอไรด์ ตามด้วยเทคนิค

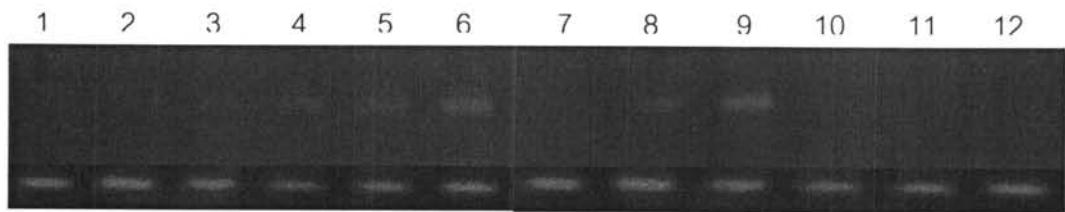
อิเล็กโทรโฟเรซิส 1% agarose ใน 1x TBE buffer ช่องที่ 1-6 ผลของอาร์เอ็นเอในส่วน
ของครีป ระยะที่ 1-6 ช่องที่ 7-12 ผลของอาร์เอ็นเอในส่วนของวงแหวนระยะที่1-6 ตาม
ลำดับ

4.2.3 การตรวจสอบระดับปริมาณการแสดงออกของยีนในรูปอาร์เอ็นเอ

ปริมาณของอาร์เอ็นเอจากดอกเห็ดที่ได้จากการตกตะกอนด้วยลิเธียมคลอไรด์มาเจือจาง
ที่ความเข้มข้น 500 เท่า มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร พบว่าในส่วน
ครีประยะที่ 1 ถึง ระยะที่ 6 ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.028 0.004 0.042 0.029 0.033 0.051
ตามลำดับ เมื่อนำค่ามาคำนวณความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอมีค่าเท่ากับ 0.56 0.08 0.84 0.58 0.66
1.02 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ส่วนในส่วนของวงแหวนได้ค่าการดูดกลืนแสงทั้ง 6 ระยะเป็น
0.055 0.016 0.035 0.064 0.040 0.076 ตามลำดับโดยมีความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอเป็น 1.10
0.32 0.70 1.28 0.80 1.52 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ทำนองเดียวกันอาร์เอ็นเอที่ได้จากการ
ตกตะกอนด้วยลิเธียมคลอไรด์ของดอกเห็ดที่ได้จากตลาด เจือจางที่ความเข้มข้น 500 เท่า พบว่า
ได้ค่าการดูดกลืนแสงของดอกเห็ดในส่วนครีปในแต่ละระยะที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรเป็น
0.010 0.062 0.017 0.026 0.038 0.006 ตามลำดับ เมื่อนำค่าที่ได้มาคำนวณความเข้มข้น ได้ผล
เป็น 0.20 1.24 0.34 0.72 0.76 0.012 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ค่าการดูดกลืนแสงในส่วนของวง
แหวนในแต่ละระยะเป็น 0.004 0.021 0.048 0.075 0.012 0.028 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าความเข้มข้น
เท่ากับ 0.08 0.42 0.96 1.50 0.24 0.56 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร อาร์เอ็นเอที่ได้เมื่อปรับให้มี
ปริมาณเทียบเท่ากันในแต่ละตัวอย่างแล้วสามารถนำมาตรวจสอบรูปแบบการแสดงออกของยีน
โดยเทคนิค RT-PCR ในขั้นตอนต่อไป

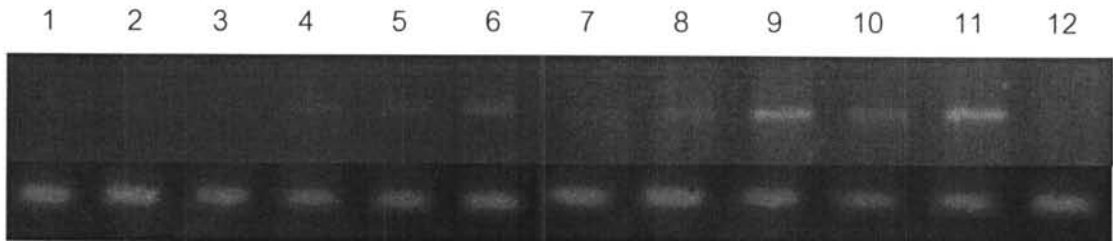
4.2.4 ปฏิกริยา reverse–transcription polymerase chain reaction

ดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยง ผลจากการนำอาร์เอ็นเอที่ตกตะกอนด้วยลิเทียมคลอไรด์แต่ละระยะ บริเวณครีบบและวงแหวนที่มีความเข้มข้นใกล้เคียงกัน ปริมาตรรวม 1 ไมโครลิตร มาสังเคราะห์ cDNA สายแรกในปฏิกริยา reverse transcription ด้วยเอนไซม์ MMLV reverse transcriptase และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอให้มากขึ้นด้วยปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเป็นดังรูปที่ 12 พบ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอของยีนไทโรซิเนสในครีบบ ในระยะ 1-3 น้อยมากแต่การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะเพิ่มมากขึ้นในระยะ 4-6 ขณะที่ในเนื้อเยื่อวงแหวนของดอกเห็ด การสังเคราะห์ดีเอ็นเอของยีนไทโรซิเนส ในระยะที่ 1 พบว่ามีอยู่น้อยมากแต่การสังเคราะห์จะเพิ่มมากขึ้นในระยะ 2 กับ 3 ส่วนระยะที่ 4-6 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอจะลดลง



รูปที่ 11 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของยีนไทโรซิเนสในเห็ดที่เพาะเลี้ยงเองในระยะต่างๆ บริเวณครีบบและวงแหวน โดยเทคนิคพอลิเมอเรส ด้วยอิเล็กโทรโพรซิส 1% agarose ใน 1% TAE buffer
 ช่องที่ M ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 นิวคลีโอไทด์
 ช่องที่ 1-6 ปริมาณการสังเคราะห์ดีเอ็นเอบริเวณครีบบในระยะที่ 1-6
 ช่องที่ 7-12 ปริมาณการสังเคราะห์ดีเอ็นเอบริเวณวงแหวนในระยะที่ 1-6

ดอกเห็ดที่ได้จากตลาด นำอาร์เอ็นเอที่ได้จากการตกตะกอนด้วยลิเทียมคลอไรด์มา
สังเคราะห์ cDNA ต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนโทโรซิเนสที่ได้จากตลาด โดยปริมาณ
ดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ในแต่ละระยะในบริเวณครีปและวงแหวน มีรูปแบบการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ
ของยีนโทโรซิเนสที่ได้จากเห็ดที่ได้จากท้องตลาดในบริเวณครีปและวงแหวนเหมือนกันกับรูปแบบ
การสังเคราะห์ดีเอ็นเอของยีนที่ได้จากเห็ดที่เพาะเลี้ยง

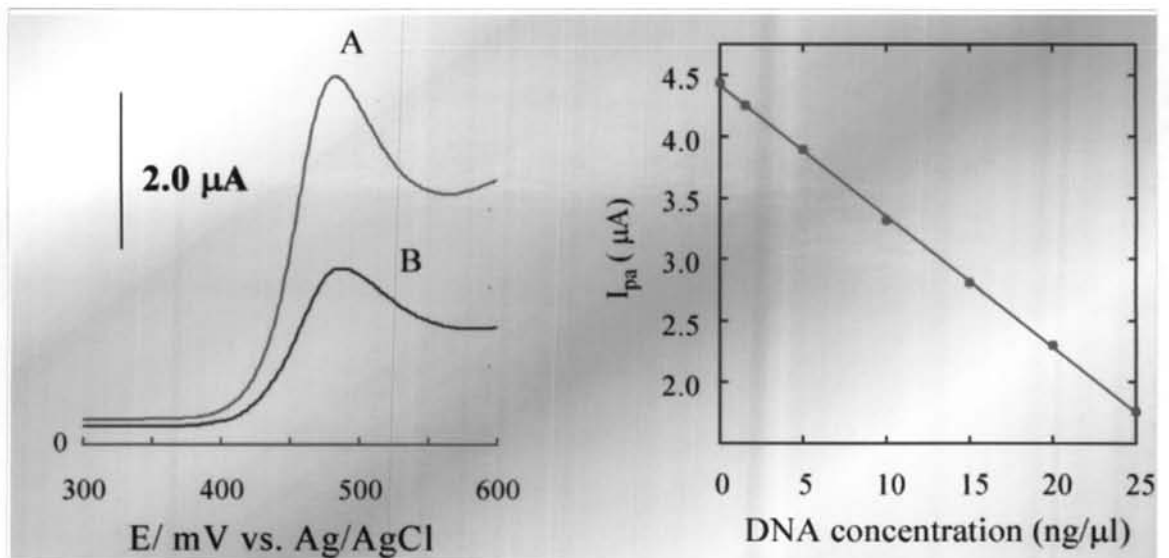


รูปที่ 12 ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของยีนโทโรซิเนสในเห็ดที่ได้จากตลาดในระยะต่าง ๆ
บริเวณครีปและวงแหวน โดยเทคนิคพอลิเมอเรส ด้วยอิเล็กโทรฟอเรซิส 1%
agarose ใน 1% TAE buffer
ช่องที่ M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 นิวคลีโอไทด์
ช่องที่ 1-6 ปริมาณการสังเคราะห์ดีเอ็นเอบริเวณวงแหวนในระยะที่ 1-6
ช่องที่ 7-12 ปริมาณการสังเคราะห์ดีเอ็นเอบริเวณวงแหวนในระยะที่ 1-6

ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับผลการแสดงออกของยีน 12S rRNA ซึ่งเป็น rRNA ที่ได้จากไมโต
คอนเดรีย จะพบว่า การแสดงออกของ 12S rRNA จะคงที่และมีความแตกต่างกันไม่มากนักในแต่ละ
ระยะและในแต่ละเนื้อเยื่อดังรูปที่ 11-12

4.2.5 การวัดระดับการแสดงออกของยีนไทโรซิเนสด้วยเทคนิคไบโอเซ็นเซอร์

การวัดระดับการแสดงออกของยีนไทโรซิเนสอยู่บนพื้นฐานของหลักการทางไบโอเซ็นเซอร์ โดยการทำปฏิกิริยาระหว่างผลิตภัณฑ์ cDNA ที่ได้จากการแสดงออกของยีนไทโรซิเนส ซึ่งได้จาก RT-PCR กับ minor groove binder Hoechst 33258 ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ช่วยแปลงสัญญาณดีเอ็นเอให้อยู่ในรูปแบบที่สามารถตรวจสอบวัดการเปลี่ยนแปลงของอิเล็กตรอนอิสระได้ โดยระดับปริมาณ cDNA จะแปรผกผันกับการเปลี่ยนแปลงทางกระแสไฟฟ้ารูปค่า anodic current peak ผลการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงทางไฟฟ้าในรูปแบบ voltammetrogram เป็นดังรูป



รูปที่ 13 ลักษณะของการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าในรูปแบบ anodic current peak

จากรูปที่ 13 รูปกราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าที่ได้จากการตรวจวัด ซึ่งกราฟทางด้านซ้ายแสดงปริมาณของดีเอ็นเอที่ตรวจวัดโดย A แทน ตัวอย่างของดีเอ็นเอที่มีปริมาณน้อยเมื่อตรวจวัดจะได้ค่ากระแสไฟฟ้าที่สูง ในทางกลับกัน B แทน ตัวอย่างของดีเอ็นเอที่มีปริมาณมากเมื่อตรวจวัดจะได้ค่ากระแสไฟฟ้าที่ต่ำลง ส่วนกราฟทางด้านขวา เป็นการเปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้นของดีเอ็นเอกับค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้จากการตรวจวัดจะพบว่า ค่าของกระแสไฟฟ้าแปรผกผันกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ถ้าความเข้มข้นของดีเอ็นเอมาก ค่าการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าในรูปแบบ anodic current peak ต่ำ แต่ในทางกลับกันถ้าดีเอ็นเอน้อย ทำให้ค่าการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าสูงขึ้น โดยหน่วยที่ได้จากการตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอจะมีหน่วยเป็นนาโนกรัมต่อไมโครลิตร (ng/ul)

การตรวจวัดการแสดงออกของยีนไทโรซิเนสในตัวอย่างเห็ดยานางที่ครีปและวงแหวนในระยะต่างๆ จะทำให้ได้ค่า anodic current peak ดังตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ค่า anodic current peak ของดอกเห็ดยานางในระยะต่างๆ

ตำแหน่งเนื้อเยื่อ	ชนิดยีนที่เปรียบเทียบ	ค่า anodic current peak ที่ระดับต่างๆ (μA)					
		1	2	3	4	5	6
ครีป	ไทโรซิเนส	2.15	1.90	1.81	1.65	1.62	1.53
	12S rRNA	1.10	1.05	1.03	1.11	1.08	1.07
วงแหวน	ไทโรซิเนส	1.91	1.63	1.58	1.62	1.68	1.87
	12S rRNA	1.05	1.11	1.07	1.08	1.09	1.10

จากตารางที่ 14 ค่า anodic current peak ของยีนไทโรซิเนสที่วัดได้จากตัวอย่างเห็ดยานางมีค่าตั้งแต่ 1.53 - 2.15 μA ขณะที่ค่าเดียวกันของยีน 12S rRNA เป็น 1.03-1.11 μA ตามลำดับ การตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและค่า anodic current peak ของยีนไทโรซิเนส เมื่อวัดโดยหลักการ voltametry เป็นดังสมการ $y (\text{Tyr}) = -0.174x + 2.167$ เมื่อ x เป็นค่า \log ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (จำนวน copy) และ y เป็นค่า anodic current peak (μA) ดังรูปที่ 14

ตารางที่ 15 ค่า anodic current peak สัดส่วนของยีน และจำนวน copy number

ตำแหน่ง เนื้อเยื่อ	ชนิดยีนที่เปรียบเทียบ	ค่า anodic current peak (μ A) และจำนวน copy number ที่ระยะต่างๆ					
		1	2	3	4	5	6
1 ครีบ	ไทโรซิเนส	1.25	9.11	112.64	935.97	1392.12	4580.57
	12S rRNA	117400	220770	284215	103469	151138	171486
	สัดส่วนระหว่างไทโรซิเนสกับ 12S	0.001%	0.004%	0.4%	0.9%	0.92%	2.67%
วงแหวน	ไทโรซิเนส	29.99	1219.57	2363.54	1392.12	629.28	50.92
	12S rRNA	220769	103469	171489	151138	133138	151138
	สัดส่วนระหว่างไทโรซิเนสกับ 12S	0.01%	1.18%	1.38%	0.92%	0.47%	0.03%

จากตารางที่ 15 การแสดงออกของยีนไทโรซิเนสในครีบจะเพิ่มมากขึ้น จากระยะที่ 1 ถึง 6 มี 11740 ชุด ถึง 171486 ชุด ตามลำดับ ขณะที่การแสดงออกของยีนในวงแหวนจะแตกต่างกันออกไปโดยพบการแสดงออกของยีนตั้งแต่ระยะที่ 2 เป็นต้นไป และจะลดต่ำลงในระยะที่ 4 การแสดงออกของยีนไทโรซิเนสนี้สอดคล้องกับระดับความเข้มข้นของแถบ cDNA ที่ตรวจพบ (รูปที่ 12) โดยหากคิดเป็นสัดส่วนของการแสดงออกเมื่อเปรียบเทียบกับ 12S rRNA ในครีบจะมีค่า 0.001 ถึง 2.67 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในวงแหวนในระยะที่ 1 จะมีค่าต่ำสุดที่ 0.01 เปอร์เซ็นต์ และสูงสุดที่ระยะ 3 มีค่าเท่ากับ 1.38 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การแสดงออกของยีนไทโรซิเนสในเห็ดยานางิ พบ การสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกเพิ่มขึ้นตามการทำงานของยีนไทโรซิเนส ในตัวอย่างเห็ดที่เพาะเลี้ยงการเปลี่ยนแปลงสีน้ำตาลเกิดขึ้นตามระยะเวลาในการเจริญเติบโต โดยจะเริ่มเปลี่ยนแปลงสีน้ำตาลตั้งแต่ระยะที่ 1 และจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในระยะสุดท้าย เมื่อทำการเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ RT-PCR พบว่าดอกเห็ดมีการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกน้ำตาลตามการทำงานของยีนไทโรซิเนส โดยสังเกตจากแถบดีเอ็นเอจะเข้มข้นเรื่อยๆ ขณะที่ในวงแหวนดอกเห็ดจะมีการเปลี่ยนแปลงสีน้ำตาลในอัตราเร็วกว่าดอกเห็ดที่เพาะเลี้ยง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว มีผลให้ดอกเห็ดมีการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกน้ำตาลเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่ระยะแรกจนกระทั่งถึงระยะสุดท้าย จากการเปรียบเทียบการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกน้ำตาลในระยะต่างๆ กับแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น พบว่า ดอกเห็ดมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอมากในระยะที่ 3 การศึกษาการแสดงออกของยีนไทโรซิเนสในเห็ดยานางิครั้งนี้เลือกใช้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไบโอเซ็นเซอร์เนื่องจากเป็นเทคนิคที่สามารถตรวจสอบได้ง่าย รวดเร็วและไม่ต้องใช้ประสบการณ์มากในการตรวจสอบ