การตรวจสอบการแสดงออกของยีนไทโรซิเนสในเห็ดยานางิ *Agrocybe cylindracea* โดยวิธีอิเล็คโตรเคมิคอลไบโอเซ็นเซอร์

นางสาวมัลลิกา แก้วดี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DETECTION OF TYROSINASE GENE EXPRESSION IN YANAGI *Agrocybe cylindracea* BY ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR

MISS MALLIKA KEAWDEE

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Genetics

Department of Botany

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

492214

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจสอบการแสดงออกของยีนไทโรซิเนสในเห็ดยานางิ *Agrocybe cylindracea* โดยวิธีอิเล็คโตรเคมิคอลไบโอเซ็นเซอร์
โดย	นางสาวมัลลิกา แก้วดี
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีดา บุญ-หลง)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เตือนใจ โก้สกุล)

.....กรรมการ
(อาจารย์ อนิวรรต เฉลิมพงษ์)

มัลลิกา แก้วดี : การตรวจสอบแสดงออกของยีนไทโรซิเนสในเห็ดยานางิ *Agrocybe Cylindracea* โดยวิธีอิเล็คโตรเคมิคอลไบโอเซ็นเซอร์. (DETECTION OF TYROSINASE GENE EXPRESSION IN YANAGI *Agrocybe cylindracea* BY ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR. อ.ที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ, อ.ที่ปรึกษาร่วม: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์., 77 หน้า.

วัตถุประสงค์ในการศึกษาวิจัยเรื่องนี้เพื่อต้องการพัฒนาวิธีการตรวจสอบการแสดงของยีนไทโรซิเนสและศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนนี้ในระหว่างการเสื่อมสภาพของเห็ดยานางิ วิธีการศึกษาวิจัยเริ่มจากการออกแบบไพรเมอร์บนพื้นฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสที่พบในเห็ดราต่างชนิด และระบบการตรวจสอบโดยวิธี reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ผลการศึกษาวิจัย พบว่าสามารถออกแบบไพรเมอร์ที่เหมาะสมเฉพาะเจาะจงต่อยีนไทโรซิเนสจากบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับของเห็ด 2 ชนิด ได้แก่ เห็ดกระดุม *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach และเห็ดหอม *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. เมื่อนำไปตรวจสอบด้วยการเปรียบเทียบในรูปแบบ local alignment (BLAST n) พบความจำเพาะเจาะจงต่อยีนไทโรซิเนสในเห็ดกระดุมและเห็ดหอมอย่างชัดเจนที่ความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ ไพรเมอร์ที่ได้นำไปประยุกต์ในการศึกษาการแสดงออกของยีนดังกล่าวด้วยเทคนิค RT-PCR ได้ผลิตภัณฑ์ cDNA ขนาด 700 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์สอดคล้องกับไทโรซิเนสที่พบในเห็ดชนิดอื่น หลังตรวจสอบโดยการโคลน หาลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ การตรวจสอบการแสดงออกของยีนสามารถแบ่งการแสดงออกได้ 6 ระยะ โดยตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิคไบโอเซ็นเซอร์ทางเคมีไฟฟ้า (electrochemical DNA biosensor) โดยใช้โมเลกุล Hoechst 33258 เป็นโมเลกุลกลางในการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนสัญญาณ cDNA พบว่า การแสดงออกของยีนในครีบในระยะที่ 1 และสะสมมากขึ้นเรื่อยๆ จนถึงระยะที่ 6 ขณะที่รูปแบบการแสดงออกของยีนในวงแหวนสูงสุดในระยะที่ 3 ส่วนผลการแสดงออกของยีนเมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของยีนกับ 12S rRNA พบว่า การแสดงออกในครีบสูงสุดที่ระยะ 6 คิดเป็น 2.67 เปอร์เซ็นต์ของการแสดงออกของ 12S rRNA และการแสดงออกในวงแหวนสูงสุดในระยะที่ 3 คิดเป็น 1.38 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับรูปแบบการแสดงออกที่แสดงในแถบ cDNA ที่ตรวจสอบโดยการแยกเจลอิเล็คโทรฟอเรซิส สำหรับผลการศึกษา รูปแบบการแสดงออกของยีนมีความสอดคล้องกับการพัฒนาการทางสรีรวิทยาที่เข้าสู่การเสื่อมของดอกเห็ด ซึ่งเป็นประโยชน์ในการศึกษาพื้นฐานการเปลี่ยนแปลงสีของดอกในเห็ดยานางิต่อไป

คำสำคัญ: การแสดงออกของยีน ไทโรซิเนส โมเลกุล Hoechst 33258 เห็ดยานางิ อิเล็คโตรเคมิคอลไบโอเซ็นเซอร์

ภาควิชา.....พฤกษศาสตร์..... ลายมือชื่อนิสิต.....มัลลิกา แก้วดี.....

สาขาวิชา .... พันธุศาสตร์..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....มุกดา คูหิรัญ.....

ปีการศึกษา...2549..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4672376523 : MAJOR GENETICS

KEY WORDS: *Agrocybe cylindracea* / EXPRESSION / ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR / HOECHST 33258/ TYROSINASE

MALLIKA KEAWDEE : DETECTION OF TYROSINASE GENE EXPRESSION IN YANAGI *Agrocybe cylindracea* BY ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR. THESIS ADVISOR : ASSOC.PROF. MUKDA KUHIRUN, THESIS COADVISOR : ASSISTANT.PROFESSOR. PIYASAK CHAUMPLUK, Ph.D., 77 pp.

The objective of this study was to determine tyrosinase gene expression of Yanagi mushroom *Agrocybe cylindracea* (DC ex Fr.) Maire during senescence. The detection system based on gene expression was developed. At first, primers in the system were designed based on tyrosinase gene data among tyrosinase from different fungi. The detection system based on RT-PCR (reverse-transcription polymerase chain reaction) was also established. Results obtained from primers designed revealed suitable primers specific for tyrosinase gene of two species, the botton mushroom *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach and the shiitake mushroom *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. And when this was investigated based on local alignment (BLAST n), the primers showed specificity to these genes with 100 % similarity. Further application of the primers by RT-PCR technique for gene expression study revealed cDNA products of 700 nucleotides in size. This cDNA indicated sequence of nucleotides in correspondence with tyrosinase from that of other fungi as determined by cDNA cloning and sequence determination. In gene expression investigation, senescence of mushroom could be devided into 6 stages which was detected by electrochemical biosensor technique that was employed for detection of gene expression using Hoechst 33258 as a molecule to induce the change in cDNA signal. The gene expression in gills was found gene expression in stage 1 and continued to accumulate the until stage 6. For rings, there was a maximum gene expression in stage 3 . When this was compared with 12S rRNA expression in gill tissues, the expression in gill reached maximum point with 2.67 % of housekeeping gene expression and the expression in ring reached maximum point with 1.38 %. It was consistent with an expression in cDNA visualized by gel electrophoresis. Tyrosinase gene expression pattern was exhibited in consistency with physiological development. The results of these basic data would be useful for further studies of color-changing of Yanagi mushroom.

Department :.....Botany..... Student's signature.....

Field of study:... Genetics..... Advisor's signature.....

Academic year .....2006..... Co-advisor's .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีโดยได้รับความช่วยเหลือจากรองศาสตราจารย์ มุกดา คูหิรัญ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. ปรีดา บุญ-หลง ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เตือนใจ โก้สกุล อาจารย์ อนิวรรต เฉลิมพงษ์ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะ ข้อคิดเห็นต่างๆ รวมทั้งการตรวจแก้ไขในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่ให้ทุนการศึกษาและทุนสนับสนุนการวิจัย

ขอขอบคุณ เพื่อน พี่ และน้องๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจมาโดยตลอดระยะเวลาที่ทำวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อบุญจันทร์ คุณแม่เรืองนภา แก้วดี พี่ชาย น้องชาย น้องสาว และญาติๆ ทุกคนที่ให้การอุปการะในด้านการเงินและให้กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้เป็นอย่างดียิ่ง ทำให้วิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คุณความดีและประโยชน์อันพึงจะมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้กับผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้นด้วย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ฌ
สารบัญรูป.....ญ

บทที่

1. บทนำ.....1
    1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1
    1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....6
    1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....6
    1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....6
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....7
3. วิธีดำเนินการวิจัย.....13
    3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี.....13
    3.2 การศึกษายีนไทโรซิเนสและการวิเคราะห์.....15
    3.3 ศึกษาระดับการแสดงออกของยีนไทโรซิเนส.....19
4. ผลการทดลอง.....22
    4.1 การศึกษายีนไทโรซิเนสและการวิเคราะห์.....22
    4.2 ศึกษาระดับการแสดงออกของยีนไทโรซิเนส.....35
5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....46
    5.1 ระบบตรวจสอบของยีนไทโรซิเนส.....46
    5.2 การเปลี่ยนแปลงของสีและการแสดงออกของยีนไทโรซิเนสในเห็ดยานางิ.....47
    5.3 การตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยไบโอเซ็นเซอร์.....47
    5.4 สรุปผลการทดลอง.....48
    5.5 ข้อเสนอแนะ.....49

สารบัญ

รายการอ้างอิง.....50
ภาคผนวก.....56
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....77

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสในเห็ดกระดุม *Agaricus bisporus*.....22

2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสในรา *Neurospora crassa*.....23

3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสในเห็ดหอม *Lentinus edodes*.....23

4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสในแอคติโนไมซิส *Streptomyces glaucescens*.....23

5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสจากรา *Aspergillus oryzae*.....24

6 ค่าคะแนนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันของแต่ละสายพันธุ์ในเห็ด
กระดุม *Agaricus bisporus*. 24

7 คะแนนความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสจากรา
Neurospora crassa.....25

8 ค่าคะแนนความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสจากเห็ดหอม
Lentinus edodes.....25

9 ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสจากเห็ดราชนิดต่างๆ.....26

10 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสในเห็ดกระดุมจากฐานข้อมูลดีเอ็นเอ.....27

11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความเหมือนของไพรเมอร์ในสาย forward และ reverse.....29

12 การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ยีนไทโรซิเนสการทำ BLAST n.....30

13 จำนวนของลำดับนิวคลีโอไทด์จากการวิเคราะห์โคลน 4 ตัวอย่าง.....34

14 ค่า anodic current peak ของดอกเห็ดยานางิในระยะต่างๆ 43

15 ค่า anodic current peak สัดส่วนของยีน และจำนวน copy number.....45

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ลักษณะสัณฐานของเห็ดยานางิ	2
2	วงจรชีวิตของเห็ดแบบ heterothallic	3
3	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence alignment) และความเหมือน (similarity search) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไทโรซิเนสในเห็ดกระดุมที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์	28
4	ผลการสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากเห็ดยานางิ แยกขนาดด้วยอิเล็คโทรฟอเรซิสด้วย 1% agarose ในสารละลาย 1x TBE buffer	31
5	ผลการตรวจสอบความจำเพาะของวิธีการตรวจจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์เห็ดยานางิด้วยคู่ยีนไทโรซิเนส ด้วยหลักการปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยเทคนิคอิเล็คโทรฟอเรซิส	32
6	ปริมาณชิ้นส่วนของโคลนที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วยเทคนิคอิเล็คโทรฟอเรซิส 1% agarose ใน 1x TAE buffer	33
7	ผลของการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสีน้ำตาลของดอกเห็ดในแต่ละระยะในส่วนของครีบและวงแหวน โดยการเทียบกับแถบสีจากตารางค่าสีมาตรฐาน PMS (Pantone maching system colorchart)	36
8	ผลการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสีน้ำตาลของดอกเห็ดที่ซื้อจากตลาดในแต่ละระยะในส่วนของครีบและวงแหวนเทียบกับแถบสีจาก ตารางค่าสีมาตรฐาน PMS (Pantone maching system colorchart)	37
9	ผลปริมาณอาร์เอ็นเอที่สกัดด้วยวิธีฟีนอล ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ตามด้วยเทคนิคอิเล็คโทรฟอเรซิส 1% agarose ใน 1x TBE buffer	38
10	ผลอาร์เอ็นเอที่ได้จากการตกตะกอนด้วยลิเธียมคลอไรด์ตามด้วยเทคนิคอิเล็คโทรฟอเรซิส 1% agarose ใน 1x TBE buffer	39
11	ผลการเปรียบเทียบการสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอของยีนไทโรซิเนสกับยีน 12S rRNA ในเห็ดที่เพาะเลี้ยงเองในระยะต่างๆ บริเวณครีบและวงแหวน โดยเทคนิคพอลิเมอเรสด้วยอิเล็คโทรฟอเรซิส 1% agarose ใน 1% TAE buffer	40

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
12	ผลการเปรียบเทียบการสังเคราะห์ซีดีเอ็นเอของยีนไทโรซิเนสกับยีน 12S rRNA ในเห็ดที่ได้จากตลาดในระยะต่างๆบริเวณครีบและวงแหวนโดยเทคนิคพอลิเมอเรส ด้วยอิเล็คโทรฟอเรซิส 1% agarose ใน 1% TAE buffer	41
13	ลักษณะของการเปลี่ยนแปลงของกระแสไฟฟ้าในรูป anodic current peak	42
14	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า anodic current peak และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ.....	44