

วัตถุประสงค์ในการศึกษาวิจัยเรื่องนี้เพื่อต้องการพัฒนาวิธีการตรวจสอบการแสดงของยีนไทโรซิเนส และศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนนี้ในระหว่างการเสื่อมสภาพของเห็ดยานางิ 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 ลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ 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 ที่ตรวจสอบโดยการแยกเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส สำหรับผลการศึกษา รูปแบบการแสดงออกของยีนมีความสอดคล้องกับการพัฒนาการทางสรีรวิทยาที่เข้าสู่การเสื่อมของดอกเห็ด ซึ่งเป็นประโยชน์ในการศึกษาพื้นฐานการเปลี่ยนแปลงสีของดอกในเห็ดยานางิต่อไป

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 button 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 divided 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 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.