บทที่ 6

สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pBIH1/APR1 เข้าสู่ผักบุ้ง โดยวิธีการใช้ *Agrobacterium tumefaciens* โดยการแช่ cotyledon explants ของผักบุ้งอายุ 7 วัน ในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีเซลล์ *A. tumefaciens* EHA101 ซึ่งมีรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pBIH1/APR1 จำนวน 1.35 X 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมีอะซิโตไซริงโอนเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ เพื่อชักนำให้เกิดการถ่ายโอนยีนจาก *A. tumefaciens* เข้าสู่ผักบุ้ง บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 80 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำ cotyledon explants มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีอะซิโตไซริงโอนเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน ล้าง cotyledon explants ด้วยสารละลายเซฟโฟแทคซีมเข้มข้น 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 2 ครั้ง เพื่อกำจัด *A. tumefaciens* ซับ cotyledon explant ให้แห้งบนแผ่นกระดาษกรองที่ปราศจากเชื้อ นำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MMS ที่มีไธเดียซูรอนเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ และเซฟโฟแทคซีมเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสีขาวความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ระยะเวลาการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวันพบว่า 13 เปอร์เซ็นต์ของ cotyledon explants สามารถงอกเป็นต้นใหม่ได้ เมื่อนำต้นอ่อนผักบุ้งซึ่งเจริญมาจาก cotyledon explants ที่มีความสูงประมาณ 1-2 เซนติเมตร มาทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าจากต้นอ่อนประมาณ 200 ต้น ที่นำมาทดสอบมีเพียง 8 ต้นเท่านั้นที่สามารถเจริญบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ความเข้มข้นนี้ได้ ย้ายผักบุ้งทั้ง 8 ต้นนี้มาปลูกบนอาหารแข็งสูตร MMS ที่ปราศจากสารปฏิชีวนะเพื่อให้ผักบุ้งเจริญได้อย่างรวดเร็วและเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ นำต้นผักบุ้งมาสกัดดีเอ็นเอ และนำดีเอ็นเอที่ได้มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการ PCR ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ prh1 และ prh2 ซึ่งใช้เพิ่มปริมาณยีน*APR1* เพื่อตรวจหายีน *APR1* ในผักบุ้งทั้ง 8 ต้นนี้ วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส พบว่าดีเอ็นเอของผักบุ้ง 2 ต้นจาก 8 ต้นเท่านั้นที่ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 เบส ซึ่งเป็นขนาดของดีเอ็นเอที่ควรจะได้เมื่อดีเอ็นเอแม่แบบคือยีน *APR1* แสดงว่าผักบุ้งทั้ง 2 ต้นนี้มียีน*APR1* สอดแทรกอยู่บนโครโมโซม จากนั้นตรวจหาว่ายีน *APR1* นี้มียีนโปรโมเตอร์ชนิด CaMV 35s อยู่ทางด้านปลาย 5' หรือไม่ด้วยวิธี PCR โดยใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ชนิด CaMV 35s และ prh2 ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซีส พบว่าได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,200 เบส ซึ่งเป็นขนาดที่ควรจะได้เมื่อยีน *APR1* ที่สอดแทรกใน

โครโมโซมของผักบุ้งมียีนโปรโมเตอร์ชนิด CaMV 35s อยู่ทางด้านปลาย 5' จริง ตรวจสอบซ้ำเพื่อยืนยันว่ามียีน *APR1* อยู่บนโครโมโซมของผักบุ้งจริงด้วยวิธี Southern hybridization โดยการตัดดีเอ็นเอของผักบุ้งด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Xba*I ร่วมกับ *Xho*I ย้ายดีเอ็นเอที่ได้ไปยังแผ่นไนลอนเมมเบรนและตรึงดีเอ็นเอไว้บนแผ่นไนลอนเมมเบรน เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอเป้าหมาย ทำไฮบริไดเซชั่นโดยมีดีเอ็นเอติดตาม (probe) เป็นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 เบส ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR เมื่อใช้ยีน *APR1* เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ prh1 และ prh2 เป็นไพร์เมอร์ ติดฉลากดีเอ็นเอติดตามด้วยสารปลอดรังสีชุด DIG High Prime พบว่าได้สัญญาณไฮบริไดเซชั่นกับดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,500 เบส ซึ่งเท่ากับขนาดของยีน *APR1* แสดงว่าโครโมโซมของผักบุ้งทั้ง 2 ต้นที่ทดสอบมียีน *APR1* อยู่จริง เรียกผักบุ้งทั้งสองนี้ว่าผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2 และหมายเลข 8 ไม่ได้สัญญาณไฮบริไดเซชั่นเมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากผักบุ้งพันธุ์เดิม ซึ่งตัดด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Xba*I ร่วมกับ *Xho*I ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องจากดีเอ็นเอติดตามที่ใช้เป็น cDNA ซึ่งไม่มีส่วนอินตรอน ดังนั้นจึงไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอที่สกัดจากผักบุ้งพันธุ์เดิม (Genomic DNA) ที่มีทั้งส่วนของอินตรอนและแอกซอนได้

ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสในต้นผักบุ้งพันธุ์หมายเลข 2 และหมายเลข 8 เทียบกับผักบุ้งพันธุ์เดิม (wild type) โดยนำราก ลำต้น และใบ ตัวอย่างละประมาณ 40 กรัม มาทำให้เย็นด้วยไนโตรเจนเหลว บดให้ละเอียดในสารละลายบัฟเฟอร์โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต-ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่มีอีดีทีเอและเมอร์แคพโตเอธานอล นำส่วนน้ำที่ได้จากการกรองผ่านผ้าขาวบางและปั่นเหวี่ยงที่ 0 องศาเซลเซียสความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ไปย่อยสลายเอพีเอสในภาวะที่มีไกลซีน เอพีเอส ไดไธโอทรีอิทอล และโซเดียมซัลเฟต ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากหยุดปฏิกิริยา วิเคราะห์ปริมาณของ 5'-AMP ที่เกิดจากกิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสโดยวิธี HPLC พบว่ากิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสในส่วนต่างๆ ที่ทดสอบของผักบุ้งพันธุ์หมายเลข 2 และหมายเลข 8 สูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม (wild type) ผักบุ้งพันธุ์เดิมมีกิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสในราก ลำต้นและใบเท่ากับ 0.1492 0.0965 และ 0.0070 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน ผักบุ้งพันธุ์หมายเลข 2 และหมายเลข 8 มีกิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสในราก ลำต้นและใบสูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิมเท่ากับ 4.95 และ 3.63 เท่า (ในราก) 2.96 และ 2.77 เท่า(ในลำต้น) 1.26 และ 1.69 เท่า(ในใบ) จะเห็นได้ว่ากิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสจะเพิ่มขึ้นมากที่สุดในราก ถัดลงมาคือลำต้นและใบตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Takahashi และคณะ (1997) Yamaguchi และคณะ (1999) และ Lee และ Leustek (1999) ซึ่งรายงานว่าภาวะที่พืชมีความจำเป็นต้องเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการนำกำมะถันซัลเฟตมาสังเคราะห์เป็นกรดอะมิโนซีสเตอีน (กระบวนการ sulfate

assimilation) นั้น พืชจะเพิ่มปริมาณการถอดรหัสของยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสที่ราก ที่รากของ *Arabidopsis thaliana* ที่เจริญในภาวะขาดแคลนซัลเฟต ปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ซึ่งถอดรหัสของยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสจะเพิ่มขึ้นประมาณ 5 เท่า (Takahashi และคณะ, 1997; Yamaghchi และคณะ, 1999) โดยอนุมานว่าเมื่อเอพีเอสรีดักเตสเพิ่มมากขึ้น กิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสที่รากก็จะเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย

ผลการหาปริมาณกรดอะมิโนซีสเตอีนและกลูตาไธโอนของผักบุ้งพันธุ์หมายเลข 2 และหมายเลข 8 เทียบกับผักบุ้งพันธุ์เดิม (wild type) โดยนำราก ลำต้นและใบของผักบุ้งที่ทดสอบ มาตัวอย่างละประมาณ 100 มิลลิกรัม บดให้ละเอียดในสารละลายเอ็กแทรคชั่นบัฟเฟอร์ ปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสที่ได้ 200 ไมโครลิตร มาติดฉลากด้วยสารละลายโมโนโบรโมบิเมน วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนซีสเตอีนและกลูตาไธโอนด้วยวิธี HPLC พบว่ารากและลำต้นของผักบุ้งพันธุ์หมายเลข 2 และหมายเลข 8 มีปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนสูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพการสังเคราะห์กรดอะมิโนซีสเตอีนและกลูตาไธโอนของผักบุ้งพันธุ์หมายเลข 2 และหมายเลข 8 สูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม (wild type) ผักบุ้งพันธุ์เดิมมีกรดอะมิโนซีสเตอีนที่รากและลำต้นเท่ากับ 1.64 และ 34.43 ไมโครโมลาร์/มิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และมีกลูตาไธโอนที่รากและลำต้นเท่ากับ 2.86 และ 11.43 ไมโครโมลาร์/มิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ปริมาณกรดอะมิโนซีสเตอีนและกลูตาไธโอนที่เพิ่มมากขึ้นของผักบุ้งพันธุ์หมายเลข 2 และหมายเลข 8 นี้ จะเพิ่มที่รากมากกว่าที่ลำต้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตส ซึ่งพบว่ากิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสจะเพิ่มขึ้นที่รากมากกว่าที่ลำต้นและที่ใบ และสอดคล้องกับผลการทดลองของ Heiss และคณะ (1999) ที่พบว่ารากของต้น *B. juncea* ดัดแปลงพันธุ์ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสเข้าไปนั้น มีปริมาณกรดอะมิโนซีสเตอีนที่รากสูงกว่า *B. juncea* พันธุ์เดิม 81 เปอร์เซ็นต์ ผักบุ้งพันธุ์หมายเลข 2 มีกรดอะมิโนซีสเตอีนที่รากเท่ากับ 323.87 ไมโครโมลาร์/มิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งสูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม 30.44 เท่า และมีกลูตาไธโอนที่รากเท่ากับ 2,999.19 ไมโครโมลาร์/มิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง ซึ่งสูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม 1,048.67 เท่า

เมื่อนำผักบุ้งพันธุ์หมายเลข 2 และหมายเลข 8 มาปลูกในวัสดุปลูกเวอร์มิคูไลท์ (vermiculite) ในสภาวะธรรมชาติที่มีซัลเฟตความเข้มข้นสูง โดยรดด้วยอาหารเหลวที่มีซัลเฟตเริ่มต้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร 100 มิลลิลิตรต่อวัน เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าลักษณะภายนอกของผักบุ้งพันธุ์หมายเลข 2 และหมายเลข 8 ไม่แตกต่างจากผักบุ้งพันธุ์เดิมแต่อย่างใด ซึ่งแสดงให้

ว่ายีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสจาก *A. thaliana* ที่ถ่ายโอนเข้าสู่ผักบุ้งพันธุ์หมายเลข 2 และหมายเลข 8 ไม่มีผลต่อลักษณะของผักบุ้งในสภาวะธรรมชาติ

ผลการทดลองที่ได้สรุปให้เห็นว่าการเพิ่มกิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสขึ้น 4.95 เท่า มีผลทำให้ปริมาณกรดอะมิโนซีสเตอีนของผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์เพิ่มขึ้นถึง 323.87 ไมโครโมลาร์/มิลลิกรัมน้ำหนักแห้ง อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสคือซัลไฟต์ ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ การถ่ายโอนยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสร่วมกับยีนประมวลรหัสซัลไฟต์รีดักเตส และยีนประมวลรหัสซีสเตอีนซินเตส เพื่อเร่งกระบวนการนำซัลไฟต์และไฮโดรเจนซัลไฟด์ไปสังเคราะห์เป็นกรดอะมิโนซีสเตอีน น่าจะมีผลทำให้ประสิทธิภาพของกระบวนการ sulfate assimilation เพิ่มมากขึ้นได้อีก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย