บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

1. การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค differential display

การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค differential display ในข้าว LPT123 และข้าว LPT123-TC171 ในภาวะปกติ และภาวะเค็ม พบว่าได้แถบ cDNA ที่แตกต่าง จำนวน 108 แถบ โดยมีรูปแบบของแถบ DNA ที่แตกต่างกัน 4 รูปแบบคือ รูปแบบที่ 1 พบเฉพาะในข้าว LPT123-TC171 หลังจากที่ได้รับภาวะเค็มเท่านั้น รูปแบบที่ 2 พบเฉพาะในข้าว LPT123-TC171 ทั้งในภาวะปกติ และในภาวะเค็ม รูปแบบที่ 3 พบในข้าวทั้งสองสายพันธุ์ หลังจากได้รับภาวะเค็มเท่านั้น และรูปแบบที่ 4 พบในข้าวทั้งสองสายพันธุ์ แต่มีระดับความเข้มของแถบ DNA แตกต่างกัน

2. การโคลนชิ้นส่วน cDNA

จากชิ้นส่วน cDNA ทั้งหมด 108 ชิ้นส่วน พบว่ามีชิ้นส่วน DNA ที่สามารถถูกเพิ่มจำนวนด้วย PCR และโคลนเข้าไปใน plasmid DNA จำนวน 54 ชิ้นส่วน ซึ่งการใช้ pGEM-T เป็น DNA พาหะ พบว่ามี ประสิทธิภาพในการโคลนได้ดีกว่าการใช้ pBluescript KS+ เป็น DNA พาหะ โดยในจำนวนโคลนทั้งหมดมีโคลนที่มี DNA พาหะเป็น pGEM-T จำนวน 53 โคลน ส่วนอีก 1โคลน มี pBluescript KS+ เป็น DNA พาหะ

3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วน DNA

จากโคลนทั้งหมด 54 โคลน สามารถตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ 36 โคลน ซึ่งพบว่า 27 โคลน มี derived amino acid sequence ที่คล้ายคลึงกับโปรตีนที่มีการรายงานหน้าที่แล้ว ซึ่งในจำนวนนี้เป็นโปรตีนที่พบในข้าวจำนวน 10 โคลน โดยโปรตีนเหล่านี้ RIM2 protein putative 6-phosphofructo-2-kinase/ fructose-2, 6-bisphosphate 2-phosphatase expressed protein having alternative splicing products putative cell wall protein NAD(P) H-quinone oxidoreductase PRLI-interacting factor L-like putative molybdenum cofactor biosynthesis protein putative disease resistance protein putative reverse transcriptase และ L-zip+NBS+LRR และมี

โคลนที่มี derived amino acid sequence คล้ายกับโปรตีนที่พบใน *Arabidopsis* จำนวน 3 โคลน ได้แก่ putative acyl-CoA synthetase putative phosphofructokinase และ putative RING zinc finger protein ที่เหลือเป็นโคลนที่มี derived amino acid sequence ที่เหมือนกับโปรตีนที่พบในแบคทีเรียจำนวน 14 โคลน โดยโปรตีนเหล่านี้ ได้แก่ glutamate synthase small subunit putative sulfate permease alkanesulfonate transport protein high affinity Zn transport protein D-alanine/D-serine/glycine transport protein succinyl-CoA synthetase HmsR protein transcriptional regulator alpha-amylase AcrB/AcrD/AcrF family cation efflux system protein glycerol-3-phosphate dehydrogenase two-component hybrid sensor and regulator และอีก 9 โคลนมี derived amino acid sequence คล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนที่ยังไม่มีรายงานหน้าที่ โดย 5 โคลน มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนของข้าว และอีก 4 โคลน คล้ายคลึงกับโปรตีนของแบคทีเรีย

4. **การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ได้ด้วย** northern blot analysis

พบการแสดงออกของยีนเมื่อใช้ probe 4 ชนิด คือ OsD1B16-11 (accession number DQ012287) OsD1B15-5 (accession number DQ012288) OsD1B18-18 (accession number DQ012289) และ OsD2B15-2 (accession number DQ012290) ซึ่ง probe OsD1B16-11 OsD1B15-5 และ OsD2B15-2 มีความคล้ายคลึงกับ RIM 2 protein 6-phosphofructo-2-kinase/ fructose-2, 6-bisphosphate 2-phosphatase และ NAD(P) H-quinone oxidoreductase ตามลำดับ สำหรับ probe OsD1B18-18 มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนที่ยังไม่ทราบหน้าที่ ซึ่งการที่พบ RIM2 protein ในภาวะเครียดอาจเป็นการปรับตัวของพืชเพื่อตอบสนองต่อภาวะเครียด ส่วน 6-phosphofructo-2-kinase/ fructose-2, 6-bisphosphate 2-phosphatase ที่พบในพืชที่ได้รับภาวะเครียดอาจจะเกี่ยวกับกระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลซูโครสในเซลล์พืช และการทำงานของ NAD(P) H-quinone oxidoreductase อาจจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการช่วยในเรื่องของการป้องกันการเกิด reactive oxygen species ที่เป็นพิษต่อเซลล์พืช

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการเพิ่มปริมาณการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อให้มีปริมาณ DNA มากเพียงพอต่อการนำไปทำความสะอาดเพื่อใช้ในการโคลนต่อไป
2. อาจทำ reverse northerns ก่อนการโคลน เพื่อช่วยลดจำนวนชิ้นส่วน DNA ที่อาจจะเป็นส่วนของ false positive
3. ทำการตรวจสอบโคลนที่มีความเหมือนกับยีนที่ไม่ได้พบในพืช ด้วย southern blot analysis ก่อนการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี northern blot analysis เพื่อตรวจสอบว่าเป็นชิ้นส่วนของยีนที่พบใน genome ข้าวจริง ไม่ได้เกิดจากการปนเปื้อนแบคทีเรียระหว่างการทดลอง
4. ทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี northern blot analysis จากโคลนที่มีความเหมือนกับยีนทั้งหมด
5. การตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธีการ northern blot analysis ในบางยีนที่ไม่สามารถตรวจสอบได้นั้น อาจทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธีการอื่นๆ ที่มีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีการ northern blot analysis เช่น real time RT-PCR หรือ cDNA blot เป็นต้น
6. ศึกษาหน้าที่ของยีนที่ได้ กับความเกี่ยวข้องกับความสามารถในการทนเค็มเพิ่มเติม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย