บทที่ 6

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการทรานสฟอร์มยีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสไอโซฟอร์มที่พบในไซโตพลาสซึมจากข้าวเข้าสู่ผักบุ้งโดยวิธีการใช้ *A. tumefaciens* โดยแช่ cotyledon explants ของผักบุ้งอายุ 7 วัน ในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีเซลล์ *A. tumefaciens* EHA 101 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBIH1-IG-RCS1 จำนวน 6.75 x10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีอะซิโตไซริงโอนเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ เพื่อเป็นการชักนำให้เกิดการถ่ายโอนยีนจาก *A. tumefaciens* EHA 101 เข้าสู่ผักบุ้ง บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 80 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำ cotyledon explant มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีอะซิโตไซริงโอนความเข้มข้นเดิม บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 3 วัน ล้าง cotyledon explant ด้วยสารละลายเซฟโฟแทคซิมเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อกำจัด *A. tumefaciens* ออก ซับให้แห้งนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MMS ที่มีไธเดียซูรอนเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์และสารละลายเซฟโฟแทคซิมความเข้มข้นเดิม บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสีขาวความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ระยะเวลาการให้แสง 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าจาก cotyledon explants 1,286 ชิ้น มีการงอกเป็นต้นใหม่ (shoot regeneration) 340 ต้นคิดเป็น 26.44 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำต้นอ่อนของผักบุ้งที่เจริญมาจาก cotyledon explant ความสูงประมาณ 1 –2 เซนติเมตร มาทดสอบความทนต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าจาก 340 ต้นมีเพียง 6 ต้นที่สามารถเจริญบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ความเข้มข้นดังกล่าวได้ คิดเป็น 1.76 เปอร์เซ็นต์ ย้ายต้นผักบุ้งทั้ง 6 ต้น มาปลูกบนอาหารแข็งสูตร MMS ที่ปราศจากสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน เพื่อให้ผักบุ้งเจริญได้อย่างรวดเร็วและเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ นำต้นผักบุ้งมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการ PCR ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ *rcs*1-1 และ *rcs*1-2 ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณยีน *rcs*1 เพื่อตรวจหายีน *rcs*1 ในดีเอ็นเอของผักบุ้งทั้ง 6 ต้น วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตโฟริซิส พบว่าดีเอ็นเอของผักบุ้งทั้ง 6 ต้นมีเพียง 4 ต้นที่ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,000 เบส ซึ่งเป็นขนาดของดีเอ็นเอที่ควรจะได้ ถ้าดีเอ็นเอแม่แบบเป็นยีน *rcs*1 แสดงว่าผักบุ้งทั้ง 4 สายพันธุ์มียีน *rcs*1 สอดแทรกอยู่บนโครโมโซม เรียกผักบุ้งทั้ง 4 สายพันธุ์ว่าผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2, 4, 5 และ 6

ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสในน้ำสกัดจากใบ ยอด ลำต้น และราก ของผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์ เทียบกับของผักบุ้งพันธุ์เดิม พบว่าแต่ละส่วนของผักบุ้งที่นำมาทดสอบมีกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสใกล้เคียงกัน และเมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสของ

ผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์และของผักบุ้งพันธุ์เดิม พบว่าผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์ทั้ง 4 สายพันธุ์มีกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสสูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม ใบของผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2 มีกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสสูงที่สุด เท่ากับ 5.46 หน่วยเอนไซม์ต่อโปรตีนหนึ่งมิลลิกรัม ซึ่งสูงกว่าใบของผักบุ้งพันธุ์เดิม 8 เท่า Saito และคณะ (1994b) รายงานว่าต้นยาสูบดัดแปลงพันธุ์ที่มียีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตส (*CSase* A) ชนิดที่อยู่ในไซโตพลาสซึมจากต้นผักขมสอดแทรกมีกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสสูงกว่าต้นยาสูบพันธุ์เดิมประมาณ 3 เท่า และNoji และคณะ (2001) รายงานว่าต้นยาสูบดัดแปลงพันธุ์ที่มียีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสชนิดที่อยู่ในไซโตพลาสซึมและชนิดที่อยู่ในคลอโรพลาสต์ซึ่งได้มาโดยการผสมข้ามสายพันธุ์ (cross-fertililzation) ระหว่างต้นยาสูบดัดแปลงพันธุ์ที่มียีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสชนิดที่อยู่ในไซโตพลาสซึมกับต้นยาสูบดัดแปลงพันธุ์ที่มียีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสชนิดที่อยู่ในคลอโรพลาสต์มีกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสสูงกว่าพันธุ์เดิมประมาณ 5 การที่ผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์ทั้ง 4 สายพันธุ์มีกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสแตกต่างกันทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมีจำนวนชุดของยีนและตำแหน่งที่ยีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสที่แตกต่างกัน (Saito และคณะ, 1994b)

ผลการหาปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนในน้ำสกัดจากผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์เทียบกับผักบุ้งพันธุ์เดิม โดยนำใบ ลำต้น และรากของผักบุ้งตัวอย่างละ 100 มิลลิกรัม มาบดในสารละลายเอ็กแทรคชันบัฟเฟอร์ ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสที่ได้มาติดฉลากด้วยสารละลายโมโนโบรโมไบเมน วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนโดยวิธี HPLC พบว่าลำต้นและรากของผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์ทุกพันธุ์ที่นำมาทดสอบมีปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนสูงกว่าลำต้นและรากของผักบุ้งพันธุ์เดิม ลำต้นของผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2 มีกรดอะมิโนซิสเตอีนสูงที่สุดเท่ากับ 114.29 ไมโครโมลาร์ต่อน้ำหนักแห้งหนึ่งมิลลิกรัม สูงกว่าลำต้นของผักบุ้งพันธุ์เดิม 8.30 เท่า ลำต้นของผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 4 มีปริมาณกลูตาไธโอนสูงที่สุด เท่ากับ 996.48 ไมโครโมลาร์ต่อน้ำหนักแห้งหนึ่งมิลลิกรัม สูงกว่าลำต้นของผักบุ้งพันธุ์เดิม 218.05 เท่า Noji และคณะ (2001) รายงานว่าพืชดัดแปลงพันธุ์ที่มีการแสดงออกของซิสเตอีนซินเตสสูง (overexpressing CSase) โดยเฉพาะซิสเตอีนซินเตสที่อยู่ไซโตพลาสซึมจะสามารถนำซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) มาสังเคราะห์เป็นกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนได้สูงกว่าพืชพันธุ์เดิม เมื่อทดลองรมด้วยก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ 0.1 ไมโครลิตรต่อลิตร และ Youssefian และคณะ (2001) รายงานว่าต้นยาสูบดัดแปลงพันธุ์ที่มียีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสชนิดที่อยู่ในไซโตพลาสซึมจากต้นข้าวสาลี (ยีน *cys*1) มีกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสมากกว่าต้นยาสูบพันธุ์เดิม 3 – 5 เท่า และสามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนได้มากกว่าต้นยาสูบพันธุ์เดิม

จากผลการทดลองทั้งหมดสรุปได้ว่า การถ่ายโอนยีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสจากข้าวเข้าสู่ผักบุ้งทำให้กิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสของผักบุ้งเพิ่มขึ้น 8.04 เท่า ปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนเพิ่มขึ้น 8.30 เท่า ลักษณะการเจริญของผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้ไม่แตกต่างจากของผักบุ้งพันธุ์เดิม การทดลองต่อไปที่ควรศึกษาคือ ศึกษาประสิทธิภาพการดูดซับซัลเฟตเพื่อนำไปใช้ในการกระบวนการสังคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีนของผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์เปรียบเทียบกับผักบุ้งพันธุ์เดิม เพื่อที่จะทำให้งานวิจัยนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย