บทที่ 5

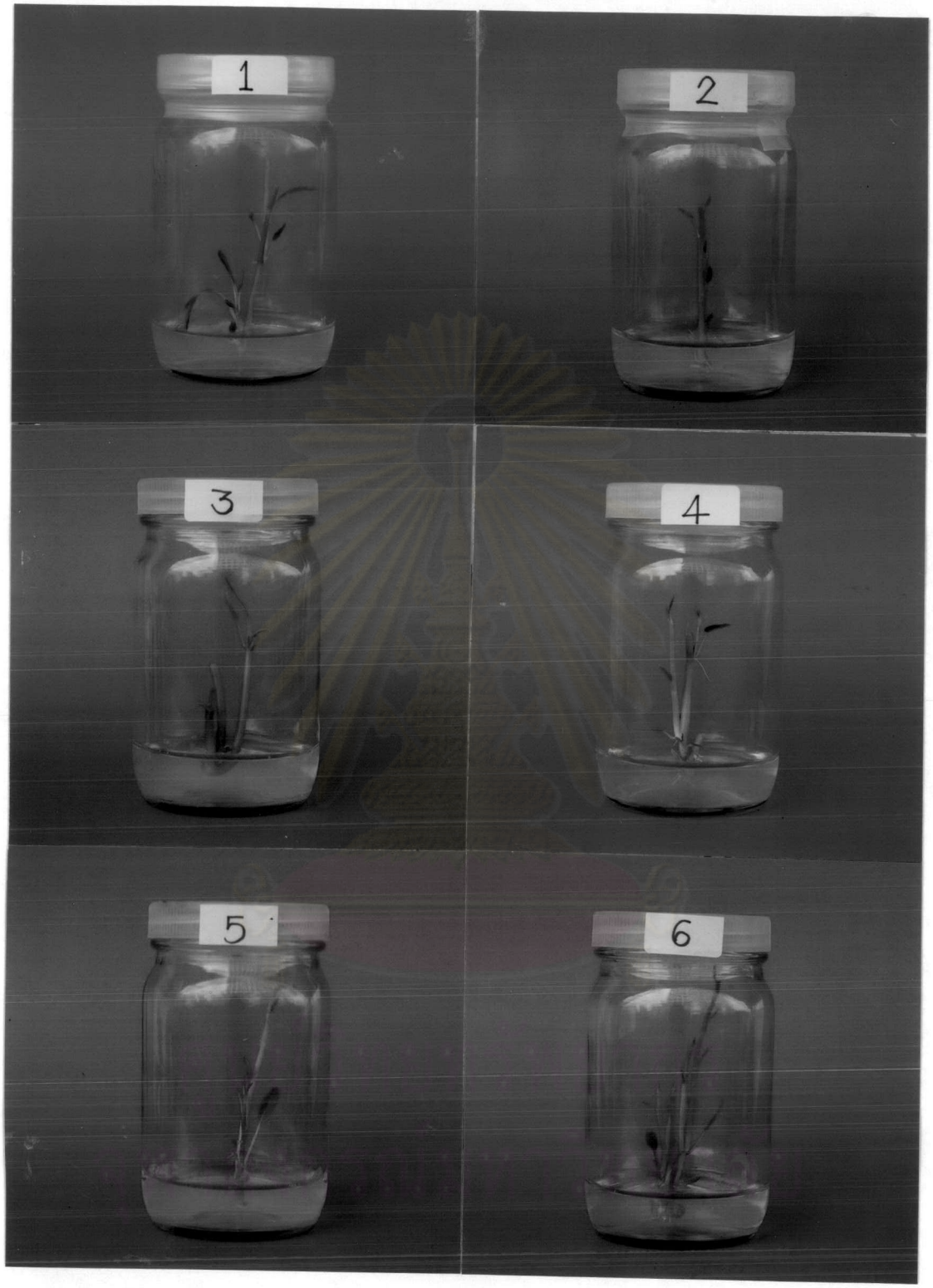
ผลการทดลอง

5.1 การถ่ายโอนยีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสเข้าสู่ผักบุ้ง (*Ipomoea aquatica*)

5.1.1 การทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBIH1-IG-RCS1 เข้าสู่ผักบุ้ง

ผลการทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBIH1-IG-RCS1 เข้าสู่ผักบุ้ง โดยวิธีการใช้ *A. tumefaciens* EHA 101 พบว่า cotyledon explant 1,286 ชิ้น มีการงอกเป็นต้นใหม่ (shoot regeneration) 340 ต้น ดังแสดงในภาพที่ 4.1 คิดเป็น 26.44 เปอร์เซ็นต์ หลังจากที่ย้ายต้นอ่อนผักบุ้งทั้งหมดที่ได้มาเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MMS ซึ่งเติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 25 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติมสารละลายเซฟโฟแทคซิมความเข้มข้นสุดท้าย 300 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้ความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ 16 ชั่วโมงต่อวัน เป็นเวลา 1 เดือน พบว่ามีต้นอ่อนผักบุ้งที่สามารถทนต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินได้เพียง 6 ต้น จากต้นอ่อนที่งอกจาก cotyledon explant ทั้งหมด 340 ต้น คิดเป็น 1.76 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 5.2

ภาพที่ 5.1 การงอกต้นใหม่ของ cotyledon explant

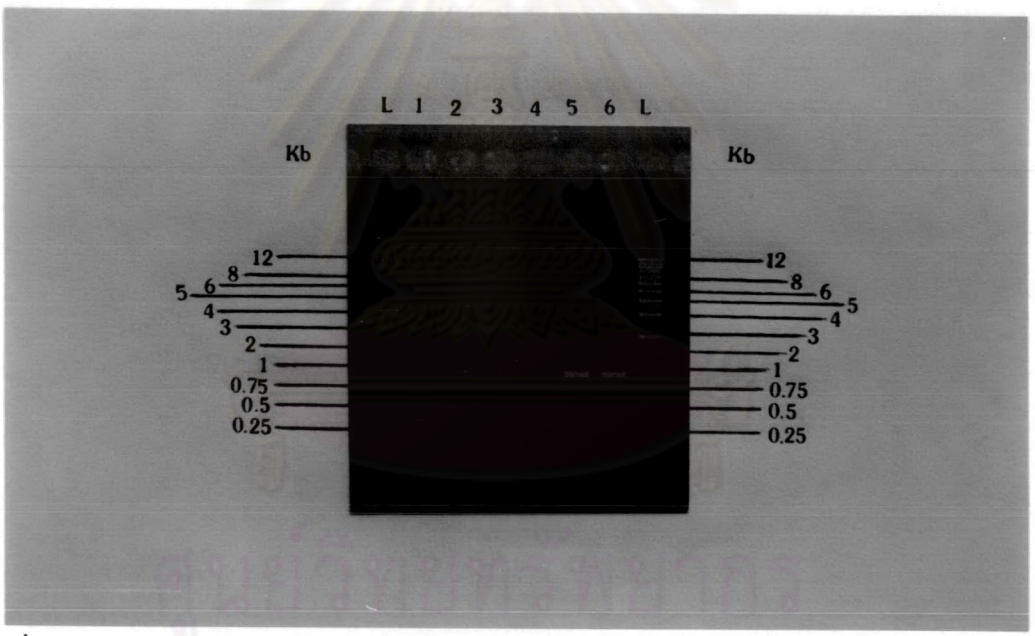


ภาพที่ 5.2 ต้นอ่อนผักบุ้งที่สามารถทนต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้นสุดท้าย 25 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 1 เดือน

1. ต้นผักบุ้งหมายเลข 1
2. ต้นผักบุ้งหมายเลข 2
3. ต้นผักบุ้งหมายเลข 3
4. ต้นผักบุ้งหมายเลข 4
5. ต้นผักบุ้งหมายเลข 5
6. ต้นผักบุ้งหมายเลข 6

5.2 การตรวจหายีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสบนดีเอ็นเอของผักบุ้งที่สามารถทนต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินและกานามัยซินโดยวิธี PCR

ผลการตรวจหายีน *rcs*1 บนดีเอ็นเอของผักบุ้งทั้ง 6 พันธุ์ที่ทนต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้นสุดท้าย 25 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสกัดดีเอ็นเอจากผักบุ้งที่คาดว่ามียีน *rcs*1 ทั้ง 6 พันธุ์นี้ คือพันธุ์หมายเลข 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ตามวิธีข้อ 4.2 ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ *rcs*1-1 และ *rcs*1-2 ในกระบวนการ PCR ตามวิธีข้อ 4.4 วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส พบว่าได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบสซึ่งเท่ากับขนาดของดีเอ็นเอ RCS1 ไม่ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 1 กิโลเบสเมื่อใช้ดีเอ็นเอของผักบุ้งพันธุ์เดิมเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ จากผักบุ้ง 6 พันธุ์ที่สามารถทนต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ความเข้มข้นดังกล่าว มีเพียง 4 พันธุ์ที่ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 1 กิโลเบสคือพันธ์หมายเลข 2, 4, 5 และ 6 ดังแสดงในภาพที่ 5.3 เรียกต้นผักบุ้งทั้ง 4 พันธุ์นี้ว่าผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2, 4, 5 และ 6



ภาพที่ 5.3 การตรวจหายีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสบนดีเอ็นเอของผักบุ้งโดยวิธี PCR ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ *rcs*1-1 และ *rcs*1-2

M : ดีเอ็นเอแลดเดอร์ขนาดตั้งแต่ 250 เบส ถึง 12 กิโลเบส

1 : ใช้ดีเอ็นเอของผักบุ้งพันธุ์เดิมเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

2 : ใช้ดีเอ็นเอของผักบุ้งพันธุ์หมายเลข 2 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

3 : ใช้ดีเอ็นเอของผักบุ้งพันธุ์หมายเลข 4 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

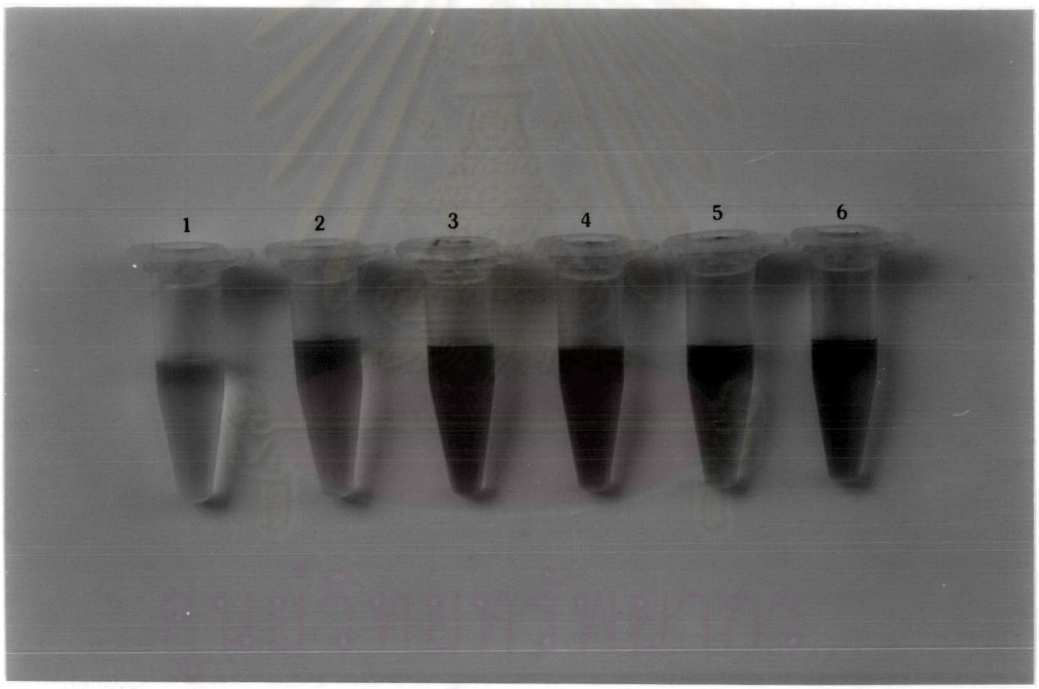
4 : ใช้ดีเอ็นเอของผักบุ้งพันธุ์หมายเลข 5 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

5 : ใช้ดีเอ็นเอของผักบุ้งพันธุ์หมายเลข 6 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

6 : ใช้พลาสมิด pBIH1-IG-RCS1 ซึ่งมียีน *rcs*1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

5.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของซิสเตอีนซินเตส

ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของซิสเตอีนซิสเตสตามวิธีของ Youssefian และคณะ (1993) ในสารสกัดจาก ใบ ลำต้น และรากของผักบุ้งพันธุ์เดิมพบว่าแต่ละส่วนของผักบุ้งที่นำมาทดสอบมีกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสใกล้เคียงกัน และเมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสของผักบุ้งทรานสฟอร์มแมนต์หมายเลข 2 , 4 , 5 และ 6 กับของผักบุ้งพันธุ์เดิม พบว่าผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์ทั้ง 4 พันธุ์ มีกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสสูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิมในทุกส่วนของต้นที่นำมาทดสอบ แสดงดังในตารางที่ 5.1 และภาพที่ 5.4 ผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2 มีกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสสูงที่สุด โดยที่ใบของผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2 มีกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสเท่ากับ 5.46 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิกรัมโปรตีนสูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม 8 เท่า



ภาพที่ 5.4 การเปรียบเทียบกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสในใบของผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์กับของผักบุ้งพันธุ์เดิม

หลอดที่1 คือ ชุดควบคุม
หลอดที่2 คือ ผักบุ้งพันธุ์เดิม
หลอดที่3 คือ ผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2
หลอดที่4 คือ ผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 4
หลอดที่5 คือ ผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 5
หลอดที่6 คือ ผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 6

ตารางที่ 5.1 เปรียบเทียบกิจกรรมของซิสเตอีนซิลเตสในส่วนต่างๆ ของผักบุ้ง

ผักบุ้ง	กิจกรรมจำเพาะของซิสเตอีนซินเตส (1 หน่วยเอนไซม์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน)							
	ใบ	ปริมาณที่เพิ่มขึ้น (เท่า)	ยอด	ปริมาณที่เพิ่มขึ้น (เท่า)	ลำต้น	ปริมาณที่เพิ่มขึ้น (เท่า)	ราก	ปริมาณที่เพิ่มขึ้น (เท่า)
พันธุ์เดิม	0.68	1	0.591	1	0.672	1	0.61	1
ทรานสฟอร์แมนท์ หมายเลข 2	5.47	8.04	5.08	8.60	4.51	6.71	4.95	8.11
หมายเลข 4	5.29	7.78	3.81	6.45	4.11	6.11	4.18	6.84
หมายเลข 5	2.55	3.74	2.48	4.19	2.30	3.42	2.79	4.57
หมายเลข 6	2.96	4.34	2.41	4.08	2.46	3.65	2.56	4.19

5.4 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอน

ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนด้วย HPLC ตามวิธีของ Noctor และ Christine (1998) ในสารสกัดจากใบ ลำต้น และรากของผักบุ้งพันธุ์เดิม พบว่ากรดอะมิโนซิสเตอีนส่วนใหญ่อยู่ที่ลำต้น ในลำต้นและรากของผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์ทุกพันธุ์ที่ทดสอบมีปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนสูงกว่าลำต้นและรากของผักบุ้งพันธุ์เดิม และพบว่าสารสกัดจากลำต้นของผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2 มีปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนสูงที่สุดเท่ากับ 114.29 ไมโครโมลาร์ต่อน้ำหนักแห้ง 1 มิลลิกรัม สูงกว่าสารสกัดจากลำต้นผักบุ้งพันธุ์เดิมถึง 8.30 เท่า พบว่าสารสกัดจากลำต้นของผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 4 มีปริมาณกลูตาไธโอนสูงที่สุดเท่ากับ 996.48 ไมโครโมลาร์ต่อน้ำหนักแห้ง 1 มิลลิกรัม สูงกว่าสารสกัดจากลำต้นของผักบุ้งพันธุ์เดิมถึง 218.05 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 5.2 และภาคผนวก ค.3

ตารางที่ 5.2 ปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนในผักบุ้ง

ผักบุ้ง	กรดอะมิโนซิสเตอีน (ไมโครโมลาร์/น้ำหนักแห้งหนึ่งมิลลิกรัม)	ปริมาณที่เพิ่มขึ้น (เท่า)	กลูตาไธโอน (ไมโครโมลาร์/น้ำหนักแห้งหนึ่งมิลลิกรัม)	ปริมาณที่เพิ่มขึ้น (เท่า)
พันธุ์เดิม				
ใบ	21.79	1	1.15	1
ลำต้น	13.77	1	4.57	1
ราก	4.26	1	3.52	1
ทรานสฟอร์แมนท์				
หมายเลข 2				
ใบ	4.80	0.22	27.31	23.75
ลำต้น	114.29	8.30	33.30	7.29
ราก	83.28	17.10	17.10	4.86
หมายเลข 4				
ใบ	25.98	1.19	139.71	121.49
ลำต้น	102.48	7.44	996.48	218.05
ราก	6.73	1.58	29.58	8.40
หมายเลข 5				
ใบ	8.77	0.40	4.31	3.75
ลำต้น	64.15	4.66	8.47	1.85
ราก	13.45	3.16	20.43	5.80
หมายเลข 6				
ใบ	7.50	0.34	70.11	60.97
ลำต้น	24.80	1.80	96.00	21.01
ราก	6.81	1.60	9.21	2.62

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.5 การศึกษาลักษณะการเจริญของต้นผักบุ้งเมื่อเจริญในภาวะที่มีซัลเฟตความเข้มข้นสูง

ผลการปลูกผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์ และผักบุ้งพันธุ์เดิม ในเวอร์มิคูไลท์ และรดด้วยอาหารเหลวสูตร MS ที่ปราศจากน้ำตาล มีความเข้มข้นของซัลเฟตเริ่มต้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์ทั้ง 4 พันธุ์มีลักษณะปกติ สมบูรณ์เหมือนผักบุ้งพันธุ์เดิมดังแสดงในภาพที่ 4.5 การเจริญของผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์ทั้ง 4 พันธุ์ไม่แตกต่างจากผักบุ้งพันธุ์เดิม

ภาพที่ 4.5 ลักษณะของต้นผักบุ้งที่เจริญในภาวะที่ซัลเฟตเริ่มต้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 1 เดือน

WT : ผักบุ้งพันธุ์เดิม

T2 : ผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2

T4 : ผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 4

T5 : ผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 5

T6 : ผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 6