บทที่ 5

ผลการทดลอง

5.1 ผลการตรวจสอบลำดับเบสของยีนที่คาดว่าเป็นยีนระบุรหัสเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสพลาสติดไอโซฟอร์ม (plastid isoform) ของ *A. thaliana* (ยีน *SAT*1) จาก EST clone104E8T7

5.1.1 ผลการค้นหาข้อมูลยีน *SAT*1 ของ *Arabidopsis thaliana* พันธุ์ Columbia จากฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information)

ยีน *SAT*1 ของ *A. thaliana* พันธุ์ Columbia (Gen Bank Accession number L42212) ในฐานข้อมูลของ NCBI พบว่าประกอบด้วย 1079 เบส แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 314 ตัว

5.1.2 การออกแบบและสังเคราะห์ดีเอ็นเอไพร์เมอร์

ออกแบบและสังเคราะห์ดีเอ็นเอไพร์เมอร์สำหรับเพิ่มจำนวนยีน*SAT*1 ของ *A. thaliana* พันธุ์ Columbia 4 สาย คือ ดีเอ็นไพร์เมอร์ JSAT1, JSAT2 และดีเอ็นเอไพร์เมอร์ JSAT3, JSAT4 ซึ่งเป็นดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางไปและทิศทางกลับตามลำดับ เมื่อใช้คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอสายเดี่ยวของ *A. thaliana* พันธุ์ Columbia หรือยีน *SAT*1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ JSAT1 และ JSAT2 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการพีซีอาร์คือดีเอ็นเอขนาด 999 เบส และเมื่อใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ JSAT3 และ JSAT4 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการพีซีอาร์คือดีเอ็นเอขนาด 460 เบส

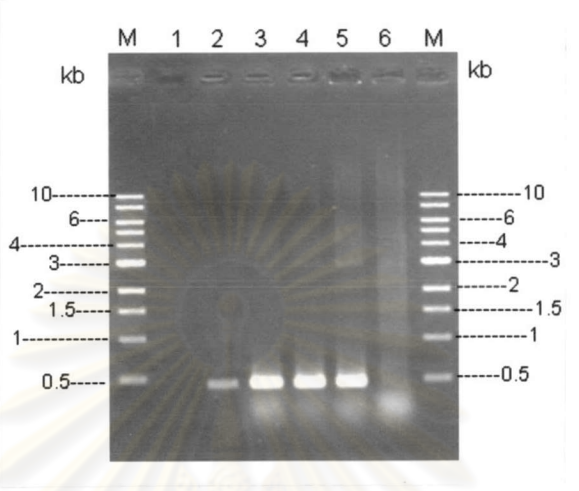
5.1.3 ผลการถ่ายโอนพลาสมิดพาหะ pGEM-*SAT*1 เข้าสู่ *E. coli* DH5α โดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน

ผลการถ่ายโอนพลาสมิด pGEM-*SAT*1 เข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ *E. coli* DH5α ได้โคโลนีที่สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งคาดว่าเป็นโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์ เรียกโคโลนีดังกล่าวว่า *E. coli* DH5α/pGEM-*SAT*1

5.1.4 การคัดเลือกโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์ *E. coli* DH5α/pGEM-*SAT*1 โดยวิธีโคโลนีพีซีอาร์ (colony PCR)

นำโคโลนีเดี่ยวสีขาว ซึ่งเป็นโคโลนีที่คาดว่ามีพลาสมิด pGEM-*SAT*1 (จากข้อ 5.1.3) ขีดสั้น ๆ ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดียวกับที่ใช้คัดเลือกโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง คัดเลือกบางโคโลนีไปตรวจสอบด้วยวิธีโคโลนีพีซีอาร์ (ตามวิธีข้อ 4.1.6) ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ JSAT3 และ JSAT4 ใช้อีเอกซ์แทคพอลิเมอเรส หากโคโลนีดังกล่าวเป็นโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์จะได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 เบส (ภาพที่ 5.1) ซึ่งเป็นขนาดของดีเอ็นเอที่ต้องการ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 5.1 ผลการทำโคโลนีพีซีอาร์ของโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์ *E. coli* DH5α/pGEM-*SAT*1 (จากข้อ 5.1.4) ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ JSAT3 และ JSAT4

M หมายถึง ดีเอ็นเอแลดเดอร์ ที่มีขนาดตั้งแต่ 0.5- 10.0 กิโลเบส

1 หมายถึง ชุดควบคุมเมื่อไม่ใส่ดีเอ็นเอแม่แบบ

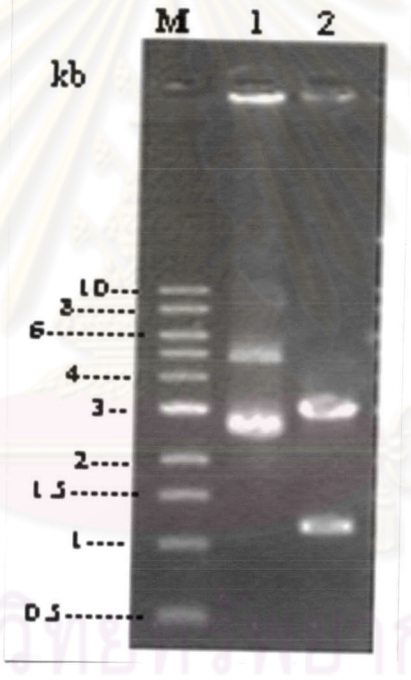
2 หมายถึง ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการพีซีอาร์ เมื่อใช้พลาสมิด pGEM-*SAT*1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (ชุดควบคุมบวก)

3-5 หมายถึง ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการโคโลนีพีซีอาร์เมื่อใช้ *E. coli* DH5α/pGEM-*SAT*1 ขนาดประมาณ 500 เบส

6 หมายถึง ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการโคโลนีพีซีอาร์ เมื่อใช้ *E.coli* DH5α/pGEM-7Zf(+)

5.1.5 ผลการตัดพลาสมิด pGEM-*SAT*1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์

ผลการวิเคราะห์ขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดพลาสมิด pGEM-*SAT*1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Sma*I และ *Sac*I โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสได้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส และดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3 กิโลเบส (ดังแสดงในภาพที่ 5.2) ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส เป็นยีน *SAT*1 ส่วนดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3 กิโลเบส เป็นพลาสมิด pGEM-7Zf(+) (ภาคผนวก ค ภาพที่ ค.2) แยกเอาดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1 กิโลเบส ออกจากเจลอะกาโรสเพื่อนำไปหาลำดับเบสต่อไป



ภาพที่ 5.2 ผลการตัดพลาสมิด pGEM-*SAT*1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Sma*I และ*Sac*I

M หมายถึง ดีเอ็นเอแลดเดอร์ ขนาดตั้งแต่ 0.5-10 กิโลเบส

1 หมายถึง พลาสมิด pGEM-*SAT*1 ที่ไม่ถูกตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์

2 หมายถึง พลาสมิด pGEM-*SAT*1 ที่ถูกตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Sma*I และ *Sac*I ได้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส และดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3 กิโลเบส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.1.6 การหาลำดับเบสของยีน *SAT*1

ผลการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอที่แยกได้จากเจลอะกาโรสจากข้อ 5.1.5 พบว่าประกอบด้วย 970 เบส (ภาพที่ 5.3)

```
1   TCTAGCGCAT AAACCATGGC AACATGCATC CACACATGCC GAACCGGTAA TACCCAAGAC
61  GATGATTCCC GGTTCTGTTG CATCAATAAA TTCTTCCGAC CCGGTTTCTC TGTCAACCGG
121 AAGATCCACC ACACCCAAAT CGAAGATGAC GATGATGTCT GGATCAAGAT GCTCAAAGAA
181 GCCGAATCCG ATGTTAAACA AGAACCCATT TTGTCAAACT ACTACTACGC TTCGATCACA
241 TCTCATCGAT CTTTAGAGTC TGCTTTAGCT CACATCCTCT CCGTAAAGCT CAGCAATTTA
301 AACCTACCAA GCAACACACT CTTCGAACTG TTCATAAGCG TTTTAGAAGA AAGCCCTGAG
361 ATCATCGAAT CCACGAAGCA AGATCTTATA GCAGTCAAAG AAAGAGACCC AGCTTGTATA
421 AGCTACGTTC ATTGCTTCTT GGGCTTCAAA GGCTTCCTCG CTTGTCAAGC TCATCGAATA
481 GCTCATACCC TCTGGAAACA GAACAGAAAA ATCGTAGCTT TATTGATCCA AAACAGAGTA
541 TCAGAATCTT TCGCCGTCGA TATTCATCCC GGAGCGAAGA TCGGAAAAGG GATTCTTTTA
601 GACCATGCGA CGGGCGTGGT TATCGGAGAG ACGGCGGTGG TTGGAGACAA TGTTTCGATT
661 CTACACGGAG TGACCTTGGG AGGAACAGGG AAACAGAGTG GTGATCGGCA TCCGAAGATT
721 GGTGATGGTG TGTTGATTGG AGCTGGGAGT TGTATATTGG GGAATATAAC AATCGGTGAG
781 GGAGCTAAGA TTGGATCAGG GTCGGTGGTG GTTAAGGATG TGCCGGCGCG TACGACGGCG
841 GTTGGAAATC CGGCGAGGTT GATTGGTGGG AAAGAGAATC CGAGAAAACA TGATAAGATT
901 CCTTGTCTGA CTATGGACCA GACATCGTAT TTAACCGAGT GGTCTGATTA TGTGATTTAA
961 CACAAATGTG
```

ภาพที่ 5.3 แสดงผลการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส (จากข้อ 5.1.5) ที่แยกได้จากเจลอะกาโรส

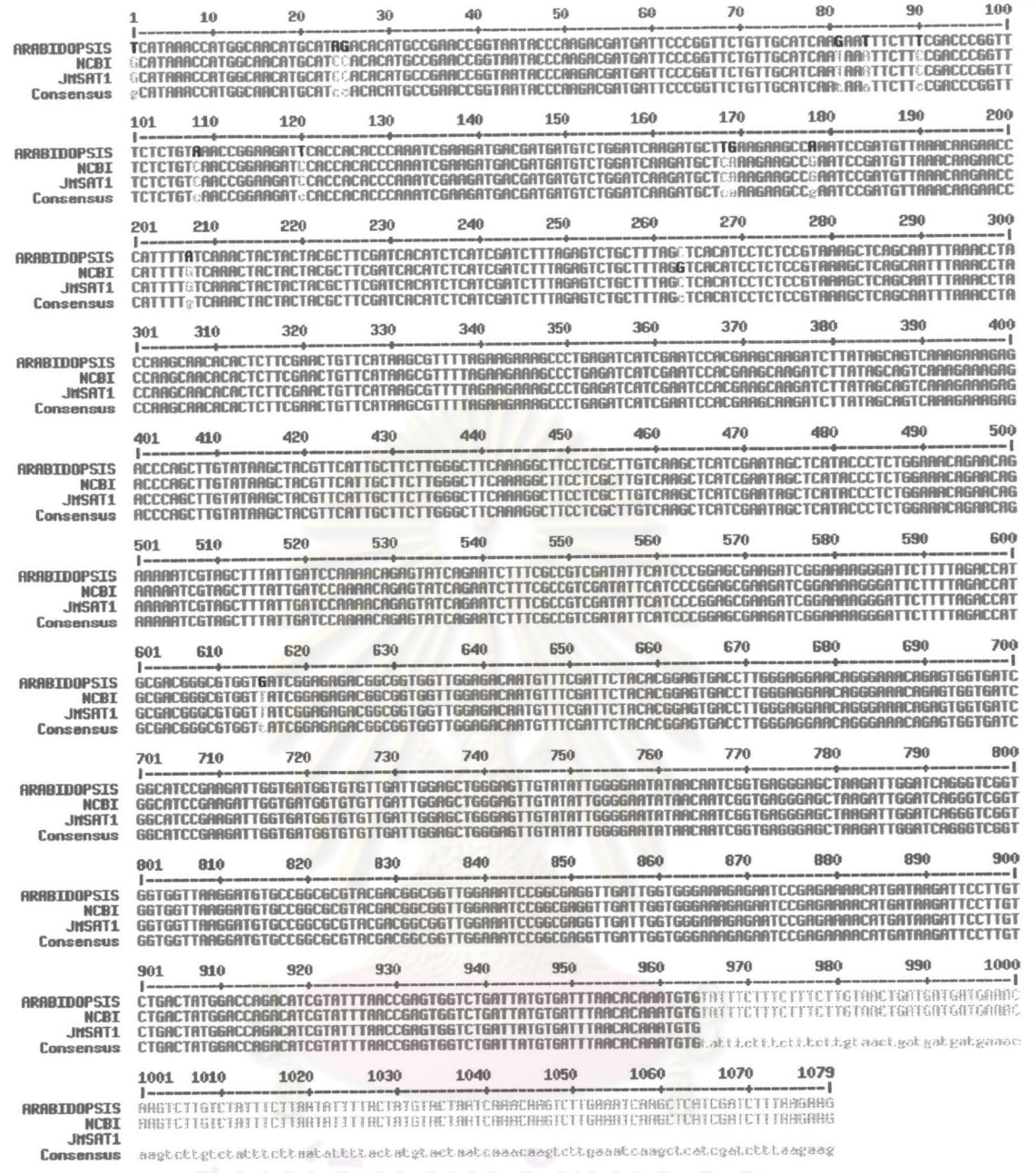
ATG start codon หมายถึงจุดเริ่มต้นของการถอดรหัสโปรตีน

TAA stop codon หมายถึงจุดสิ้นสุดของการถอดรหัสโปรตีน

5.1.7 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของดีเอ็น (จากข้อ 5.1.5) กับลำดับเบสของยีน *SAT*1 ของ *A. thaliana*พันธุ์ Columbia

ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของดีเอ็นเอ จากข้อ 5.1.5 กับลำดับเบสของยีน *SAT*1 ของ *A. thaliana* พันธุ์ Columbia ในฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Gene Bank Accession number L42212) และฐานข้อมูล AIR (Arabidopsis Information Resource) (Acession number at1g55920) โดยโปรแกรม Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov) และโปรแกรม multialignment (www.tolouse.inra.fr) พบว่าเหมือนกัน 99 เปอร์เซ็นต์ ลำดับเบสที่แตกต่างแสดงด้วยอักษรสีชมพู (ภาพที่ 5.4)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 5.4 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของดีเอ็นเอ จากข้อ 5.1.5 กับลำดับเบสของยีน *SAT*1 ของ *A thaliana* พันธุ์ Columbia

ATG ที่ตำแหน่ง 10 คือ start codon หมายถึงจุดเริ่มต้นของการถอดรหัสโปรตีน

TAA ที่ตำแหน่ง 952 คือ stop codon หมายถึง จุดสิ้นสุดของการถอดรหัสโปรตีน

ARABIDOPSIS หมายถึง ยีน *SAT*1 ในฐานข้อมูล AIR (Acession number at1g55920)

NCBI หมายถึง ยีน *SAT*1 ในฐานข้อมูล NCBI (Accession number L42212)

JMSAT1 หมายถึง ยีน *SAT*1 จาก EST clone104E8T7 ซึ่งอยู่ในพลาสมิด pGEM-*SAT*1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

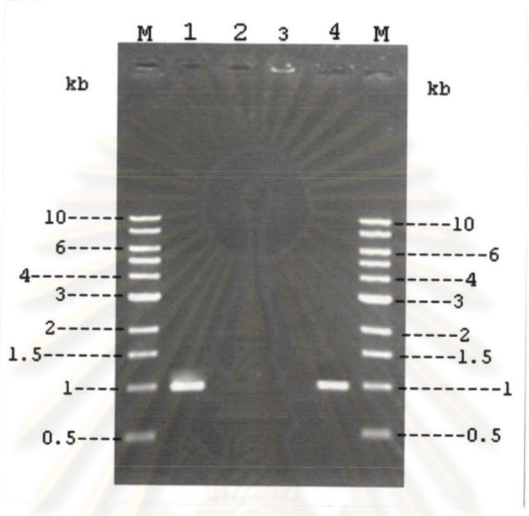
5.2 ผลการถ่ายโอนพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 เข้าสู่ *E. coli* DH5α โดยวิธีอิเลคโตรพอชัน

ผลการถ่ายโอนพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 เข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ *E. coli* DH5α ได้โคโลนีที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โคโลนีที่ได้คาดว่าเป็นโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์ *E. coli* DH5α/ pBIH1-IG(SX)-*rcs*1

5.2.1 ผลการคัดเลือกโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์ *E. coli* DH5α/pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 โดยวิธีพีซีอาร์

สกัดพลาสมิดจากโคโลนีที่คาดว่าเป็นโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์ *E. coli* DH5α/ pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการพีซีอาร์ ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ rcs1-1 และ rcs1-2 ตามวิธีข้อ 4.2.3 ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส (ภาพที่ 5.5) ซึ่งเป็นขนาดของยีน *rcs*1 แสดงว่าเดิมเป็นโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 จริง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 5.5 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการพีซีอาร์ ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ rcs1-1 และ rcs1-2

M หมายถึง ดีเอ็นเอแลดเดอร์ ที่มีขนาดตั้งแต่ 0.5- 10.0 กิโลเบส

1 หมายถึง เมื่อใช้พลาสมิดที่สกัดจากโคโลนีที่คาดว่าเป็นโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์ *E. coli* DH5α / pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

2 หมายถึง ชุดควบคุมเมื่อไม่ใส่ดีเอ็นเอแม่แบบ

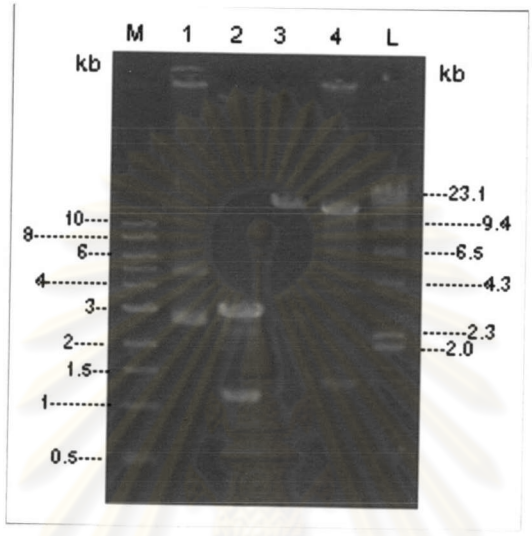
3 หมายถึง เมื่อใช้พลาสมิด pBIH1-IG(SX) เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

4 หมายถึง เมื่อใช้พลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 เป็นดี เอ็นเอแม่แบบ (ชุดควบคุมบวก)

5.3 ผลการสร้างพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1

ตัดพลาสมิด pGEM-*SAT*1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Xba*I และ *Sac*I ได้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส และดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3 กิโลเบส ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส คือยีน *SAT*1 (ภาพที่ 5.6) และตัดพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดเดียวกัน ได้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส และดีเอ็นเอขนาดใหญ่กว่า 10 กิโลเบส ดีเอ็นเอขนาดใหญ่กว่า 10 กิโลเบส คือพลาสมิด pBIH1-IG(SX) ที่ปราศจากยีน *rcs*1 (ภาพที่ 5.6) แยกเอายีน *SAT*1 และพลาสมิด pBIH1-IG(SX) ที่ปราศจากยีน *rcs*1 ออกจากเจลอะกาโรส นำมาเชื่อมต่อกัน เรียกพลาสมิดที่ได้ว่า pBIH1-IG(SX)-*SAT*1 ถ่ายโอนพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1 เข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ *E. coli* DH5α คัดเลือกโคโลนีที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง LB ที่มีสารสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาสกัดพลาสมิดเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการพีซีอาร์ ตรวจหายีน *SAT*1 โดยใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ JSAT1 และดีเอ็นเอไพร์เมอร์ JSAT2 วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส ซึ่งเป็นขนาดของยีน *SAT*1 (ภาพที่ 5.7) แสดงว่าโคโลนีที่นำมาสกัดพลาสมิดเป็นโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1 จริง เรียกโคโลนีดังกล่าวว่า *E. coli* DH5α / pBIH1-IG(SX)-*SAT*1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 5.6 ผลการตัดพลาสมิด pGEM-*SAT*1 และ pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Xba* I และ *Sac* I

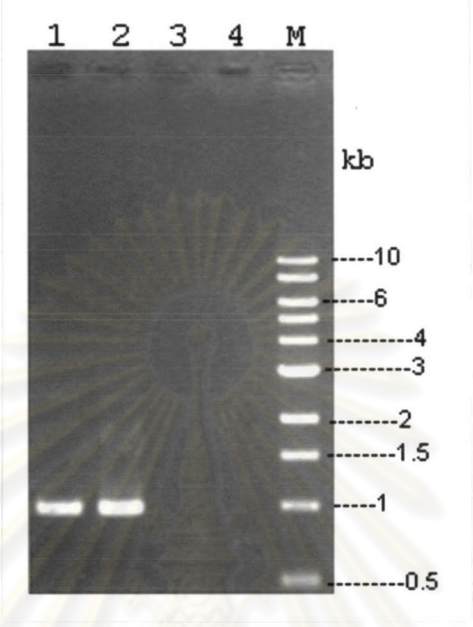
M หมายถึง ดีเอ็นเอแลดเดอร์ขนาดตั้งแต่ 0.5-1.0 กิโลเบส

1 และ3 หมายถึง พลาสมิด pGEM-*SAT*1 และ pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 ตามลำดับ ซึ่งไม่ถูกตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Xba* I และ *Sac* I

2 หมายถึง พลาสมิด pGEM-*SAT*1 ที่ถูกตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Xba*I และ *Sac*I ได้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 และ 3 กิโลเบส

4 หมายถึง พลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 ที่ถูกตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Xba*I และ *Sac*I ได้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 และใหญ่กว่า 10 กิโลเบส

L หมายถึง ดีเอ็นเอ λ/ Hind III ตั้งแต่ 2-23 กิโลเบส



ภาพที่ 5.7 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการพีซีอาร์ ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ JSAT1 และ JSAT2

M หมายถึง ดีเอ็นเอแลดเดอร์มีขนาดตั้งแต่ 0.5 – 10 กิโลเบส

1 หมายถึง เมื่อใช้พลาสมิด pGEM-*SAT*1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (ชุดควบคุมบวก)

2 หมายถึง เมื่อใช้พลาสมิดที่สกัดจากโคโลนีที่คาดว่าเป็นโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์ *E. coli* DH5α / pBIH1-IG(SX)-*SAT*1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

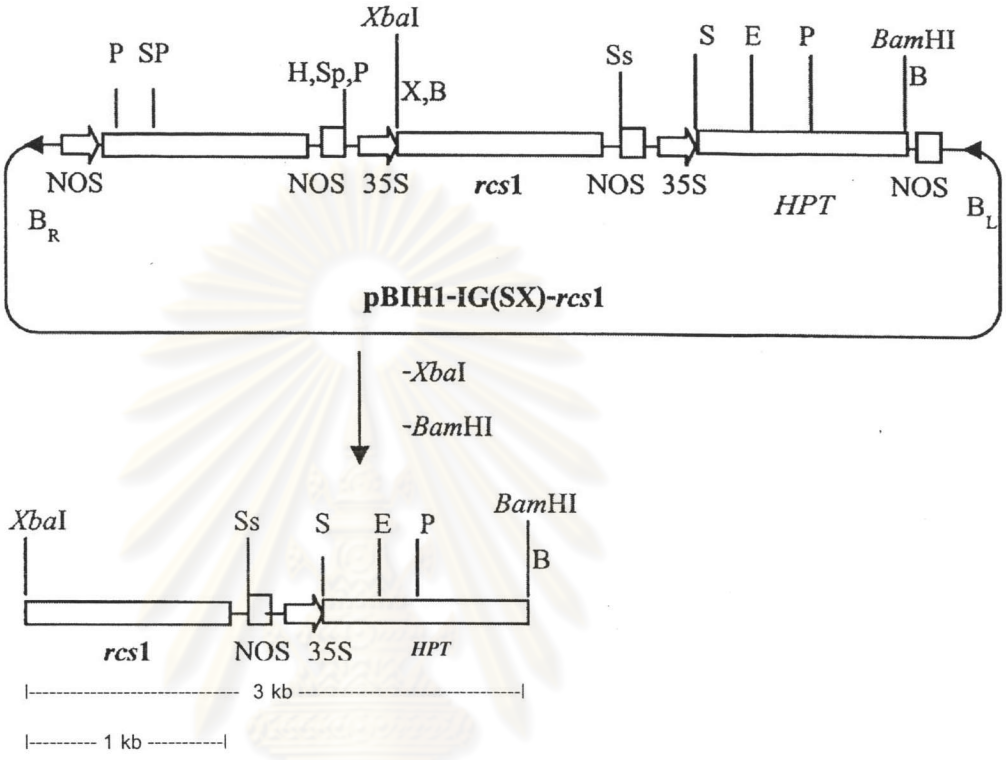
3 หมายถึง ชุดควบคุมเมื่อไม่ใส่ดีเอ็นเอแม่แบบ

4 หมายถึง เมื่อใช้พลาสมิด pGEM-7Zf(+) เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

5.4 ผลการสร้างพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1

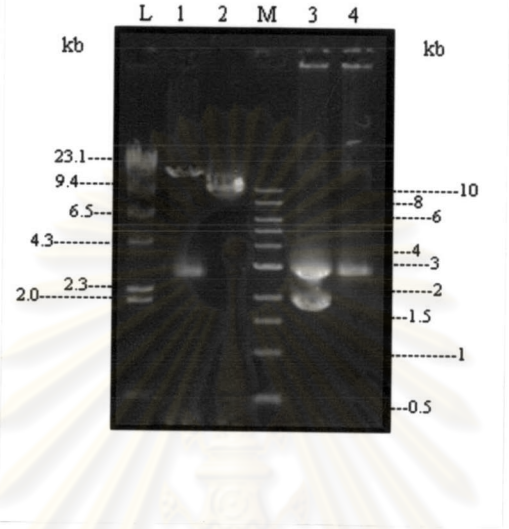
ผลการวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Xba*I และ *Bam*HI โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิสได้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3 กิโลเบส และขนาดใหญ่กว่า 10 กิโลเบส (ภาพที่ 5.8 และภาพที่ 5.9) ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3 กิโลเบส เป็นชิ้นดีเอ็นเอที่มียีน *rcs*1 ขนาดประมาณ 1 กิโลเบส และยีนต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน (ยีน *HPT*) ขนาดประมาณ 2 กิโลเบส แยกเอาชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3 กิโลเบส ออกจากเจลอะกาโรส นำชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3 กิโลเบส ที่ได้มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pUC19 ซึ่งตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ชนิดเดียวกัน (ภาพที่ 5.9) เรียกพลาสมิดที่ได้ว่า pUC19-*rcs*1 ตัดพลาสมิด pUC19-*rcs*1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Sal*I และ *Bam*HI ได้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3 กิโลเบส และ 1 กิโลเบส (ภาพที่ 5.10) ดีเอ็นเอขนาด 3 กิโลเบส เป็นชิ้นดีเอ็นเอที่มียีน *rcs*1 และยีน *HPT* ซึ่งมีปลายเหนียวชนิด *Sal*I และ *Bam*HI แยกเอาชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3 กิโลเบส ที่ได้ออกจากเจลอะกาโรส นำมาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1 ซึ่งตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Sal*I และ *Bam*HI เรียกพลาสมิดที่ได้ว่าพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 (ภาพที่ 5.11) ถ่ายโอนพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 เข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ *E.coli* DH5α คัดเลือกโคโลนีมาตรวจสอบว่าเป็นโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์ โดยวิธีการสกัดเอาพลาสมิดมาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการพีซีอาร์ ตรวจหายีน *SAT*1 โดยใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางไป คือ JSAT1 และดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางกลับ คือ JSAT2 ตรวจหายีน *rcs*1 โดยใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางไป คือ *rcs*1-1 และดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางกลับคือ *rcs*1-2 วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส ซึ่งเป็นขนาดของยีน *rcs*1 และยีน *SAT*1 (ภาพที่ 5.12 ก. และ ข.) แสดงว่าโคโลนีสีขาวที่นำมาสกัดพลาสมิดเป็นโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1จริง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 5.8 การตัดพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Xba*I และ *Bam*HI จะได้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3 กิโลเบส ประกอบด้วยยีน *rcs*1 และยีนต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน (ยีน*HPT*1)

อักษรย่อของเรสทริกชันเอนไซม์ที่ใช้ : P แทน *Pst*I , Sp แทน *Spn*I , H แทน *Hind* III , B แทน *BamH* I , S แทน *Sal* I , Sn แทน *SnaB*I , X แทน *Xba* I , Ss แทน *Sac* I , E แทน *EcoR* I



ภาพที่ 5.9 ผลการตัดพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 และพลาสมิด pUC19 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Xba*I และ*Bam*HI

L หมายถึง ดีเอ็นเอ λ /*Hind*III ขนาดตั้งแต่ 2 – 23 กิโลเบส

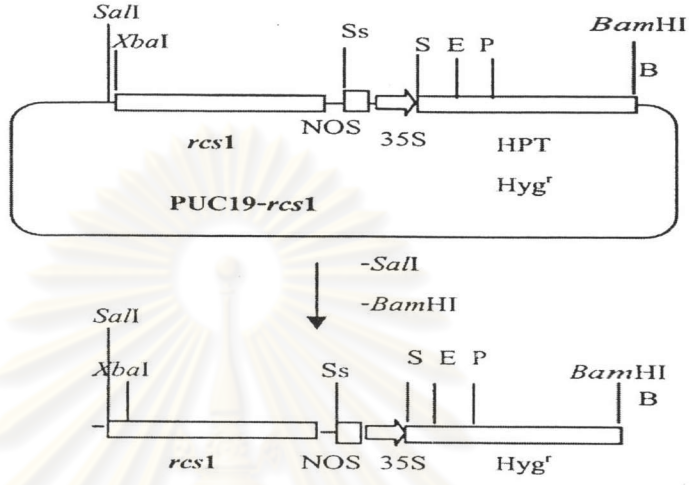
M หมายถึง ดีเอ็นเอแลดเดอร์ ขนาดตั้งแต่ 0.5-10 กิโลเบส

1 หมายถึง พลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 ที่ตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Xba*I และ *Bam*HI ได้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3 กิโลเบส และใหญ่กว่า 10 กิโลเบส

2 หมายถึง พลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 ที่ไม่ถูกตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Xba*I และ *Bam*HI

3 หมายถึง พลาสมิด pUC19 ที่ไม่ถูกตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Xba*I และ *Bam*HI

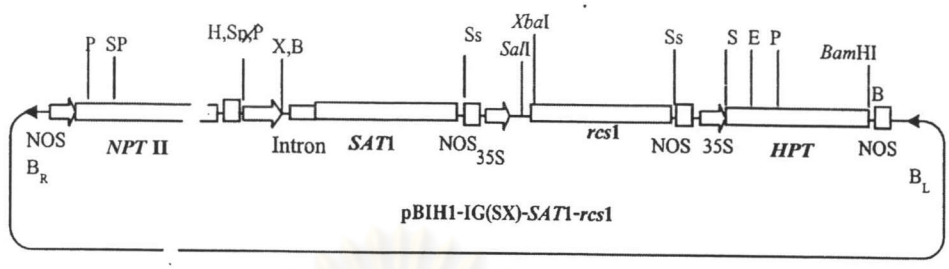
4 หมายถึง พลาสมิด pUC19 ที่ถูกตัดด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Xba*I และ *Bam*HI ได้ ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3 กิโลเบส



ภาพที่ 5.10 การตัดพลาสมิด pUC19- *rcs*1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Sal*I และ *Bam*HI จะได้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3 กิโลเบส ประกอบด้วยยีน *rcs*1 และยีนต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน (ยีน*HPT*1)

อักษรย่อของเรสทริกชันเอนไซม์ที่ใช้ : P แทน *Pst*I , B แทน *BamH* I , S แทน *Sal* I , X แทน *Xba* I , Ss แทน *Sac* I , E แทน *EcoR* I

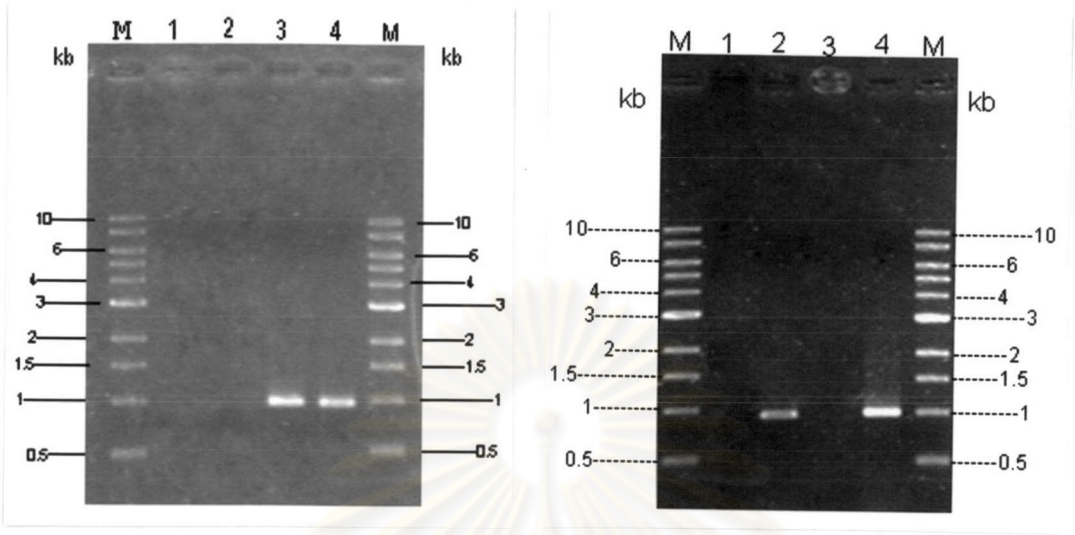
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 5.11 ตำแหน่งของยีนต่าง ๆ บนพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1

อักษรย่อของเรสทริกชันเอนไซม์ที่ใช้ : P แทน *Pst*I , Sp แทน *Spn*I , H แทน *Hind* III , B แทน *BamH* I , S แทน *Sal* I , Sn แทน *SnaB*I , X แทน *Xba* I , Ss แทน *Sac* I , E แทน *EcoR* I

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ก. ข.

ภาพที่ 5.12 ผลการตรวจหายีน *rcs*1 (ก) และยีน *SAT*1 (ข) ในพลาสมิดที่สกัดจากโคโลนีที่คาดว่าเป็นโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)- *SAT*1- *rcs*1 โดยวิธีพีซีอาร์

ภาพ ก. M หมายถึง ดีเอ็นเอแลดเดอร์ขนาดตั้งแต่ 0.5-10 กิโลเบส

1, 2, 3 และ 4 ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางไป คือ rcs1-1 และดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางกลับ คือ rcs1-2

1 หมายถึงชุดควบคุมเมื่อไม่ใส่ดีเอ็นเอแม่แบบ

2 หมายถึงใช้พลาสมิด pBIH1-IG(SX) เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

3 หมายถึงดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการพีซีอาร์เมื่อใช้พลาสมิดที่สกัดจากโคโลนีที่คาดว่าเป็นโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

4 หมายถึงดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการพีซีอาร์เมื่อใช้พลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (ชุดควบคุมบวก)

ภาพ ข. M หมายถึง ดีเอ็นเอแลดเดอร์ขนาดตั้งแต่ 0.5-10 กิโลเบส

1, 2, 3 และ 4 ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางไป คือ JSAT1 และดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางกลับ คือ JSAT2

1 หมายถึงใช้พลาสมิด pBIH1-IG(SX) เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

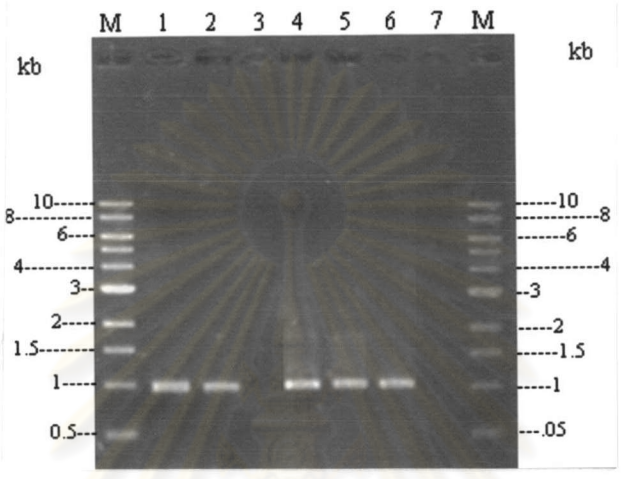
2 หมาย ถึงดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการพีซีอาร์ เมื่อใช้พลาสมิดที่สกัดจากโคโลนีที่คาดว่าเป็นโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

3 หมายถึง ชุดควบคุมเมื่อไม่ใส่ดีเอ็นเอแม่แบบ

4 หมายถึงดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการพีซีอาร์เมื่อใช้พลาสมิด pGEM-*SAT*1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (ชุดควบคุมบวก)

5.5 ผลการถ่ายโอนพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1 และ pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 เข้าสู่ *A.tumefaciens* EHA101

ถ่ายโอนพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1 และ pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 เข้าสู่เซลล์คอมพีเทนต์ *A. tumefaciens* EHA101 โดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน นำโคโลนีที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YEP ที่มีสารสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาตรวจสอบว่าเป็นโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์ โดยวิธีการสกัดเอาพลาสมิดมาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการพีซีอาร์ ตรวจหายีน *SAT*1 โดยใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางไปคือ JSAT1 และดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางกลับ คือ JSAT2 ตรวจหายีน *rcs*1 โดยใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางไป คือ rcs1-1 และดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางกลับคือ rcs1-2 วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส ซึ่งเป็นขนาดของยีน *rcs*1 และยีน *SAT*1 (ภาพที่ 5.13) แสดงว่าโคโลนีที่นำมาสกัดพลาสมิดเป็นโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1 และพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 จริง



ภาพที่ 5.13 ผลการตรวจหายีน *rcs*1 และยีน *SAT*1 ในพลาสมิดที่สกัดจากโคโลนีที่คาดว่าเป็นโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)- *SAT*1- *rcs*1 โดยวิธีพีซีอาร์

M หมายถึง ดีเอ็นเอแลดเดอร์ขนาดตั้งแต่ 0.5-10 กิโลเบส

1, 2 และ3 ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางไปคือ *rcs*1-1 และดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางกลับคือ *rcs*1-2

1 หมายถึง ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการพีซีอาร์ เมื่อใช้พลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (ชุดควบคุมบวก)

2 หมายถึง เมื่อใช้พลาสมิดที่สกัดจากโคโลนีที่คาดว่าเป็นโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

3 หมายถึง เมื่อใช้พลาสมิด pBIH1-IG(SX) เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

4, 5, 6 และ 7 ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางไปคือ JSAT1 และดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางกลับ คือ JSAT2

4 หมายถึง เมื่อใช้พลาสมิดที่สกัดจากโคโลนีที่คาดว่าเป็นโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

5 หมายถึง เมื่อใช้พลาสมิดที่สกัดจากโคโลนีที่คาดว่าเป็นโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

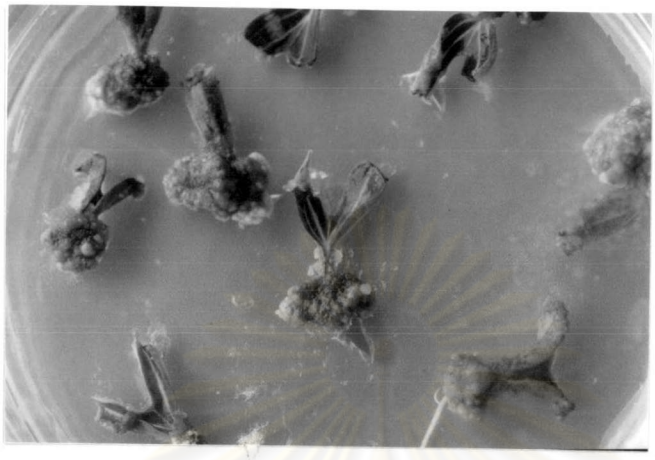
6 หมายถึง เมื่อใช้พลาสมิด pGEM-*SAT*1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (ชุดควบคุมบวก)

7 หมายถึง เมื่อใช้พลาสมิด pBIH1-IG(SX) เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

5.6 ผลการถ่ายโอนยีน *SAT*1 เพียงอย่างเดียว และยีน *SAT*1 ร่วมกับยีน *rcs*1 เข้าสู่ผักบุ้ง (*Ipomoea aquatica*)

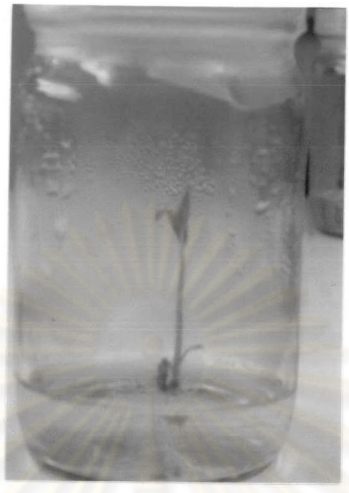
ผลการถ่ายโอนยีน *SAT*1 เพียงอย่างเดียวเข้าสู่ผักบุ้ง โดยวิธีการใช้ *A. tumefaciens* EHA101 ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1 พบว่า cotyledon explants 1,115 ชิ้น มีการงอกเป็นต้นใหม่ (shoot regeneration) (ภาพที่ 5.14) 62 ต้น คิดเป็น 5.56 เปอร์เซ็นต์ และผลการถ่ายโอนยีน *SAT*1 ร่วมกับยีน *rcs*1 เข้าสู่ผักบุ้งโดยวิธีการใช้ *A. tumefaciens* EHA101 ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 พบว่า cotyledon explants 1,853 ชิ้น มีการงอกเป็นต้นใหม่ 85 ต้น คิดเป็น 4.59 เปอร์เซ็นต์ ย้ายต้นอ่อนผักบุ้งที่ได้มาเลี้ยงบนบนอาหารแข็ง MS ซึ่งเติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเติมสารปฏิชีวนะเซฟโฟแทคซิมความเข้มข้นสุดท้าย 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ให้แสง 3,000 ลักซ์ 16 ชั่วโมง/วัน เป็นเวลา 1 เดือน พบว่ามีต้นอ่อนผักบุ้งที่สามารถทนต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินได้เพียง 1 ต้น และ 2 ต้น (ภาพที่ 5.15) คิดเป็น 1.61 เปอร์เซ็นต์ และ 2.35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

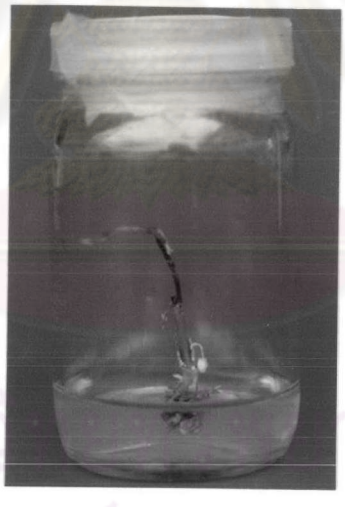


ภาพที่ 5.14 การงอกต้นใหม่จาก cotyledon explants

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ก



ข

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 5.15 แสดงลักษณะต้นอ่อนผักบุ้งที่เจริญในอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 เดือน

(ก) ต้านทานต่อสารปฏิชีนะไฮโกรมัยซิน (เจริญได้ไม่ตาย)

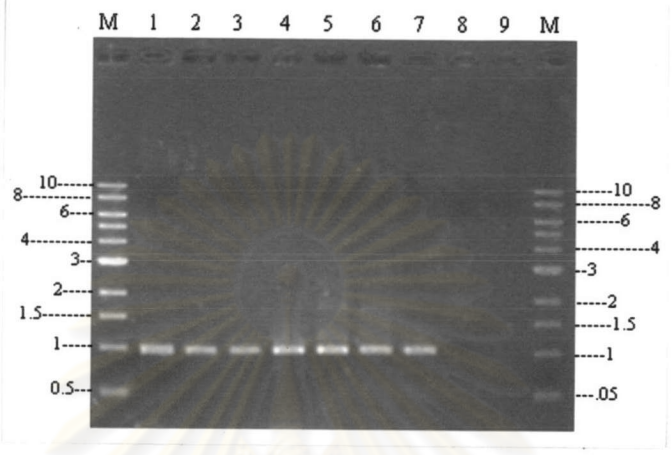
(ข) ไม่ต้านทานต่อสารปฏิชีนะไฮโกรมัยซิน (ตาย)

5.7 ผลการตรวจหายีน *SAT*1 และยีน *rcs*1 ในดีเอ็นเอของผักบุ้งที่สามารถต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินโดยวิธีพีซีอาร์

การตรวจหายีน *SAT*1 และยีน *rcs*1 ในดีเอ็นเอของผักบุ้งที่สามารถต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินด้วยวิธีพีซีอาร์ ทำโดยนำดีเอ็นเอที่สกัดจากผักบุ้งที่สามารถเจริญบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 เดือน มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการพีซีอาร์ ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ JSAT1 และ JSAT2 สำหรับการตรวจหายีน *SAT*1 และดีเอ็นเอไพร์เมอร์ rcs1-1 และ rcs1-2 สำหรับการตรวจหายีน *rcs*1 วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส พบว่าได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส ซึ่งเป็นขนาดของดีเอ็นเอที่จะได้เมื่อใช้ยีน *rcs*1 และยีน *SAT*1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (ภาพที่ 5.16) เรียกต้นผักบุ้งที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1 ว่าผักบุ้งแปลงพันธุ์ SAT1/II และเรียกต้นผักบุ้งที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 ว่าผักบุ้งแปลงพันธุ์ SR3 และ SR10 เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากผักบุ้งพันธุ์เดิม (wild type) เป็นดีเอ็นเอแม่แบบไม่ได้แถบดีเอ็นเอใด ๆ

ผักบุ้งแปลงพันธุ์ SAT1/II ซึ่งมียีน *SAT*1 เพียงอย่างเดียว การเจริญส่วนใหญ่เป็นลำต้น (shoot) มีการเจริญแตกกิ่งน้อยมาก และเมื่อขยายพันธุ์ต้นผักบุ้งมีลักษณะเหลืองและตายในที่สุด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 5.16 ผลการตรวจหายีน *SAT*1 และยีน *rcs*1 ในดีเอ็นเอที่สกัดจากผักบุ้งพันธุ์ที่สามารถทนต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินโดยวิธีพีซีอาร์

M หมายถึง ดีเอ็นเอแลดเดอร์ขนาดตั้งแต่ 0.5-10 กิโลเบส

1, 2 และ 8 ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางไป คือ rcs1-1 และดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางกลับ คือ rcs1-2

1 หมายถึง ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการพีซีอาร์เมื่อใช้พลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (ชุดควบคุมบวก)

2 และ 3 หมายถึง ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการพีซีอาร์เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากต้นผักบุ้งแปลงพันธุ์ SR3 และ SR10 ตามลำดับ เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

4, 5 , 6, 7 และ 9 ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางไป คือ JSAT1 และดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางกลับ คือ JSAT2

4 หมายถึง ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการพีซีอาร์ เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากต้นผักบุ้งแปลงพันธุ์ SAT1/ II เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

5 และ 6 หมายถึง ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการพีซีอาร์เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากต้นผักบุ้งแปลงพันธุ์ SR3 และ SR10 ตามลำดับ เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

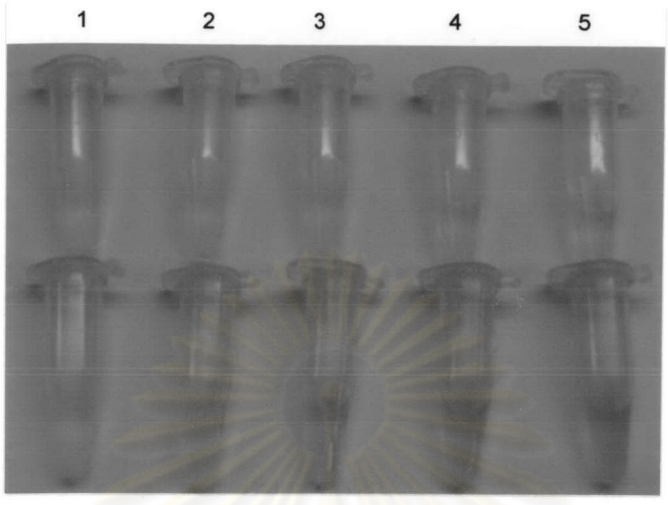
7 หมายถึง ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการพีซีอาร์เมื่อใช้พลาสมิด pGEM-*SAT*1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (ชุดควบคุมบวก)

8 และ 9 หมายถึง ไม่ได้แถบดีเอ็นเอ เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากผักบุ้งพันธุ์เดิม (wild type) เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

5.7 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสในผักบุ้ง (Youssifian และคณะ, 1993)

ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสในน้ำสกัดจากใบผักบุ้ง พบว่าผักบุ้งแปลงพันธุ์ที่มียีน *SAT*1 ร่วมกับยีน *rcs*1 (ผักบุ้งแปลงพันธุ์ SR3 และ SR10) มีกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสสูงกว่าผักบุ้งแปลงพันธุ์ที่มียีน *rcs*1 เพียงอย่างเดียว (ผักบุ้งแปลงพันธุ์ RCS1) (สร้างโดยอังคณา โพธิ์ไกร, 2545) และผักบุ้งพันธุ์เดิม (ภาพที่ 5.17 และตารางที่ 5.1) ผักบุ้งแปลงพันธุ์ SR3 มีกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสสูงที่สุด คือ 3.47 หน่วยเอนไซม์/มิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งสูงกว่าผักบุ้งแปลงพันธุ์ RCS1 1.24 เท่า และสูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม 4.13 เท่า ในขณะที่กิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสของผักบุ้งแปลงพันธุ์ SR10 ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับของผักบุ้งแปลงพันธุ์ RCS1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 5.17 การเปรียบเทียบสีของส่วนผสมปฏิกิริยาซึ่งเกิดจากกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสในใบของผักบุ้ง

แถวบน หมายถึงหลอดที่หยุดปฏิกิริยาทันทีที่เวลา 0 นาที

แถวล่าง หมายถึงหลอดที่หยุดปฏิกิริยาที่เวลา 15 นาที

หลอดที่ 1 คือ ชุดควบคุม

หลอดที่ 2 คือ ผักบุ้งพันธุ์เดิม

หลอดที่ 3 คือผักบุ้งแปลงพันธุ์ที่มียีน *rcs*1 เพียงอย่างเดียว (RCS1)

หลอดที่ 4 คือผักบุ้งแปลงพันธุ์ที่มียีน *SAT*1 ร่วมกับยีน *rcs*1 (SR3)

หลอดที่ 5 คือผักบุ้งแปลงพันธุ์ที่มียีน *SAT*1 ร่วมกับยีน *rcs*1 (SR10)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตาราง 5.1 การเปรียบเทียบกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสในใบผักบุ้ง

ผักบุ้ง	กิจกรรมจำเพาะของซิสเตอีนซินเตส (หน่วยเอนไซม์/มิลลิกรัมโปรตีน)	ปริมาณที่เพิ่มขึ้น (เท่า)
พันธุ์เดิม	0.84±4.359E-02[a]	1.00
แปลงพันธุ์ RCS1	2.79±4.000E-02[b]	3.32
แปลงพันธุ์ SR3	3.47±2.646E-02[c]	4.13
แปลงพันธุ์ SR10	2.89±9.165E-02[b]	3.44

5.8 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสในผักบุ้งตามวิธีของ Baecker และ Wedding (1980)

ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสในน้ำสกัดจากใบของผักบุ้งโดยการวัดแอซีทิล-โคอที่ลดลง พบว่าผักบุ้งแปลงพันธุ์ SR3 และ SR10 มีกิจกรรมของเซอรีนแอซีติลแทรนส์เฟอเรสสูงกว่าผักบุ้งแปลงพันธุ์ RCS1 และผักบุ้งพันธุ์เดิม (ตารางที่ 5.2) ผักบุ้งแปลงพันธุ์ SR3 มีกิจกรรมของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสสูงที่สุด คือ 7.24 หน่วยเอนไซม์/มิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งสูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม 2.52 เท่า กิจกรรมจำเพาะของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสของผักบุ้งทุกพันธุ์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5.2 การเปรียบเทียบกิจกรรมของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสในใบผักบุ้ง

ผักบุ้ง	กิจกรรมจำเพาะของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรส (หน่วยเอนไซม์/มิลลิกรัมโปรตีน)	ปริมาณที่เพิ่มขึ้น (เท่า)
พันธุ์เดิม	2.87±5.292E-02[a]	1.00
แปลงพันธุ์ RCS1	3.36±4.583E-02[b]	1.17
แปลงพันธุ์ SR3	7.24±1.732E-02[c]	2.52
แปลงพันธุ์ SR10	5.97±2.000E-02[d]	2.08

5.9 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสในผักบุ้งตามวิธีของ Kredich และ Tomkins (1966)

ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสในน้ำสกัดจากใบของผักบุ้งโดยการวัดโคเอที่เกิดขึ้น พบว่าผักบุ้งแปลงพันธุ์ SR3 และ SR10 มีกิจกรรมของเซอรีนแอซีติลแทรนส์เฟอเรสสูงกว่าผักบุ้งแปลงพันธุ์ RCS1 และผักบุ้งพันธุ์เดิม (ตารางที่ 5.3) ผักบุ้งแปลงพันธุ์ SR3 มีกิจกรรมของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสสูงที่สุด คือ 4.99 หน่วยเอนไซม์/มิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งสูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม 2.29 เท่า และกิจกรรมจำเพาะของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสของผักบุ้งทุกพันธุ์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

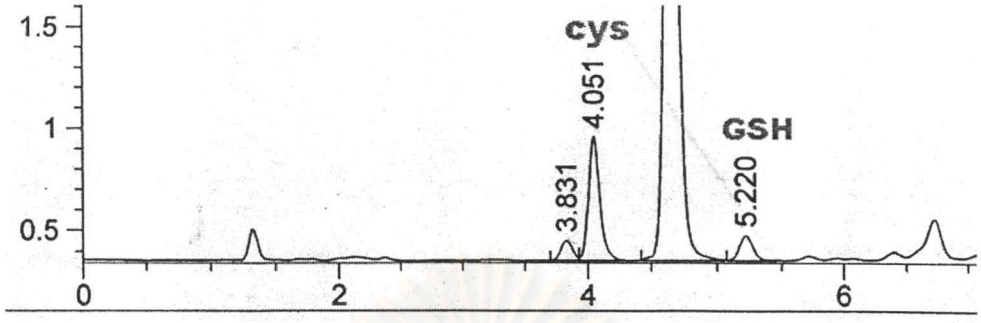
ตารางที่ 5.3 การเปรียบเทียบกิจกรรมของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสในใบผักบุ้ง

ผักบุ้ง	กิจกรรมจำเพาะของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรส (หน่วยเอนไซม์/มิลลิกรัมโปรตีน)	ปริมาณที่เพิ่มขึ้น (เท่า)
พันธุ์เดิม	2.17±1.528-02[a]	1.00
แปลงพันธุ์ RCS1	2.27±3.055E-02[b]	1.05
แปลงพันธุ์ SR3	4.99±2.646E-02[c]	2.29
แปลงพันธุ์ SR10	3.69±2.000E-02[d]	1.70

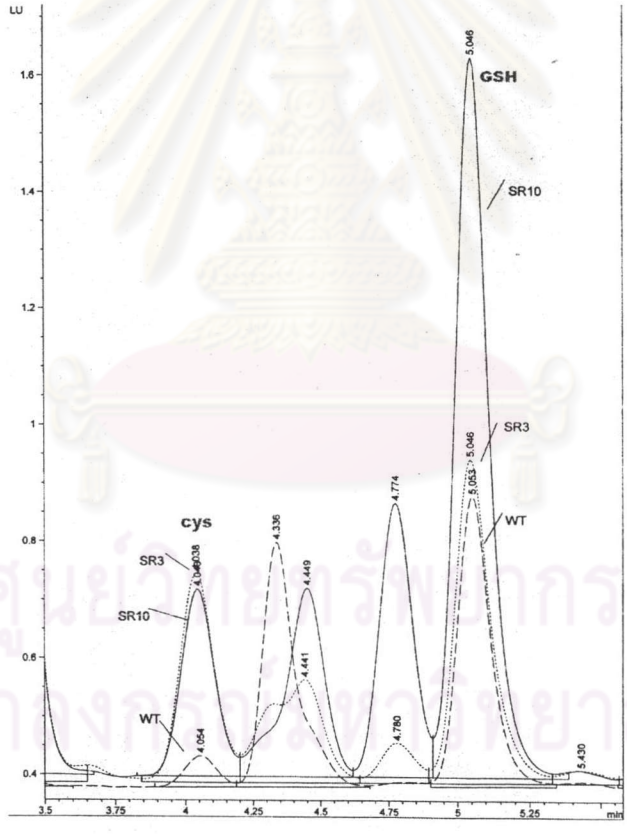
5.10 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนในผักบุ้งโดย HPLC ตามวิธีของ Noctor และ Foyer (1998)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนซีสเตอีนและกลูตาไธโอนในน้ำสกัดจากใบของผักบุ้งแปลงพันธุ์ RCS1 ผักบุ้งแปลงพันธุ์ SR3 และผักบุ้งแปลงพันธุ์ SR10 โดยวิธี HPLC เปรียบเทียบกับของผักบุ้งพันธุ์เดิม พบว่าผักบุ้งแปลงพันธุ์ทุกสายพันธุ์มีปริมาณกรดอะมิโนซีสเตอีนและกลูตาไธโอนสูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม (ภาพที่ 5.18 และตารางที่ 5.4) ผักบุ้งแปลงพันธุ์ SR3 มีปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนสูงที่สุด คือ 62.92 พิโคโมล/น้ำหนักใบ 1 มิลลิกรัม ซึ่งสูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม 7.6 เท่า และผักบุ้งแปลงพันธุ์ SR10 มีปริมาณกลูตาไธโอนสูงที่สุด คือ 51.41 พิโคโมล/น้ำหนักใบ 1 มิลลิกรัม ซึ่งสูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม 3 เท่า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

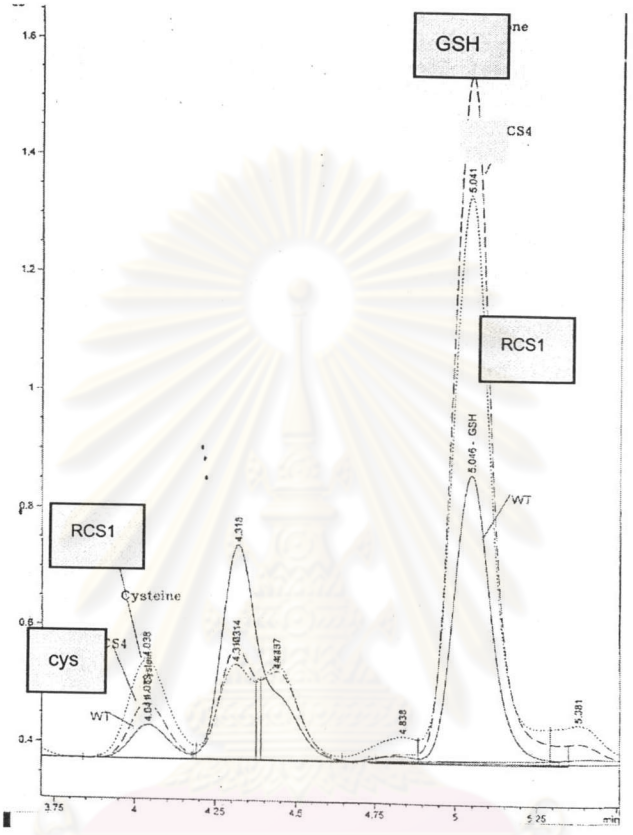


ก



ข

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ค

ภาพที่ 5.18 โครมาโตแกรมของกรดอะมิโนซิสเตอีน (Cys) และกลูตาไธโอน (GSH) ในสารละลายมาตรฐาน (ก) และน้ำสกัดจากใบของผักบุ้ง (ข) และ (ค)

WT: ผักบุ้งพันธุ์เดิม

SR3, SR10 และ RCS1: ผักบุ้งแปลงพันธุ์ SR3, SR10 และ RCS1

ตารางที่ 5.4 การเปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีน และกลูตาไธโอนในน้ำสกัดจากใบผักบุ้ง

ผักบุ้ง	ปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีน (พิโคโมล/น้ำหนักใบ1 มิลลิกรัม)	ปริมาณ (เท่า)	ปริมาณกลูตาไธโอน (พิโคโมล/น้ำหนักใบ1 มิลลิกรัม)	ปริมาณ (เท่า)
พันธุ์เดิม	8.28	1.0	16.61	1.0
แปลงพันธุ์ RCS1	27.79	3.4	39.82	2.4
แปลงพันธุ์ SR3	62.92	7.6	22.65	1.4
แปลงพันธุ์ SR10	53.77	6.5	51.41	3.0

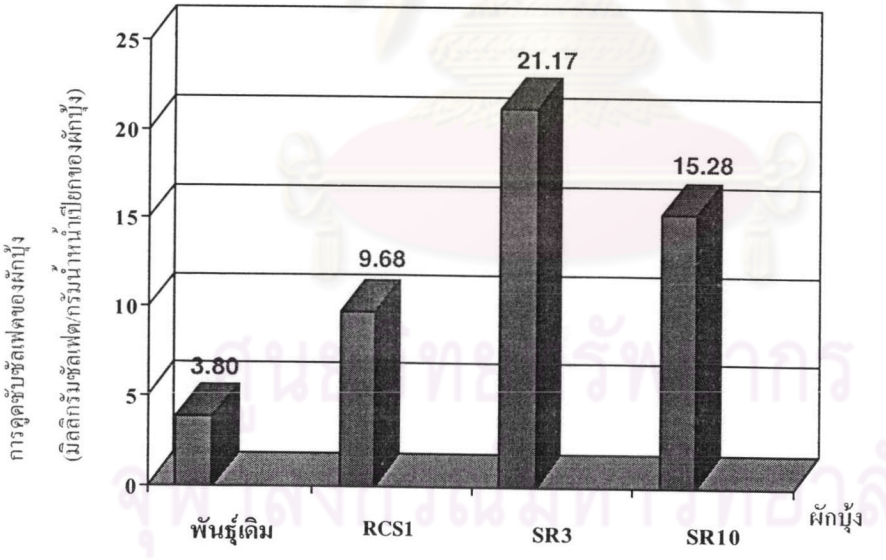
5.11 ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับซัลเฟตของผักบุ้ง

ผลการปลูกผักบุ้งแปลงพันธุ์ RCS1 ผักบุ้งแปลงพันธุ์ SR3 และ SR10 และผักบุ้งพันธุ์เดิมในอาหารเหลว MS ที่มีความเข้มข้นของซัลเฟตเริ่มต้น 1,000 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 14 วัน พบว่าผักบุ้งแปลงพันธุ์ SR3 และ SR10 มีประสิทธิภาพการดูดซับซัลเฟตสูงกว่าผักบุ้งแปลงพันธุ์ RCS1 และผักบุ้งพันธุ์เดิม (ตารางที่ 5.5 และ ภาพที่ 5.19) ผักบุ้งแปลงพันธุ์ SR3 มีประสิทธิภาพการดูดซับซัลเฟตสูงที่สุด เท่ากับ 21.17 มิลลิกรัมซัลเฟต/กรัมน้ำหนักเปียกของผักบุ้ง ซึ่งสูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม 5.5 เท่า และสูงกว่าผักบุ้งแปลงพันธุ์ RCS1 2.19 เท่า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5.5 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับซัลเฟตของผักบุ้ง

ผักบุ้ง	ประสิทธิภาพการดูดซับซัลเฟตของผักบุ้ง (มิลลิกรัมซัลเฟต/ต้น)	ประสิทธิภาพการดูดซับซัลเฟตของผักบุ้ง (มิลลิกรัมซัลเฟต/กรัมน้ำหนักเปียกของผักบุ้ง)	ประสิทธิภาพการดูดซับซัลเฟตที่เพิ่มขึ้น (เท่า)
พันธุ์เดิม	1.92±2.646E-02	3.80±1.732E-02	1.0
แปลงพันธุ์ RCS1	3.85±3.464E-02	9.68±2.646E-02	2.8
แปลงพันธุ์ SR3	7.62±2.646E-02	21.17±2.646E-02	5.5
แปลงพันธุ์ SR10	5.96±2.646E-02	15.28±1.000E-02	4.0



ภาพที่ 5.19 กราฟแท่งเปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับซัลเฟตของผักบุ้งแปลงพันธุ์ และผักบุ้งพันธุ์เดิม

5.12 ผลการศึกษาลักษณะที่ปรากฏ (phenotype) ของผักบุ้ง

ผลการปลูกผักบุ้งแปลงพันธุ์ SR3 และ SR10 และผักบุ้งพันธุ์เดิมในดิน พบว่าลักษณะที่ปรากฏของผักบุ้งแปลงพันธุ์ SR3 และ SR10 ไม่มีความแตกต่างจากผักบุ้งพันธุ์เดิม (ภาพที่ 5.20)

ภาพที่ 5.20 ลักษณะที่ปรากฏ (phenotype) ของต้นผักบุ้งที่เจริญในดิน

WT หมายถึง ผักบุ้งพันธุ์เดิม

SR3 หมายถึง ผักบุ้งแปลงพันธุ์ SR3

SR10 หมายถึง ผักบุ้งแปลงพันธุ์ SR10

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย