บทที่ 6

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการทรานสฟอร์มยีนระบุรหัสซิสเตอีนซินเตสไอโซฟอร์มที่พบในไซโตพลาสซึมจากข้าว และยีนระบุรหัสเซอรีนอะซิติลทรานสเฟอเรส จาก *Arabidopsis thaliana* ไอโซฟอร์มที่พบในพลาสติดเข้าสู่ผักบุ้งจีนโดยวิธีการใช้ *A. tumefaciens* โดยแช่ cotyledon explants ของผักบุ้งอายุ 7 วัน ในอาหารเหลวสูตร MS ที่มีเซลล์ *A. tumefaciens* EHA 101 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 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 องศาเซลเซียสในที่มืด 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 3,125 ชิ้น มีการงอกเป็นต้นใหม่ (shoot regeneration) 523 ต้นคิดเป็น 16.74 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำต้นอ่อนของผักบุ้งที่เจริญมาจาก cotyledon explant ความสูงประมาณ 1 –2 เซนติเมตร มาทดสอบความทนต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าจาก 523 ต้นมีเพียง 2 ต้นที่สามารถเจริญบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ความเข้มข้นดังกล่าวได้ คิดเป็น 0.38 เปอร์เซ็นต์ ย้ายต้นผักบุ้งทั้ง 2 ต้น มาปลูกบนอาหารแข็งสูตร MMS ที่ปราศจากสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน เพื่อให้ผักบุ้งเจริญได้อย่างรวดเร็วและเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ นำต้นผักบุ้งมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการ PCR ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ *rcs*1-1 และ *rcs*1-2 ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณยีน *rcs*1 เพื่อตรวจหายีน *rcs*1 และใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ *JSAT*3 และ *JSAT*4 ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณยีน*SAT*1 ในดีเอ็นเอของผักบุ้งทั้ง 2 ต้น วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตโฟเรซิส พบว่าดีเอ็นเอของผักบุ้งทั้ง 2 ต้น ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.0 กิโลเบส และ 0.5 กิโลเบส ซึ่งเป็นขนาดของดีเอ็นเอที่ควรได้เมื่อใช้ยีน *rcs*1และยีน*SAT*1เป็นดีเอ็นเอแม่แบบตามลำดับ แสดงว่าผักบุ้งทั้ง 2 พันธุ์มียีน *rcs*1 และยีน*SAT*1 สอดแทรกอยู่บนโครโมโซม เรียกผักบุ้งทั้ง 2 พันธุ์ว่าผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์หมายเลข 1 และ 2

ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสในน้ำสกัดจากใบ ของผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์หมายเลข 1 และ 2 เทียบกับผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์ที่มียีน *rcs*1 และผักบุ้งพันธุ์เดิม พบว่าผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์ทั้ง 2 พันธุ์มีกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสสูงกว่าผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์ที่มียีน *rcs*1และผักบุ้งพันธุ์เดิม ผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์หมายเลข 1 มีกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสสูงที่สุด เท่ากับ 0.541 หน่วยเอนไซม์/โปรตีนหนึ่งมิลลิกรัม ซึ่งสูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม 5.20 เท่า

ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเซอรีนอะซิติลทรานสเฟอเรสในน้ำสกัดจากใบ ของผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์หมายเลข 1 และ 2 เทียบกับผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์ที่มียีน *rcs*1 และผักบุ้งพันธุ์เดิม พบว่าผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์ทั้ง 2 พันธุ์มีกิจกรรมของเซอรีนอะซิติลทรานสเฟอเรสสูงกว่าผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์ที่มียีน *rcs*1และผักบุ้งพันธุ์เดิม ผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์หมายเลข 1 มีกิจกรรมของเซอรีนอะซิติลทรานสเฟอเรสสูงที่สุด เท่ากับ 7.24 หน่วยเอนไซม์/โปรตีนหนึ่งมิลลิกรัม ซึ่งสูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม 2.17 เท่า

ประสิทธิภาพการดูดซับซัลเฟตของผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์หมายเลข 1 และ 2 เทียบกับผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์ที่มียีน *rcs*1 และผักบุ้งพันธุ์เดิม พบว่าผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์ทั้ง 2 พันธุ์มีประสิทธิภาพการดูดซับซัลเฟตสูงกว่าผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์ที่มียีน *rcs*1และผักบุ้งพันธุ์เดิม ผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์หมายเลข 1 มีประสิทธิภาพการดูดซับซัลเฟตสูงที่สุด เท่ากับ 19.7004 มิลลิกรัมซัลเฟต/กรัม (น้ำหนักเปียกของผักบุ้ง) ซึ่งสูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม 4.48 เท่า

จากผลการทดลองทั้งหมดสรุปได้ว่า การถ่ายโอนยีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสจากข้าวและยีนระบุรหัสเซอรีนอะซิติลทรานสเฟอเรสจาก *A. thaliana* เข้าสู่ผักบุ้งจีน ทำให้กิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสของผักบุ้งเพิ่มขึ้น 5.20 เท่า กิจกรรมของเซอรีนอะซิติลทรานสเฟอเรสของผักบุ้งเพิ่มขึ้น 2.17 เท่า ประสิทธิภาพการดูดซับซัลเฟตของผักบุ้งเพิ่มขึ้น 4.48 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับผักบุ้งพันธุ์เดิม และเพิ่มขึ้น 2.28 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์ที่มียีน *rcs*1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย