

บทที่ 6

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ได้ตรวจสอบลำดับเบสของยีนที่คาดว่าเป็นยีนระบุรหัสเซอรินแอซีทิล แทรนส์เฟอเรนสพลาสติดไอโซฟอร์ม (plastid isoform) ของ *A. thaliana* (ยีน *SAT1*) จาก EST clone104E8T7 ในพลาสมิด pGEM-*SAT1* โดยการหาลำดับเบสด้วยวิธี Thermal cycle DNA sequencing พบว่าประกอบด้วย 970 เบส (ภาพที่ 5.3) พบจุดเริ่มต้นของการถอดรหัส (start codon) และจุดสิ้นสุดของการถอดรหัส (stop codon) ที่ตำแหน่งที่ 10 และ 954 ตามลำดับ เมื่อนำข้อมูลลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของยีน *SAT1* ของ *A. thaliana* พันธุ์ Columbia ในฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information) (Gene Bank Accession number L42212) และฐานข้อมูล AIR (Arabidopsis Information Resource) (Accession number at1g55920) โดยโปรแกรม Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov) และโปรแกรม multialignment (www.toulouse.inra.fr) (ภาพที่ 5.4) พบว่าเหมือนกัน 99 เปอร์เซ็นต์ ลำดับเบสของยีน *SAT1* จาก EST clone 104E8T7 ในพลาสมิด pGEM-*SAT1* จะเหมือนกับลำดับเบสที่ควรจะเป็น (consensus) ณ ตำแหน่งที่ลำดับเบสของยีน *SAT1* จาก EST clone104E8T7 ในพลาสมิด pGEM-*SAT1* แตกต่างจากลำดับเบสในฐานข้อมูลทั้งสอง และเมื่อนำลำดับเบสของยีน *SAT1* จาก EST clone104E8T7 ในพลาสมิด pGEM-*SAT1* และจากฐานข้อมูลทั้งสองทำนายลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม CLUSTAL W (1.82) พบว่าตำแหน่งที่ลำดับเบสต่างกัดังกล่าวลำดับกรดอะมิโนจะต่างกันด้วย แต่ลำดับกรดอะมิโนของยีน *SAT1* จาก EST clone104E8T7 ในพลาสมิด pGEM-*SAT1* ยังคงเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนจากฐานข้อมูลใดฐานข้อมูลหนึ่ง (ภาพที่ ค.6) ดังนั้นยีน *SAT1* จาก EST clone104E8T7 ในพลาสมิด pGEM-*SAT1* จึงมีความถูกต้อง และใช้ถ่ายโอนเข้าสู่ผักนึ่งต่อไป

การถ่ายโอนยีน *SAT1* ร่วมกับยีน *rcs1* ซึ่งระบุรหัสซิสเตอีนซินเตสไอโซฟอร์มที่พบในไซโตพลาสซึมจากข้าวเจ้า และการถ่ายโอนยีน *SAT1* เพียงอย่างเดียวเข้าสู่ผักนึ่งจีน ด้วยวิธีการใช้ *Agrobacterium tumefaciens* โดยแช่ cotyledon explants ของผักนึ่งอายุ 7 วัน ในอาหารเหลว MS ที่มีเซลล์ *A. tumefaciens* EHA101 ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT1* (มียีน *SAT1* เพียงอย่างเดียว) หรือพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT1-rcs1* (มียีน *SAT1* ร่วมกับยีน *rcs1*) จำนวน 6.75×10^7 เซลล์/มิลลิลิตร มีอะซิโตไซริงอน (acetosyringone) เข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ เพื่อเป็นการชักนำให้เกิดการถ่ายโอนยีนจาก *A. tumefaciens* EHA101 เข้าสู่ผักนึ่ง บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 80 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำ cotyledon explants มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มีอะซิโตไซริงอนความเข้มข้นเดิม บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสในที่มืด เป็นเวลา 3 วัน ล้าง cotyledon explants ด้วยสารปฏิชีวนะเซฟโทแทคซิม (cefotaxime) ความเข้มข้นสุดท้าย 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เพื่อกำจัด

A. tumefaciens EHA101 ออก ชับให้แห้งแล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MMS ที่มีไธเดียซุรอน (thidiazuron) เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ และสารปฏิชีวนะเซฟโทรแทกซิมความเข้มข้นเดิม บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสีขาวความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ระยะเวลาการให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน เป็นเวลา 1 เดือน พบว่าผลการถ่ายโอนพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT1* เข้าสู่ผักนึ่งใช้ cotyledon explants 1,115 ชิ้น มีการงอกเป็นต้นใหม่ (shoot regeneration) 62 ต้น คิดเป็น 5.56 เปอร์เซ็นต์ และผลการถ่ายโอนพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT1-rcs1* เข้าสู่ผักนึ่งโดยวิธีเดียวกัน พบว่า cotyledon explants 1,853 ชิ้น มีการงอกเป็นต้นใหม่ 85 ต้น คิดเป็น 4.59 เปอร์เซ็นต์ น้อยกว่าที่ Akaracharanya และคณะ (2001) รายงานไว้ว่า การงอกเป็นต้นใหม่ของผักนึ่งจาก cotyledon explants ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนเบต้ากลูคูโรนิเดส (β -glucuronidase; GUS) เท่ากับ 75 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ cotyledon explants อายุ 7 วัน และใช้ไธเดียซุรอนเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ เป็นสารเร่งการงอกเป็นต้นใหม่ของผักนึ่งเช่นเดียวกับในงานวิจัยนี้ อย่างไรก็ตามผักนึ่งที่ Akaracharanya และคณะ (2001) ใช้ต่างสายพันธุ์กับในงานวิจัยนี้

เมื่อย้ายต้นอ่อนผักนึ่งที่ได้มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ซึ่งเติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเติมสารปฏิชีวนะเซฟโทรแทกซิมความเข้มข้นสุดท้าย 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่ภาวะเดียวกับข้างต้น เป็นเวลา 1 เดือน พบว่ามีต้นอ่อนผักนึ่งที่สามารถทนต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินได้เพียง 1 ต้น และ 2 ต้น คิดเป็น 1.61 เปอร์เซ็นต์ และ 2.35 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ย้ายต้นผักนึ่งดังกล่าวมาปลูกบนอาหารแข็ง MS ที่ปราศจากสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน เพื่อให้สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว และเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ แล้วนำต้นผักนึ่งมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการพีซีอาร์ ใช้ดีเอ็นเอไพรเมอร์ JSAT1 และ JSAT2 ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณยีน *SAT1* เพื่อตรวจหายีน *SAT1* และใช้ดีเอ็นเอไพรเมอร์ rcs1-1 และ rcs1-2 ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณยีน *rcs1* เพื่อตรวจหายีน *rcs1* พบว่าดีเอ็นเอของผักนึ่งที่คาดว่าได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT1* ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.0 กิโลเบส (ภาพที่ 5.16) ซึ่งเป็นขนาดของดีเอ็นเอที่ควรได้เมื่อใช้ยีน *SAT1* เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ เรียกต้นผักนึ่งนี้ว่าผักนึ่งแปลงพันธุ์ SAT1/ II และดีเอ็นเอของผักนึ่งที่คาดว่าได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT1-rcs1* ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.0 กิโลเบส (ภาพที่ 5.16) เมื่อใช้ดีเอ็นเอไพรเมอร์เพื่อเพิ่มยีน *SAT1* และเพื่อเพิ่มยีน *rcs1* ดังกล่าวข้างต้น ซึ่งเป็นขนาดของดีเอ็นเอที่ควรได้เมื่อใช้ยีน *SAT1* และ *rcs1* เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ เรียกต้นผักนึ่งทั้งสองต้นนี้ว่าผักนึ่งแปลงพันธุ์ SR3 และ SR10 แต่ไม่ได้แถบดีเอ็นเอเมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากต้นผักนึ่งพันธุ์เดิม แสดงว่าผักนึ่งแปลงพันธุ์ SAT1/ II มียีน *SAT1* สอดแทรกอยู่บนโครโมโซม และผักนึ่งแปลงพันธุ์ SR3 และ SR10 มียีน *SAT1* และยีน *rcs1* สอดแทรกอยู่บนโครโมโซมจริง

หลังจากการปลูกผักนึ่งแปลงพันธุ์ SAT1/II ได้ประมาณ 2-3 อาทิตย์ พบว่ามีการเจริญของลำต้นเพียงอย่างเดียว การเจริญของใบและการแตกกิ่งน้อยมาก ใบและต้นมีสีเหลือง และตายในที่สุด อาจเกิดจากแอซิติล-โคเอ (acetyl-CoA) ถูกนำมาใช้ในกระบวนการสังเคราะห์โอ-แอซิติล-แอลเซอร์ิน (O-acetyl-L-serine) มากกว่าปกติ โดยการเร่งปฏิกิริยาคด้วยเซอร์ินแอซิติลทรานส์เฟอเรสที่

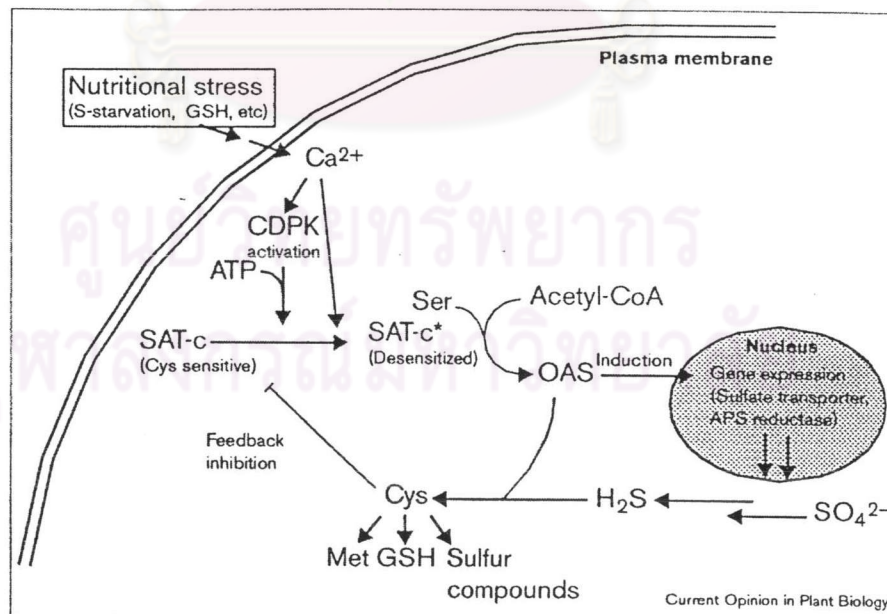
เพิ่มขึ้นเมื่อใช้แอสซิทิล-โคเอเป็นสับสเตรท ทำให้แอสซิทิล-โคเอในกระบวนการไกลโคลิซิส (glycolysis) ขาดแคลน จึงมีผลให้กระบวนการสังเคราะห์สารต่าง ๆ ที่จำเป็น และใช้แอสซิทิล-โคเอเป็นสับสเตรทเกิดน้อยกว่าหรือผิดปกติ อย่างไรก็ตามมีรายงานการถ่ายโอนยีนระบุรหัสเซอรินแอสซิทิลทรานส์เฟอเรส (SAT) เพียงอย่างเดียว และเป็นไอโซฟอร์มที่ไม่ถูกยับยั้งแบบย้อนกลับ (feedback inhibition) โดยกรดอะมิโนซิสเตอีนเช่นเดียวกับยีน SAT1 เข้าสู่พืช พบว่าพืชนั้นมีการเจริญปกติ นอกจากนั้นกิจกรรมของเซอรินแอสซิทิลทรานส์เฟอเรส และปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนในพืชแปลงพันธุ์ดังกล่าวยังสูงกว่าในพันธุ์เดิมอีกด้วย เช่น Harms และคณะ (2000) ถ่ายโอนยีน SAT จาก *E. coli* เข้าสู่มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum* cv. Désirée) พบว่ามันฝรั่งแปลงพันธุ์ที่ได้ทุกต้นมีกิจกรรมของเซอรินแอสซิทิลทรานส์เฟอเรส และปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนสูงกว่าจากต้นมันฝรั่งพันธุ์เดิม สอดคล้องกับที่ Blaszczyk และคณะ (1999) ถ่ายโอนยีน SAT จาก *E. coli* เข้าสู่ยาสูบ (*Nicotina tabacum*) โดยต้นยาสูบแปลงพันธุ์มีปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีน และกลูตาไธโอนสูงกว่าต้นยาสูบพันธุ์เดิม 4 เท่า และ 2 เท่าตามลำดับ เช่นเดียวกับการถ่ายโอนยีน SAT จากผักขม (*Spinacia oleracea* L.) เข้าสู่ยาสูบ โดย Noji และคณะ (2001)

การวิเคราะห์กิจกรรมของเซอรินแอสซิทิลทรานส์เฟอเรสในน้ำสกัดจากใบของผักนึ่งแปลงพันธุ์ SR3 และ SR10 โดยวิธีการวัดการลดลงของแอสซิทิล-โคเอ เทียบกับผักนึ่งแปลงพันธุ์ RCS1 ซึ่งมียีน *rsc1* เพียงอย่างเดียว และผักนึ่งพันธุ์เดิม พบว่าผักนึ่งแปลงพันธุ์ SR3 และ SR10 มีกิจกรรมของเซอรินแอสซิทิลทรานส์เฟอเรสสูงกว่าผักนึ่งแปลงพันธุ์ RCS1 และผักนึ่งพันธุ์เดิม ผักนึ่งแปลงพันธุ์ SR3 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด คือ 7.24 หน่วยเอนไซม์/มิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งสูงกว่า ผักนึ่งพันธุ์เดิม 2.52 เท่า สอดคล้องกับการวิเคราะห์กิจกรรมของเซอรินแอสซิทิลทรานส์เฟอเรสในน้ำสกัดจากใบของผักนึ่งแปลงพันธุ์โดยการวัดการเกิดโคเอ (CoA) ซึ่งพบว่าผักนึ่งแปลงพันธุ์ SR3 และ SR10 มีกิจกรรมของเซอรินแอสซิทิลทรานส์เฟอเรสสูงกว่าผักนึ่งแปลงพันธุ์ RCS1 และผักนึ่งพันธุ์เดิม ผักนึ่งแปลงพันธุ์ SR3 มีกิจกรรมของเซอรินแอสซิทิลทรานส์เฟอเรสสูงสุด คือ 4.99 หน่วยเอนไซม์/มิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งสูงกว่า ผักนึ่งพันธุ์เดิม 2.29 เท่า และกิจกรรมจำเพาะของเซอรินแอสซิทิลทรานส์เฟอเรสโดยการวิเคราะห์ทั้งสองวิธีในผักนึ่งทุกพันธุ์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากตำแหน่งบนโครโมโซมของผักนึ่งที่ยีน SAT1 และยีน *rsc1* สอดแทรกอยู่ต่างกัน จึงส่งผลต่อการแสดงออกของยีนทั้งสองในต้นผักนึ่งแปลงพันธุ์ SR3 และ SR10 ไม่เท่ากัน และการถอดรหัส (transcription) ของยีน SAT1 เกิดที่นิวเคลียส จากนั้นจึงแปลรหัส (translation) ในไซโตพลาซึมแล้วไปทำงานในคลอโรพลาสต์ ซึ่งเป็นบริเวณกระบวนการ reduction ของซัลเฟตสูงที่สุด (Saito, 2000) จึงเป็นไปได้ว่าการขนส่งเซอรินแอสซิทิลทรานส์เฟอเรสไปยังคลอโรพลาสต์ในต้นผักนึ่งแปลงพันธุ์ SR3 และ SR10 เกิดในอัตราต่างกัน

ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสในน้ำสกัดจากใบของผักนึ่งแปลงพันธุ์ SR3 และ SR10 เทียบกับผักนึ่งแปลงพันธุ์ RCS1 และผักนึ่งพันธุ์เดิม พบว่าผักนึ่งแปลงพันธุ์ SR3 และ SR10 มีกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสสูงกว่าผักนึ่งแปลงพันธุ์ RCS1 และผักนึ่งพันธุ์เดิม โดยผักนึ่งแปลง

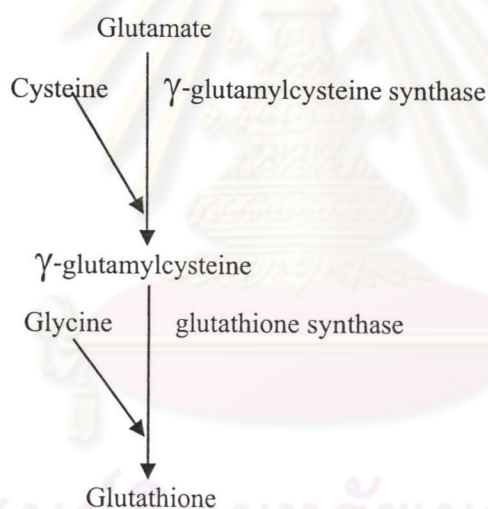
พันธุ์ SR3 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดคือ 3.47 หน่วยเอนไซม์/มิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งสูงกว่าผักบั้งพันธุ์เดิม 4.13 เท่า และสูงกว่าผักบั้งแปลงพันธุ์ RCS1 1.24 เท่า ในขณะที่กิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสของผักบั้งแปลงพันธุ์ SR10 ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับของผักบั้งแปลงพันธุ์ RCS1 เช่นเดียวกับกรณีการวิเคราะห์กิจกรรมของเซอรินแอซีทิลทรานส์เฟอเรสในน้ำสกัดจากใบของผักบั้งคือ ตำแหน่งบนโครโมโซมของผักบั้งที่ยีน *SAT1* และยีน *rcs1* สอดแทรกอยู่ต่างกัน จึงส่งผลต่อการแสดงออกของยีนทั้งสองในต้นผักบั้งแปลงพันธุ์ SR3 และ SR10 ไม่เท่ากัน ด้วยเหตุผลดังกล่าวและเนื่องจากไม่ได้วิเคราะห์กิจกรรมของเซอรินแอซีทิลทรานส์เฟอเรสและซิสเตอีนซินเตสของต้นผักบั้งแปลงพันธุ์ที่มียีน *SAT1* เพียงอย่างเดียว จึงไม่สามารถสรุปได้ว่าการถ่ายโอนยีน *SAT1* ร่วมกับยีน *rcs1* เข้าสู่ผักบั้งจีน ทำให้กิจกรรมของเซอรินแอซีทิลทรานส์เฟอเรสและซิสเตอีนซินเตสสูงกว่าการถ่ายโอนยีน *rcs1* หรือยีน *SAT1* เพียงยีนเดียวเข้าสู่ผักบั้งจีนหรือไม่ นอกจากนี้การแสดงออกของยีนต่าง ๆ ในกระบวนการ sulfate assimilation ยังถูกควบคุมด้วยแสง ภาวะขาดแคลนไนโตรเจน และสารอาหารบางชนิดอีกด้วย (Saito,2000) ดังแสดงในภาพที่ 6.1

เนื่องจากบริเวณ C- terminal ของเซอรินแอซีทิลทรานส์เฟอเรสเป็นบริเวณที่เกิดการจับเป็น dimer กับซิสเตอีนซินเตส (Wirtz, 2001) ดังนั้นการแปลรหัสของเซอรินแอซีทิลทรานส์เฟอเรสที่เพิ่มขึ้น และการเพิ่มขึ้นของโอ-แอซีทิล-แอล-เซอรินซึ่งเป็นปัจจัยจำกัดของกระบวนการ sulfate assimilation โดยการเร่งปฏิกิริยาของเซอรินแอซีทิลทรานส์เฟอเรส น่าจะทำให้กิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสเพิ่มขึ้นด้วย



ภาพที่ 6.1 การควบคุมกระบวนการ sulfate transport and assimilation (Saito,2000)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไรโอนในใบของผักบุ้งแปลง พันธุ์ SR3 และ SR10 ผักบุ้งแปลงพันธุ์ RCS1 เปรียบเทียบกับผักบุ้งพันธุ์เดิม โดยวิธี HPLC พบว่าผักบุ้ง แปลงพันธุ์ทุกสายพันธุ์มีปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไรโอนสูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม โดยผักบุ้ง แปลงพันธุ์ SR3 และ SR10 มีปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีน 62.92 พิโคโมล/น้ำหนักใบ 1 มิลลิกรัม และ 53.77 พิโคโมล/น้ำหนักใบ 1 มิลลิกรัม ซึ่งสูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม 7.6 เท่า และ 6.5 เท่า ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณกลูตาไรโอนของผักบุ้งแปลงพันธุ์ SR3 และ SR10 คือ 22.65 พิโคโมล/น้ำหนักใบ 1 มิลลิกรัม และ 51.41 พิโคโมล/น้ำหนักใบ 1 มิลลิกรัม ซึ่งสูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม 1.4 เท่า และ 3 เท่า ตามลำดับ ผักบุ้งแปลงพันธุ์ SR3 มีกรดอะมิโนซิสเตอีนมากกว่าผักบุ้งแปลงพันธุ์ SR10 แต่มีปริมาณ กลูตาไรโอนน้อยกว่า เนื่องจากผักบุ้งแปลงพันธุ์ SR10 นำกรดอะมิโนซิสเตอีนไปใช้ในการสังเคราะห์ กลูตาไรโอนมากกว่าผักบุ้งแปลงพันธุ์ SR3 กระบวน การสังเคราะห์กลูตาไรโอนในพืชแสดงในภาพที่ 6.2



ภาพที่ 6.2 กระบวนการสังเคราะห์กลูตาไรโอน (Saito, 2000)

ประสิทธิภาพการดูดซับซัลเฟตของผักบุ้งแปลงพันธุ์ SR3 และ SR10 เทียบกับผักบุ้ง แปลงพันธุ์ RCS1 และผักบุ้งพันธุ์เดิม พบว่าผักบุ้งแปลงพันธุ์ SR3 และ SR10 มีประสิทธิภาพการดูด ซักซัลเฟตสูงกว่าผักบุ้งแปลงพันธุ์ RCS1 และผักบุ้งพันธุ์เดิม ผักบุ้งแปลงพันธุ์ SR3 มีประสิทธิภาพการ ดูดซัลเฟตสูงสุด เท่ากับ 21.17 มิลลิกรัมซัลเฟต/กรัมน้ำหนักเปียกของผักบุ้ง ซึ่งสูงกว่าผักบุ้งพันธุ์ เดิม 5.5 เท่า และสูงกว่าผักบุ้งแปลงพันธุ์ RCS1 2.19 เท่า

จากผลการทดลองทั้งหมดสรุปได้ว่า การถ่ายโอนยีน *SAT1* และ ยีน *rcs1* เข้าสู่ ผักบู้จิ้นทำให้ผักบู้จิ้นมีประสิทธิภาพการดูดซับซัลเฟตสูงกว่าผักบู้จิ้นพันธุ์เดิม และผักบู้จิ้นที่มียีน *rcs1* เพียงอย่างเดียว ผลที่ได้สนับสนุนสมมติฐานของ Ruffet และคณะ (1994) ที่ว่าเซอรินแอซิติลทรานส์เฟอเรสน่าจะเป็นเอนไซม์สำคัญ (key step enzyme) ของกระบวนการ sulfate assimilation โดยควบคุมกระบวนการผ่านปริมาณของโอ-แอซิติล-แอล-เซอริน (O-acetyl-L-serine) ผักบู้จิ้นแปลงพันธุ์ที่ได้มีศักยภาพที่จะนำไปใช้บำบัดซัลเฟตใน biological pond ที่เหมืองแม่เมาะ จ.ลำปาง เพราะเป็นแหล่งน้ำที่มี pH เป็นกลาง และไม่มีโลหะหนักปนเปื้อน



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย