บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

เนื้อเยื่อกระสังเพื่อใช้เป็นระบบทดลอง

กระสังเป็นวัชพืชที่ขึ้นอยู่ตามที่ร่ม ที่ชุ่มชื้น ปัจจัยเหล่านี้เองทำให้กระสังมีโอกาสในการปนเปื้อนของเชื้อราและแบคทีเรียสูงตามไปด้วย ในการนำกระสังมาใช้เป็นวัสดุในการวิจัยจึงเลือกใช้เมล็ดมาเป็นวัตถุดิบเริ่มต้น เนื่องจากเมล็ดสามารถเก็บไว้ได้นานรวมทั้งมีความสะดวกและง่ายต่อการเก็บรักษา โดยปกติกระสังเป็นพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยเมล็ด ซึ่งในสภาพแวดล้อมทั่วไปแล้วสามารถงอกได้เองตามธรรมชาติ และมีอัตราการงอกในปริมาณที่สูงมาก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่อเมล็ดอยู่ในภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม มีความชุ่มชื้นเพียงพอก็จะสามารถงอกต้นอ่อนได้

เริ่มจากใช้เมล็ดพันธุ์กระสัง มาเป็นวัสดุที่ใช้ในการวิจัย พบว่าชุดการทดลองที่ใช้เวลาในการฟอกด้วย $HgCl_2$ ความเข้มข้น 0.25% เป็นเวลา 3 นาที ไม่พบการปนเปื้อน และอัตราการงอกคิดเป็นร้อยละ 38.33 % จากอัตราการงอกในทางทฤษฎีการงอกคิดเป็น 100% เงื่อนไขการฟอกนี้ต่างไปจากที่ Kintzios *et al.*(1996) ได้รายงานไว้ในพริกไทยซึ่งเป็นพืชชนิดใกล้เคียง ที่ 0.1% นาน 12 นาที อย่างไรก็ดีการฟอกเมล็ดซึ่งเป็นส่วนที่แข็งแรง การใช้ความเข้มข้นสูงจึงมีความเหมาะสมมากกว่า

ต้นอ่อนที่ได้จากการเพาะเมล็ดวิธีดังกล่าวมีความสมบูรณ์ไม่พบลักษณะผิดปกติที่เกิดจากผลของการฟอกฆ่าเชื้อด้วย $HgCl_2$ มีความแข็งแรงสามารถเจริญเติบโตได้ดี โดยภายในระยะเวลา 2 สัปดาห์ ต้นอ่อนจะเจริญจนมีความสูง 1.5 – 1.7 เซนติเมตร และให้ใบเขียว 2 - 3 ใบ ที่ย้ายลงในอาหารแข็งสูตรพื้นฐาน MS เพื่อเลี้ยงแยกเตรียมเป็นต้นสำหรับการทดลองต่อไป กระสังสามารถเพิ่มจำนวนต้นได้อย่างรวดเร็ว ในภาวะดังกล่าว โดยการตัดบริเวณส่วนของข้อ แล้วนำไปวางลงในอาหารสูตรพื้นฐาน MS ตาข้างจะงอกส่วนของยอดอ่อนภายในเวลา 1 สัปดาห์ และสามารถเจริญเป็นต้นปลอดเชื้อเพื่อใช้สำหรับการทดลองได้ภายในระยะเวลา 1 เดือน

เนื่องจากกระสังเป็นพืชอวบน้ำ ที่มีอัตราการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว มีวงชีวิตตั้งแต่เมล็ดจนถึงออกดอกเพียง 5 – 8 สัปดาห์ จึงมีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการที่จะใช้เป็นระบบในการศึกษาการถ่ายยีน ไม่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจ ต่างจากที่ผ่านมาพืชที่ใช้ในการศึกษาระบบการถ่ายยีนจะต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งนอกจากจะมีราคาแพงแล้ว ไม่เหมาะสมกับสถาพภูมิอากาศในเมืองไทยอีกด้วย ในการศึกษาระบบการถ่ายยีนในพืช จำเป็นต้องมีการศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยเฉพาะศึกษาการชักนำให้เกิดการพัฒนาเป็นแคลลัสและพัฒนาจากแคลลัสกลายเป็นต้น เพื่อเป็นระบบรองรับสำหรับการถ่ายยีน

พบว่าสูตรอาหารพื้นฐานMS ที่เติมสารเร่งการเจริญเติบโต คือ NAA 1 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ให้ค่าเฉลี่ยขนาดแคลลัสที่มีขนาดใหญ่ที่สุด และสูตรอาหารพื้นฐานMS ที่เติมสารเร่งการเจริญเติบโตคือ NAA 0 มิลลิกรัมต่อลิตร และ kinetin 3 มิลลิกรัมต่อลิตร ชักนำให้แคลลัสเจริญเป็นต้นและให้ค่าเฉลี่ยจำนวนต้นและความสูงของต้นมากที่สุด ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการรายงานของ Agrawal และคณะที่ศึกษาการเกิดใหม่ของเนื้อเยื่อสำหรับพัฒนาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพริกไทย(*Capsicum annuum* L. CV. *mathania*) ที่พบว่าการเติมสารเร่งการเจริญเติบโต auxin ในอาหารสูตรพื้นฐานMS เพียงอย่างเดียวไม่มีผลต่อการชักนำให้เกิดต้น การเปลี่ยนไปของใบเป็นแคลลัสและเป็นตายอดจำเป็นต้องมีสารเร่งการเจริญเติบโต kinetin ซึ่งเป็นฮอร์โมนในกลุ่ม Cytokinin ลงไปด้วย(Agrawal *et al*, 1998) ในต้นกระสังพบว่าเมื่อย้ายยอดอ่อนลงปลูกในอาหารสูตรพื้นฐานMS ยอดอ่อนกระสังสามารถงอกรากใหม่ออกมาให้กลายเป็นต้นใหม่ที่สมบูรณ์ได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าภายในเนื้อเยื่อกระสังมีระดับของสารเร่งการเจริญเติบโตจำพวก auxin สูงกว่า cytokinin จึงทำให้เกิดรากได้โดยธรรมชาติ ซึ่งพบว่าปัจจัยดังกล่าวเกิดเนื่องจาก อัตราส่วนระหว่างสารเร่งการเจริญเติบโตของพืช 2 ชนิด นั่นเอง(Slater *et al.*, 2004)

ที่ผ่านมามีการศึกษาการถ่ายยีนโปรตีนที่สำคัญทางการแพทย์ ในพืชหลายชนิดเช่น ยาสูบ มะเขือเทศ มันฝรั่ง ถั่วอัลฟาฟ่า เป็นต้น (Veronique and Loic, 2004) ซึ่งจากการศึกษาพบว่าต่างก็มีข้อจำกัด โดยเฉพาะยาสูบพบว่าสารสกัดที่ได้มีการปนเปื้อนของอัลคาลอยด์ที่เป็นพิษ (Warzecha and Mason, 2003.) นอกจากนี้แล้ว พืชเหล่านี้ยังได้รับการศึกษาและพัฒนาในรูปสิทธิบัตรในต่างประเทศแล้ว ทำให้การนำพัฒนาต่อยอดเพื่อให้เกิดเป็นเทคโนโลยีของคนไทยมีข้อจำกัด

ในการศึกษาระบบในการถ่ายยีน โดยใช้ยีน *BAR* เป็นต้นแบบนั้น Kang และคณะรายงานการแสดงออกของยีน *bar* ในคลอโรพลาสต์ของยาสูบที่ต้านทานยาปราบวัชพืช โดยได้ศึกษาระบบการถ่ายยีนในคลอโรพลาสต์ของต้นยาสูบ พบว่าการแสดงออกคลอโรพลาสต์ที่ได้รับยีน *bar* จะมีความทนต่อยาปราบวัชพืชฟอสฟิโนตริซิน(phosphinothricin) จากการตรวจด้วยวิธีพีซีอาร์ และเซาร์เทิร์นบล็อท ยืนยันว่ามีชิ้นยีน *bar* แทรกอยู่ในจีโนมของคลอโรพลาสต์ หลังจากที่ย้ายต้นยาสูบที่ได้รับยีนออกปลูกในโรงเรือนพบว่าต้นยาสูบมีความทนต่อยาปราบวัชพืชที่ความเข้มข้น 2 %

ในการคัดเลือกพืชที่ได้รับการถ่ายยีนก็เช่นเดียวกัน สามารถคัดเลือกได้จากความสามารถในการต้านทานยาปราบวัชพืช ซึ่งค่าที่เหมาะสมในการใช้คัดเลือก สามารถหาได้โดยใช้ความ

เข้มข้นของยาปราบวัชพืชที่มีผลให้ชิ้นเยื่อที่ใช้ในการทดสอบมีอัตราการตาย 50 % ซึ่งเรียกว่าค่า LD_{50} (lethal dose 50)ซึ่งในกระสังก็เช่นเดียวกัน จากการทดลองพบว่าค่าความเข้มข้นที่ทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อกระสังที่ใช้ในการทดสอบมีอัตราการตาย 50 % อยู่ที่ความเข้มข้น 20 ppm. ซึ่งได้ใช้เข้มข้นที่เหมาะสมนี้เป็นตัวคัดเลือกพืชที่ได้รับยีน ตลอดทั้งการทดลอง และเมื่อใช้ยีน *bar* เป็นมาร์คเกอร์ในการพัฒนาระบบการถ่ายยีนในกระสังพบว่าในการศึกษาเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการถ่ายยีน การใช้สารละลาย 1%โพลีเอทธิลีนไกลคอลร่วมกับแคลเซี่ยมคลอไรด์ และใช้ไฟฟ้ากระแสตรง 50 โวลล์ช็อตเซลล์เป็นเวลา 20 วินาทีมีความเหมาะสม เนื่องจากคุณสมบัติของดีเอ็นเอที่มีประจุเป็นลบ เมื่ออยู่ภายใต้สนามไฟฟ้าร่วมกับบาดแผลที่เกิดผนังเซลล์ขนาดเล็ก ซึ่งเป็นผลจากการทำปฏิกิริยากับ1%โพลีเอทธิลีนไกลคอลและแคลเซี่ยมคลอไรด์และเนื่องจากความเข้มข้นของดีเอ็นเอภายนอกเซลล์สูงกว่าภายในมาก เนื่องจากในระบบได้ใส่ดีเอ็นเอพลาสมิดเทียบเท่ากับ 8 pmol DNA ซึ่งมีจำนวนของโมเลกุลประมาณ 4.8 แสนล้านโมเลกุล ทำให้เซลล์สามารถดึงให้ดีเอ็นเอแทรกเข้าไปในเซลล์ได้โดยวัดจาก อัตราการรอดของชิ้นเนื้อเยื่อภายหลังจากที่ผ่านการคัดเลือกด้วยยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส

วิธีการถ่ายยีนโดยการใช้กระแสไฟฟ้ารูปแบบนี้เป็นวิธีที่มีต้นทุนต่ำ เนื่องจากตัวส่งผ่านกระแสไฟฟ้าสามารถผลิตขึ้นได้เองในห้องปฏิบัติการทรานเจนิกแพลนท์และไบโอเซนเซอร์เทคโนโลยี รวมทั้งขั้นตอนในการถ่ายยีนก็ไม่ยุ่งยากซับซ้อน และที่สำคัญเป็นวิธีการที่พัฒนาขึ้นเป็นครั้งแรกทำให้สามารถพัฒนาต่อยอดเพื่อการจดสิทธิบัตรได้

ในส่วนการตรวจสอบพืชที่ได้รับการถ่ายยีน *bar* นอกจากการคัดเลือกเบื้องต้นโดยใช้ยาปราบวัชพืชแล้วผลการทดลองโดยการ ตรวจสอบซ้ำด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับยีน bar ที่ออกแบบไว้แล้ว สามารถยืนยันผลว่ายีน *bar* ได้แทรกตัวอยู่ในชั้นเนื้อเยื่อจริงและผลการตรวจสอบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน และตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR ต่างก็ได้ผลยืนยัน ว่ายีน *bar* มีการแสดงออกในรูป mRNA จริง แต่อย่างไรก็ดีเนื่องจากความสามารถในการต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส จะไม่เกิดขึ้นหากไม่มีเอนไซม์phosphinotricin actyltransferase(PAT)ที่สร้างจากยีนที่สร้างจากยีน *bar* ดังนั้นในการทดลองจึงไม่ได้ตรวจสอบในระบบโปรตีนเนื่องจากไม่มีความจำเป็น

การสังเคราะห์ชุดของยีนกลูโคเซเรโบรซิเดส โดยใช้เทคนิค ligation RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ความจำเพาะเจาะจงกับชิ้นยีน GBA ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากปฏิกิริยาเมื่อเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน พบว่ามีขนาด 570 และ 1338 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งสอดคล้องกับขนาดของชิ้นยีน ตามที่คาดหวัง ผลิตภัณฑ์ พีซีอาร์ทั้งสองชนิด มีบริเวณที่สามารถเชื่อมต่อกันได้ บริเวณตำแหน่งที่ 423

ถึง 463 หลังจากเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ทั้งสองชนิดเข้าด้วยกันโดยเทคนิค PCR ligation amplification อีกครั้งได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ชิ้นยีนของ GBA ขนาด 1,900 นิวคลีโอไทล์ จากนั้นนำไปโคลนเข้ากับ *pBICBAR* ทำการเลี้ยงและคัดเลือกแบคทีเรียที่ได้รับยีน ตรวจสอบพลาสมิดที่ได้โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานพบว่ามีขนาดสอดคล้องกันกับยีน GBA

ผลการถ่ายยีน GBA เข้าสู่กระสังโดยวิธีใช้ไฟฟ้ากระแสตรงร่วมกับ 1% PEG $CaCl_2$ 1 mM. และดำเนินการคัดเลือกบนความสามารถในการต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส ได้คัดเลือกชิ้นเนื้อเยื่อที่ต้านทานยาปราบวัชพืชที่อายุ 15 วัน 2 ชิ้น ตรวจสอบชิ้นยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับยีน GBA พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเป้าหมายได้ แสดงถึงการปรากฎของชิ้นยีนในชิ้นของเนื้อเยื่อ ได้ตรวจสอบการแสดงออกของยีนเพิ่มเติมด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้น cDNA เป้าหมาย ขนาดที่สอดคล้องกับขนาดทางทฤษฎีเช่นกันทั้ง 2 ตัวอย่าง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการถ่ายยีนประสบความสำเร็จ อย่างไรก็ดีการทดลองไม่สามารถการทดลองไม่สามารถตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนได้นั้น เนื่องจากต้องใช้เวลาในการสั่งสารเคมีเป็นเวลานาน ทางห้องปฏิบัติการไม่สามารถจัดซื้อได้ทัน ดังนั้นจึงจะตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนเพื่อยืนยันผลด้วยเทคนิคไบโอเซ็นเซอร์

จากผลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่ากระสังเป็นพืชที่มีศักยภาพและความเหมาะสมที่จะใช้เป็นระบบในการถ่ายยีนหรือเพื่อพัฒนาให้เป็นระบบในการผลิตโปรตีนที่สำคัญในทางการแพทย์ นอกจากนี้แล้วยังได้พัฒนาอุปกรณ์ที่ใช้ในการถ่ายยีนที่มีความเหมาะสมและมีต้นทุนในการถ่ายยีนต่ำอีกด้วย