

บทที่ 5

บทย่อ สรุปผล อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

1. บทย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีน V-ATPase G Subunit ของยางพารา ซึ่งเป็นโปรตีนที่พืชสร้างขึ้นเมื่ออยู่ในภาวะเครียด (Stress) พร้อมทั้งทดสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อโปรตีน V-ATPase G Subunit ของยางพาราเพื่อนำไปพัฒนาไปเป็นชุดตรวจสอบสายพันธุ์ยางที่ให้ผลผลิตสูงและทนเค็ม ทนแล้ง โดยสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์จีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* ของยางพาราสายพันธุ์ RRIT 251 แล้วถ่ายรีคอมบิแนนท์จีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* เข้าสู่แบคทีเรีย *E.coli* One Shot® TOP10 และตรวจสอบยืนยันเป้าหมายโดยนำพลาสมิดที่เตรียมได้ไปเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR ซึ่งใช้ Primer ที่จำเพาะกับยีน *V-ATPase G Subunit* จากนั้น Subclone รีคอมบิแนนท์จีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* เข้าสู่ *E.coli* BL21 Star™ (DE3) One Shot® เพื่อให้มีการสังเคราะห์โปรตีน V-ATPase G Subunit นำเซลล์แบคทีเรียมาทำให้แตกและแยกโปรตีนโดยการทำ SDS-PAGE ตัดแถบโปรตีน V-ATPase G Subunit แยกออกจากเจล จากนั้นนำรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ที่ได้ไปฉีดให้กับกระต่ายเป็นระยะเวลา 4 เดือน แล้วเก็บเลือดกระต่าย (Serum) มาตรวจสอบความจำเพาะกับโปรตีน V-ATPase G Subunit ในยางพาราโดยวิธี Western Blot ผลปรากฏว่ามีการจับกันระหว่างโปรตีน V-ATPase G Subunit ของยางพาราและแอนติบอดีที่ผลิตได้จากกระต่ายแสดงว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้จากกระต่ายเป็น V-ATPase G Subunit Antibody

2. สรุปผล

จากการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน V-ATPase G Subunit ในยางพารา สรุปผลได้ดังนี้

2.1 รีคอมบิแนนท์จีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* ของยางพาราที่เชื่อมต่อกับ pET100/D-TOPO® Vector มีลำดับเบส Open Reading Frame ของยีน *V-ATPase G Subunit* ที่ถูกต้องเมื่อเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เปลื้องได้รายงานไว้

2.2 *E.coli* BL21 StarTM(DE3) One Short[®] ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* สามารถสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน *V-ATPase G Subunit* ที่ความเข้มข้นของ IPTG 0.5 mM อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2.3 รีคอมบิแนนท์โปรตีน *V-ATPase G Subunit* ที่สังเคราะห์ใน *E.coli* BL21 StarTM(DE3) One Short[®] สามารถกระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน *V-ATPase G Subunit*

2.4 *V-ATPase G Subunit* Antibody ในซีรัมกระต่ายมีความจำเพาะกับโปรตีน *V-ATPase G Subunit* ของยางพารา

3. อภิปรายผล

3.1 การสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอของยีน *V-ATPase G Subunit* ในยางพารา

จากการออกแบบ Primer สำหรับสังเคราะห์ cDNA ของยีน *V-ATPase G Subunit* จากใบยางพาราสายพันธุ์ RRIT 251 แล้วนำมาเชื่อมต่อกับ pET 100/D-TOPO[®] โดยอาศัยเอนไซม์ TOPO Isomerase แล้วถ่ายโอนเข้าสู่ *E.coli* One Short[®] TOP10 นำโคลนที่คัดเลือกได้ ไปเตรียมพลาสมิดและวิเคราะห์ DNA ของยีน *V-ATPase G Subunit* ที่เชื่อมกับพลาสมิดด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ Primer ที่จำเพาะกับยีน *V-ATPase G Subunit* พบว่าได้แถบ DNA ขนาดเดียวกับที่ใช้อย่างเป็น Primer เมื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pET 100/D-TOPO[®] เรียงลำดับต่อเนื่องกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *V-ATPase G Subunit* แสดงว่า pET 100/D-TOPO[®] เชื่อมต่อกับยีน *V-ATPase G Subunit* ในตำแหน่งของ Open Reading Frame ที่ถูกต้อง เมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน Genbank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีค่า Identity 91% กับยีน *Vacuolar ATP Synthase Subunit G* ของกะทิง (*Ricinus communis*) (Accession no. GAHH01014188.1, E value = 1e-25) ซึ่งแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน 110 กรดอะมิโน และมวลโมเลกุลเท่ากับ 12.35 กิโลดาลตัน ค่า pI เท่ากับ 6.38 โดยใช้โปรแกรม Compute pI/Mw (http://web.expasy.org/compute_pi/)

3.2 การสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน *V-ATPase G Subunit*

เมื่อนำตะกอนเชื้อ *E.coli* BL21 StarTM(DE3) One Short[®] ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* ซึ่งเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ในสภาพ Uninduced และ Induced ด้วย IPTG 0.5 0.7 0.9 1.2 และ 1.5 mM มาเตรียมสารละลายโปรตีนด้วยวิธี Freeze-Thaw Lysis และวิเคราะห์โปรตีนด้วย SDS-PAGE พบว่า ความเข้มข้นของ IPTG ทุก

ระดับความเข้มข้น สามารถเห็นว่าการสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ได้ใกล้เคียงกัน แต่โปรตีนอยู่ในส่วนของ Pellet แสดงว่าเป็น Inclusion Body ซึ่งรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ดีสามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์ได้ง่ายจะต้องอยู่ในรูปของ Soluble Protein จึงได้เลี้ยงเซลล์ภายในสภาวะต่างๆที่เหมาะสมต่อการเห็นวนำให้ได้ Soluble Protein โดยเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มี IPTG ความเข้มข้น 0.5 mM ที่อุณหภูมิ 25 30 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าเซลล์สามารถสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สำหรับที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ไม่มีการสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit และที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีการสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ได้น้อยกว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แต่รีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ยังอยู่ในรูป Inclusion body จึงเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มี IPTG ความเข้มข้น 0.5 mM ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 6 และ 16 ชั่วโมง พบว่ามีการสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ได้ไม่แตกต่างกัน และรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ยังคงอยู่ในรูปของ Inclusion body การสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีนของยูคาริโอตในแบคทีเรีย ส่วนใหญ่จะพบโปรตีนในรูปของ Inclusion body ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Rao, Gullipalli and Bhuyan.(2009: 53-60) ที่สังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน Apaf-1 ของคนใน *E.coli* BL21 DE3 และเลี้ยงเซลล์ในสภาวะต่างๆที่เหมาะสมต่อการเกิด Soluble Protein แต่รีคอมบิแนนท์โปรตีน ยังคงอยู่ใน Inclusion Body เช่นเดียวกัน

3.3 การแยกรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ให้บริสุทธิ์และการผลิตโพลี

โคลนอลแอนติบอดีในกระต่าย

เมื่อเลี้ยงเซลล์ *E.coli* BL21 StarTM(DE3) One Short[®] ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* ไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง(OD~0.6) ในสภาพ Induced ด้วย IPTG 0.5 mM เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึง Centrifuge ที่ 5,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อแยกอาหารออก นำเซลล์ดังกล่าวแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย Sodium Dodecyl Sulfate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis(SDS-PAGE) เป็นการแยกโปรตีนโดยใช้เจลโพลีอะครีลาไมด์จะเกิดปฏิกิริยาการเชื่อมต่อกันของโมเลกุลเดี่ยว(Monomer) ของอะครีลาไมด์ จนได้เป็นสายโซ่ยาวและเชื่อมต่อกันด้วยพันธะโคเวเลนต์(Covalent Bond) ซึ่งมีหมู่ฟังก์ชัน 2 หมู่ คือ N, N-Methylene Bisacrylamide ที่มีตัวเร่งปฏิกิริยาเป็น Ammonium Persulfate และ N, N, N', N'-Tetramethylene Diamine (TEMED) จะเร่งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระจาก Persulfate ทำให้เกิด Polymerization ขึ้น จากปฏิกิริยานี้ทำให้โครงสร้างมีลักษณะเป็นรูพรุน ซึ่งรูพรุนของเจล

โพลีอะคริลาไมด์ นี้จะแปรผกผันกับความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ ในส่วนผสมของเจล ถ้าอะคริลาไมด์มีความเข้มข้นต่ำ ขนาดรูพรุนจะใหญ่ ซึ่งเหมาะแก่การแยกโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ แต่ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของ เจลโพลีอะคริลาไมด์ให้สูงขึ้นขนาดรูพรุนจะเล็กลงเหมาะแก่การแยกโปรตีนขนาดเล็ก การแยกโปรตีนส่วนใหญ่ใช้เจลที่มีความเข้มข้นของ อะคริลาไมด์อยู่ในช่วงร้อยละ 5-15 ในการแยกโปรตีนด้วย อะคริลาไมด์มี 2 ประเภท คือ ประเภทที่ไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ (Non-Denaturing Gel หรือ Native Gel Electrophoresis) วิธีนี้โปรตีนจะอยู่ในสภาพธรรมชาติ โปรตีนที่แยกมาได้สามารถนำไปตรวจหา Activity ได้ แต่ไม่สามารถแยกความแตกต่างของรูปร่าง ขนาด หรือประจุของโปรตีนได้ และประเภทที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ โปรตีนที่แยกได้ไม่สามารถนำมาทดสอบหา Activity ได้ แต่บอกน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ต่างกันได้ วิธีนี้จึงนำมาใช้ในการตรวจหาความบริสุทธิ์และขนาดของโปรตีน รวมทั้งสามารถนำไปตรวจหาคุณสมบัติของโปรตีนทางอิมมูโนวิทยา โดยวิธีการทำ Western Blot สำหรับการแยกโปรตีนในวิธีนี้ ได้แก่ SDS-PAGE ซึ่ง SDS เป็นสาร Detergent ทำให้โปรตีนเสียสภาพเปลี่ยนสภาพจากทรงกลม(Globular)ไปอยู่ในสภาพเหยียดตรง โดย SDS มีประจุเป็นลบจะไปเกาะกับโปรตีน ทำให้โปรตีนทั้งหมดมีประจุเป็นลบ ซึ่ง SDS จะจับกับโปรตีนในอัตราส่วนน้ำหนักคงที่ (1.4 กรัมของ SDS ต่อโพลีเพปไทด์ 1 กรัม) ทำให้โปรตีนทุกชนิดมีค่าความหนาแน่นของประจุน้ำหนักโปรตีนเท่ากัน ดังนั้นการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของโปรตีนจึงเป็นการเคลื่อนที่โดยอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุล โดยจะเป็นการเคลื่อนที่จากขั้วไฟฟ้าลบไปสู่ขั้วไฟฟ้าบวกในอัตราส่วนผกผันกับค่า log ของน้ำหนักโมเลกุล ซึ่งสามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนได้ จากระยะการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่ต้องการทราบน้ำหนักโมเลกุลกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแล้ว นอกจากนี้การปรากฏของแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวใน SDS-PAGE ยังเป็นตัวบ่งชี้ถึงความบริสุทธิ์ของโปรตีน สำหรับวิธีการ SDS-PAGE ต้องทำให้โปรตีนตัวอย่างให้เสียสภาพโดยความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2-5 นาที ในสารละลายที่มี SDS มากเกินพอและมีสารประเภทไทออล(Thiol) เป็นองค์ประกอบเช่น B-Mercaptoethanol เพื่อทำลายพันธะไดซัลไฟด์ในโปรตีน ซึ่งในภาวะนี้โปรตีนจะจับกับ SDS ในอัตราส่วนน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำตัวอย่างโปรตีนใส่ในแท่งของแผ่นเจล และนำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้า ซึ่งทั้งเจลและ Buffer ที่ใช้ในการแยกมี SDS เป็นองค์ประกอบอยู่ (สายทิพย์ ซาปาวี, 2555: 19-22) ภายหลังการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าจึงตัดแถบของรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit จากเจลนำไปบดใน 1M PBS แล้ว Centrifuge ที่ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที คัดส่วนใสเก็บไว้ตรวจสอบโดยการทำ SDS-PAGE พบว่า เมื่อนำรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ไปทำ SDS-PAGE สามารถแยกรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ได้เพียงแถบเดียวไม่มีการปนเปื้อนของโปรตีนชนิดอื่น แสดงว่า

รีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ที่แยกได้มีความบริสุทธิ์ สามารถนำไปฉีดกระตุ้นให้กับกระต่ายได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ ริซซงและคณะ (Rizhong *et al.* 2009: 602-607) โดยโคลนยีน V-PPase จากยางพารา เข้าสู่ pET 22b แล้วถ่ายเข้าสู่ *E.coli* BL21 (DE3) ใช้ IPTG ชักนำให้มีการสร้างโปรตีน V-PPase แยกโปรตีน V-PPase โดยวิธีการ SDS-PAGE ตัดแถบโปรตีนไปบดในไนโตรเจน แล้วนำโปรตีนดังกล่าวไปฉีดกระตุ้นได้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน V-PPase จากยางพารา

เมื่อแยกรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ให้บริสุทธิ์แล้ว นำรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G Subunit ปริมาตร 500 µg ผสมกับ Complete Freund's Adjuvant ฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณคอและสะโพกของกระต่ายสายพันธุ์ New Zealand White เป็นระยะเวลา 4 เดือนแล้วเก็บเลือดกระตุ้นโดยการเจาะเลือดดำบริเวณหู (Marginal Ear Vein) มาตรวจสอบความจำเพาะกับโปรตีน V-ATPase Subunit G ในยางพารา

3.4 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อรีคอมบิแนนท์โปรตีน V-ATPase G

Subunit โดยวิธี Western Blot

เมื่อนำแอนติบอดีที่ผลิตได้จากกระต่ายมาตรวจหาค่าไตเตอร์ พบว่าช่วงของไตเตอร์ที่เจือจาง 1:6400-1:102400 เท่า เป็นระยะ log phase จึงเลือกที่ 1:10000 เท่า ไปตรวจหาความจำเพาะของแอนติบอดีต่อโปรตีน V-ATPase G Subunit ในยางพาราโดยวิธี Western Blot พบว่า มีการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างโปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์ โปรตีนจากใบยางพารา โปรตีนจากน้ำยางพารา และ Cell Lysis *E.coli* BL21 (DE3) ที่ได้รับรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ *V-ATPase G Subunit* กับแอนติบอดีที่ผลิตได้จากกระต่าย เกิดเป็นแถบสีน้ำตาลอย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Rouquie *et al.* 1998 ได้ทดสอบความจำเพาะของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ต่อโปรตีน V-ATPase Subunit G ในยาสูบโดยวิธี Western Blot ในช่วงของไตเตอร์ที่เจือจาง 1:10000 เท่า พบว่ามีการจับกันอย่างจำเพาะระหว่างโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน V-ATPase Subunit G ในยาสูบ จากผลการทดลองครั้งนี้ V-ATPase G Subunit จากใบยางพาราน่าจะอยู่ในส่วนของ Vacuolar Membrane และยังพบในน้ำยาง แสดงว่า V-ATPase G Subunit อาจเกี่ยวข้องกับการผลิตน้ำยาง

4. ข้อเสนอแนะ

1. ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

นำแอนติบอดีที่ผลิตได้ไปตรวจแยกสายพันธุ์ยางที่ทนแล้งและทนเค็มโดยวิธี

Indirect ELISA

2. ข้อเสนอแนะในการวิจัยต่อไป

ควรพัฒนาแอนติบอดีไปเป็นชุดทดสอบเพื่อปรับปรุงและพัฒนาสายพันธุ์ยางที่ให้ผลผลิตสูงทนแล้งและทนเค็มต่อไป