บทที่ 4

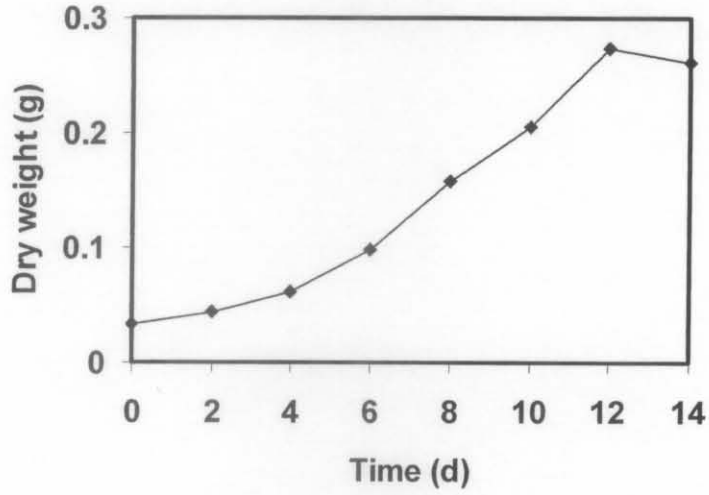
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาการเจริญของเซลล์แคลลัสต้นไข่เน่าเพาะเลี้ยง

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แคลลัสต้นไข่เน่า บนอาหารสูตร ½ MS ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีแสงสว่าง 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่าเซลล์แคลลัสมีการเจริญและให้ค่าการเจริญสูงสุดในวันที่ 12 ภายหลังจากการเพาะเลี้ยง และมีแนวโน้มการเจริญลดลงหลังจากวันที่ 12 (ตารางที่ 2 และรูปที่ 5) สำหรับลักษณะของแคลลัสในช่วงระยะเริ่มแรกของการเพาะเลี้ยงจนกระทั่งถึงวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยงจะมีสีเหลือง (รูปที่ 6) หลังจากนั้นแคลลัสจะเปลี่ยนเป็นสีดำและตายในที่สุด สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเกิดจากสารอาหารเริ่มหมด และเซลล์มีการสร้างสารประกอบฟีโนลิคจึงทำให้เซลล์เปลี่ยนเป็นสีดำและบางส่วนตายไปเนื่องจากความเป็นพิษของสารชนิดนี้

ตารางที่ 2 ค่าการเจริญ (น้ำหนักแห้ง) ของเซลล์แคลลัสพืชไข่เน่าที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร½ MS

อายุ (วัน)	น้ำหนักแห้งเฉลี่ย (กรัม)	ลักษณะสีของเซลล์
0	0.034	สีเหลือง
2	0.043	สีเหลือง
4	0.062	สีเหลือง
6	0.099	สีเหลือง
8	0.158	สีเหลือง
10	0.206	สีเหลือง
12	0.274	สีดำ
14	0.262	สีดำ



รูปที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ (น้ำหนักแห้ง (กรัม)) กับระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (วัน)

รูปที่ 6 ลักษณะของเซลล์แคลลัสจากต้นไข่เน่าที่เจริญอยู่บนอาหารสูตร ½ MS

4.2 การโคลนยีนบางส่วนและศึกษาคุณลักษณะบางประการของ cytochrome P450 gene ที่ควบคุมการสังเคราะห์สารเอคไดโซนในต้นไข่เน่า

4.2.1 การออกแบบไพรเมอร์จำเพาะสำหรับเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของ cytochrome P450 gene จากต้นไข่เน่า

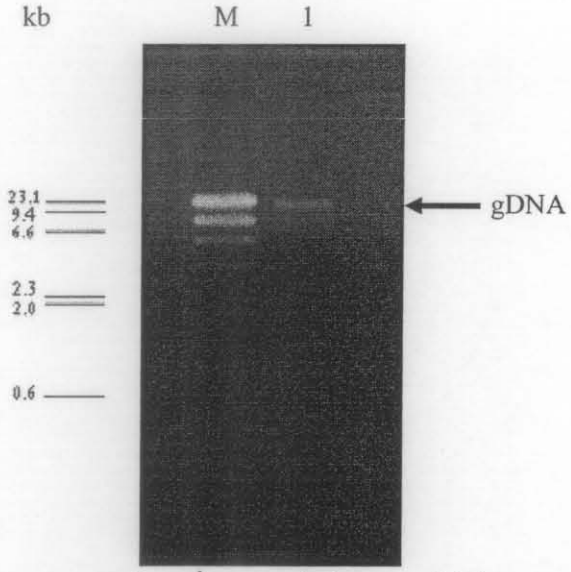
จากการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ โดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณอนุรักษ์ของยีน cytochrome P450 gene จากสิ่งมีชีวิตในกลุ่มแมลงและพืชที่มีรายงานในฐานข้อมูล พบว่าลำดับนิว คลีโอไทด์สำหรับใช้เป็นไพรเมอร์ มีลำดับดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับใช้เป็นไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของยีน cytochrome P450 gene

ชื่อ	ลำดับนิวคลีโอไทด์	Tm
Ecdysone F	5'- CGAAGCTTGCTG(AT)CGCCGAC(GT)TT-3'	68
Ecdysone R	5'- CTGGATCCCGC(AT)(AG)(AG)CCGATGCAG-3'	68

4.2.2 การแยกสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากเซลล์พืชและการทำให้บริสุทธิ์

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แคลลัสของต้นไข่เน่า และแยกสกัด genomic DNA และทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดแยกสกัดดีเอ็นเอและทำให้บริสุทธิ์สำเร็จรูป QIAGEN Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany) พบว่าสามารถเตรียม genomic DNA ที่มีความบริสุทธิ์ เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis และหาขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอ พบว่ามีขนาดประมาณ 14 กิโลเบส (รูปที่ 7) ความเข้มข้นของดีเอ็นเอมีค่าเท่ากับ 60 μg/ml ค่าอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 มีค่าเท่ากับ 1.5 จากค่าอัตราส่วนที่ได้แสดงให้เห็นว่าดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้มีสารโปรตีนปะปนอยู่บ้าง ซึ่งต้องนำดีเอ็นเอไปกำจัดโปรตีน เพื่อให้ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์มากขึ้น

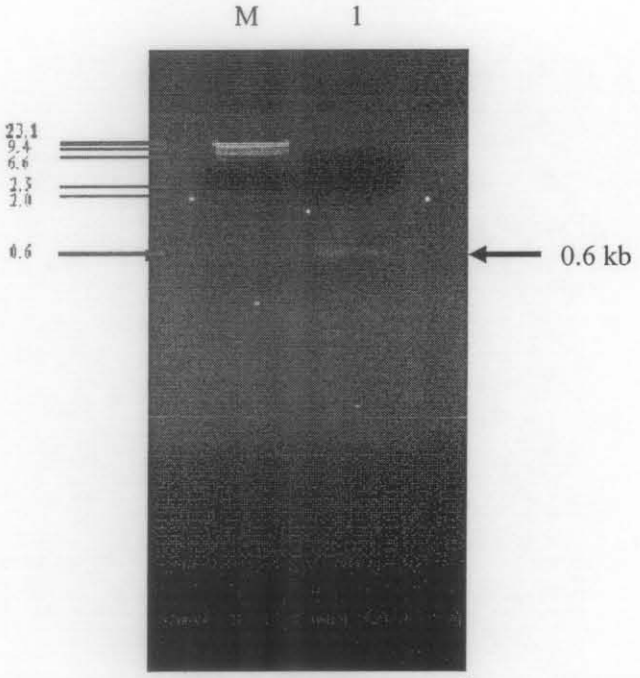


รูปที่ 7 แสดงแถบดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้จากเซลล์พืชไข่เน่าเพาะเลี้ยง
lane M : DNA marker (λ*Hin*dIII)
lane 1 : แถบดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้จากเซลล์พืช

4.2.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของ cytochrome P450 gene จากเซลล์แคลลัสพืชไข่เน่าเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค PCR

จากไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบได้ เมื่อนำไปใช้ในการทำปฏิกิริยาเพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของ cytochrome P450 gene ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ genomic DNA ที่แยกสกัดได้จากเซลล์แคลลัสของพืชไข่เน่าเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (รายละเอียดของสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในการทำปฏิกิริยาและการตั้งโปรแกรมของอุณหภูมิในการทำ PCR ดูได้ในบทที่ 3) ภายหลังจากการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ด้วยเทคนิค electrophoresis โดยใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ agarose พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาดประมาณ 0.6 กิโลเบส (รูปที่ 8) ซึ่งสอดคล้องกับขนาดดีเอ็นเอที่คาดการณ์ไว้จากการออกแบบไพรเมอร์ เมื่อเทียบจากลำดับดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ในฐานข้อมูล

วว
QP
671
.C83
W212



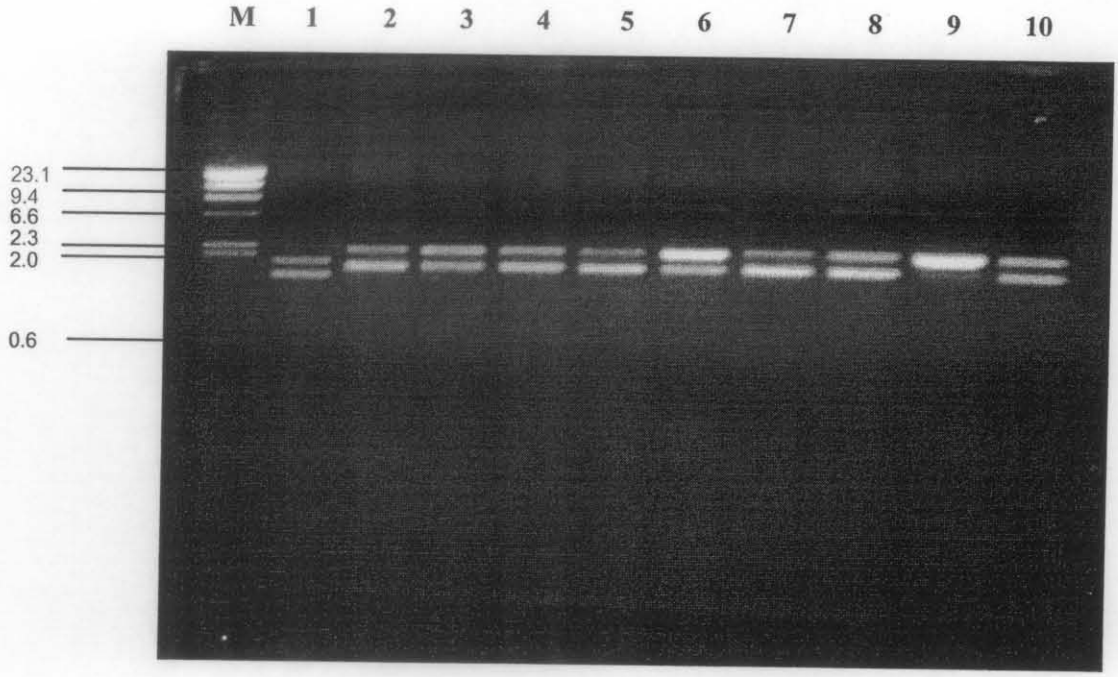
รูปที่ 8 ผลการวิเคราะห์ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นยีน cytochrome P450 gene ด้วยเทคนิค PCR ภายหลังที่แยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis
lane M : DNA marker (λ*Hin*dIII)
lane 1 : ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน cytochrome P450 gene

4.2.4 การโคลนชิ้น PCR product และการคัดเลือกโคลนที่ต้องการ

ภายหลังจากทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดแยกสกัดชิ้นดีเอ็นเอสำเร็จรูป และเชื่อมต่อเข้าสู่ pGEM T-easy vector จากนั้นถ่ายพลาสมิดลูกผสมที่ได้นี้เข้าสู่เซลล์ *E. coli* DH5α โดยใช้ชุด Rapid ligation and transformation kit (Fermentas, USA) ผลจากการโคลนชิ้นดีเอ็นเอและคัดเลือกโคลนที่ต้องการด้วยเทคนิค blue/white selection สามารถคัดเลือกโคลนที่ต้องการคิดเป็น

เปอร์เซ็นต์ของ transformant ได้ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ สาเหตุที่ประสิทธิภาพในการโคลนยีนอยู่ในระดับปานกลางไม่สูงมากนัก อาจเนื่องมาจากจำนวนของเซลล์ที่เป็น competent cell มีจำนวนน้อยทำให้โอกาสที่เซลล์จะรับดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์ต่ำไปด้วย ซึ่งอาจจะต้องมีการปรับปรุงเทคนิคในการส่งถ่ายยีนเข้าสู่เซลล์ต่อไป อย่างไรก็ตามจากโคลนที่คัดแยกได้ทั้งหมด ได้ทำการสุ่มเลือกมาจำนวน 9 โคลน เพื่อนำไปเพาะเลี้ยงและแยกสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอในระดับขนาดเล็ก (small scale preparation) โดยใช้เทคนิค rapid alkaline lysis ผลจากการแยกสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลนที่คัดเลือกได้แสดงดังรูปที่ 9

จากพลาสมิดดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้จากโคลนต่างๆ เมื่อนำไปตรวจสอบโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI พบว่าทุกโคลนที่คัดเลือกไปทดสอบคือโคลนที่ 2, 3, 5, 6 และ 9 มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการสอดแทรกอยู่ โดยชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวมีขนาดประมาณ 0.6 กิโลเบส ดังรูปที่ 10 ดังนั้นจึงได้คัดเลือกโคลนเพียงหนึ่งโคลนคือโคลนหมายเลข 5 ไปเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนและแยกสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอในระดับขยายส่วน (large scale preparation) จากผลการแยกสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอและทำให้บริสุทธิ์ด้วยสาร PEG พบว่าความเข้มข้นของพลาสมิดดีเอ็นเอที่เตรียมได้มีค่าเท่ากับ 550 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าสัดส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 เท่ากับ 1.66 ซึ่งถือได้ว่าดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์สูง ดังนั้นจึงได้นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้นี้ ไปศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Didcoxy chain termination ต่อไป

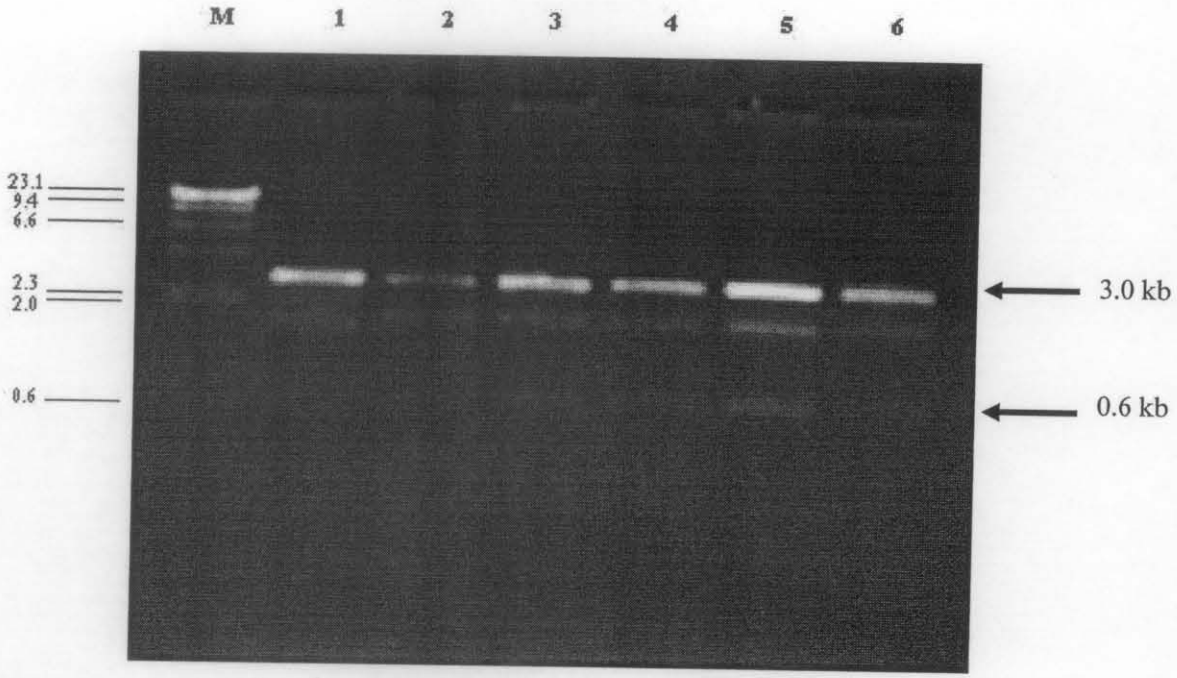


รูปที่ 9 แถบพลาสมิดดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้จากโคโลนีสีขาวซึ่งคาดว่าน่าจะมีชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายอยู่บนโมเลกุลของพลาสมิด

lane M : DNA marker (λ*Hin*dIII)

lane 1 : Plasmid DNA ที่แยกสกัดได้จากโคโลนีสีฟ้า (negative clone)

lane 2-10 : Plasmid DNA ที่แยกสกัดได้จากโคโลนีสีขาว (positive clone) หมายเลข 2 ถึง 10



รูปที่ 10 แถบพลาสมิดดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้จากโคโลนีสีขาวภายหลังจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

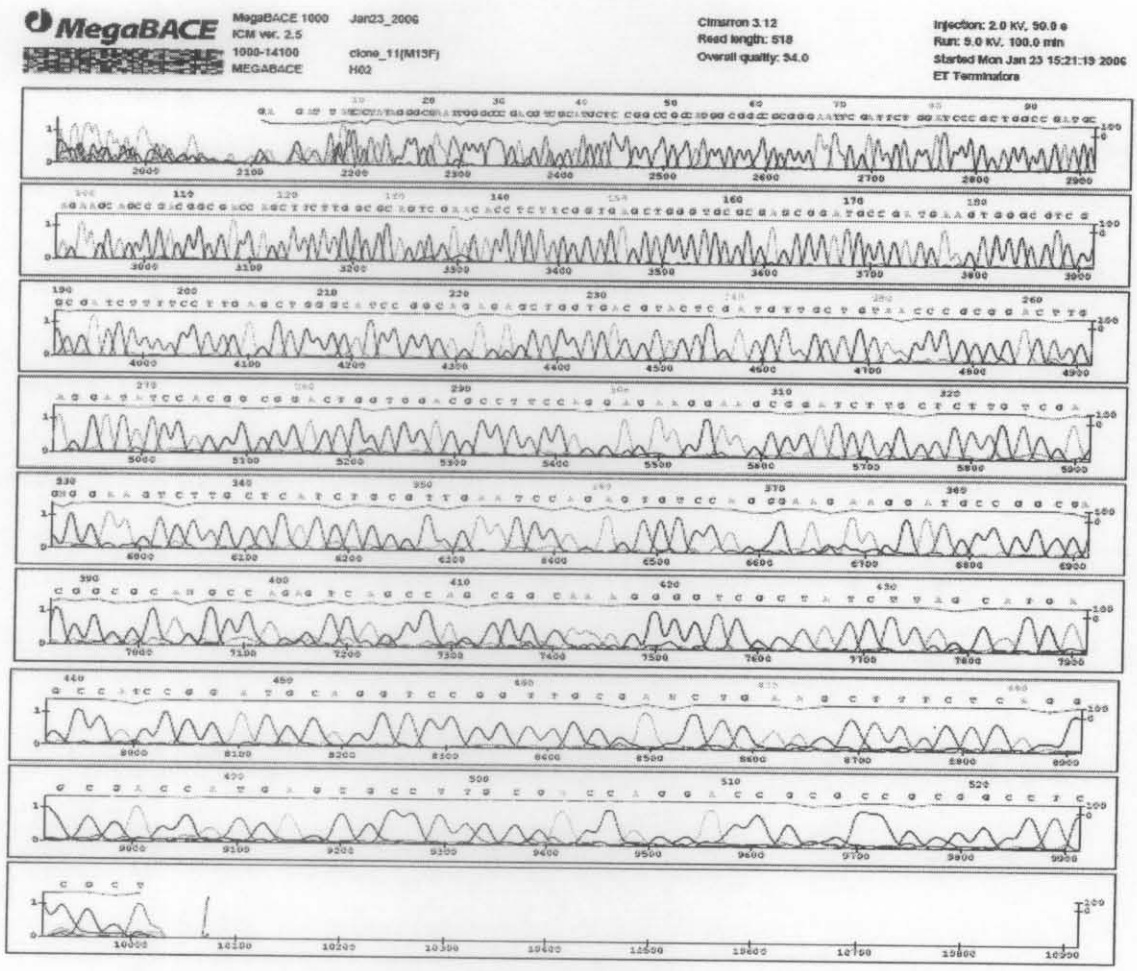
lane M : DNA marker (λ*Hin*dIII)

lane 1 : Plasmid DNA ที่แยกสกัดได้จากโคโลนีสีฟ้า (negative clone)

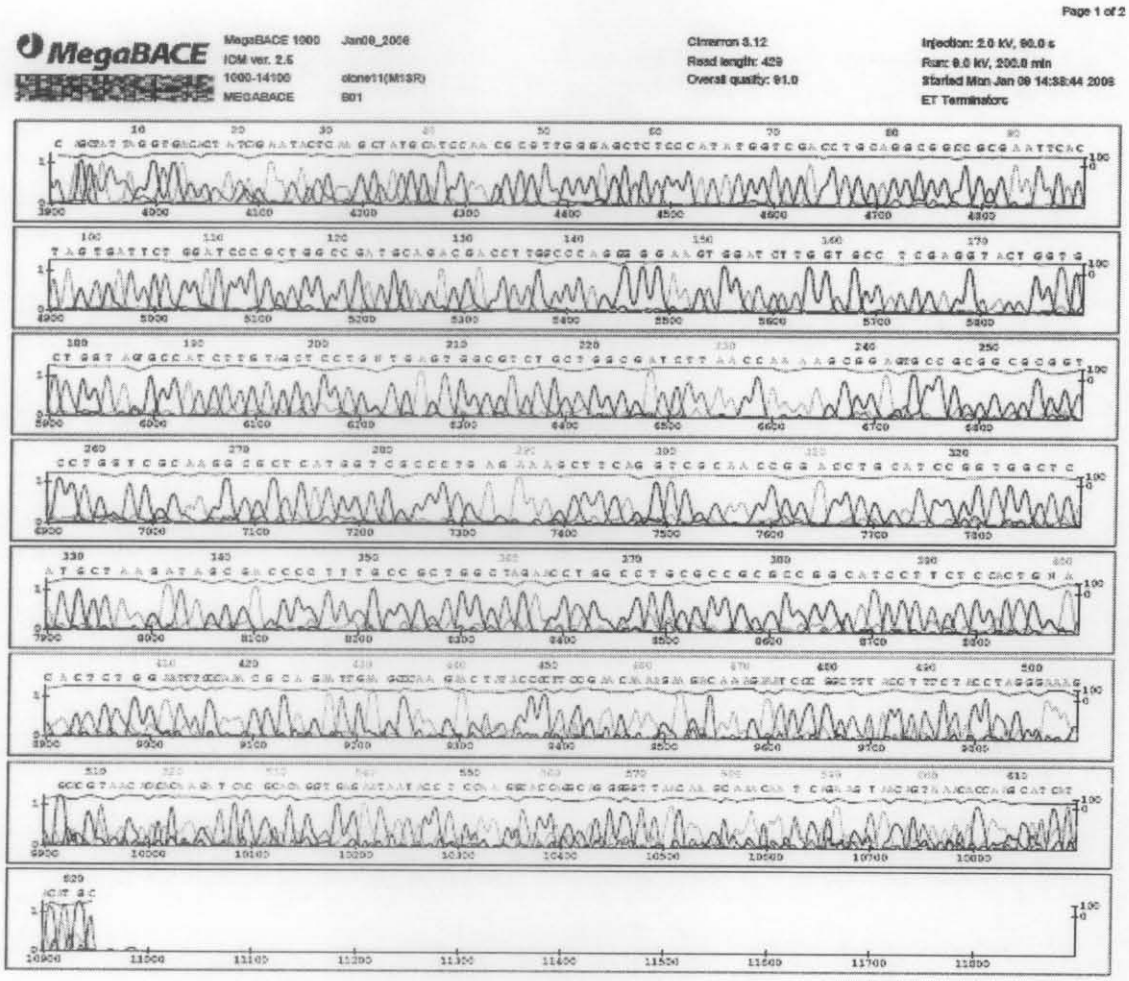
lane 2-6 : Plasmid DNA ที่แยกสกัดได้จากโคโลนีสีขาวหมายเลข 2, 3, 5, 6 และ 9 ภายหลังการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

4.2.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR

จากการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอและยืนยันผลโดยใช้เทคนิค PCR และเลือกเฉพาะ พลาสมิดดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้จากโคลนที่ 5 ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Dideoxy chain termination โดยการส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ผลการวิเคราะห์แสดงดังโครมาโตรแกรมรูปที่ 11, 12 และ 13 จากผลการศึกษาพบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ประกอบด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความยาวทั้งสิ้น 621 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สาร ecdysone ในสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในฐานข้อมูล NCBI GenBank โดยใช้โปรแกรม Blast ร่วมกับ Clustal W พบว่ามีความเหมือน (Identity) กับยีนในกลุ่ม cytochrome P450 โดยเฉพาะ CYP6 และ CYP45 ในสิ่งมีชีวิตในกลุ่มแมลง และพืช *Arabidopsis* ซึ่งผลการเปรียบเทียบแสดงดังตารางที่ 3



รูปที่ 11 โครมาโตแกรมแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR ของ cytochrome P450 gene จากเซลล์แคลลัสพืชไข่เน่าในส่วนของไพร์เมอร์เส้นฟอร์เวอร์ส



รูปที่ 12 โครมาโตแกรมแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR ของ cytochrome P450 gene จากเซลล์แคลลัสพืชไข่เน่าในส่วนของไพร์เมอร์เส้นรีเวอร์ส

CAGCTATTAG GTGACACTAT CAGAATACTC AAGCTATGCA TCCAACGCGT 50
TGGGAGCTCT CCCATATGGT CGACCTGCAG GCGGCCGCGA ATTCACTAGT 100
GATTCTGGAT CCCGCTGGCC GATGCAGACG ACCTTGGCCC AGGGGGAAGT 150
GGATCTTGGT GCCTCGAGGT ACTGGTGCTG GTAGTGCCAT CTTGTAGCTC 200
CTGNTGAGTG GCGTCTGCTG GCGATCTTAA CCAAAAGCGG AGTGCCGCGG 250
CGCGGTCCTG GTCGCAAGGC GCTCATGGTC GCCCTGAGAA AGCTTCAGGT 300
CGCAACCGGA CCTGCATCCG GTGGCTCATG CTAAGATAGC GACCCCTTTG 350
CCGCTGGCTA GAACCTGGCC TGCGCCGCGC CGGCATCCTT CTCCACTGNA 400
CACTCTGGAA TTTCCCAAAC GCAGAATTGA AGCCCAAGAA CTATACCCCT 450
TCCGAACAAA AGAAGACAAA GAAATCCCGG CTTTACCTTT CTACCTAGGG 500
AAAGGCACGT AACACACACA AGATCACGCA CAGGTGAGAA TAATACCTCC 550
AAGAGTACCA GGCAGGGGGT TAACAAGACA AACAATCAGA AGTAACAGTA 600
AACACCAAGC ATCATACATG C 621

รูปที่ 13 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR ของ cytochrome P450 gene จากเซลล์แคลลัสพืชไข่เน่า

ตารางที่ 4 แสดงผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cytochrome P450 gene จากต้นไข่เน่ากับสิ่งมีชีวิตอื่น

Organisms	% identity
Drosophila melanogaster (CYP6A2)	46
Locusta migratoria (CYP6H1)	46
Musca domestica (CYP6C1)	46
Arabidopsis thaliana (CYP86A4)	45
Culex quinquefasciatus (CYP6E1)	45
Homarus americanus (CYP45A1)	44

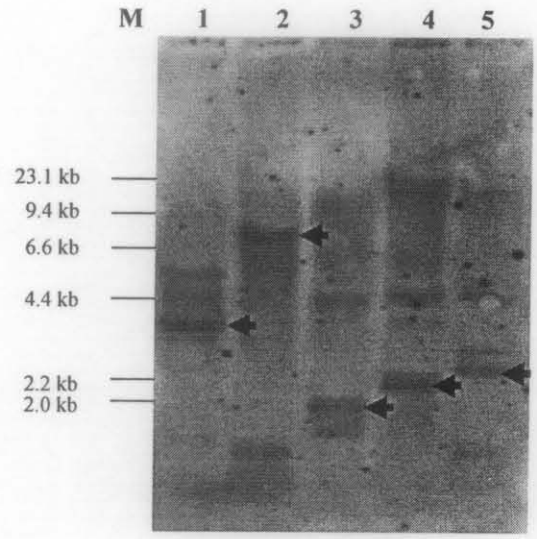
จากผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับยีนต่างๆ คาดว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ น่าจะเป็นบางส่วนของยีนซึ่งอยู่ในกลุ่ม cytochrome P450 แต่จะเป็นบางส่วน

ของยีน ecdysone 20-monooxygenase หรือไม่นั้นจะต้องทำการศึกษาต่อไป โดยเฉพาะการโคลนยีนและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีนนี้ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดลองการโคลนยีนเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ แต่ยังไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร ทั้งนี้เพราะในการเปรียบเทียบผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับยีนที่มีรายงานในฐานข้อมูล ไม่สามารถกระทำได้ดี เนื่องจากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน ecdysone 20-monooxygenase จากพืช ยังไม่มีรายงานมากนัก มีเพียงการศึกษาในระดับการแยกและทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ รวมถึงการศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์เท่านั้น

สำหรับคุณลักษณะที่สำคัญของยีนในกลุ่ม cytochrome P450 นั้นมีรายงานว่าจะประกอบไปด้วยส่วนที่เป็น heme-binding domain ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนเป็น FEPERF และ PFGSGRRICPG (Winter et al., 1999) เพราะฉะนั้นการศึกษาในอนาคตอาจจะใช้ลำดับกรดอะมิโนในบริเวณนี้เป็นจุดเริ่มต้นสำหรับการออกแบบไพรเมอร์และเพิ่มปริมาณชิ้นยีนบางส่วนเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอตรวจติดตาม (DNA probe) สำหรับการโคลนยีนต่อไป

4.2.6 การติดตามการสังเคราะห์ cytochrome P450 gene ในเซลล์พืช

จากการตรวจติดตามการสังเคราะห์ cytochrome P450 gene ในเซลล์แคลลัสต้นไข่เน่าด้วยเทคนิค Southern hybridization โดยนำ genomic DNA ที่แยกสกัดจากแคลลัสพืชมาตัดแบบ single digestion ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด คือ *Hin*dIII, *Bam*HI, *Eco*RI, *Pst*I และ *Sal*I จากนั้นนำไปแยกขนาดด้วยเทคนิค electrophoresis ผ่าน 0.7 เปอร์เซ็นต์ agarose gel แล้วจึงย้ายดีเอ็นเอจากแผ่นเจลไปยังแผ่นไนลอนเมมเบรน สำหรับทำปฏิกิริยาไฮบริไดเซชั่นโดยใช้ผลิตภัณฑ์ PCR เป็นตัวตรวจติดตาม ผลจากการทำปฏิกิริยาพบว่ามีรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดปฏิกิริยาไฮบริไดซ์ (hybridization pattern) จำนวน 1 แถบในแต่ละตัวอย่างของดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์แต่ละชนิด (รูปที่ 14) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า cytochrome P450 gene มีเพียง 1 ชุด บนโครโมโซมของพืช ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยที่มีรายงานในพืชตระกูลถั่ว (Frank et al., 1996) จากขนาดแถบแบนของดีเอ็นเอที่เกิดปฏิกิริยาไฮบริไดเซชั่นกับดีเอ็นเอตรวจตาม พบว่าการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sal*I ให้ขนาดดีเอ็นเอประมาณ 2 กิโลเบส ซึ่งไม่เล็กหรือใหญ่จนเกินไป ดังนั้นในการโคลนยีนเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์จึงเลือกใช้เอนไซม์ *Sal*I ในการตัดดีเอ็นเอต่อไป ซึ่งผลการโคลนยีนที่สมบูรณ์ยังไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากขาดฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนนี้ในพืชต่างๆ ที่จะนำมาใช้ในการเปรียบเทียบ ซึ่งจะต้องมีการพัฒนาเทคนิคอื่นๆ เพื่อช่วยให้การโคลนยีนประสบผลสำเร็จต่อไป



รูปที่ 14 รูปแบบของแถบดีเอ็นเอจากเซลล์แคลลัสต้นไข่เน่าที่เกิดปฏิกิริยาไฮบริไดเซชั่น (hybridization pattern) กับดีเอ็นเอตรวจติดตามภายหลังจากการตัดแบบ single digestion ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด

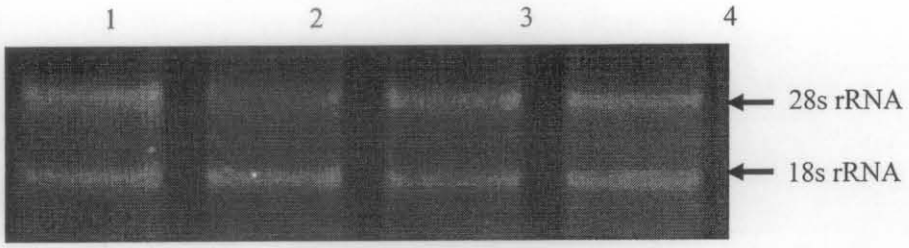
- Lane 1: *Eco*RI
- Lane 2: *Bam*HI
- Lane 3: *Hin*dIII
- Lane 4: *Sal*I
- Lane 5: *Pst*I
- Lane M: DNA marker (λ*Hin*dIII)

4.3 การศึกษาการแสดงออกของ cytochrome P450 gene ในระยะต่างๆ ของการเจริญของเซลล์แคลลัสต้นไข่เน่า

4.3.1 การแยกสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากเซลล์แคลลัสต้นไข่เน่าที่เจริญในระยะต่างๆ

เพาะเลี้ยงเซลล์แคลลัสของต้นไข่เน่าบนอาหารแข็งสูตร ½ MS ภายใต้สภาวะที่มีแสงความเข้ม 2,000 ลักซ์ เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2°C จนกระทั่งเซลล์เจริญเข้าสู่ระยะต่างๆ คือ lag- (2 วันหลังการเพาะเลี้ยง) log- (8 วันหลังการเพาะเลี้ยง) stationary- (12 วันหลังการเพาะเลี้ยง) และ death- (18 วันหลังการเพาะเลี้ยง) จากนั้นนำเซลล์ไปแยกสกัดอาร์เอ็นเอรวมโดยใช้ชุดแยกสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป (RNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN, Germany) และนำอาร์เอ็นเอที่แยกสกัดได้ไปวิเคราะห์คุณภาพโดยใช้เทคนิค agarose gel electrophoresis ได้ผลการทดลองแสดงดัง

รูปที่ 15 จากผลการทดลองที่ได้จะสังเกตเห็นแถบของ 28s rRNA และ 18s rRNA ในทุกตัวอย่างของอาร์เอ็นเอ และเมื่อปรับความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอให้เท่ากันโดยดูจากความเข้มของแถบแบนอาร์เอ็นเอจะพบว่าอาร์เอ็นเอในแต่ละตัวอย่างมีความเข้มเท่ากัน ซึ่งแสดงให้เห็นถึงปริมาณเริ่มต้นของอาร์เอ็นเอในแต่ละตัวอย่างที่เท่ากัน สามารถที่จะนำไปใช้ในการศึกษาถึงการแสดงออกของยีนในระยะต่างๆ ของการเจริญของพืชด้วยเทคนิค RT-PCR ต่อไป



รูปที่ 15 ผลการวิเคราะห์อาร์เอ็นเอรวมที่แยกสกัดได้จากแคลลัสต้นไข่เน่าที่เจริญในระยะต่าง ๆ
1: lag phase, 2: log phase, 3: stationary phase, 4: death phase

4.3.2 การศึกษาการแสดงออกของ cytochrome P450 gene จากเซลล์แคลลัสต้นไข่เน่าที่เจริญในระยะต่างๆ ด้วยเทคนิค RT-PCR

จากการศึกษาการแสดงออกของ cytochrome P450 gene ในระดับการถอดรหัสยีน (transcription) ในแต่ละระยะการเจริญของแคลลัสต้นไข่เน่า ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอภายหลังจากทำ PCR ได้ 20, 23, 26, 29, 32 และ 35 รอบ ครั้งละ 8 ไมโครลิตร และนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis พบว่าแถบผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นมีความเข้มที่แตกต่างกัน (รูปที่ 16) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงระดับของการแสดงออกของ cytochrome P450 gene ที่ไม่เท่ากันในแต่ละระยะของการเจริญ โดยพบว่าระยะการเจริญที่เป็น log phase สามารถตรวจพบแถบผลิตภัณฑ์ PCR ตั้งแต่รอบที่ 26 และมีแถบความเข้มของผลิตภัณฑ์ PCR มากที่สุดเมื่อเทียบกับระยะการเจริญในช่วงอื่นๆ (เมื่อเทียบที่จำนวนรอบในการทำ PCR ที่เท่ากัน) รองลงมาคือในระยะ lag phase, stationary phase และระยะ death phase ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่า cytochrome P450 gene มีการแสดงออกมากที่สุดในระยะ log phase ซึ่งเป็นไปได้ว่ายีนในกลุ่มนี้มีบทบาทสำคัญในระหว่างการเจริญและการพัฒนาการของเซลล์พืช โดยอาจจะทำหน้าที่หลักในการควบคุมการสังเคราะห์ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ภายในเซลล์พืช ที่อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างเซลล์ใหม่ หรือเพื่อป้องกันเซลล์จากปัจจัยแวดล้อมภายนอก เพื่อเป็นการยืนยันสมมติฐานข้างต้นจำเป็นที่

จะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องหน้าที่ของยีนนี้ โดยเทคนิคบางประการเช่น target gene disruption หรือ RNAi เป็นต้น

รูปที่ 16 ผลการศึกษาการแสดงออกของ cytochrome P450 gene ในแต่ละระยะการเจริญของแคลลัสต้นไข่เน่า ด้วยเทคนิค RT-PCR