บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 การศึกษาการเจริญของเซลล์แคลลัสพืชไข่เน่าเพาะเลี้ยง

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเซลล์แคลลัส ในสภาวะที่มีแสงสว่าง 2,000 ลักซ์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส พบว่าการเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้นและสูงสุดในวันที่ 12 หลังจากนั้นเซลล์จะเริ่มตายโดยเปลี่ยนเป็นสีดำ จากผลการศึกษารูปแบบการเจริญของเซลล์แคลลัสพืชไข่เน่าด้วยวิธีชั่งหาน้ำหนักแห้ง พบว่าระยะ mid-log ของการเจริญอยู่ที่ประมาณวันที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง

5.2 การโคลนยีนบางส่วนและศึกษาคุณลักษณะบางประการของ cytochrome P450 gene ที่ควบคุมการสังเคราะห์สารเอคไดโซนในต้น ไข่เน่า

จากการออกแบบไพรเมอร์จำเพาะสำหรับการตรวจติดตามยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ Ecdysone 20-monooxygenase ในต้นไข่เน่าโดยทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ในสิ่งมีชีวิตต่างๆ ที่มีรายงานในฐานข้อมูล สามารถออกแบบไพรเมอร์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

Ecdysone F : 5'- CGAAGCTTGCTG(AT)CGCCGAC(GT)TT-3'

Ecdysone R : 5'- CTGGATCCCGC(AT)(AG)(AG)CCGATGCAG-3'

จากผลการแยกสกัดดีเอ็นเอของเซลล์พืชไข่เน่าเพาะเลี้ยงพบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดโดยประมาณ 14 กิโลเบส เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis และความเข้มข้นของดีเอ็นเอมีค่าเท่ากับ 0.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 60 นาโนกรัม คุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้อยู่ในเกณฑ์ดี และจากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของ cytochrome P450 gene ในต้นไข่เน่าโดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะ พบว่าชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR (PCR product) ภายหลังที่แยกสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลแล้วมีขนาดประมาณ 0.6 kb

จากการนำ PCR product เชื่อมต่อเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ pGEM T-easy vector โดยใช้ T4 DNA ligase หลังจากนั้นนำพลาสมิดลูกผสมที่ได้ถ่ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (*E. coli*) และคัดเลือกเซลล์เจ้าบ้านที่รับเอาพลาสมิดลูกผสมซึ่งมีดีเอ็นเอเป้าหมายเชื่อมต่ออยู่โดยอาศัยเทคนิค Blue/White selection สามารถคัดเลือกโคลนได้ 5 โคลน โดยโคลนที่คัดเลือกได้จะมีชิ้นดีเอ็นเอ (คือชิ้น PCR product) ขนาดประมาณ 0.6 กิโลเบส อยู่บนโมเลกุลของพลาสมิดดีเอ็นเอ เมื่อนำโคลนที่คัดเลือกได้นี้

ไปเพาะเลี้ยงและแยกสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอในระดับขยายส่วน ดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้มีความเข้มข้น 550 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และมีค่าสัดส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm และ 280 nm เท่ากับ 1.66

จากผลการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธี Dideoxy chain termination พบว่าชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาด 621 bp และจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR พบว่ามีความเหมือนกับ cytochrome P450 gene กับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ดังนี้ *Drosophila melanogaster (CYP6A2), Locusta migratoria (CYP6H1), Musca domestica (CYP6C1)* ประมาณ 46%, *Arabidopsis thaliana (CYP86A4), Culex quinquefasciatus (CYP6E1)* ประมาณ 45% และ *Homarus americanus (CYP45A1)* ประมาณ 44% ซึ่งยืนยันได้เบื้องต้นว่าชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR นี้คือบางส่วนของ cytochrome P450 gene ที่อาจจะอยู่ในกลุ่ม CYP6 หรือ CYP45 ซึ่งหากจะศึกษาคุณลักษณะของยีนที่สมบูรณ์จำเป็นจะต้องหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ต่อไป

จากการติดตามการสังเคราะห์ cytochrome P450 gene ในเซลล์พืชโดยใช้เทคนิค Southern hybridization พบว่ามีแถบดีเอ็นเอที่เกิดปฏิกิริยาไฮบริไดเซชั่นเพียง 1 แถบกับดีเอ็นเอตรวจติดตาม ซึ่งแสดงให้เห็นว่า cytochrome P450 gene มีเพียง 1 ชุดบนโครโมโซมของพืช

5.3 การศึกษาการแสดงออกของ cytochrome P450 gene ในระยะต่างๆ ของการเจริญของเซลล์แคลลัสต้นไข่เน่า

จากการศึกษาการแสดงออกของ cytochrome P450 gene ในเซลล์แคลลัสของต้นไข่เน่าด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่า cytochrome P450 gene มีการแสดงออกมาในระยะที่เซลล์เจริญเข้าสู่ log phase ซึ่งคาดว่ายีนนี้น่าจะมีบทบาทสำคัญในขั้นตอนของการเจริญและการพัฒนาการของเซลล์พืช