บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

จากการทำการสร้างคลังยีนจากน้ำยางพารา เพื่อค้นหายีนที่สนใจ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการที่สำคัญในเซลล์ laticifer ของต้นยางพารา รวมทั้งการคัดเลือกยีน pectate lyase จากคลังยีนมาทำการโคลนนิ่งและศึกษาคุณสมบัติของโปรตีน สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

1. คลังยีนจากน้ำยางพาราที่ได้มีขนาด $1X10^7$ pfu/ml ทำการสุ่มคัดเลือกโคลนจำนวนทั้งหมด 413 โคลน ไปหาการเรียงลำดับเบสและเปรียบเทียบผลกับข้อมูลของธนาคารยีน พบยีนที่มีความเหมือนกับยีนที่เคยรายงานแล้ว 377 โคลน (91.3%) และไม่เคยมีรายงานมาก่อน 36 โคลน (8.7%)

2. พบยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการสร้างยาง (rubber biosynthesis-related gene) แสดงออกมากที่สุด 48 โคลน (11.6%) รองลงมาคือยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับระบบป้องกันตนเอง 36 โคลน (8.7%)

3. ยีนที่ได้เส้นเต็ม (full length cDNA) จากการทำ cDNA library ได้แก่ Glutaredoxin, protease inhibitor protein 1, latex abundant protein 1, ATP synthase subunit H protein, cyclophilin และ Rubber elongation factor protein (REF)

4. ทำการโคลนนิ่งยีน pectate lyase จากน้ำยางพาราพบว่า ได้ยีน 2 ยีนที่มีขนาดแตกต่างกัน คือ Hb-Pel-1 และ Hb-Pel-2 สามารถแปลเป็นลำดับกรดอะมิโนเป็น 393 และ 323 กรดอะมิโน ตามลำดับ ยีนทั้งสองมีความเหมือนกับยีน pectate lyase จาก *Arabidopsis thaliana* 74%

5. ผลิตโปรตีนลูกผสม GST-Hb-Pel-1 และ GST-Hb-Pel-2 ในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21 ได้โปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 73 และ 65 กิโลดาลตัน ตามลำดับ โดยเป็นน้ำหนักของโปรตีน GST ประมาณ 29 กิโลดาลตัน

6. พบว่าเฉพาะโปรตีนลูกผสม GST-Hb-Pel-1 เท่านั้นที่เกิดกิจกรรมของเอนไซม์ หลังจากศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ นั้นต้องใช้แคลเซียมเป็นโคแฟกเตอร์ และความเข้มข้นของ $CaCl_2$ และ pH ที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์คือ 0.3 mM $CaCl_2$ และ pH 7 ตามลำดับ

7. พบว่ายีน pectate lyase มีการแสดงออกสูงสุดหลังจากกรีดวันแรกและค่อยลดลงเมื่อเพิ่มระยะการกรีด

ข้อเสนอแนะ

1. จากการสุ่มคัดเลือกโคลนจากคลังยีนไปหาการเรียงลำดับเบสในการทดลองครั้งนี้ยังไม่ครอบคลุมยีนที่แสดงออกมาทั้งหมดและอาจทำให้ไม่พบยีนที่มีความสำคัญ ดังนั้นควรมีการสุ่มโคลนไปหาลำดับเบสเพิ่มขึ้น เพื่อให้ได้ยีนที่มีความหลากหลายมากขึ้น

2. จากการศึกษาการแสดงออกของยีน pectate lyase ในน้ำยางพาราของต้นยางพาราที่มีระยะของการกรีดที่แตกต่างกัน นั้นควรมีการเพิ่มระยะเวลาการกรีดให้นานขึ้น เพื่อจะได้ทราบบทบาทและหน้าที่ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการกรีดยางพาราชัดเจนมากยิ่งขึ้น