

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(6)
สารบัญ	(7)
รายการตาราง	(8)
รายการรูป	(10)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(12)
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	29
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	30
วัสดุ	30
อุปกรณ์	33
วิธีการทดลอง	34
3. ผลการทดลอง	56
4. วิจารณ์ผลการทดลอง	93
5. สรุปผลการทดลอง	98
เอกสารอ้างอิง	101
ภาคผนวก	113
ประวัติผู้เขียน	120

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. กรดไขมันที่พบในน้ำมันปาล์มซึ่งสกัดจากผลปาล์มน้ำมัน	12
2. ปริมาณคลอโรฟิลล์ (mg/kg) ในผลปาล์มน้ำมันชนิด <i>E. guineensis</i> ระยะต่างๆ	14
3. แคโรทีนอยด์ที่พบในน้ำมันปาล์มซึ่งสกัดจากผลปาล์มน้ำมันชนิด <i>E. guineensis</i>	14
4. องค์ประกอบของบัฟเฟอร์สำหรับสกัดอาร์เอ็นเอ	34
5. สารที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RT-PCR แบบขั้นตอนเดียว	37
6. สภาวะการทำ RT-PCR แบบขั้นตอนเดียว	38
7. องค์ประกอบของสารที่ใช้ในการทำ RT-PCR แบบสองขั้นตอน	38
8. องค์ประกอบของสารที่ใช้ในการสังเคราะห์ second strand cDNA	39
9. สภาวะการทำ RT-PCR แบบสองขั้นตอน	40
10. สารที่ใช้ในการตรวจสอบดีเอ็นเอถูกผสมโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoR I</i>	44
11. สารที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอ	44
12. สภาวะที่ใช้ในการทำ PCR เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์	45
13. สารที่ใช้กำจัดส่วน 5' phosphates ของอาร์เอ็นเอ	46
14. สารที่ใช้กำจัดส่วน 5' cap structure ของอาร์เอ็นเอ	47
15. สารเคมีที่ใช้ในการเชื่อมปลาย 5' ของอาร์เอ็นเอ	49
16. สารเคมีที่ใช้ในการสังเคราะห์ first strand cDNA	50
17. ส่วนผสมของสารที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน cDNA โดยการทำ PCR	51
18. สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวน cDNA โดยการทำ PCR	52
19. ชนิด ซี้อย่อ และ accession number ของเอนไซม์ DXS ในแบคทีเรีย สาหร่าย และพืชที่ใช้ในการเปรียบเทียบข้อมูลต่างๆกับปาล์มน้ำมัน	53
20. ความเหมือนร้อยละ (% identity) ของลำดับกรดอะมิโนสำหรับเอนไซม์ DXS ระหว่างปาล์มน้ำมันกับแบคทีเรีย, สาหร่าย และพืชชนิดต่างๆ	75
21. ความยาวของเปปไทด์ที่นำไปโปรตีนเข้าสู่คลอโรพลาสต์ ในเอนไซม์ DXS จากปาล์ม น้ำมันและพืชชั้นสูงชนิดอื่นทำนายโดยใช้โปรแกรม ChloroP 1.1	76
22. ลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่นำไปโปรตีนเข้าสู่คลอโรพลาสต์ในเอนไซม์ DXS จาก ปาล์มน้ำมันและพืชชั้นสูงชนิดอื่น ทำนายโดยใช้โปรแกรม ChloroP1.1	77

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
23. อัตราส่วนระหว่างความเข้มแถบ PCR product ของยีน <i>dxs</i> กับ <i>18S rRNA</i> (Relative intensity) ของผลปาล์มน้ำมันทั้ง 8 ระยะ (8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 และ 22 สัปดาห์หลังจากการผสมพันธุ์)	88
24. ค่าอัตราส่วนระหว่างความเข้มแถบ PCR product ของยีน <i>dxr</i> กับ <i>18S rRNA</i> ของผลปาล์มน้ำมันทั้ง 8 ระยะ (8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 และ 22 สัปดาห์หลังจากการผสมพันธุ์)	90
25. ปริมาณ β -carotene ของผลปาล์มน้ำมันทั้ง 8 ระยะ อายุ 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 และ 22 สัปดาห์หลังจากการผสมพันธุ์	91

รายการรูป

รูปที่	หน้า
1. ลักษณะระบบรากของปาล์มน้ำมัน	5
2. ลักษณะใบปาล์มน้ำมันและการเรียงตัวของใบย่อย	6
3. ลักษณะต่างๆของผลปาล์มน้ำมัน	8
4. ลักษณะของผลปาล์มน้ำมันสายพันธุ์ต่างๆ	10
5. ลักษณะผลปาล์มน้ำมันสายพันธุ์เทเนอราที่ได้จากการผสมระหว่างสายพันธุ์ดูรากับ ฟิลิเฟอรา	11
6. วิถี acetate/mevalonate ที่ไซโทพลาสซึมและ 2-C-methyl-D-erythritol-4- phosphate ที่พลาสติด	17
7. การสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในพืชโดยผ่านวิถี MEP	24
8. ตัวอย่างโครงสร้างของสารในกลุ่มแคโรทีนอยด์	25
9. แผนที่ลักษณะดีเอ็นเอพาหะ pGEM [®] -T Easy	42
10. ขั้นตอนในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์โดยวิธี RLM-RACE	48
11. ผลปาล์มน้ำมันระยะที่ 1-8 อายุ 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 และ 22 สัปดาห์ หลังจากการผสมพันธุ์	54
12. เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ DXS ในพืช โดยใช้โปรแกรม ClustalX 1.81	57
13. เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ DXR ในพืช โดยใช้โปรแกรม ClustalX 1.81	58
14. แบบแผนของ PCR product จากการทำ RT-PCR แบบขั้นตอนเดียวสำหรับยีน <i>dxs</i> และ <i>dxr</i> ในใบและผลปาล์มน้ำมัน แยกด้วยอิเล็กโทรโฟริซิสบนเจลอะกาโรส 1.5%	60
15. ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>dxs</i> ในใบและผลปาล์มน้ำมันที่ได้จากการทำ RT-PCR แบบขั้นตอนเดียว	61
16. เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ DXS ในใบและผลปาล์มน้ำมัน	62
17. ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน <i>dxr</i> และเอนไซม์ DXR จากใบ และผล ปาล์มน้ำมัน	63
18. แบบแผนของ PCR product จากการทำ 3' และ 5' RACE สำหรับยีน <i>dxs1</i> ใน ใบปาล์มน้ำมัน แยกด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสบนเจลอะกาโรส 1.5%	66

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
19. ลำดับนิวคลีโอไทด์ทางปลาย 3' จากการทำ 3' RACE ด้วยวิธี RLM-RACE ของยีน <i>dxs1</i> จากใบปาล์มน้ำมันสายพันธุ์เทเนอร่า	67
20. ลำดับนิวคลีโอไทด์ทางปลาย 5' จากการทำ 5' RACE ด้วยวิธี RLM-RACE ของยีน <i>dxs1</i> จากใบปาล์มน้ำมันสายพันธุ์เทเนอร่า	68
21. ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน <i>dxs1</i> และเอนไซม์ DXS จากใบปาล์ม น้ำมัน	69
22. เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ DXS ในปาล์มน้ำมันกับพืชชนิดอื่น, สาหร่าย และ <i>E. coli</i> โดยใช้โปรแกรม ClustalX 1.81	71
23. Phylogenetic tree โดยโปรแกรม Progressive alignment	79
24. ผลของปริมาณดีเอ็นเอต่อปริมาณ PCR product จากการทำ RT-PCR แบบสอง ขั้นตอนสำหรับยีน <i>dxs2</i> และยีน <i>dxr</i>	82
25. ผลของความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ต่อปริมาณ PCR product จากการทำ RT-PCR แบบ สองขั้นตอนสำหรับยีน <i>dxs2</i> และยีน <i>dxr</i>	84
26. ผลของจำนวนรอบในการทำ RT-PCR แบบสองขั้นตอนต่อปริมาณ PCR product ของยีน <i>dxs2</i> และยีน <i>dxr</i>	85
27. การแสดงออกของยีน <i>dxs</i> และ 18S rRNA ของผลปาล์มน้ำมันโดยวิธี semiquantitative RT-PCR	87
28. การแสดงออกของยีน <i>dxr</i> และ 18S rRNA ของผลปาล์มน้ำมันโดยวิธี semiquantitative RT-PCR	89
29. กราฟมาตรฐาน β -carotene	91
30. การแสดงออกของยีน <i>dxs2</i> และ <i>dxr</i> กับปริมาณ β -carotene ของผลปาล์มน้ำมัน ทั้ง 8 ระยะ	92

ตัวย่อและสัญลักษณ์

Ala (A)	=	Alanine
Arg (R)	=	Arginine
Asp (D)	=	Aspartic acid
Asn (N)	=	Asparagine
bp	=	Base pair
DEPC	=	Diethyl pyrocarbonate
<i>dxs</i>	=	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase gene
<i>dxr</i>	=	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase gene
°C	=	Degree Celsius
CTAB	=	Hexadecyl trimethyl ammonium bromide
Cys (C)	=	Cysteine
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
dNTP	=	Deoxynucleoside triphosphate
EGTA	=	Ethyleneglycol-bis(β-aminoethyl ether)N,N,N',N'-tetraacetic acid
Gln (Q)	=	Glutamine
Glu (E)	=	Glutamic acid
Gly (G)	=	Glycine
His (H)	=	Histidine
IPTG	=	Isopropyl-β -D-thiogalactopyranoside
Ile (I)	=	Isoleucine
kb	=	Kilobase
kDa	=	Kilodalton
Leu (L)	=	Leucine
LB	=	Luria Bertaini
M	=	Molar
Met (M)	=	Methionine

ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

mg	=	Milligram
ml	=	Millilitre
mM	=	Millimolar
mRNA	=	messenger ribonucleic acid
µg	=	Microgram
µl	=	Microlitre
OD	=	Optical density
Phe (F)	=	Phenylalanine
pH	=	-log hydrogen ion concentration
pmole	=	picomole
Pro (P)	=	Proline
RT-PCR	=	Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction
RNA	=	Ribonucleic acid
RNase A	=	Ribonuclease A
rpm	=	Revolutions per minute
SDS	=	Sodium dodecyl sulphate
Ser (S)	=	Serine
TAE	=	Tris acetate EDTA
Thr (T)	=	Threonine
Trp (W)	=	Tryptophan
Tyr (Y)	=	Tyrosine
U	=	Unit
Val (V)	=	Valine
X-GAL	=	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside