

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 degenerate primer สำหรับโคลนส่วนของยีน *dxs* และ *dxr* ในใบและผลปาล์มน้ำมัน degenerate primer สำหรับโคลนบางส่วนของยีน *dxs* และ *dxr* ซึ่งแปลเป็นรหัสของ เอนไซม์ DXS และ DXR เริ่มจากการรวบรวมลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ DXS และ DXR จากพืช ชนิดอื่นที่มีการศึกษามาแล้วจากธนาคารยีน (GenBank) โดยผ่านฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) แล้วนำข้อมูลที่ได้มา จัดเรียงและเปรียบเทียบกันโดยใช้โปรแกรม ClustalX 1.81 ดังรูปที่ 12 และรูปที่ 13 สำหรับ เอนไซม์ DXS และเอนไซม์ DXR ตามลำดับ จากข้อมูลพบว่าลำดับกรดอะมิโนสำหรับเอนไซม์ DXS และ DXR มีบริเวณอนุรักษ์ (conserve region) หลายตำแหน่ง จากนั้นเลือกลำดับกรดอะมิโนใน บริเวณอนุรักษ์ (แถบสีดำ) จากเอนไซม์ทั้งสองโดยในเอนไซม์ DXS ได้เลือกบริเวณ WDVGHQS และ IAEQHAV ในเอนไซม์ DXR ได้เลือกบริเวณ GSIGTQT และ GWPDMRL สำหรับใช้ในการ ถอดรหัสกลับไปเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อใช้เป็น forward และ reverse primer ในการโคลน บางส่วนของยีน *dxs* และ *dxr*

จากบริเวณ WDVGHQS และ GIAEQHA ของเอนไซม์ DXS สามารถถอดรหัสกลับได้เป็น ลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'-TGGGATGTTGGTCATCAGTC-3' สำหรับเป็น forward primer (FDXS) และ 5'-ACTGC(A/G)TGTTGTTCC(C/T)GCTAT-3' สำหรับเป็น reverse primer (RDXS) บริเวณ GSIGTQT และ GWPDMRL ของเอนไซม์ DXR สามารถถอดรหัสกลับได้เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ 5'-GG(C/T)TC(C/T)ATTGG(AC)ACTCAGAC-3' สำหรับเป็น forward primer (FDXR) และ 5'-AACCGCATATC(A/G)GGCCA(A/T)CC-3' สำหรับเป็น reverse primer (RDXR)

3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากส่วนของยีน *dxs* และ *dxr* ในใบและผลปาล์มน้ำมันโดย ใช้วิธี RT-PCR แบบขั้นตอนเดียว

3.2.1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากส่วนของยีน *dxs* ในใบและผลปาล์มน้ำมัน

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากส่วนของยีน *dxs* ของใบและชิ้นเนื้อของผลปาล์มน้ำมัน โดยใช้ degenerate primer จากข้อ 3.1 คือ FDXS และ RDXS โดยใช้วิธี RT-PCR แบบขั้นตอน เดียวดังวิธีการข้อ 2.3.1.5 (ก.) พบว่าเมื่อนำ PCR product มาตรวจสอบผลด้วยการทำ

```

*          20          *          40          *          60          *          80
C.a. : MALCAYRFFGILNRTVAGASDASKPTPLFSEWHGCHLQGFHQHQLT-ATKESRTNQRSELSSEGEYVTRQRPPTPLLDTTI : 79
L.e. : MALCAYRFFGILNR-TCVUSDSKATPLFSGWHGCHLQGLFQHQLTHTKESRRTVQASLSESGEYVTRQRPPTPLLDTTI : 79
A.a. : MALCAYRFFGILNR-RSVDI-----QPLIQHCLFCHLMS--SQPFNQLVPEKSRVRSILSERGEYVTRQRPPTPLLDTTI : 73
M.t. : MDLGLSLGCSFSTP---CDPRRLPLPLSSSSSHSQWGLHGFSEHSQQHNKLKRFQGVVHDSLSEMGEYVTRQRPPTPLLDTTI : 77
      MaLca AIP 6n  v s      P l s      gtdL f      k      6KK4s 6 a3LSE GEYy3QRPPTP66DT6

*          100         *          120         *          140         *          160
C.a. : NYPIHKMKNLSFELEKQLADELRSDIFNVSETGCGHCGSSLGVVELTVALHYVFNAPQDQILWVQVGHQSYPHKILTGRRDE : 159
L.e. : NYPIHKMKNLSFELEKQLADELRSDIFNVSETGCGHCGSSLGVVELTVALHYVFNAPQDQILWVQVGHQSYPHKILTGRRDE : 159
A.a. : NYPIHKMKNLSFELEKQLADELRSDVIFNVSETGCGHCGSSLGVVELTVALHYVFNAPQDQILWVQVGHQSYPHKILTGRRDE : 153
M.t. : NYPIHKMKNLSFELEKQLADELRSDVIFNVSETGCGHCGSSLGVVELTVALHYVFNAPQDQILWVQVGHQSYPHKILTGRRDE : 157
      NYPIHKMKNLS KELKQLADELRSD IFnV54TGCHLGSLLGVVELT6ALHYVFN PQD4ILWVQVGHQSYPHKILTGRRdk

*          180         *          200         *          220         *          240
C.a. : NSTLRQTNGLGQPTRESESEMDLFGTCHSSTTISAGLGNVAGDLDKGRKNDVVAIVIGDQANTAGQAYEAANNAGYLLDSDM : 239
L.e. : NSTLRQTNGLGQPTRESESEMDLFGTCHSSTTISAGLGNVAGDLDKGRKNDVVAIVIGDQANTAGQAYEAANNAGYLLDSDM : 239
A.a. : NSTLRQTNGLGQPTRESESEMDLFGTCHSSTTISAGLGNVAGDLDKGRKNDVVAIVIGDQANTAGQAYEAANNAGYLLDSDM : 233
M.t. : NSTLRQTNGLGQPTRESESEMDLFGTCHSSTTISAGLGNVAGDLDKGRKNDVVAIVIGDQANTAGQAYEAANNAGYLLDSDM : 237
      N T6RQT1GLGqPTKRESESEyDofGTCHSSTTISAGLGNVAGDLDKGr N1V6A6IGDQANTAGQAYEAANNAGYLLDSDM

*          260         *          280         *          300         *          320
C.a. : IVILNDNQVSLPTAQLDGPVPGALSSALSPLQSNRPLRELEVAHGVTTRIGGPNHMLAAKVDYARGNISGSGSTL : 319
L.e. : IVILNDNQVSLPTAQLDGPVPGALSSALSPLQSNRPLRELEVAHGVTTRIGGPNHMLAAKVDYARGNISGSGSTL : 319
A.a. : IVILNDNQVSLPTAQLDGPVPGALSSALSPLQSNRPLRELEVAHGVTTRIGGPNHMLAAKVDYARGNISGSGSTL : 313
M.t. : IVILNDNQVSLPTAQLDGPVPGALSSALSPLQSNRPLRELEVAHGVTTRIGGPNHMLAAKVDYARGNISGSGSTL : 317
      IVILNDNQVSLPTAQLDGPpVPGALSSALSRLQSN4PLRELEVAHGVTTRIGGPNHMLAAKVDYARGNISGSGSTL

*          340         *          360         *          380         *          400
C.a. : FEELGLYYIGVVDGHNIDDLISILHEVKESTTTGQPVLIHVVTBKGRGYPYAERAAQKYHGVAKFPDPTGKQKFAKTDG : 398
L.e. : FEELGLYYIGVVDGHNIDDLISILHEVKESTTTGQPVLIHVVTBKGRGYPYAERAAQKYHGVAKFPDPTGKQKFAKTDG : 399
A.a. : FEELGLYYIGVVDGHNIDDLISILHEVKESTTTGQPVLIHVVTBKGRGYPYAERAAQKYHGVAKFPDPTGKQKFAKTDG : 393
M.t. : FEELGLYYIGVVDGHNIDDLISILHEVKESTTTGQPVLIHVVTBKGRGYPYAERAAQKYHGVAKFPDPTGKQKFAKTDG : 397
      FEELGLYYIGpVDGHNIDDL6aILKEV43Tr3TGPVLIHV6TEKGRGYPYA24aADKYHGVAKFPDPTGKQKFAKTDG

*          420         *          440         *          460         *          480
C.a. : YTTYFAEALIAEAKRDEITVTHAAKGGGTGMNLFRRPPTTRCFDVGIAEQHAUTFAAGLACEGLKPFCAIYSSFFQRAEY : 478
L.e. : YTTYFAEALIAEAKRDEITVTHAAKGGGTGMNLFRRPPTTRCFDVGIAEQHAUTFAAGLACEGLKPFCAIYSSFFQRAEY : 479
A.a. : YTTYFAEALIAEAKRDEITVTHAAKGGGTGMNLFRRPPTTRCFDVGIAEQHAUTFAAGLACEGLKPFCAIYSSFFLQRAEY : 473
M.t. : YTTYFAEALIAEAKRDEITVTHAAKGGGTGMNLFRRPPTTRCFDVGIAEQHAUTFAAGLACEGLKPFCAIYSSFFQRAEY : 477
      YTTYFAEALIAEAKADKIGaIHAaKGGGTGMN6F RRPPTTRCFDVGIAEQHAUTFAAGLACEG6KPFCAIYSSFFQRAEY

*          500         *          520         *          540         *          560
C.a. : DQVVHVDVLQELPVRFAADRAGLVGADGPTHGAFDUTFNACLPNKVVUMAPSDEAELCHVATATAAIDDRPSCFRVPRGN : 558
L.e. : DQVVHVDVLQELPVRFAADRAGLVGADGPTHGAFDUTFNACLPNKVVUMAPSDEAELCHVATATAAIDDRPSCFRVPRGN : 559
A.a. : DQVVHVDVLQELPVRFAADRAGLVGADGPTHGAFDUTFNACLPNKVVUMAPSDEAELCHVATATAAIDDRPSCFRVPRGN : 553
M.t. : DQVVHVDVLQELPVRFAADRAGLVGADGPTHGAFDUTFNACLPNKVVUMAPSDEAELCHVATATAAIDDRPSCFRVPRGN : 557
      DQVVHVDVLQELPVRFAADRAGLVGADGPTH G FDUVTSNACLPNKVVUMAPSDEAELCh6VATATAAIDDRPSCFRVPRGN

*          580         *          600         *          620         *          640
C.a. : GIGVLEPAGNKGIVLEVEGGRVILLEGQVALLGYGSAVQCILARRSLVESEGLQTVADARFCEPLDHALIRSLAKSHEV : 638
L.e. : GIGVLEPAGNKGIVLEVEGGRVILLEGQVALLGYGSAVQCILARRSLVESEGLQTVADARFCEPLDHALIRSLAKSHEV : 639
A.a. : GIGVLEPAGNKGIVLEVEGGRVILLEGQVALLGYGSAVQCILARRSLVESEGLNITVADARFCEPLDHALIRSLAKSHEV : 633
M.t. : GIGVLEPTEYKGIPLVIGKGRVILLEGQVALLGYGSAVQCILARRSLVESEGLQTVADARFCEPLDHALIRSLAKSHEV : 637
      GIGVLeP gnKG6PLE6GKGRI66EG2RVALLGYGSAVQC6aAA 662 rGL 6TVADARFCEPLD LIRsLAKSHEV

*          660         *          680         *          700         *          720
C.a. : LITVEGSGIGGFGRSHVDFMALLGLLDCKLEWRPVLPRYIDHSGPAdQLREAGLTPSHIAATVFNILGQTRALEVMS : 718
L.e. : LITVEGSGIGGFGRSHVDFMALLGLLDCKLEWRPVLPRYIDHSGPAdQLREAGLTPSHIAATVFNILGQTRALEVMS : 719
A.a. : LITVEGSGIGGFGRSHVDFMALLGLLDCKLEWRPVLPRYIDHSGPAdQLREAGLTPSHIAATVFNILGQTRALEVMS : 713
M.t. : LITVEGSGIGGFGRSHVDFMALLGLLDCKLEWRPVLPRYIDHSGPAdQLREAGLTPSHIAATVFNILGQTRALEVMS : 717
      L6TVeEGSIGGFGRSHV df6ALDGLLDG LKWRP6VLPRYIDHGsPAdQLReAGLTPSHIAATVFNILGQTRALEVMS

```

รูปที่ 12 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ DXS ในพืช โดยใช้โปรแกรม ClustalX 1.81 พืชที่ใช้เปรียบเทียบคือ *C. annuum* (C.a.), *L. esculentum* (L.e.), *A. thaliana* (A.t.) และ *M. truncatula* (M.t.) แถบสีดำคือบริเวณของอนุรักษ์ (Conserve region) และ ลูกศร คือ บริเวณที่เลือกมาออกแบบ primer

```

      *           20           *           40           *           60           *
L.e. : -MALNLSLSPAEIKSISFLDMSKSSYNLSHIFRTGGLSIRRKECSGAFARRVQCSAQL----PPPPAWPGR : 6
C.r. : -MALNLSLSPPKIKTISFLDSSKSNYNLNLRLPGGRAFKKKDFGASGGKKIQCSVC----PPPPAWPGR : 6
A.t. : MMTLNSLSLSPAESKASISFLDTSR--FNP-IPKLSGGESLRRRNQGRGFGRGKCSVKVQQQQPPPAWPGR : 6
M.p. : -MALNLMAPTEIKTKLSFLDSSKSNYNLNLPLKFOGGFAFKRKRDSRCTAAKRVHCSAQS---OSPPPAWPGR : 6
      MaLN 6sP eiK 6SFLD S4s SN1 1K GGf 444 K 6 CS q PPPAWPGR

      *           80           *           100          *           120          *           140
L.e. : ANAEPGRCSWDGPKPISIVGSTGSIGTQTLDIVAENPDKFRVVALAAGSNVTLADQVTRFRPKLVAVRN : 13
C.r. : ANAEPGRYKRWEGQPKPISIVGSTGSIGTQTLDIVAENPDKFRVVALAAGSNVTLADQVTRFKPQLVSVRN : 13
A.t. : ANPEAPRCSWDGPKPISIVGSTGSIGTQTLDIVAENPDKFRVVALAAGSNVTLADQVTRFKPALVAVRN : 13
M.p. : AFPEPGRMTWEGPKPISIVGSTGSIGTQTLDIVAENPDKFRIVALAAGSNVTLADQ--KAFKPKLVSVKVD : 13
      Av Epgr 3W GpKPiS66GSTGS6GTQTLDIVAENPDKFR6VALAAGSNVTLADQv4 F4P LV V41
      ↓

      *           160          *           180          *           200          *
L.e. : ESLVEELKDALADMEDKPEIIPGEQGVIEVARHPDAVTVVVTGIVGCAGLKPTVAAIEAGKDIALANKETL : 20
C.r. : ESLVNELKDALSDVDDKPEIIPGEQGVVIEVVRHSDAVTVVVTGIVGCAGLKPTVAAIEAGKDIALANKETL : 20
A.t. : ESLINELKDALADLDYKLEIIPGEQGVIEVARHPDAVTVVVTGIVGCAGLKPTVAAIEAGKDIALANKETL : 20
M.p. : ESLISELKEALAGFEDMPEIIPGEQGVIEVARHPDAVTVVVTGIVGCAGLKPTVAAIEAGKDIALANKETL : 20
      ESL6 ELKeALad dkpEIPGEQG66EVaRHpdAVTVVVTGIVGCAGLKPTVAAIEAGKDIALANKETL

      *           220          *           240          *           260          *           280
L.e. : IAGGPFVLPFAKHKRNVKILPADSEHSAIFQCIQGLPEGALRRIILTASGGAFRDWPVEKLKEVKVADALK : 27
C.r. : IAGXPFVLPFAKHKRNVKILPADSEHSAIFQCIQGLPEGALRRIILTASGGAFRDWPVEKLKEVKVADALK : 27
A.t. : IAGGPFVLPFAKHKRNVKILPADSEHSAIFQCIQGLPEGALRRIILTASGGAFRDWPVEKLKEVKVADALK : 27
M.p. : IAGGPFVLPFAKHKRNVKILPADSEHSAIFQCIQGLPEGALRRIILTASGGAFRDWPVEKLKEVKVADALK : 27
      IAGGPFVLPFA KH VKILPADSEHSAIFQCIQGLPEGALR4IILTASGGAFRDWPVEKLKEVKVADALK

      *           300          *           320          *           340          *
L.e. : HENWNMGKKITVDSATLFLN-KGLEVIEAHYLFGAEYDNIETVIVHPOSIIHSMVETODSSVLAQLGWPDMR : 34
C.r. : HENWNMGKKITVDSATLFLN-KGLEVIEAHYLFGAEYDNIDIVIVHPOSIIHSMVETODSSVLAQLGWPDMR : 34
A.t. : HENWNMGKKITVDSATLFLN-KGLEVIEAHYLFGAEYDDIETVIVHPOSIIHSMIETODSSVLAQLGWPDMR : 34
M.p. : HSNWNMGKKITVRLQLFLFNKGLEVIKAHYLFGAEYDDIETVIVHSPSIIHSMVETODSSVLAQLGWPDMR : 34
      HpNWNMGKKITVdsatLfn KGLEVIEaHYLFGAEYD1IeIVIHpqSIIHSM6ETODSSVLAQLGWPDMR
      ↓

      *           360          *           380          *           400          *           420
L.e. : LPILYTLSPDRVYCESEITWPRDLCKLGSLLTFKPDNVKYPSEMDLAYAAGRAGGTMTGVLSAANEKAVE : 41
C.r. : LPILYTLSPDRISCESEITWPRDLCKLGSLLTFKPDNVKYPSEMDLAYAAGRAGGTMTGVLSAANEKAVE : 41
A.t. : LPILYTLSPDRVYCESEITWPRDLCKLGSLLTFKPDNVKYPSEMDLAYAAGRAGGTMTGVLSAANEKAVE : 41
M.p. : LPILYTLSPDRVYCESEITWPRDLCKVD-LPFFKPDNREIPAMDLAYAAGRSRSTMTGVLSAANEKAVE : 41
      LPILYT6SPDR6 CSE6TWPRDLCK6gsLTFK PDNVkyPsMDLAYaAg4aggTMTGVLSAANEKAVE

      *           440          *           460          *           480
L.e. : LFI SERISYLDIFKIVELTCAKHREELVSPSLEEIHYDLGARDYAASLFPSSGLSPALV : 475
C.r. : LFI DEKISYLDIFKIVVELTCAKHQAEVYTSPSLDEIHYDLGARDYAASFONSLGLSPALV : 474
A.t. : MFI DEKISYLDIFKIVVELTCDKHFNELVTSPSLEIVHYDLGAREYAANVLSGARPWHA : 477
M.p. : MFI DEKISYLDIFKIVVELTCDKHRSEMVAVSPSLEEIHYDLGARDYAATVLSAGLSPALV : 475
      6FIde4IsYLDIFK6VELTC KHR E6v SPSLeEI6HYDlwARdYAA S GlSPalv

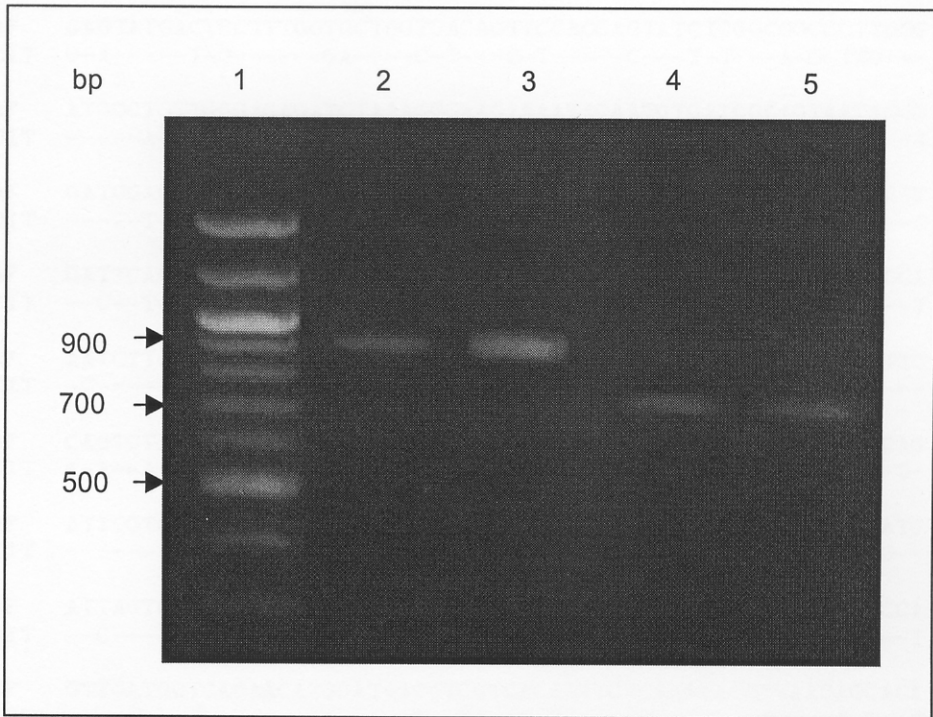
```

รูปที่ 13 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ DXR ในพืช โดยใช้โปรแกรม ClustalX 1.81 พืชที่ใช้เปรียบเทียบคือ *L. esculentum* (L.e.), *C. roseus* (C.r.), *A. thaliana* (A.t.) และ *Mentha x piperita* (M.p.) แถบสีดำคือบริเวณของอนุรักษ์ (Conserve region) และลูกศร คือ บริเวณที่เลือกมาออกแบบ primer

อิเล็กโทรโฟเรซิสบนเจลอะกาโรส 1.5% ใน 0.5X TAE buffer จะพบแถบ PCR product เพียงแถบเดียว ขนาดประมาณ 900 คู่เบส (base pair, bp) ดังรูปที่ 14 และเมื่อนำ PCR product มาทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุดทำให้บริสุทธิ์ QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) และเชื่อม PCR product กับ ดีเอ็นเอพาหะ pGEM[®]-T Easy (Promega) แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลูกผสมในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* XL1-Blue MRF' และนำมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้เครื่อง Biosystems 377 sequencer (Perkin-Elmer, USA) แล้วตรวจสอบผลการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอว่าเป็นยีน *dxs* หรือไม่กับข้อมูลของธนาคารยีน จากการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอดังกล่าวพบว่า เป็นยีน *dxs* ที่มี ลำดับนิวคลีโอไทด์ยาว 938 คู่เบส ทั้งในใบและผลปาล์มน้ำมัน แต่เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ยีน *dxs* จากเนื้อเยื่อทั้งสองมาเปรียบเทียบกันจะมีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ แม้จะ ให้ลำดับที่แปลเป็นรหัสสำหรับเอนไซม์ DXS เหมือนกัน โดยลำดับนิวคลีโอไทด์มีความแตกต่างกัน 19.19% (ความคล้ายคลึง 80.81%) ดังรูปที่ 15 และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาแปลเป็น กรดอะมิโน (http://www.dnalc.org/bioinformatics/dnalc_nucleotide_analyzer.htm) แล้วนำมา เปรียบเทียบพบว่าลำดับกรดอะมิโนมีความแตกต่างกัน 8.65% (ความคล้ายคลึง 91.35%) ดัง รูปที่ 16 จากข้อมูลที่พบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน *dxs* สำหรับ เอนไซม์ DXS จึงสรุปได้ว่ายีน *dxs* ในใบและผลปาล์มน้ำมันเป็นยีนที่มาจาก mRNA ต่างสายกัน ดังนั้นจึงให้ชื่อยีน *dxs* ในใบปาล์มน้ำมันเป็น *dxs1* และในชั้นเนื้อของผลปาล์มน้ำมัน *dxs2*

3.2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากส่วนของยีน *dxr* ในใบและผลปาล์มน้ำมัน

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากส่วนของยีน *dxr* จากใบและชั้นเนื้อของผลปาล์มน้ำมัน โดยใช้ degenerate primer จากข้อ 3.1 คือ FDXR และ RDXR ด้วยวิธี RT-PCR แบบขั้นตอนเดียว เมื่อตรวจสอบผลของ PCR product ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิสบนเจลอะกาโรส 1.5% ใน 0.5X TAE buffer จะพบแถบ PCR product เพียงแถบเดียวขนาดประมาณ 750-800 คู่เบส ดังรูปที่ 14 และ เมื่อนำมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้เครื่อง Biosystems 377 sequencer (Perkin-Elmer, USA) แล้วตรวจสอบผลการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอว่าเป็นยีน *dxr* หรือไม่กับข้อมูลของ ธนาคารยีน พบว่าแถบดีเอ็นเอดังกล่าวเป็นยีน *dxr* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ยาว 773 คู่เบส แปลเป็น กรดอะมิโนได้ประมาณ 257 ตัว ทั้งในใบและผลปาล์มน้ำมัน แสดงดังรูปที่ 17 เมื่อเปรียบเทียบ ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน *dxr* สำหรับเอนไซม์ DXR จากใบและผลปาล์ม น้ำมันพบว่าไม่แตกต่างกัน ดังนั้นดีเอ็นเอจากส่วนของยีน *dxr* ที่โคลนได้ทั้งในใบและผลปาล์ม น้ำมันจึงเป็นยีนที่มาจาก mRNA เส้นเดียวกัน



- รูปที่ 14 แบบแผนของ PCR product จากการทำ RT-PCR แบบขั้นตอนเดียวสำหรับยีน *dxs* และ *dxr* ในใบและผลปาล์มน้ำมัน แยกด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 1.5%
- ช่องที่ 1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 base pair ladders (Promega)
- ช่องที่ 2 แถบ PCR product ของยีน *dxs* ในผลปาล์มน้ำมัน
- ช่องที่ 3 แถบ PCR product ของยีน *dxs* ในใบปาล์มน้ำมัน
- ช่องที่ 4 แถบ PCR product ของยีน *dxr* ในผลปาล์มน้ำมัน
- ช่องที่ 5 แถบ PCR product ของยีน *dxr* ในใบปาล์มน้ำมัน

LEAF TGGGATGTTGGTCAATCAGTCATATCCACACAAGATCTTGACAGGGAGGAGAGACAAG : 57
 FRUIT -----C-C-----A--C---T-----A-----
 LEAF ATGCCAACTTTGAGACAGACAAAATGGCTTGTCTGGTTTCACTAAACGCTCAGAGAGC : 114
 FRUIT ----AC--AA-C-----AC-T-----G-G-G-G-----T
 LEAF GAGTATGACTCCTTTGGTGCTGGTCACAGTTCACCAGTATCTCGGCGGCCCTTGGG : 171
 FRUIT --A-----T-G-----GA---C-T---C-T-----C--T-T---A-G-TTG---
 LEAF ATGGCTGTTGGGAGAGATCTAAAGGGAAGAAAAACAATGTGATCGCAGTAATAGGG : 228
 FRUIT -----A-G-----T-G-A-----C--AG-T--T--T-----T
 LEAF GATGGAGCCATGACTGCCGGACAGGCATATGAGGCTATGAACAATGCTGGATATCTT : 285
 FRUIT -----T-----A--A-----A--T-----A-----A--G--C--G
 LEAF GATTCAGACATGATTGTCATACTGAATGACAACAAGCAGGTTTCTCTGCCCACTGCA : 342
 FRUIT --C--T--T-----T--T-C-----A--A-----T--A--A-----T
 LEAF AATCTTGATGGGCCTATACCACCAGTTGGAGCTTTGAGCAGTGCTCTCAGTAGATTG : 399
 FRUIT -C-----A--C--T-----G-----T-----G---
 LEAF CAGTCTAGCCGACCTCTAAGAGAAGCTCAGGGAGGTAGCTAAGGGAGTCACAAAGCAG : 456
 FRUIT --A--A-A-A-G-----C-G-----A--A-----T-----T-----G-
 LEAF ATTGGTGGCTCAATGCATAAACTAGCTGCABAAAGTTGATGAGTATGCTCGAGGAATG : 513
 FRUIT -----AC-C-----G--G--A-----G-----A-----T--G--
 LEAF ATTAGTGGATCTGGTTCAACCTTGTTCGAAGAGCTTGGTCTCTACTACATAGGTCCA : 570
 FRUIT --C-----T-----A-----C-C-----AT-A--T--T--T-----T
 LEAF GTTGATGGTCACAACATGGATGACCTCGTCACCATTCTCAAAGAGGTTAAGAGCACA : 627
 FRUIT -----C-----A-----T--TA-AG-T-----G---G-T--T
 LEAF AAAACAACAGGCCAGTTTTTCATCCATGTTGTGACTGAGAAAGGAAGAGGATACCCC : 684
 FRUIT -----T--T-----C--G--A-----C-----TC-G-G-----A
 LEAF TATGCGGAGAGAGCTGCTGACAAGTATCATGGTGTGCGAAAATTTGATCCATCAACT : 741
 FRUIT -----T---A-----A-----C-----G--TA-C--G-----TG---
 LEAF GGAAAGCAATTCAAATCTAGATCCAAGACTCAGTCTTATACAACTACTTTGCTGAG : 798
 FRUIT -----A-----GGGC--TG-T-TT--A-----C--T-CA-----A---
 LEAF GCTTTGATATCTGAAGCAGAGGTGGACAAAGATATTGTTGCAATTCATGCAGCAATG : 855
 FRUIT -----TG-A-----A-----G-----T-----
 LEAF GGAGGGGGAACAGGTCTCAACTACTTTCTTCGCCGCTTTCCGACAAGGTGTTTTGAT : 912
 FRUIT -----T-----CT-A--TCT--C-----T--C--A-----A--C-----
 LEAF GTTGAATAGCAGAACAACACGCAGT : 938
 FRUIT -----

- รูปที่ 15 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *dxs* ในใบและผลปาล์มน้ำมันที่ได้จากการทำ RT-PCR แบบชั้นตอนเดียว
 - แทนนิวคลีโอไทด์จากผลที่เหมือนกับในใบปาล์มน้ำมัน

```

LEAF      WDVGHQSYPHKILTGRRDKMPTLRQTNGLSGFTKRSESEYDSFGAGHSST : 50
FRUIT     -----H-I-----C-T-----

LEAF      SISAALGMAVGRDLKGRKNNVIAVIGDGAMTAGQAYEAMNAGYLSDMI : 100
FRUIT     -----G-----V-----

LEAF      VILNDNKQVSLPTANLDGPIPPV GALSSALSRLQSSRPLRELREVAKGVT : 150
FRUIT     -----T-----N-----

LEAF      KQIGGSMHKLA AKVDEYARGMISGSGSTLFEELGLYYIGPVDGHNMDLV : 200
FRUIT     -R---P-E-----G---I---

LEAF      TILKEVKSTKTTGPFVIHVVTEKGRGYPYAERAADKYHGVAKFD PSTGKQ : 250
FRUIT     A---G-G-----L-----K-----T---A---

LEAF      FKSRSKTQSYTNYFAEALISEAEVDKDIVA IHAAMGGGTGLNYFLRRFPT : 300
FRUIT     --GSAI-----T-----A-----L-----

LEAF      RCFDVGIAEQHA : 312
FRUIT     -----

```

- รูปที่ 16 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ DXS ในใบและผลปาล์มน้ำมัน
 - แทนกรดอะมิโนจากผลที่เหมือนกับในใบปาล์มน้ำมัน
 ลำดับกรดอะมิโนได้จากการนำนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการทำ RT-PCR แบบขั้นตอนเดียว
 มาแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนผ่านโปรแกรมคอมพิวเตอร์
 (http://www.dnalc.org/bioinformatics/dnalc_nucleotide_analyzer.htm)

```

GGCTCTATTGGAACCTCAGACATTAGACATAGTGGCTGAAAATCCAGATAAGTTTCGG : 57
  G S I G T Q T L D I V A E N P D K F R
GTGGTTGCACTTGCCGCTGGCTCTAATGTGACGCTCTTAGCTGATCAGGTCAAACAA :114
  V V A L A A G S N V T L L A D Q V K Q
TTCAAACCTCAATTGGTTTTCGGTAAGAAACGAGTCTTTGGTTGGAGAACTAAAAGAA :171
  F K P Q L V S V R N E S L V G E L K E
GCTTTGGCTGATGCAGAACACAAACCTGAAATAATTCCTGGGGAGCAAGGTGTTATA :228
  A L A D A E H K P E I I P G E Q G V I
GAGGTTGCTCGCCACCCAGATGCTGTGACAGTAGTCACAGGAATAGTAGGATGTGCA :285
  E V A R H P D A V T V V T G I V G C A
GGCTTAAAGCCTACTGTGGCTGCAATTGAGGCTGGAATTGACATAGCCTTGCCAAAC :342
  G L K P T V A A I E A G I D I A L A N
AAAGAGACTCTTATTGCAGGCGGTCCTTTTGTGCTTCTCTTGCACACAAGCATAAA :399
  K E T L I A G G P F V L P L A H K H K
GTGAAAATACTTCTGCTGATTTCAGAACATTCTGCCATATTCCAGTGTATTCAAGGT :456
  V K I L P A D S E H S A I F Q C I Q G
TTGCCAGAGGGTGCACCTTCGGCGCATAATTTTGACGGCATCTGGAGGAGCGTTCAGG :513
  L P E G A L R R I I L T A S G G A F R
GATTTGCCAGTTGAAAAGTTAAAGGAGGTGAAAGTTGCAGATGCTTTAAAACATCCA :570
  D L P V E K L K E V K V A D A L K H P
AACTGGAATATGGGGAAAAAGATCACTGTGGATTCTGCTACCCTTTTCAATAAGGGG :627
  N W N M G K K I T V D S A T L F N K G
TTAGAAGTTATTGAAGCACACTATCTATTTGGGGCGGAGTATGATATTATTGAGATT :684
  L E V I E A H Y L F G A E Y D I I E I
GTGATTCATCCACAGTCAATCATTCACTCTATGGTTGAGACACAGGATTCATCTGTT :741
  V I H P Q S I I H S M V E T Q D S S V
TTGGCTCAGTTGGGTTGGCCCCGATATGCGGTT :773
  L A Q L G W P D M R

```

รูปที่ 17 ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน *dxr* และเอนไซม์ DXR จากใบและผลปาล์ม
น้ำมัน

3.3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน *dxs1* ทางปลาย 3' และ 5' ในใบปาล์มน้ำมันจากวิธี RLM-RACE (RNA ligase-mediated rapid amplification of 5' and 3' cDNA ends)

3.3.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ทางปลาย 3' ของยีน *dxs1*

เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *dxs1* ในใบปาล์มน้ำมันที่โคลนได้จากข้อ 3.2.1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่สมบูรณ์เพราะเป็นส่วนหนึ่งของยีน ดังนั้นจึงทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ทางปลาย 3' ด้วยวิธี RLM-RACE จากการเตรียม first strand cDNA ดังวิธีการข้อ 2.3.2.1-2.3.2.4 แล้วทำการเพิ่มจำนวน cDNA โดยใช้ primer 5'-CTTTCTTCGCCGCTTCCGACAAGGTGT-3' (3FDXS1) สำหรับเป็น forward primer และ 5'-CGCTACGTAACGGCATGACAGTG-3' (GeneRacer™ 3' Nested) สำหรับเป็น reverse primer ดังวิธีการข้อ 2.3.2.5 แล้วนำ PCR product มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 1.5% ใน 0.5X TAE buffer พบว่ามีแถบของ PCR product แถบเดียวขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส ดังรูปที่ 18 จากนั้นตัดชิ้นเจลที่มีส่วนของแถบ PCR product ดังกล่าวมาสกัด PCR product ออกจากเจลโดยวิธีใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) และเชื่อม PCR product ที่สกัดได้กับดีเอ็นเอพาหะ pGEM®-T Easy (Promega) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลูกผสมในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* XL1-Blue MRF' จากนั้นนำมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ดังวิธีการข้อ 2.3.1.13 แล้วตรวจสอบผลการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอว่าเป็นยีน *dxs1* หรือไม่กับข้อมูลของธนาคารยีน พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอดังกล่าวเป็นยีน *dxs1* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ยาว 993 คู่เบส ดังรูปที่ 19

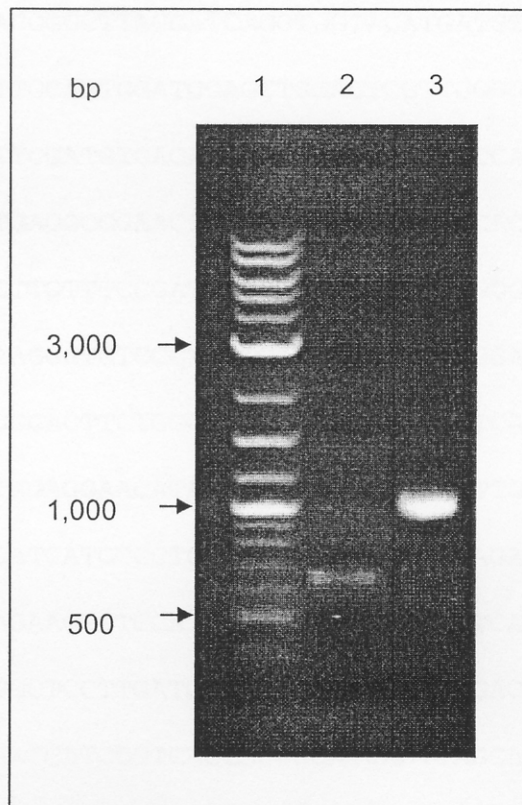
3.3.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ทางปลาย 5' ของยีน *dxs1*

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางปลาย 5' ด้วยวิธี RLM-RACE จากการนำ first strand cDNA จากข้อ 2.3.2.4 มาเพิ่มจำนวน cDNA โดยใช้ primer 5'-GGACACTGACATGGACTGAGGAGTA-3' (GeneRacer™ 5' Nested) สำหรับเป็น forward primer และ 5'-CAACAGCCATCCCAAGGGCCGCGAGAT-3' (5RDXS1) สำหรับเป็น reverse primer ดังวิธีการข้อ 2.3.13.5 แล้วนำ PCR product มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 1.5% ใน 0.5X TAE buffer พบว่ามีแถบของ PCR product เพียงแถบเดียวขนาดประมาณ 650 คู่เบส แสดงดังรูปที่ 18 จากนั้นตัดชิ้นเจลที่มีส่วนของแถบ PCR product ดังกล่าวมาสกัด PCR product ออกจากเจลโดยวิธีใช้ QIAquick Gel Extraction Kit และเชื่อม PCR product ที่สกัดได้กับดีเอ็นเอพาหะ pGEM®-T Easy (Promega) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอลูกผสมในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* XL1-Blue MRF' จากนั้นนำมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ดังวิธีการข้อ 2.3.1.13 แล้วตรวจสอบผลการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์

บนสายดีเอ็นเอว่าเป็นยีน *dxs1* หรือไม่กับข้อมูลของธนาคารยีน พบว่าแถบดีเอ็นเอดังกล่าวเป็นยีน *dxs1* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ยาว 609 คู่เบส ดังรูปที่ 20

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ทางปลาย 3' และ 5' ของยีน *dxs1* ประกอบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากการโคลนยีนข้อ 3.2.1 ทำให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน *dxs1* ดังรูปที่ 21 จากข้อมูลดังกล่าวพบว่ายีน *dxs1* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 2,301 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วยส่วนที่ไม่สามารถแปลเป็นรหัส (non-coding region) สำหรับเอนไซม์ DXS ทางปลาย 5' และ 3' จำนวน 45 และ 135 นิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ และส่วนที่เป็นรหัส (coding region) สำหรับเอนไซม์ DXS จำนวน 2,121 นิวคลีโอไทด์ โดยมีนิวคลีโอไทด์ที่เป็นรหัสเริ่มต้นในการสังเคราะห์เอนไซม์ DXS (start codon) คือ ATG และรหัสสำหรับสิ้นสุดการสังเคราะห์เอนไซม์ DXS (stop codon) คือ TAG ซึ่งบริเวณ coding region ของยีน *dxs1* สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนสำหรับเอนไซม์ DXS ได้ 707 กรดอะมิโน

เมื่อนำดับกรดอะมิโนที่เป็นรหัสสำหรับเอนไซม์ DXS จำนวน 707 กรดอะมิโน มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (http://au.expasy.org/cgi-bin/pi_tool) พบว่ามีมวลโมเลกุล 76.4 กิโลดาลตัน และมีค่า Isoelectric point (pI) เท่ากับ 7.0



รูปที่ 18 แบบแผนของ PCR product จากการทำ 3' และ 5' RACE สำหรับยีน *dxs1* ใน
 ใบปาล์มน้ำมัน แยกด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 1.5%
 ช่องที่ 1 แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 2-Log Ladder (BioLabs)
 ช่องที่ 2 แถบดีเอ็นเอจากการทำ 5' RACE
 ช่องที่ 3 แถบดีเอ็นเอจากการทำ 3' RACE

CTTTCTTCGCCGCTTTCCGACAAGGTGTTTTGATGTTGGAATAGCAGAACAACACG : 56
 CAGTCACATTTGCTGCTGGTCTAGCCTGTGAAGGCCCTTAAGCCTTTTTGCGCAATC :112
 TACTCATCATTCTTGCAACGGGCTTACGATCAGGTGGTACATGATGTGGATTTGCA :168
 GAAACTGCCGGTAAGGTTTGCAATGGATCGAGCTGGACTCGTTGGGGCTGATGGCC :224
 CAACTCATTGTGGATCATTCGATGTCACATACATGGCATGCCTGCCAAACATGGTC :280
 GTCATGACTCCTTCAGATGAGGCCGAACTATTTACATGGTTGCCACTGCAGCAGC :336
 CATCGATGACCGCCATCTTGTTCGATATCCTAGAGGTAATGGGGTTGGTGTTC :392
 CACTACCAGCAGGAAACAAGGGTGTCCCTCTTGAGGTGGGCAAAGGAAGGATACTG :448
 ATTGAGGGTGAGAGGGTGGCACTTCTGGGATATGGAGCAGCTGTTCAAGGCTGCTT :504
 GGCTGCTGCTTCCCTGCTAGAGGAACATAGCCTGAAAGTAACAGTTGCTGATGCGC :560
 GCTTCTGCAAGCCATTGGATCATGCCCTCATTCGGAGCCTAGCTAGATCACATGAG :616
 CTGCTTATCACGGTCGAAGAAGGCTCCATCGGGGGATTTGGCTCTCATGTTGCTCA :672
 GTTCATGGCACTTGATGGGCTCCTTGATGGCAAACCTGAAGTGGAGACCATTGGTTC :728
 TTCCGGACAGATACATCGACCATGGGTCACCAGCCGATCAGTTAGCAGAGGCTGGC :784
 TTGACACCATCTCATGTAGCAGCCACTGTATTTAATATGCTTGGACAAGCCAGAGA :840
 AGCTCTTGAAATCATGTCATAGGGGGAAAAAACAGCAGGAAAATGTGTTCTTCATC :896
 TAGATATAGAGGGTGGTCTTTGTCCCATTGCTTGTACATTTTGATGTTAGTGTGGT :952
 ATAAAGAACATAGGTCTTTGAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA :993

รูปที่ 19 ลำดับนิวคลีโอไทด์ทางปลาย 3' จากการทำ 3' RACE ด้วยวิธี RLM-RACE ของยีน *dxs1* จากไบโพลีเมอร์น้ำมันสายพันธุ์เทเนอรา

CCTCCTCCTCTGTTATTGTGGTACCTGTTGTTGCTTCTAAATCCTATGGCT : 51
 CTCTCTACATTCTCTTTCCCTTCCCAGATGCCCTCTCTTCTGTGTCCCCAC : 102
 TGGCTTGGCGGTGCTGACCTCCATTCCCACCAACATCAGTATAGACTTCTC : 153
 AAGACTAGGAAAAGGCCATGTGTTTGTGCATCACTATCAGAGCATGGAGAG : 204
 TATCATTCACAGAGACCACCAACTCCTCTCTTGGACACTATCAACTATCCC : 255
 ATCCATATGAAGAATCTCTCAATCAAGGAGCTTAAGCAGCTGGGGGATGAG : 306
 CTCCGTTCCGACATCATCTTCCATGTCTCAAAAACCGGAGGTCATCTTGGC : 357
 TCGAGCCTTGGTGTGGTTGAGCTAACAGTTGCCCTCCACCATGTCTTCAAT : 408
 GTCCTCAAGATAAGATACTCTGGGATGTTGGTCATCAGTCATATCCACAC : 459
 AAGATCTTGACAGGGAGGAGAGACAAGATGCCAACTTTGAGACAGACAAAT : 510
 GGCTTGTCTGGTTTCACTAAACGCTCAGAGAGCGAGTATGACTCCTTTGGT : 561
 GCTGGTCACAGTTCCACCAGTATCTCGGCGGCCCTTGGGATGGCTGTT : 609

รูปที่ 20 ลำดับนิวคลีโอไทด์ทางปลาย 5' จากการทำ 5' RACE ด้วยวิธี RLM-RACE ของยีน *dxs1* จากไบโพลีเมอร์น้ำมันสายพันธุ์เทเนอรา

CCTCCTCCTCTGTTATTGTGGTACCTGTTGTTGCTTCTAAATCCT -45
ATGGCTCTCTACATTCTCTTTCCCTTCCCAGATGCCCTCTCTTCTGTGTCCCCTACTGGCTTGGCGGTGCTGAC 75
 M A L S T F S F P S Q M P S L L C P H W L G G A D
 CTCCATTCCCACCAACATCAGTATAGACTTCTCAAGACTAGGAAAAGGCCATGTGTTTGTGCATCACTATCAGAG 150
 L H S H Q H Q Y R L L K T R K R P C V C A S L S E
 CATGGAGAGTATCATTACAGAGACCACCAACTCCTCTCTTGGACACTATCAACTATCCCATCCATATGAAGAAT 225
 H G E Y H S Q R P P T P L L D T I N Y P I H M K N
 CTCTCAATCAAGGAGCTTAAGCAGCTGGGGATGAGCTCCGTTCCGACATCATCTTCCATGTCTCAAAAACCGGA 300
 L S I K E L K Q L G D E L R S D I I F H V S K T G
 GGTACTCTTGGCTCGAGCCTTGGTGTGGTTGAGCTAACAGTTGCCCTCCACCATGTCTTCAATGCTCCTCAAGAT 375
 G H L G S S L G V V E L T V A L H H V F N A P Q D
 AAGATACTCTGGGATTTGGTCACTCAGTCATATCCACACAAGATCTTGACAGGGAGGAGACAAAGATGCCAAT 450
 K I L W D V G H C S Y P H K I L T G R R D K M P T
 TTGAGACAGAAATGGCTTGCTGGTTTCAACGCTCAGAGAGCGAGTATGACTCCTTTGGTGTGCTGGTCAC 525
 L R Q T N G L S G F T K R S E S E Y D S F G A G H
 AGTCCACCAGTATCTCGGCGGCCCTTGGGATGGCTGTGGGAGAGATCTAAAGGGAAGAAAAACAATGTGATC 600
 S S T S I S A A L G M A V G R D L K G R K N N V I
 GCAGTAATAGGGGATGGAGCCATGACTGCCGACAGGCATATGAGGCTATGAACAATGCTGGATGCTTGTATTCA 675
A V I G D G A M T A G O A Y E A M N N A G Y L D S
 GACATGATTGTCACTGAATGACAACAAGCAGGTTTCTGCCCCTGCAAACTTTGATGGGCTATACACCA 750
D M I V I L N D N K Q V S L P T A N L D G P I P P
 GTTGGAGCTTTGAGCAGTCTCAGTGTAGATTGCAGTCTAGCCGACTTAAGAGAACTCAGGGAGGTAGTAAAG 825
 V G A L S S A L S R L Q S S R P L R E L R E V A K
 GGAGTCAAAAGCAGATTGGTGGCTCAATGCATAAACTAGCTGCAAAAGTTGATGAGTATGCTCGAGGAATGATT 900
 G V T K Q I G G S M H K L A A K V D E Y A R G M I
 AGTGGATCTGGTCAACCTTGTCGAAGACTTGGTCTCTACTACATAGGTCCAGTTGATGGTGCACAACATGGAT 975
 S G S G S T L F E E L G L Y Y I G P V D G H N M D
 GACCTCGTCACCATTCTCAAAGAGGTTAAGAGCACAAAAACAACAGGCCAGTTTTTCATCCATGTGTGACTGAG 1050
 D L V T I L K E V K S T K T T G P V F I H V V T E
 AAAGGAAGAGGATACCCCTATCGGAGAGCTGTGACAAGTATCATGGTGTCCGAAAATTTGATCCATCAACT 1125
 K G R G Y P Y A E R A A D K Y H G V A K F D P S T
 GGAAAGCAATTCAAATCTAGATCCAAGACTCAGTCTTATACAACTACTTTGCTGAGGCTTTGATATCTGAAGCA 1200
 G K Q F K S R S K T Q S Y T N Y F A E A L I S E A
 GAGTGGACAAAGATATTGTCGAATTCATGCAGCAATGGGAGGGGGAACAGGTCTCAACTACTTTCTTCGCCCG 1275
 E V D K D I V A I H A A M G G G T G L N Y F L R R
 TTTCCGACAAGGTGTTTTGATGTTGGAATAGCAGAACAACAGCAGTACATTTGCTGTGCTGTAGCCTGTGAA 1350
 F P T R C F D V G I A E Q H A V T F A A G L A C E
 GGCCTTAAGCCTTTTTCGCAACTACTCATCTCTTTGCAACGGGCTTACGATCAGGTGGTACATGATGTGGAT 1425
 G L K P F A C I Y S S F L Q R A Y D Q V H D V D
 TTGCAGAAACTGCCGTAAGGTTTGCATGGATCGAGCTGGACTCGTTGGGGCTGATGGCCCAACTCATTGTGGA 1500
 L Q K L P V R F A M D R A G L V G A D G P T H C G
 TCATTGATGTACATATAGCCTGCCAAACTGGTTCGTCATGACTCCTTCAGATGAGGCCGAACACTATT 1575
 S F D V T Y M A C L P N M V M T P S D E A E L F
 CACATGGTTGCCACTGCAGCAGCCATCGATGACCGGCCACTTTGTTTCCGATATCCTAGAGGTAATGGGGTTGGT 1650
 H M V A T A A A I D D R P S C F R Y P R G N G V G
 GTTCCACTACCAGGAAACAGGGTGTCCCTCTTGGGTTGGGCAAAGGAAGGACTGATTGAGGGTGGAGAGG 1725
 V P L P A G N K G V P L E V G K G R I L I E G E R
 GTGGCACTTCTGGGATATGGAGCAGCTGTTCAAGGCTGCTTGGCTGCTGCTTCCCTGCTAGAGGAAACATAGCCCTG 1800
 V A L L G Y G A A V Q G C L A A A S L L E E H S L
 AAAGTAACAGTGTGATGCGCGCTTCTGCAAGCCATTGGATCATGCCCTCATTCCGAGCCTAGCTAGATCACAT 1875
 K V T V A D A R F C R P L D H A L I R S L A R S H
 GAGCTGCTTATCACGGTCCGAAGAAGGCTCCATCGGGGATTTGGCTCTCATGTTGCTCAGTTCATGGCACTTGAT 1950
 E L L I T V E E G S I G G F G S H V A Q F M A L D
 GGGCTCCTTGTGGCAAACTGAAGTGGAGACCATTGGTTCTTCCGACAGATACATCGACCATGGGTCCACCAGCC 2025
 G L L D G K L K W R P L V L P D R Y I D H G S P A
 GATCAGTTAGCAGAGGCTGGCTTGCACCATCTCATGTAGCAGCCATGATTTAATGCTTGGACAAGCCAGA 2100
 D Q L A E A G L T P S H V A A T V F N M L G Q A R
 GAAGCTCTTGAATCATGTCAAGGGGGAAAAACAGCAGGAAAATGTGTTCTTCTCATCTAGATATAGAGGGTGGT 2175
 E A L E I M S *
 CTTTGTCCCATTGCTGTACATTTTGTAGTGTGGTAATAAAGAACATAGGTCTTTGAGCAAAAAAAAAAAAA 2250
 AAAAAA 2256

รูปที่ 21 ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน *dxs1* และเอนไซม์ DXS จากไบปาล์มน้ำมัน

ATG = start codon, TAG = stop codon (*)

ลูกศร คือ บริเวณ Thiamine diphosphate binding site

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ DXS บริเวณ coding region ของยีน *dxs1* มาเปรียบเทียบกับความเหมือนระหว่างแบคทีเรีย สาหร่ายสีเขียว และพืชชนิดอื่นที่มีการศึกษามาแล้ว จากธนาคารยีนรวมทั้งหมด 26 ชนิด ข้อมูลดังตารางที่ 19 โดยใช้โปรแกรม Progressive alignment (Feng and Doolittle, 1990) พบว่าเอนไซม์ DXS ในปาล์มน้ำมันมีความเหมือนใกล้เคียงกับ *C. annuum* มากที่สุด 86% รองลงไปได้แก่ *L. esculentum* 85% ดังตารางที่ 20 และเมื่อเรียงลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ DXS จากแบคทีเรีย *E. coli*, สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* และพืชชนิดอื่นอีก 14 ชนิด ให้อยู่ในแนวเส้นตรง (alignment) โดยใช้โปรแกรม ClustalX 1.81 พบว่าเอนไซม์ DXS มีลำดับกรดอะมิโนที่มีลักษณะอนุรักษ์ (แถบสีดำ) หลายบริเวณด้วยกัน ดังรูปที่ 22 และมีความยาวของเปปไทด์ในช่วง ต้นของเอนไซม์ DXS จากสาหร่ายและพืชยาวมากกว่าใน *E. coli* โดยเปปไทด์ที่เพิ่มขึ้นมานี้อาจเป็นส่วนของเปปไทด์ที่นำเอนไซม์จากไซโทพลาสซึมไปทำงานยังออร์แกเนลเป้าหมาย (signal transit peptide)

3.4 ความยาวและลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่นำโปรตีนเข้าสู่คลอโรพลาสต์ (chloroplast transit peptides, CTP)

การโคลนยีนทางปลาย 5' และ 3' จนได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน *dxs1* ดังข้อ 3.6 ทำให้ทราบว่า coding region ของยีน *dxs1* สามารถแปลรหัส เป็นกรดอะมิโนสำหรับเอนไซม์ DXS ได้จำนวน 707 กรดอะมิโน เมื่อนำกรดอะมิโนทั้งหมด สำหรับเอนไซม์ DXS จากปาล์ม น้ำมัน มาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม TargetP, SignalP (Nielsen *et al.*, 1997; Nielsen *et al.*, 1999; www.cbs.dtu.dk/services/SignalP) และโปรแกรม Predator (www.inra.servilete/web/Predator) ทำให้ทราบว่าเอนไซม์ DXS ทำงานในพลาสต์หรือคลอโรพลาสต์ และมีส่วนของเปปไทด์ที่นำเอนไซม์จากไซโทพลาสซึมเข้าสู่คลอโรพลาสต์ด้วย และเมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ DXS จากปาล์มน้ำมันและพืชชั้นสูงอื่นๆอีก 14 ชนิด มาศึกษาความยาวของเปปไทด์ที่นำเอนไซม์ DXS จากไซโทพลาสซึมเข้าสู่คลอโรพลาสต์ โดยใช้โปรแกรม ChloroP 1.1 (Emanuelsson *et al.*, 1999; <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) พบว่าความยาวของเปปไทด์ที่นำเอนไซม์ DXS เข้าสู่คลอโรพลาสต์สำหรับพืชชั้นสูงนั้นอยู่ในช่วง 30-58 กรดอะมิโน โดยในปาล์ม น้ำมันมีความยาว 44 กรดอะมิโน ดังตารางที่ 21 และมีลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ ดังตารางที่ 22 ดังนั้นเอนไซม์ DXS ที่ทำงานจริง (mature DXS) ของปาล์มน้ำมันในคลอโรพลาสต์จึงมีจำนวนกรดอะมิโน 663 กรดอะมิโน

```

*      20      *      40      *      60
CATH : -----MAVSGAVIGLN-PPISPAYWTVPRLN-----YTARKQFCLRASSVNSSN : 43
STEV : -----MAVAGSTMNLH-LTSSP-YKTVPSLC-----KPTRKQFRLKASATNP-- : 40
NARC : -----MAVNGSLFSS--QAAFTLLRTPFSS-----SACRGQFHV GAS----- : 36
MED2 : -----MALSSCLLKNHSLQCHKFKAPNP-----HGFRNQFCVMAS----- : 38
ORYS : -----MALQAS-----SSPSMFRAIPTNTN-----ASCRRKLVASAAAAAA : 38
TAGE : -----MALCGALKGGFVPIAONGYTS SLLNPSANAIMPSNKRKFLGIVAVSKEHA : 51
MORI : -----MALNAFAFPGN---LSRVLVNSSIKQ-----SLLHSNWLCGTDLQLQFE : 41
MEDI : -----MDLC-SLACPSFVTPCDPRRTLPLPS-----SSSSHSQWGLHFFSHSQQH : 44
ANDR : -----MASVATWDRSASSPYLQE-----MASVATWDRSASSPYLQE : 18
CAPS : -----MALC-AYAFPGILNRTVAVASDASKPT-----PLFSEWINGTDLQFQFHOK : 45
LYCO : -----MALC-AYAFPGILNR-TGVVSDSSKAT-----PLFSGWINGTDLQFLQFHOK : 44
ARAB : -----MASS-AFAFPSYIITKGLSTDSCKST-----SLSSRSRLVTDLPSCLKP : 45
ARTE : -----MALS-AFAFPTQINHRSVTSNQ-----PLIQHCLFGTDLNS-SOKP : 39
PALM : -----MALS-TFSFPSQMP-----LLCPHWLGGADLHSHQHGY : 33
TRIT : -----MALSSTFSLPRGFLG-----VLPQEHFAPAVELQAKPL : 34
CHLA : -----MLRGVSHGPAVADRAAGPARCAAPVARG-----VRSAAPTRQRRAEASVNA : 49
ESCH : ----- : -

```

ma

```

*      80      *      100      *      120      *
CATH : DAEEGKMSI KKEKDG--WKIDFSGEKPEPILDDTINYEVHMKNISAE-----HDLEQLAAELRA : 100
STEV : DAEDGKMM-FKNDKPN--LKVEFAGEKEVPELDDTINYEVHMKNITTT-----QDLEQLAAELRQ : 96
NARC : GSEGERKLSVKKEKNT--SKIVYSGEKPAVPLDDTINDPAHMKNIST-----QDLEQLASELRL : 93
MED2 : SSSDGERTIIRKEKDE--WKINFSAEKPEPILDDTINYEVHMKNITTT-----EDLEQLAAELRA : 95
ORYS : NGGGDGKVMRKEAASGAWKIDYSGEKPAPELDDTINYEVHMKNIST-----PELEQLAAELRA : 97
TAGE : TNEHEDLTMDKTTST---TLKYSGDKEKPELDDTINYPIHMKNICV-----EELVKLADELRE : 107
MORI : CQNNQVMKNSRRVRASLSERGEYYSQRPEPILDDTINYPIHMKNISTKSHYLIQELKQLADELRS : 106
MEDI : NK--LKKKFGVVHASLSEM-GEYYSQRPEPILDDTINYPIHMKNIST-----KELKQLADELRS : 100
ANDR : QS--GKEKVKWNFASLAER-GEYFSEKPEPILDDTINYPIHMKNIST-----KELKQLADELRS : 74
CAPS : LT-QVKKRSRTVQASLSES-GEYYTQRPEPILDDTINYPIHMKNIST-----KELKQLADELRS : 102
LYCO : LTHEVKKRSRVVQASLSES-GEYYTQRPEPILDDTINYPIHMKNIST-----KELKQLADELRS : 102
ARAB : NNNSHSNRRAKVCASLAEK-GEYYSNRPEPILDDTINYPIHMKNIST-----KELKQLADELRS : 103
ARTE : FN-QIVKRSLGIRVSLSER-GEYHSQRPEPILDDTINYPIHMKNIST-----KELKQLADELRS : 96
PALM : RLKTRKR-PCVCSLSEH-GEYHSQRPEPILDDTINYPIHMKNIST-----KELKQLADELRS : 90
TRIT : KT--PRRRSSGISASLSEREAHYHSQRPEPILDDTINYPIHMKNIST-----KELKQLADELRS : 91
CHLA : RAGPAGSYSGEWDKLSVEEIDEDWRDVGKPELDDTINYEVHMKNFNN-----EQLKQLCKELRS : 108
ESCH : -----MSFDIAKYETLALVDSTQELRLLPK-----ESLPKLCEDELRS : 37

```

p tP ldt nyp hmknL L qL ELR

```

140 ↓ *      160      *      180      *
CATH : EIVYSVAKTEGHLSSSLGVEELTVALHHVENTPDDKLIWDVGHQAYECHKILTGRRSKMHTLRQTS : 165
STEV : DIVYSVANTEGHLSSSLGVEELTVALHHVENTPDDKLIWDVGHQAYECHKILTGRRSKMHTLRQTS : 161
NARC : DIVHSVSKTEGHLSSSLGVEELTVALHHVENTPDDKLIWDVGHQAYECHKILTGRRSRMHTLRQTS : 158
MED2 : DIVHSVEDTEGHLSSSLGVEELTVALHHVENTPDDKLIWDVGHQAYECHKILTGRRSRMHTLRQTS : 160
ORYS : EIVHTVSKTEGHLSSSLGVEELTVALHHVENTPDDKLIWDVGHQAYECHKILTGRRSRMHTLRQTS : 162
TAGE : EIVYTVSKTEGHLSSSLGVEELTVALHHVENTPDDKLIWDVGHQAYECHKILTGRRSRMHTLRQTF : 172
MORI : DIIFNVSKEGHLGSSSLGVEELTVALHYVENTPDDKLIWDVGHQAYECHKILTGRRSKMHTLRQTY : 171
MEDI : DVIFSVSRTEGHLGSSSLGVEELTVALHYVENTPDDKLIWDVGHQSYECHKILTGRRDKMHTLRQTN : 165
ANDR : DVIFNVSKTEGHLGSSSLGVEELTVALHYVENTPDDKLIWDVGHQSYECHKILTGRRNMHTLRQTD : 139
CAPS : DTIFNVSKTEGHLGSSSLGVEELTVALHYVENTPDDKLIWDVGHQSYECHKILTGRRDKMHTLRQTN : 167
LYCO : DTIFNVSKTEGHLGSSSLGVEELTVALHYVENTPDDKLIWDVGHQSYECHKILTGRRDKMHTLRQTD : 167
ARAB : DVIFNVSKTEGHLGSSSLGVEELTVALHYVENTPDDKLIWDVGHQSYECHKILTGRRDKMHTLRQTN : 168
ARTE : DVIFNVSKTEGHLGSSSLGVEELTVALHYVENTPDDKLIWDVGHQSYECHKILTGRRDKMHTLRQTN : 161
PALM : DIIFNVSKEGHLGSSSLGVEELTVALHHVENTPDDKLIWDVGHQSYECHKILTGRRDKMHTLRQTN : 155
TRIT : DIIFNVSKEGHLGSSSLGVEELTVALHYVENTPDDKLIWDVGHQSYECHKILTGRRDKMHTLRQTN : 156
CHLA : DIVHTVSRTEGHLSSSLGVEELTVALHYVENTPDDKLIWDVGHQAYECHKILTGRRKMATLRQTN : 173
ESCH : YLLDSVSRSSGHFAAGLGTVELTVALHYVENTPDDKLIWDVGHQAYECHKILTGRRDKIGTIRQKG : 102

```

Vs tGHL ssLGvveLtvAlH vfn P D i WDVGHQ YpHKILTGRR m T Rqt

รูปที่ 22 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ DXS ในปาล์มน้ำมันกับพืชชนิดอื่น สหราชอาณาจักร และ *E. coli* โดยใช้โปรแกรม ClustalX 1.81
 ลูกศร คือ กรดอะมิโนที่เป็นบริเวณเร่งปฏิกิริยา (catalytic site) ของเอนไซม์ DXS


```

      200          *          220          *          240          *          260
CATH : GLAGFPKRDESIYDAFGAGHSSTSI SAGLGMVAARDLLGKNNNVI SVIGDGAMTAGQAYEAMNNA : 230
STEV : GLAGFPKRDESAHDAFGAGHSSTSI SAGLGMVAGRDLLGKNNNVI SVIGDGAMTAGRAYEAMNNA : 226
NARC : GLAGFPKRDESVHDAFGAGHSSTSI SAGLGMVAARDLLGKNNHVI SVIGDGAMTAGQAYEAMNNV : 223
MED2 : GLAGFPKRDESVHDAFGVGHSSSTSI SAGLGMVAARDLLGKKNNSVI SVIGDGAMTAGQAYEAMNNA : 225
ORYS : GLAGFPKRDESAHDAFGAGHSSTSI SAAALGMVAARDLLGKNNHVI SVIGDGAMTAGQAYEAMNNS : 227
TAGE : GLAGFPKRDESNHDAFGAGHSSTSI SAGLGMVAGRDLLGKNNHVI SVIGDGAMTAGQAYEAMNNA : 237
MORI : GLAGFPKRDESVYDAFGAGHSSTSI SAGLGMVAGRDLLGKNNNVI SVIGDGAMTAGQAYEAMNNA : 236
MEDI : GLSGFTKRSESEYDCEFGTGHSSSTTI SAGLGMVAGRDLLGKNNHVI SVIGDGAMTAGQAYEAMNNA : 230
ANDR : GLCGFTKRSESNYDCFGAGHSSTTI SAGLGMVAGRDLLGKNNHVI SVIGDGAMTAGQAYEAMNNA : 204
CAPS : GLAGFTKRSESEYDCEFGTGHSSSTTI SAGLGMVAGRDLLGKNNHVI SVIGDGAMTAGQAYEAMNNA : 232
LYCO : GLAGFTKRSESEYDCEFGTGHSSSTTI SAGLGMVAGRDLLGKNNHVI SVIGDGAMTAGQAYEAMNNA : 232
ARAB : GLSGFTKRGESEHDCFGTGHSSSTTI SAGLGMVAGRDLLGKNNHVI SVIGDGAMTAGQAYEAMNNA : 233
ARTE : GLAGFTKRSESEHDCFGTGHSSSTTI SAGLGMVAGRDLLGKNNHVI SVIGDGAMTAGQAYEAMNNA : 226
PALM : GLSGFTKRSESEYDCEFGAGHSSTSI SAAALGMVAGRDLLGKNNHVI SVIGDGAMTAGQAYEAMNNA : 220
TRIT : GLSGFVKRSESEYDCEFGTGHSSSTTI SAAALGMVAGRDLLGKNNHVI SVIGDGAMTAGQAYEAMNNA : 221
CHLA : GLSGFTKRDESEYDCEFGAGHSSTSI SAAALGMVAGRDVKGKNNHVI SVIGDGAMTAGQAYEAMNNA : 238
ESCH : GLHPEPWRGESEYDVLVSVGHSSSTSI SAGIGIIVAAEKEGKNNRRTVCIIGDGAMTAGMAFEAMNNA : 167
Gl gF kR ES D fg GHSST ISA lGmAV rdl G n v vIGDGAMtaGqAyEAmNna

```

```

      *          280          *          300          *          320
CATH : GFILDANLIVLNDNKQVSLPTATLDGPATEVVGALSALSKLQASPKFROLREAAKRSITKROI GPQA : 295
STEV : GFILDANLIVLNDNKQVSLPTATLDGPATEVVGALSALSKLQASTKFRKLRREAAKRSITKROI GPQA : 291
NARC : GYLDANLIVLNDNKQVSLPTATLDGPATEVVGALSALAKLQASAKFROLREAAKRSITKROI GGQA : 288
MED2 : GFILDANLIVLNDNKQVSLPTATLDGPATEVVGALSSTLSKLCASRKFRLREAAKRSITKROI GGQT : 290
ORYS : GYLDANLIVLNDNKQVSLPTATLDGPATEVVGALSALSKLQASPKFROLREAAKRSITKROI GGQA : 292
TAGE : GYLDANLIVLNDNRQVSLPTATLDGPATEVVGALSRLTRLOTSQKFRQLREAAFEVTKROI GDDKT : 302
MORI : GFILDANLIVLNDNKQVSLPTATLDGPATEVVGALSALSKLQASPKFROLREAAKRSITKROI GPQA : 301
MEDI : GYLDSDMIVLNDNKQVSLPTATLDGPIPEVVGALSALSRQSNRPLRELRVARGVTROI GGPM : 295
ANDR : GYLDSDMIVLNDNKQVSLPTANLDGPIPEVVGALSALSRQSNRPLRELRVARGVTROI GGSM : 269
CAPS : GYLDSDMIVLNDNRQVSLPTATLDGPATEVVGALSALSRQSNRPLRELRVARGVTROI GGPM : 297
LYCO : GYLDSDMIVLNDNRQVSLPTATLDGPATEVVGALSALSRQSNRPLRELRVARGVTROI GGPM : 297
ARAB : GYLDSDMIVLNDNKQVSLPTATLDGPPPEVVGALSALSRQSNPALRELRVARGMTROI GGPM : 298
ARTE : GYLDSDMIVLNDNKQVSLPTANLDGPIPEVVGALSALSRQSNRPLRELRVARGVTROI GGPM : 291
PALM : GYLDSDMIVLNDNKQVSLPTANLDGPIPEVVGALSALSRQSNRPLRELRVARGVTROI GGSM : 285
TRIT : GYLDSDMIVLNDNKQVSLPTATLDGPATEVVGALSALSKLQASPKFROLREAAKRSITKROI GGSV : 286
CHLA : GFILDKNMIVLNDNRQVSLPTQYNNKNQDEVVGALSALARDQANRPLRELRVARGVTROI PDVV : 303
ESCH : GDIRPDMLVILNDN-EMTISEN-----VGLNHHLAQLLSGKLYSSLRGGRKVFSGVP-PI : 222
G ld iv LNDN qvslpta ldgp pVGALs aL lq r LRE aK tkqig

```

```

      *          340          *          360          *          380          *
CATH : HEVAAKVDEYARGMISASSTLFEELGLYYIGPVDGHSIBDLVTFQVKKAMPAPGPVLIHVITE : 360
STEV : HEVAAKVDEYARGMISASSTLFEELGLYYIGPVDGHNVEIDLVNDFEKVKSMAPGPVLIHVITE : 356
NARC : HEVAAKVDEYARGMISASASTLFEELGLYYIGPVDGHNVEIDLVAIFKKVAMPAPGPVLIHVITE : 353
MED2 : HLVGSKVDKYARDFISGSSSLFEELGLYYIGPVDGHNIEIDLVNDFEKVKAMPAPGPVLIHVITE : 355
ORYS : HEVAAKVDEYARGMVSASSTLFEELGLYYIGPVDGHSVDDLVAIFNKKVSMAPGPVLIHVITE : 357
TAGE : HEVAAKMDSLVKEMVGGQASMFEEELGLYYIGPVDGHNLEIDLVYVDFDKIKSMTABGPVLIHVITE : 367
MORI : HEVAAKVDEYARGLISASSTLFEELGLYYIGPVDGHNIEDLITLFDKVKTMPAPGPVLIHVITE : 366
MEDI : HELAAKVDEYAREMISGTSSTLFEELGLYYIGPVDGHNIDDLVAALKEVKSTKTTGPVLIHVITE : 360
ANDR : HELAAKVDEYARELISGSSSTLFEELGLYYIGPVDGHNIDDLTALKEVKSTKTTGPVLIHVITE : 334
CAPS : HELAAKVDEYAREMISGSSSTLFEELGLYYIGPVDGHNIDDLISLKEVRSKTTGPVLIHVITE : 361
LYCO : HELAAKVDEYAREMISGSSSTLFEELGLYYIGPVDGHNIDDLIALKEVRSKTTGPVLIHVITE : 362
ARAB : HQLAAKVDEYAREMISGTSSTLFEELGLYYIGPVDGHNIDDLVAALKEVKSTRTTGPVLIHVITE : 363
ARTE : HELAAKVDEYAREMISGSSSTLFEELGLYYIGPVDGHSIDDLVAALKEVKSTKTTGPVLIHVITE : 356
PALM : HKLAAKVDEYAREMISGSSSTLFEELGLYYIGPVDGHNMDLVTILKEVKSTKTTGPVLIHVITE : 350
TRIT : HELAAKVDEYAREMISGSSSTLFEELGLYYIGPVDGHNIDDLITLREVKGKTTGPVLIHVITE : 351
CHLA : QKATAKIDYAREMISGTSSTLFEELGLYYIGPVDGHNLDLIALVLSVRSABTVGPVLIHVITE : 368
ESCH : KELLKRTEBHIKEMVVPG--TLFEELGFNYIGPVDGHDVLGTLITLKNMRDLK--GPQFLHIMTK : 283
h aakvdeyargm s gs lFEELGLyYiGpvdGH dL i v GPvL H Te

```

รูปที่ 22 (ต่อ)

บริเวณที่ขีดเส้นใต้ คือ บริเวณ Thiamine diphosphate binding site

400 * 420 * 440 *

CATH : KGKGYEPAEVAADKMHGVVVKFDPKTGKQFKSKSPILSYTOYFAESLIKEAETDNKTIATHAAMGG : 425
 STEV : KGKGYEPAEAAAADRMHGCVVVKFDVPTGKQFKTKSPILSYTOYFAESLIKEAEDNKTIVATHAAMGG : 421
 NARC : KGKGYEPAEAAAADKMHGVVVKFDPKTGKQFKTKFPILSYTOYFAESLVKEAEVDEKTIATHAAMGG : 418
 MED2 : KGKGYEPALAAAADRMHGCVVVKFDPKTGKQFKPKPSFLAYTOYFAEDSLIKEAEMDNKTIATHAAMGG : 420
 ORYS : KGKGYEPAEAAAADRMHGCVVVKFDPTGKQFKSKCSTLSYTOYFAEALIREAEADDKVVGITHAAMGG : 422
 TAGE : KGKGYEPAEVAADKMHGVVVKFDPTGKQKKNKTILSYTOYFVDSLVAEAKBDDKTIATHAAMGG : 432
 MORI : KGKGYEPAEAAAADRMHGCVVVKFDVASKQFKSKSPILSYTOYFAEALIKEAETDNKTIATHAAMGG : 431
 MEDI : KGRGYEYAAQKAADKYHGVAKFDPTGKQFKVAAKTQSYTTYFAEALIAEAKADKDIATHAAMGG : 425
 ANDR : KGRGYEYAEKAADKYHGVAKFDPTGKQFKSSTPTQAYTTYFAEALIAEAEQDNIIATHAAMGG : 399
 CAPS : KGRGYEYAEAAADKYHGVAKFDPTGKQFKGSAKTQSYTTYFAEALIAEAEADKDIATHAAMGG : 426
 LYCO : KGRGYEYAEAAADKYHGVAKFDPTGKQFKASAKTQSYTTYFAEALIAEAEADKDIATHAAMGG : 427
 ARAB : KGRGYEYAEAAADKYHGVVVKFDPTGKQFKTKTNKTQSYTTYFAEALVAEAEVDKDVATHAAMGG : 428
 ARTE : KGRGYEYAEKAADKYHGVGKFDPTGKQFKSAPTQSYTTYFAEALIAEAEADKKTIVITHAAMGG : 421
 PALM : KGRGYEYAEAAADKYHGVAKFDPTGKQFKSRSKTQSYTTYFAEALISEAEVDKDIATHAAMGG : 415
 TRIT : KGRGYEYAEAAADKYQVAKFDPTGKQFKGPAKILSYTTYFAEALIAQAGODSKTIATHAAMGG : 416
 CHLA : KGRGYLPAETAQDKMHGVVVKFDPTGKQVQAKTKAMSYTTYFAEALIAEAEERDSRIYAVHAAMAG : 433
 ESCH : KGRGYEPAEKDPITFHAVPKFDESSGCLPKSSGGLPSYSKIFGDWLCETAAKDNKLMATPAMRE : 348
 KG GYp Ae a d hgV KFDp tG qfk t sYt yFa L eA D ivaihaAMgg

460 * 480 * 500 * 520

CATH : GTGLNYEOKREPDRCFDVGIAEQHAVTFAAGLATEGLKPFCAIYSSFLQRYDQVVDVLDLQKLP : 490
 STEV : GTGLNYEQKKCPBRCEFDVGIAEQHAVTFAAGLATEGLKPFCAIYSSFLQRYDQVVDVLDLQKLP : 486
 NARC : GTGLNYEQKKEPDRCFDVGIAEQHAVTFAAGLATEGLKPFCAIYSSFLQRYDQVVDVLDLQKLP : 483
 MED2 : GTGLNYEQKREPDRCFDVGIAEQHAVTFAAGLATEGLKPFCAIYSSFLQRYDQVVDVLDLQKLP : 485
 ORYS : GTGLNYEHKREPDRCFDVGIAEQHAVTFAAGLATEGLKPFCAIYSSFLQRYDQVVDVLDLQKLP : 487
 TAGE : GTGLNYEQKEEPRCFDVGIAEQHAVTFAAGLATEGLKPFCAIYSSFLQRYDQVVDVLDLQKLP : 497
 MORI : GTGLNYEQKIEPDRCFDVGIAEQHAVTFAAGLATEGLKPFCAIYSSFLQRYDQVVDVLDLQKLP : 496
 MEDI : GTGMNLEHRRPEPRCFDVGIAEQHAVTFAAGLATEGLKPFCAIYSSFLQRYDQVVDVLDLQKLP : 490
 ANDR : GTGMNLEDRREPDRCFDVGIAEQHAVTFAAGLATEGLKPFCAIYSSFLQRYDQVVDVLDLQKLP : 464
 CAPS : GTGMNLELRREPDRCFDVGIAEQHAVTFAAGLATEGLKPFCAIYSSFLQRYDQVVDVLDLQKLP : 491
 LYCO : GTGMNLEHRRPEPRCFDVGIAEQHAVTFAAGLATEGLKPFCAIYSSFLQRYDQVVDVLDLQKLP : 492
 ARAB : GTGMNLEORREPDRCFDVGIAEQHAVTFAAGLATEGLKPFCAIYSSFLQRYDQVVDVLDLQKLP : 493
 ARTE : GTGMNLELRREPDRCFDVGIAEQHAVTFAAGLATEGLKPFCAIYSSFLQRYDQVVDVLDLQKLP : 486
 PALM : GTGLNYELRREPDRCFDVGIAEQHAVTFAAGLATEGLKPFCAIYSSFLQRYDQVVDVLDLQKLP : 480
 TRIT : GTGLNYELRREPDRCFDVGIAEQHAVTFAAGLATEGLKPFCAIYSSFLQRYDQVVDVLDLQKLP : 481
 CHLA : GTGLYREFEKKEPDRCFDVGIAEQHAVTFAAGLATEGLVPELTIYSTFMQRYDQVVDVLDLQKLP : 498
 ESCH : GSEMVVEISRKEPDREYDVAIAEQHAVTFAAGLATEGYKPIVATYSTFLQRYDQVVDVLDLQKLP : 413
 Gt g N F fP RCFDVGIAEQHAVTFAAGLA eGlkPfcAIYSSf QR YDQVVDVLDLQkLP

* 540 * 560 * 580

CATH : VRFANDRAGLVGADGETHC GA F DVAYMACLPNMVMAPSDAEELMHNVAATAAIDDRPSCFRFPR : 555
 STEV : VRFANDRAGLVGADGETHC GA F DITYMACLPNMVMAPADEAELMHNVAATAAIDDRPSCFRFPR : 551
 NARC : VRFANDRAGLVGADGETHC GA F DVTYMACLPNMVMAPSDAEELMHNVAATAAIDDRPSCFRFPR : 548
 MED2 : VRFANDRAGLVGADGETHC GA F DITFMACLPNMVMAPSDAEELMHNVAATAAIDDRPSCFRFPR : 550
 ORYS : VRFANDRAGLVGADGETHC GA F DVAYMACLPNMVMAPADEAELMHNVAATAAIDDRPSCFRFPR : 552
 TAGE : VRFANDRAGLVGADGETHC GA F DITFMACLPNMVMAPSCAEELMHNVAATAAIDDRPSCFRFPR : 562
 MORI : VRFANDRAGLVGADGETHC GA F DVAYMACLSNMVMAPADEAELMHNVAATAAIDDRPSCFRFPR : 561
 MEDI : VRFANDRAGLVGADGETHSGSFDVTFMACLPNMVMAPSDAEELCHNVATAAATIDDRPSCFRFPR : 555
 ANDR : VRFANDRAGLVGADGETHC GA F DITYMACLPNMVMAPADEAELFHMVATAAATIDDRPSCFRFPR : 529
 CAPS : VRFANDRAGLVGADGETHC GA F DVTFMACLPNMVMAPSDAEELFHVATAAATIDDRPSCFRFPR : 556
 LYCO : VRFANDRAGLVGADGETHC GA F DVTYMACLPNMVMAPSDAEELFHMVATAAATIDDRPSCFRFPR : 557
 ARAB : VRFANDRAGLVGADGETHC GA F DVTFMACLPNMVMAPSDAEELFHMVATAAATIDDRPSCFRFPR : 558
 ARTE : VRFANDRAGLVGADGETHSGSFDVTFMACLPNMVMAPSDAEELFHMVATAAATIDDRPSCFRFPR : 551
 PALM : VRFANDRAGLVGADGETHSGSFDVTFMACLPNMVMAPSDAEELFHMVATAAATIDDRPSCFRFPR : 545
 TRIT : VRFANDRAGLVGADGETHC GA F DVAFMACLPNMVMAPSDAEELMNVATAAATIDDRPSCFRFPR : 546
 CHLA : VRFANDRAGLVGADGETHC GA F DVTFMACLPNMVMAPSDAEELMNVATAAATIDDRPSCFRFPR : 563
 ESCH : VRFANDRAGLVGADGETHC GA F DLSYLRCIFBNMVMAPSDAEELMNVATAAATIDDRPSCFRFPR : 478
 VRFAmDRAGLVGADGpTHcGAFD maclpnM vMaP dEael mvaTaaaidDrPscfR PR

```

*          600          *          620          *          640          *
CATH : GNCICVALPP-----NNKCTPLETCKGRILLVCGSRVAILLGYGSIWQQLGAEMLKSHNVSPITVA : 615
STEVE : GNCICAPLPP-----NNKCIPLVVGKGRILLVCGTRVAILLGYGSIWQQLGAASLLQAHNVSATVA : 611
NARC : GNEVYVALPS-----DYKCTPLETCKGRILLVCGDKVAILLGYGSIWQQLKKAAGSLRREGISATVA : 608
MED2 : GNCICANLPL-----NNKCTPLETCKGRILLVCGSRVAILLGYGSIWQQLKKAEMLRVAVGYVTV : 610
ORYS : GNCICAVLPP-----NNKCTPLEVVGKGRVLLVGGNRVALLVGYGTMVQACMKAAEALKEHGIYVTV : 612
TAGE : GNCISGILPA-----NNKCTLLEVGTGRVILKCGNRVALLVGYGTIVOSQLAAEVLKKGISVTV : 622
MORI : GNCICAKLPP-----DNKCNLIGTCKGRILLVCGSRVAILLGYGAIWQQLGAEMLKHLHNKPTIA : 621
MEDI : GNCICVELPT-----EYKCIPLVVGKGRILLVCGSRVALLVGYGSAVONCLAAASLVEQHGRLRTVA : 615
ANDR : GNCICVELPP-----GNKCIPLVVGKGRILLVCGSRVALLVGYGTAVOSQMTAAALMEPHGLQLTVA : 589
CAPS : GNCICVELPA-----GNKCIPLVVGKGRILLVCGSRVALLVGYGSAVONCLAAASVLESRGLQVTV : 616
LYCO : GNCICVELPA-----GNKCIPLVVGKGRILLVCGSRVALLVGYGSAVONCLDAASVLESRGLQVTV : 617
ARAB : GNCICVALPP-----GNKGVPLVVGKGRILLVCGSRVALLVGYGSAVOSQLGAAMVLEERGLNVTVA : 618
ARTE : GNCICVPLPP-----GNKGVPLVVGKGRIMLVCGSRVALLVGYGTAVOSQMAAATVQERGLNITVA : 611
PALM : GNCICVPLPA-----GNKGVPLVVGKGRILLVCGSRVALLVGYGAAVQQLAAASLLEHSLKVTVA : 605
TRIT : GNCICVPLPE-----NYKCTALVVGKGRIMLVCGSRVALLVGYGSAVOYQMAASIVAHHGLRVTVA : 606
CHLA : GNCIGLLDAAAYGISKDLKCVPLVVGKGVVRRQKDVCLVAVGSSVNEALAAADMLERDGVSTTVI : 628
ESCH : GNAVCVELTP-----LEKLPVCGKIVKRRGKLLIINEGFLMPEAAKVEESLN-----ATLV : 530
GNg G Lp          kg e GkGr eG rva lgyG vq c aa          Tva

```

```

          660          *          680          *          700          *
CATH : DARFCKPLDGLLIRTLAKEHEIILITVEE-CSIIGFGSHVTHLSLITGLIDCPVVRSLFLPDRYI : 679
STEVE : DARFCKPLDGLLIRRLANEHEVILITVEE-CSIIGFGSHVAHLSLSINELLDCPKLKLRAMTLEDKLI : 675
NARC : DGRFCKPLDSELLRRVNEHEIILITVEE-CSIIGFGASHVSHLSLSINELLDCPKLKLRSMLPDRYI : 672
MED2 : DARFCKPLDGLLIRLLAREHEIILITVEE-CSIIGFGSHVSHLSLSINELLDCPKLKLRSMLPDRYI : 674
ORYS : DARFCKPLDGLLIRLAEAEHEVILITVEE-CSIIGFGSHVAHYLSLSINELLDCPKLKLRSMLPDRYI : 676
TAGE : DARFCKPLDGNLIRQLANEHEVILITVEE-CSIIGFGSHVSHLSLSINELLDCPKLKLRSMLPDRYI : 686
MORI : DARFCKPLDGLLIRLAKHEHEIILITVEE-CSIIGFGSHVSHLSLSINELLDCPKLKLRSMLPDRYI : 685
MEDI : DARFCKPLDRSLIRSLAKSHEVILITVEE-CSIIGFGSHVAQPMALDGLLIDCNLKWRFVPLPDRYI : 679
ANDR : DARFCKPLDGLLIRRLANSHEVILITVEE-CAVGFAAHVAVQPMALDGLLIDCNLKWRFVPLPDRYI : 653
CAPS : DARFCKPLDRALLIRSLAKSHEVILITVEE-CSIIGFGSHVQPMALDGLLIDCNLKWRFVPLPDRYI : 680
LYCO : DARFCKPLDHALLIRSLAKSHEVILITVEE-CSIIGFGSHVQPMALDGLLIDCNLKWRFVPLPDRYI : 681
ARAB : DARFCKPLDRALLIRSLAKSHEVILITVEE-CSIIGFGSHVQPMALDGLLIDCNLKWRFVPLPDRYI : 682
ARTE : DARFCKPLDHSLLIRALAKTHEVILITVEE-CSIIGFGSHVAHLSLADGLLIDCNLKWRFVPLPDRYI : 675
PALM : DARFCKPLDHALLIRSLAKSHEVILITVEE-CSIIGFGSHVAQPMALDGLLIDCNLKWRFVPLPDRYI : 669
TRIT : DARFCKPLDHALLIRSLAKSHEVILITVEE-CSIIGFGSHVAQPMALDGLLIDCNLKWRFVPLPDRYI : 670
CHLA : DARFCKPLDTKLIRSAKHEPVMITIEE-CSVGFAAHVMOQLALEGLLIDCNLKWRFVPLPDRYI : 692
ESCH : DMRFCKPLDETLLILEMAASHEAVITVEENALMGGAGSGVNEVLMAH---RFPVPLNIGLDPDFFI : 592
DarFCKPLD LI la He l TvEe gsiGGf shV f l gllDg lk r LPDryI

```

```

          720          *          740          *
CATH : DHGAEVDQIEEAGLSSRHICATVLSLIGKPKKALQKQ----- : 716
STEVE : DHGAEVDQIEEAGLSSKHICSSLLSLLGKPKKALQYKSIM---- : 715
NARC : DHGAEVDQIEEAGLSSKHICATVLSLIGRPMFAFQLQ----- : 709
MED2 : DHGAEVDQIEEAGLSSKHILATVLSLIDMPKKAALFK----- : 711
ORYS : DHGAEVDQIEEAGLTPRHIAATVLSLIGRPLEAALQLS----- : 713
TAGE : EHGAEVDQIEEAGLSSKHIAATVLSLIGSKKTEHALNV---- : 725
MORI : DHGAEVDQIEEAGLSSRHICATVLSLIGKPKKALQKQ----- : 722
MEDI : DHGAEVDQIEEAGLTPSHIAATVFNILGQTRAEAEVMS----- : 717
ANDR : DHGAEVDQIEEAGLTPSHIAATVFNILGKAREAEQIMS----- : 691
CAPS : DHGAEVDQIEEAGLTPSHIAATVFNILGQTRAEAEVMT----- : 718
LYCO : DHGAEVDQIEEAGLTPSHIAATVFNILGQTRAEAEVMT----- : 719
ARAB : DHGAEVDQIEEAGLTPSHIAATVFNILGQTRAEAEVMT----- : 717
ARTE : DHGAEVDQIEEAGLTPSHIAATVFNILGQTRAEAEVMS----- : 713
PALM : DHGAEVDQIEEAGLTPSHIAATVFNILGQTRAEAEVMS----- : 707
TRIT : DHGAEVDQIEEAGLTPSHIAATVFNILGQTRAEAEVMS----- : 712
CHLA : DHGAEVDQIEEAGLTPSHIAATVFNILGQTRAEAEVMS----- : 735
ESCH : PQGTQEEMLRGLTDAAGMEKIKAWIA----- : 620
dhG p dq eaGL hi at lg eal

```

ตารางที่ 20 ความเหมือนร้อยละ (% identity) ของลำดับกรดอะมิโนสำหรับเอนไซม์ DXS ระหว่างपाल์มน้ำมันกับแบคทีเรีย สาหร่าย และพืชชนิดต่างๆ

ตัว อักษร	ANDR	AGRO	ARTE	ARAB	CATH	BRUC	CHLA	CHRO	MED2	MEDI	MESO	MORI	NARC	NITR	NOVO	ORYS	RHOC	RHOD	SINO	STEV	TRIT	TAGE	CAPS	LYCO	PALM	ESCH
ANDR	100																									
AGRO	59	100																								
ARTE	84	60	100																							
ARAB	82	58	83	100																						
CATH	69	59	70	70	100																					
BRUC	62	75	64	62	62	100																				
CHLA	66	58	64	65	62	60	100																			
CHRO	52	53	55	53	53	54	51	100																		
MED2	69	57	69	69	80	62	62	53	100																	
MEDI	53	60	94	52	70	64	64	54	69	100																
MESO	63	78	62	62	62	79	61	53	61	63	100															
MORI	73	57	73	73	80	61	60	52	75	71	61	100														
NARC	70	58	69	70	80	62	62	53	79	69	62	76	100													
NITR	51	54	52	52	53	55	51	71	52	52	56	52	52	100												
NOVO	59	68	60	59	58	69	59	53	58	61	70	58	59	53	100											
ORYS	71	59	72	70	79	61	64	54	79	69	61	75	78	53	59	100										
RHOC	55	60	56	55	57	60	56	50	57	56	60	57	57	50	59	57	100									
RHOD	58	66	61	59	57	66	54	52	56	60	67	56	58	53	65	57	58	100								
SINO	60	86	59	59	59	75	57	53	59	60	80	57	58	55	67	59	57	65	100							
STEV	71	58	70	70	83	62	62	52	81	70	61	79	80	52	59	80	56	57	58	100						
TRIT	80	58	83	81	69	62	64	53	70	81	62	70	68	51	60	70	55	58	58	69	100					
TAGE	67	58	67	67	72	61	61	52	71	66	61	70	73	51	57	73	56	57	58	72	67	100				
CAPS	85	60	83	84	68	64	64	54	68	84	63	74	68	52	61	69	55	59	60	69	81	67	100			
LYCO	85	61	84	83	69	64	65	54	68	83	64	74	69	52	62	70	56	59	61	69	82	67	94	100		
PALM	85	60	84	83	71	65	66	53	70	84	62	75	70	53	61	72	57	59	60	71	83	67	86	85	100	
ESCH	48	50	49	49	50	52	48	61	48	50	54	49	48	59	50	49	47	48	50	84	49	48	59	51	50	100

ตารางที่ 21 ความยาวของเปปไทด์ที่นำโปรตีนเข้าสู่คลอโรพลาสต์ ในเอนไซม์ DXS จากปาล์ม น้ำมันและพืชชั้นสูงชนิดอื่นทำนายโดยใช้โปรแกรม ChloroP 1.1

ชนิดพืช	เอนไซม์ DXS	
	ความยาวของลำดับกรดอะมิโน	ความยาวของ CTP
<i>Capsicum annuum</i>	719	57
<i>Lycopersicon esculentum</i>	719	56
<i>Medicago truncatula</i> (1)	717	54
<i>Morinda citrifolia</i>	722	55
<i>Arabidopsis thaliana</i>	717	58
<i>Artemisia annua</i>	713	51
<i>Andrographis paniculata</i>	691	31
<i>Catharanthus roseus</i>	716	35
<i>Oryza sativa</i>	713	30
<i>Stevia rebaudiana</i>	715	34
<i>Medicago truncatula</i> (2)	711	36
<i>Narcissus pseudonarcissus</i>	709	34
<i>Tagetes erecta</i>	725	44
<i>Triticum aestivum</i>	712	45
<i>Elaeis guineensis</i>	707	44

ที่มา : <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>

ตารางที่ 22 ลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่นำไปรีดิวซ์เข้าสู่คลอโรพลาสต์ในเอนไซม์ DXS จาก ปาล์มน้ำมันและพืชชั้นสูงชนิดอื่น ทำนายโดยใช้โปรแกรม ChloroP1.1

ชนิดพืช	ลำดับกรดอะมิโนของ CTP ในเอนไซม์ DXS
<i>Capsicum annuum</i>	MALCAYAFPGILNRTVAVASDASKPTPLFSEWIHGTDLQFQFHQKLTQVKKRSRTVQ
<i>Lycopersicon esculentum</i>	MALCAYAFPGILNRTGVVSDSSKATPLFSGWIHGTDLQFLFQHKLTHEVKKRSRV
<i>Medicago truncatula (1)</i>	MDLCSLACPSFVTPCDPRRTLPLPSSSSSHSQWGLHFFSHSQQHNLKKKFGWV
<i>Morinda citrifolia</i>	MALNAFAFPGNLSRVLVNSIKQSLLSHNWLCGTDLQFQECQNNQVMKNSRRVR
<i>Arabidopsis thaliana</i>	MASSAFAPSYIITKGGLSTDCKSTSLSSRSRLVTDLPSPCLKPNNNSHNSNRRKVC
<i>Artemisia annua</i>	MALSAFAFPTQINHRVTSNQPLIQHCLFGTDLNSSQKPFNQIVKRSNGIR
<i>Andrographis paniculata</i>	MASVATWDRSASSPYLQEQSGKEKVKWNFAS
<i>Catharanthus roseus</i>	MAVSGAVIGLNPISPAYWTVPRNLNYTARKQFCLR
<i>Oryza sativa</i>	MALQASSSPSMFRAIPTNTNASCRRKLQVR
<i>Stevia rebaudiana</i>	MAVAGSTMNLHLTSSPYKTVPSLCKFTRKQFRLK
<i>Medicago truncatula (2)</i>	MALSSCLLKPNHSLQLQCHKFKAPNPNHGFNRNQFCVM
<i>Narcissus pseudonarcissus</i>	MAVNGSLFSSQAANFTLLRTPFSSSACRGQFHV GASGSEGERKLS
<i>Tagetes erecta</i>	MALCGALKGGFVPIAQNGYTSLLNPSANAIMPSNKRKFLGIV
<i>Triticum aestivum</i>	MALSSTFSLPRGFLGVLQEHFAPAVELQAKPLKTPRRRSSGIS
<i>Elaeis guineensis</i>	MALSTFSFSPQMPSLLCPHWLGGADLHSHQHQRLLKTRKRPCV

ที่มา : <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>

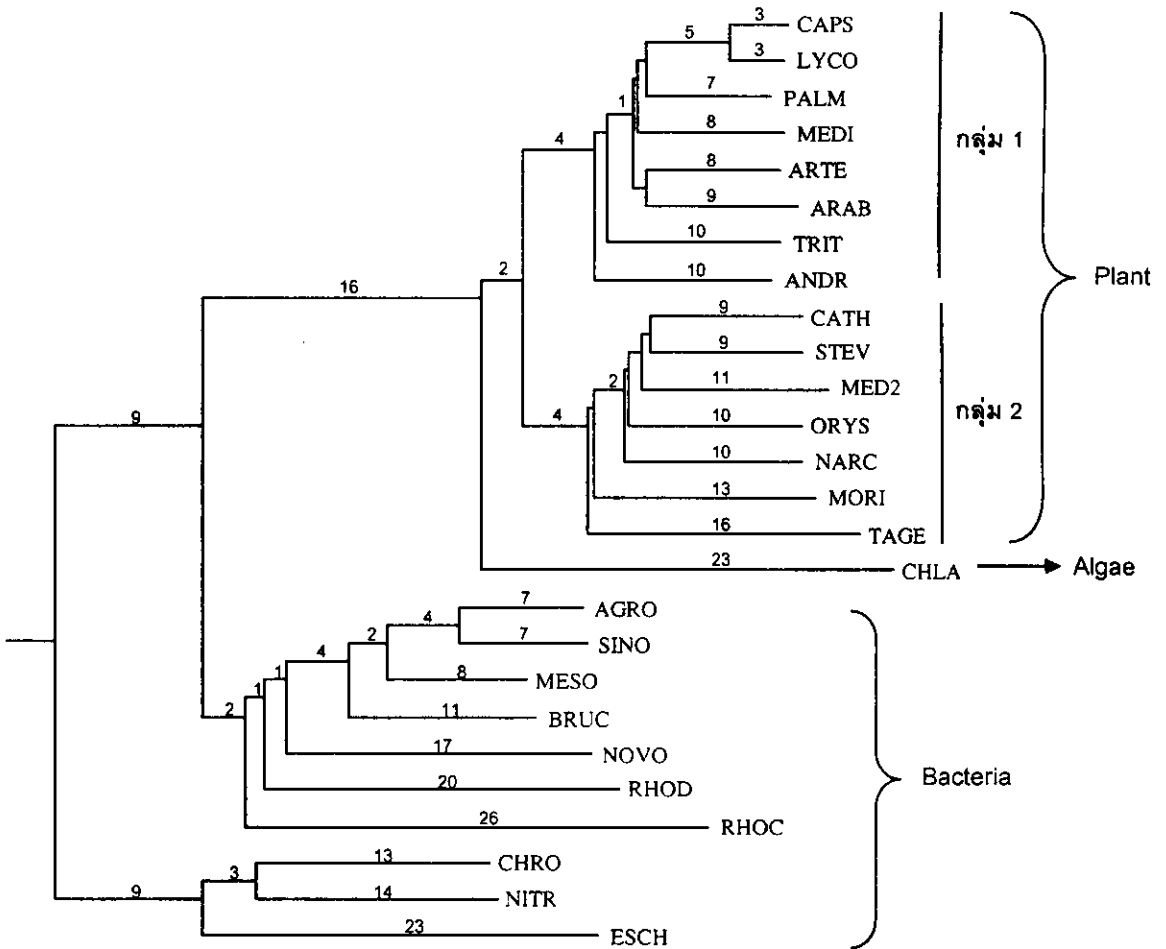
3.5 ลำดับกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณตำแหน่งตัดของเอนไซม์ signal peptidase บนเอนไซม์ DXS เพื่อให้ได้เอนไซม์ที่ทำงานในคลอโรพลาสต์

จากข้อมูลการเรียงลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ DXS จากแบคทีเรีย *E. coli*, สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardtii* และพืชชนิดอื่นอีก 14 ชนิด ให้อยู่ในแนวเส้นตรงโดยใช้โปรแกรม ClustalX 1.81 ดังรูปที่ 22 ประกอบกับข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่นำไปโปรตีนเข้าสู่คลอโรพลาสต์ดังตารางที่ 21 และ 22 ทำให้พบว่าตำแหน่งในการตัดของเอนไซม์ signal peptidase ที่ตัดส่วนเปปไทด์ที่นำไปโปรตีนจากไซโทพลาสซึมเข้าสู่คลอโรพลาสต์เพื่อให้ได้เอนไซม์ DXS ที่ทำงานในคลอโรพลาสต์ อยู่ในบริเวณกึ่งอนุรักษ์ (semi-conserved region) ที่แบ่งออกเป็นกลุ่มได้ 2 กลุ่มคือ 1) (Arg/Lys)-X₃-(Val/Ile)-X-↓(Ala/Ser)-Leu-(Ala/Ser)-Glu และ 2) (Arg/Lys)-X₂-(Phe/Leu)-X-(Val/Leu)-X-↓Ala-Ser เมื่อ X คือกรดอะมิโนใดก็ได้ โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยพืชคือ *C. annuum*, *L. esculentum*, *M. truncatula* (1), *A. annua*, *A. thaliana*, *T. aestivum*, *A. paniculata* โดยปาล์มน้ำมัน จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 ด้วยเช่นกัน และพืชกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *C. roseus*, *S. rebaudiana*, *M. truncatula* (2), *O. sativa*, *N. pseudonarcissus*, *M. citrifolia* และ *T. erecta* อย่างไรก็ตาม ในพืช กลุ่มที่ 1 อาจมีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ signal peptidase ที่นอกเหนือจากบริเวณ Ala เช่น ใน *L. esculentum*, *M. truncatula* (1) และปาล์มน้ำมัน มีตำแหน่งตัดก่อนหน้า Ala 1 กรดอะมิโน แต่ใน *A. paniculata* จะมีตำแหน่งตัดหลังจาก Ala 1 กรดอะมิโน

3.6 การศึกษาสายสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ DXS จากใบปาล์มน้ำมัน เปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่น

เมื่อนำกรดอะมิโนของเอนไซม์ DXS จากปาล์มน้ำมันและในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นจากธนาคารยีนรวมทั้งหมด 26 ชนิด มาศึกษาสายสัมพันธ์ของเอนไซม์ DXS โดยการทำให้ phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม Progressive alignment (Feng and Doolittle, 1990) พบว่าลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ DXS สามารถใช้แบ่งกลุ่มสิ่งมีชีวิตเป็นกลุ่มได้ 3 กลุ่ม คือ แบคทีเรีย สาหร่าย และพืชชั้นสูง ดังรูปที่ 23 โดยแบคทีเรียเป็นกลุ่มแรกที่เอนไซม์ DXS เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนในบางตำแหน่งทำให้มีการแยกออกมาจากบรรพบุรุษก่อนกลุ่มอื่น ตามด้วยสาหร่ายซึ่งเป็นกลุ่มที่มีช่วงเปลี่ยนแปลงของลำดับกรดอะมิโนสำหรับเอนไซม์ DXS อยู่ระหว่างกลุ่มแบคทีเรียและพืชชั้นสูง

สำหรับกลุ่มแบคทีเรียแยกย่อยได้อีก 2 กลุ่มคือกลุ่ม alphaproteobacteria และ betaproteobacteria รวมกับ gammaproteobacteria ซึ่งกลุ่มแบคทีเรียทั้งหมดที่ศึกษาในครั้งนี้ กลุ่ม gammaproteobacteria คือ *E. coli* มีการแยกตัวของลำดับกรดอะมิโนของ DXS ออกมาจากบรรพบุรุษก่อนกลุ่ม betaproteobacteria ที่ประกอบด้วย *Chromobacterium violaceum* ATCC



รูปที่ 23 Phylogenetic tree โดยโปรแกรม Progressive alignment (Feng and Doolittle, 1990) *C. annuum* (CAPS), *L. esculentum* (LYCO), *M. truncatula*1 (MED1), *A. annua* (ARTE), *A. thaliana* (ARAB), *T. aestivum* (TRIT), *A. paniculata* (ANDR), *E. quineensis* (PALM), *C. roseus* (CATH), *S. rebaudiana* (STEV), *M. truncatula* (MED2), *O. sativa* (ORYS), *N. pseudonarcissus* (NARC), *M. citrifolia* (MORI), *T. erecta* (TAGE), *C. reinhardtii* (CHLA), *A. tumefaciens* STR. C58 (AGRO), *S. meliloti* (SINO), *M. loti* (MESO), *B. suis* 1330 (BRUC), *N. aromaticivorans* (NOVO), *R. rubrum* (RHOD), *R. capsulatus* (RHOC), *C. violaceum* ATCC 12472 (CHRO), *N. europaea* ATCC 19718 (NITR) และ *E. coli* O157:H7 (ESCH)

12472 และ *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718 รวมทั้งกลุ่ม alphaproteobacteria ที่ประกอบด้วย *Agrobacterium tumefaciens* STR. C58, *Sinorhizobium meliloti*, *Mesorhizobium loti*, *Brucella suis* 1330, *Novosphingobium aromaticivorans*, *Rhodobacter capsulatus* และ *Rhodospirillum rubrum*

สำหรับกลุ่มพืชชั้นสูงพบว่าสามารถใช้ลำดับกรดอะมิโนของ DXS แบ่งกลุ่มได้ 2 กลุ่มอย่างชัดเจน โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยชนิดพืชคือ *C. annuum*, *L. esculentum*, *M. truncatula* (1), *A. annua*, *A. thaliana*, *T. aestivum*, *A. paniculata* รวมถึงปาล์มน้ำมัน และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยชนิดพืชคือ *C. roseus*, *S. rebaudiana*, *M. truncatula* (2), *O. sativa*, *N. pseudonarcissus*, *M. citrifolia* และ *T. erecta* และจาก phylogenetic tree จะเห็นได้ว่าทั้งสองกลุ่มมีสายสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนสำหรับ DXS ใกล้เคียงกันโดยเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงลำดับกรดอะมิโนของ DXS จากบรรพบุรุษในระยะเวลาไม่ห่างไกลกันมากนักและเมื่อพิจารณาถึงชนิดพืชจากทั้ง 2 กลุ่ม พบว่าสอดคล้องกับกลุ่มที่แบ่งได้โดยการใช้ตำแหน่งในการตัดของเอนไซม์ signal peptidase

3.7 บริเวณจับของ Thiamine diphosphate บนเอนไซม์ DXS ในระหว่างการเกิดปฏิกิริยา (Thiamine diphosphate binding site)

การศึกษาบริเวณจับของ Thiamine diphosphate (ThDP) หรือ Thiamine pyrophosphate (TPP) บนเอนไซม์ DXS ในระหว่างการเกิดปฏิกิริยา เริ่มจากการนำลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ในปาล์มน้ำมันมาเปรียบเทียบกับเอนไซม์ DXS จาก *E. coli* ที่ได้มีการศึกษาบริเวณดังกล่าวมาแล้ว พบว่าบริเวณที่ Thiamine diphosphate จับกับเอนไซม์ DXS ของปาล์มน้ำมันอยู่ในช่วงของกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 204-234 ดังรูปที่ 22 ซึ่งมีลำดับคือ Gly-Asp-Gly-Ala-Met-Thr-Ala-Gly-Gln-Ala-Tyr-Glu-Ala-Met-Asn-Asn-Ala-Gly-Tyr-Leu-Asp-Ser-Asp-Met-Ile-Val-Ile-Leu-Asn-Asp-Asn (GDGAMTAGQAYEAMNNAGYLDSDMIVILNDN) แต่เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ DXS ในพืชทั้งหมด 15 ชนิดรวมทั้งปาล์มน้ำมันกับใน *E. coli* จะเห็นได้ว่าบริเวณจับกับ Thiamine diphosphate มีลักษณะอนุรักษ์อย่างมากในพืชชั้นสูงโดยมีลำดับดังนี้ Gly-Asp-Gly-Ala-Met-Thr-Ala-Gly-Gln-Ala-Tyr-Glu-Ala-Met-Asn-Asn-Ala-Gly-(Phe/Tyr)-Leu-Asp-(Ser/Ala)-(Asp/Asn)-(Met/Leu)-Ile-Val-(Ile/Val)-Leu-Asn-Asp-Asn (GDGAMTAGQAYEAMNNAG(F/Y)LD(S/A)(D/N)(M/L)IV(IV)LNDN) แต่ในบางตำแหน่งของบริเวณจับสำหรับ Thiamine diphosphate ในพืชบางชนิดมีลำดับที่แตกต่างกันบ้าง ในบางกรดอะมิโน คือใน *N. pseudonarcissus* Ala ตำแหน่งที่ 210 เปลี่ยนเป็น Val, *A. paniculata*

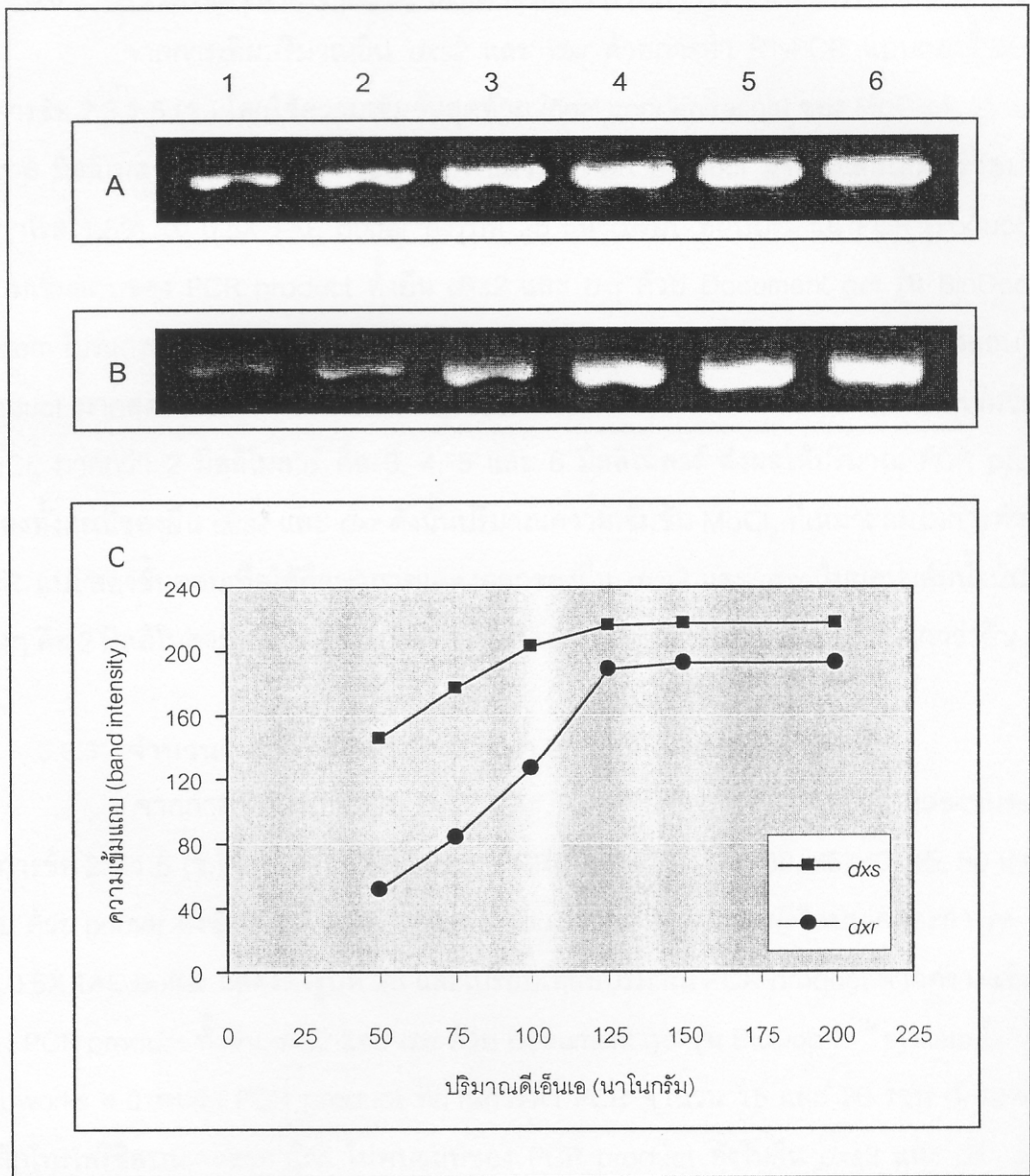
Thr ตำแหน่งที่ 193 เปลี่ยนเป็น Ile, *S. rebaudiana* Gln ตำแหน่งที่ 215 เปลี่ยนเป็น Arg, *S. rebaudiana* Met ตำแหน่งที่ 223 เปลี่ยนเป็น Ile, *N. pseudonarcissus* Ala ตำแหน่งที่ 223 เปลี่ยนเป็น Val, *O. sativa* Ala ตำแหน่งที่ 227 เปลี่ยนเป็น Ser, *M. truncatula* (2) เปลี่ยนเป็น Ser, *M. truncatula* (2) Leu ตำแหน่งที่ 228 เปลี่ยนเป็น Ile และ *T. erecta* Val ตำแหน่งที่ 228 เปลี่ยนเป็น Ile

เมื่อศึกษาตำแหน่งที่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ DXS จากปาล์มน้ำมัน โดยเปรียบเทียบกับ *E. coli* ซึ่งได้มีการศึกษามาแล้ว พบว่าบริเวณดังกล่าวของ *E. coli* เป็น His ตำแหน่งที่ 49 และตรงกับ His ในปาล์มน้ำมันตำแหน่งที่ 102 ดังรูปที่ 21

3.8 สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน *dxs2* และ *dxr* ในการทำ RT-PCR แบบสองขั้นตอน

3.8.1 ปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการทำ RT-PCR แบบสองขั้นตอน

จากการสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากผลปาล์มน้ำมันระยะที่ 1 ดังวิธีการข้อ 2.3.1.1 แล้วนำมาเพิ่มปริมาณยีน *dxs2* และ *dxr* ด้วยการทำให้ RT-PCR แบบสองขั้นตอนโดยใช้ปริมาณดีเอ็นเอ 50, 75, 100, 125, 150 และ 200 นาโนกรัมรวมทั้งสารเคมีดังวิธีการข้อ 2.3.4.2 โดยใช้ primer ที่จำเพาะ (specific primer) สำหรับยีน *dxs2* คือ 5'-TGGGATGTTGGTCATCAGTC-3' สำหรับเป็น forward primer (semi-FDXS2) และ 5'-ACTGCGTGTGTCTGCTAT-3' สำหรับเป็น reverse primer (semi-RDXS2) และยีน *dxr* 5'-GGCTCTATTGGAACCTCAGAC-3' สำหรับเป็น forward primer (semi-FDXR) และ 5'-AACCGCATACGGGCCAACC-3' สำหรับเป็น reverse primer (semi-RDXR) จากนั้นนำ PCR product มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 1.5% ใน 0.5X TAE buffer ดังรูปที่ 24 แล้ววัดปริมาณความเข้มแถบของ PCR product ทั้งยีน *dxs2* และ *dxr* ด้วย Document gel รุ่น BioDoc-IT™ system โปรแกรม Labworks 4.0 พบว่าการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในช่วง 50-125 นาโนกรัม ส่งผลให้มีการเพิ่มปริมาณ PCR product ทั้งในยีน *dxs2* และ *dxr* แต่เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมากกว่า 125 นาโนกรัม จะไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณของ PCR product ทั้งในยีน *dxs2* และ *dxr* และแถบความเข้มของ PCR product จะใกล้เคียงกัน ดังนั้นปริมาณดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการทำ RT-PCR แบบสองขั้นตอนอยู่ในช่วง 50-125 นาโนกรัม และปริมาณดีเอ็นเอที่ได้เลือกใช้ในการทำ RT-PCR แบบสองขั้นตอนในการศึกษาการแสดงออกของยีน *dxs2* และ *dxr* ในผลปาล์มน้ำมันระยะต่างๆต่อไป คือ 87.5 นาโนกรัม



รูปที่ 24 ผลของปริมาณดีเอ็นเอต่อปริมาณ PCR product จากการทำให้ RT-PCR แบบสองขั้นตอน สำหรับยีน *dxs2* และยีน *dxr*

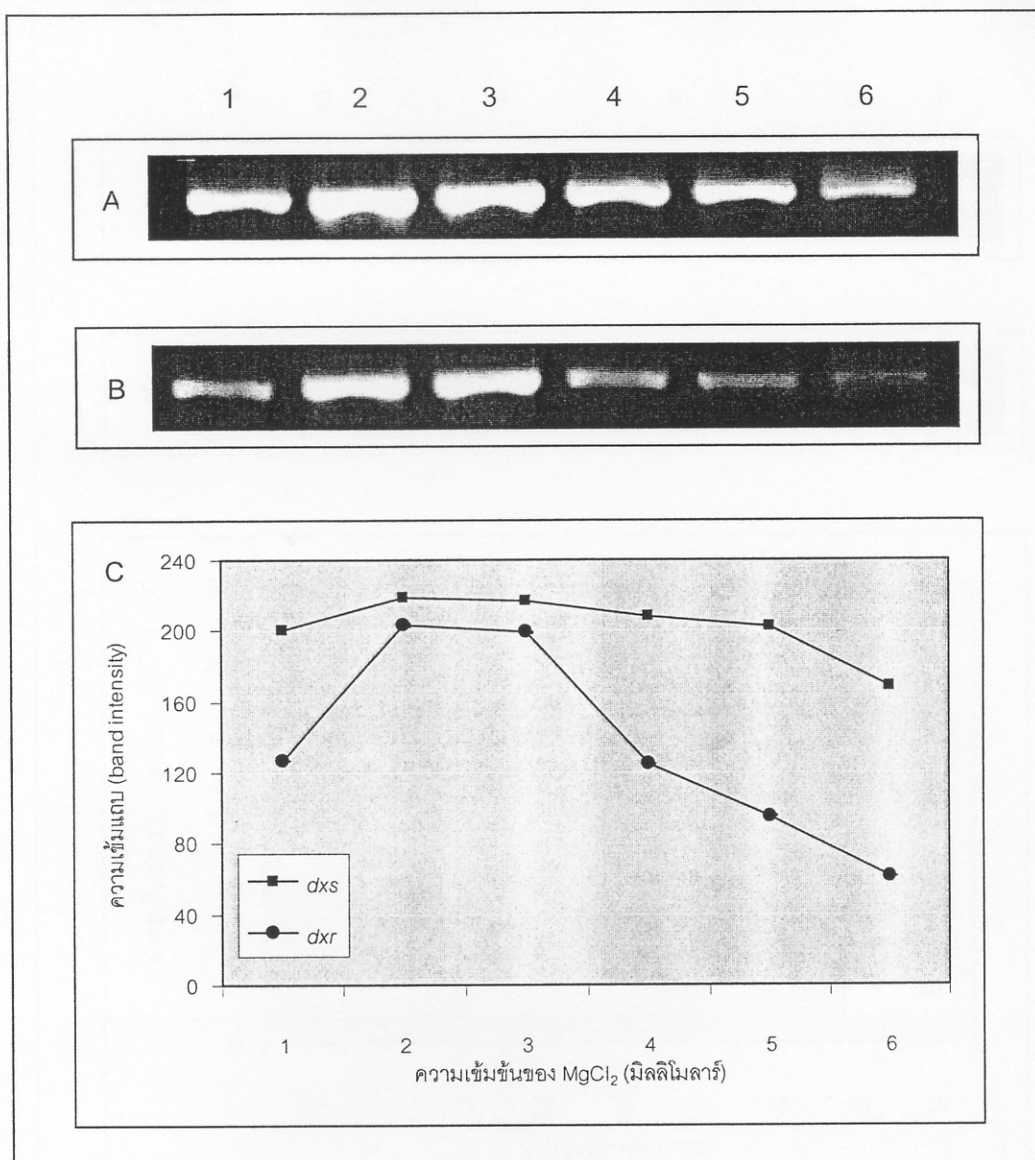
ช่องที่ 1-6 แถบ PCR product ของ ยีน *dxs2* (A) และยีน *dxr* (B) ที่เกิดจากปริมาณ ดีเอ็นเอ 50, 75, 100, 125, 150 และ 200 นาโนกรัม ตามลำดับ
รูป C กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณดีเอ็นเอกับความเข้มของแถบ PCR product จาก (A) และ (B) ที่วัดด้วย Document Gel รุ่น BioDoc-IT™ system โปรแกรม Labworks 4.0

3.8.2 ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมในการทำ RT-PCR แบบสองขั้นตอน

จากการเพิ่มปริมาณยีน *dxs2* และ *dxr* ด้วยการทำให้ RT-PCR แบบสองขั้นตอนด้วยวิธีการข้อ 2.3.1.5 (ข.) โดยใช้ความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) ของ $MgCl_2$ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 มิลลิโมลาร์ด้วย primer ดังข้อ 3.8.1 แล้วนำ PCR product มาทำอิลเล็กโทรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 1.5% ใน 0.5X TAE buffer ดังรูปที่ 25 และเปรียบเทียบปริมาณ PCR product จากความเข้มแถบของ PCR product ทั้งยีน *dxs2* และ *dxr* ด้วย Document gel รุ่น BioDoc-IT™ system โปรแกรม Labworks 4.0 พบว่าความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่มีผลให้ความเข้มของแถบ PCR product มากที่สุดคือ 2 มิลลิโมลาร์ และจากการทดลองจะเห็นว่า การเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของ $MgCl_2$ มากกว่า 2 มิลลิโมลาร์ คือ 3, 4, 5 และ 6 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้ปริมาณ PCR product ลดลงทั้งกรณีของยีน *dxs2* และ *dxr* ดังนั้นปริมาณความเข้มข้น $MgCl_2$ ที่เหมาะสมในการทำ RT-PCR แบบสองขั้นตอนเพื่อใช้ศึกษาการแสดงออกของยีน *dxs2* และ *dxr* ในผลปาล์มน้ำมันระยะต่างๆ คือ 2 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้ยังพบว่า การเกิดแถบของยีน *dxs2* มีความเข้มมากกว่ายีน *dxr*

3.8.3 จำนวนรอบที่เหมาะสมในการทำ RT-PCR แบบสองขั้นตอน

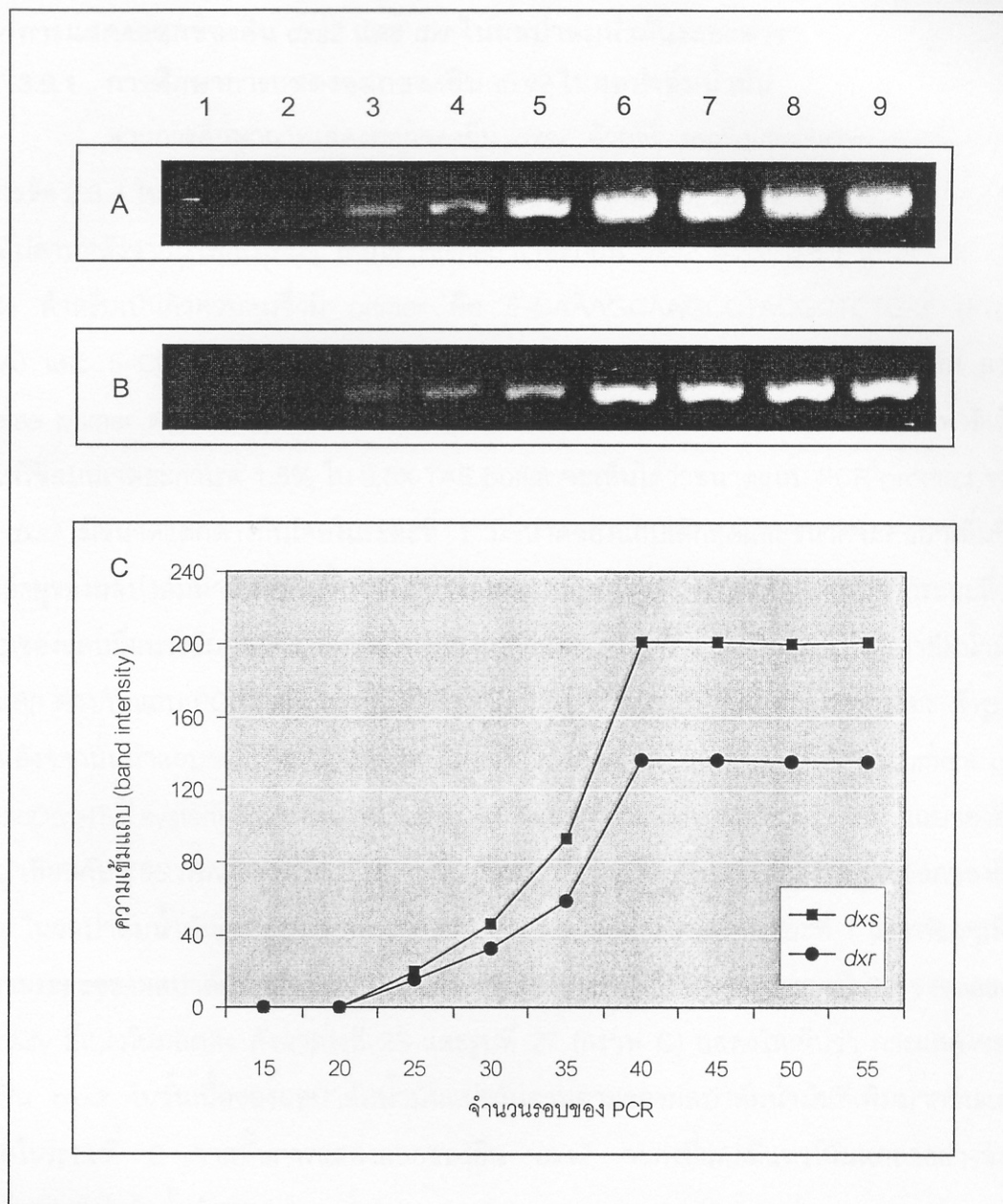
จากการเพิ่มปริมาณยีน *dxs2* และ *dxr* ด้วยการทำให้ RT-PCR แบบสองขั้นตอนด้วยวิธีการข้อ 2.3.1.5 (ข.) โดยใช้จำนวนรอบของ PCR เป็น 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 และ 55 รอบ ด้วย primer ดังข้อ 3.8.1 แล้วนำ PCR product มาทำอิลเล็กโทรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 1.5% ใน 0.5X TAE buffer แสดงดังรูปที่ 26 และเปรียบเทียบปริมาณ PCR product จากความเข้มแถบของ PCR product ทั้งยีน *dxs2* และ *dxr* ด้วย Document gel รุ่น BioDoc-IT™ system โปรแกรม Labworks 4.0 พบว่า PCR product ที่ผ่านการทำให้ PCR จำนวน 15 และ 20 รอบ เมื่อนำมาทำอิลเล็กโทรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส ไม่พบแถบของ PCR product ทั้งในยีน *dxs2* และ *dxr* แต่เมื่อเพิ่มจำนวนรอบของ PCR ในช่วง 25-40 รอบ ปริมาณ PCR product เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่เมื่อเพิ่มจำนวนรอบมากกว่า 40 รอบ ปริมาณ PCR product ไม่เพิ่มขึ้นทั้งในยีน *dxs2* และ *dxr* และยีน *dxs2* มีความเข้มแถบมากกว่ายีน *dxr* ดังนั้นจำนวนรอบของ PCR ที่เหมาะสมในการทำ RT-PCR แบบสองขั้นตอนอยู่ในช่วง 25-40 รอบ และจำนวนรอบของ PCR ที่ได้เลือกสำหรับใช้ในการทำให้ RT-PCR แบบสองขั้นตอนเพื่อใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *dxs2* และ *dxr* ในผลปาล์มน้ำมันระยะต่างๆต่อไป คือ 35 รอบ



รูปที่ 25 ผลของความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ต่อปริมาณ PCR product จากการทำ RT-PCR แบบสองขั้นตอนสำหรับยีน *dxs2* และยีน *dxr*

ช่องที่ 1-6 แถบ PCR product ของยีน *dxs2* (A) และยีน *dxr* (B) ที่เกิดจากความเข้มข้นของ $MgCl_2$ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

รูป C กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ $MgCl_2$ กับความเข้มของแถบ PCR product จาก (A) และ (B) ที่วัดได้จาก Document Gel รุ่น BioDoc-IT™ system โปรแกรม Labworks 4.0



รูปที่ 26 ผลของจำนวนรอบในการทำ RT-PCR แบบสองขั้นตอนนี้ต่อปริมาณ PCR product ของยีน *dxs2* และยีน *dxr*

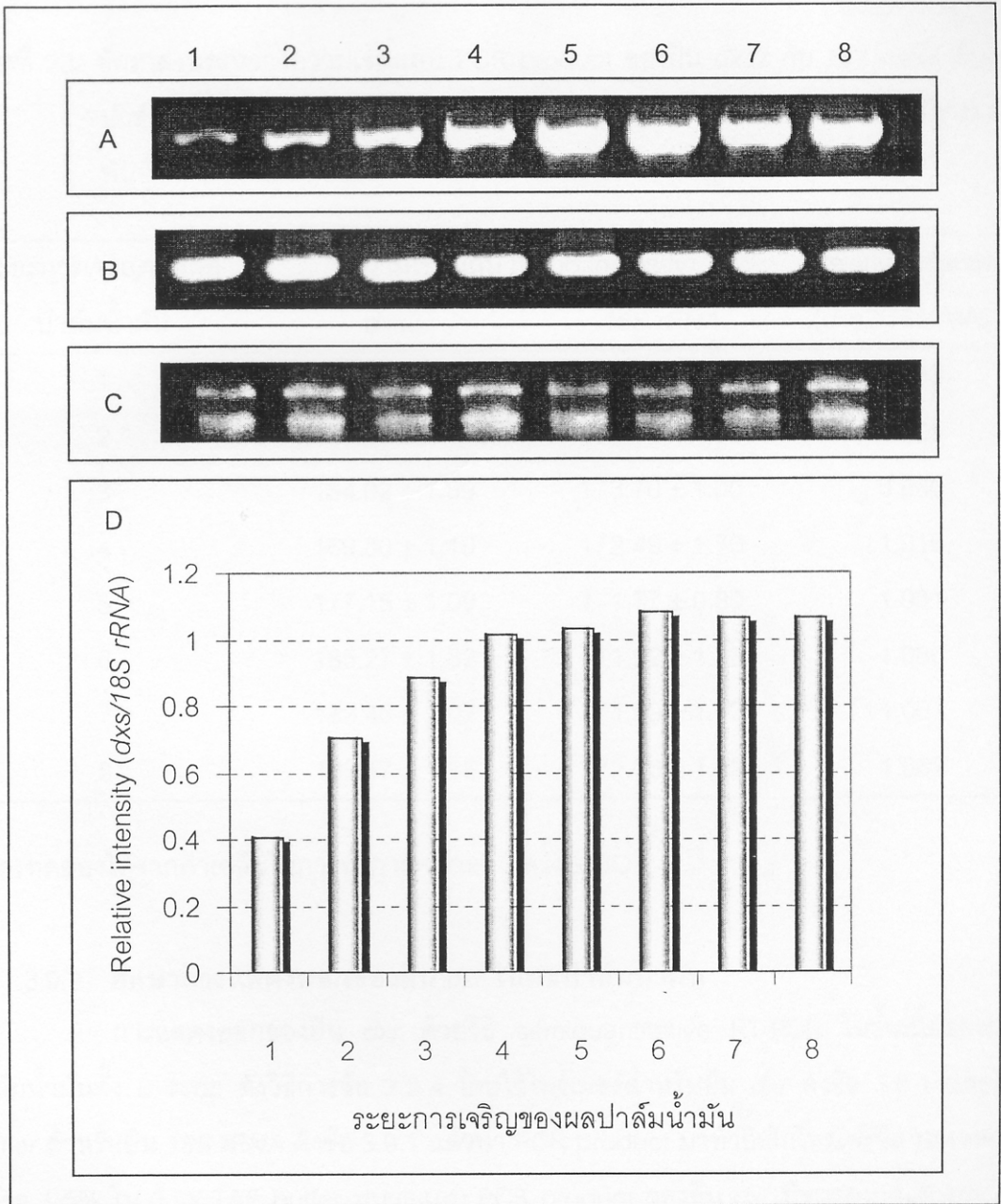
ช่องที่ 1-9 แถบ PCR product ของ ยีน *dxs2* (A) และยีน *dxr* (B) ที่ได้จากจำนวนรอบของ PCR 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 และ 55 รอบ ตามลำดับ

รูป C กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนรอบของ PCR กับความเข้มของแถบ PCR product จาก (A) และ (B) ที่วัดด้วย Document Gel รุ่น BioDoc-IT™ system โปรแกรม Labworks 4.0

3.9 การแสดงออกของยีน *dxs2* และ *dxr* ในผลปาล์มน้ำมันระยะต่างๆ

3.9.1 การศึกษาการแสดงออกของยีน *dxs2* ในผลปาล์มน้ำมัน

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *dxs2* ด้วยวิธี semiquantitative RT-PCR ดังวิธีการข้อ 2.3.4 ในชั้นเนื้อของผลปาล์มน้ำมันทั้ง 8 ระยะซึ่งมีอายุ 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 และ 22 สัปดาห์หลังจากการผสมพันธุ์ โดยใช้ primer สำหรับยีน *dxs2* ดังข้อ 3.8.1 และใช้ยีน *18S rRNA* สำหรับเป็นตัวควบคุมซึ่งมี primer คือ 5'-CAAAGCAAGCCTACGCTCTG-3' (*F18S rRNA*) และ 5'-CGCTCCACCAACTAAGAACG-3' (*R18S rRNA*) เพื่อใช้เป็น forward และ reverse primer ตามลำดับ แล้วนำ PCR product ของยีน *dxs2* และ *18S rRNA* มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 1.5% ใน 0.5X TAE buffer จะเห็นได้ว่าขนาดแถบ PCR product ของยีน *dxs2* มีขนาดแตกต่างกันโดยในระยะที่ 1 มีขนาดของแถบเล็กสุดและขนาดจะค่อยๆเพิ่มขึ้นตามอายุของผลปาล์มน้ำมันที่เพิ่มขึ้นจนมีขนาดของแถบใหญ่ที่สุดในระยะที่ 6 หลังจากระยะที่ 6 ขนาดของแถบมีแนวโน้มค่อยๆลดลงจนถึงระยะสุดท้ายคือ ระยะที่ 8 ซึ่งเป็นระยะที่ผลปาล์มน้ำมันสุก แตก ต่างกับแถบ PCR product ของยีน *18S rRNA* ที่มีขนาดใกล้เคียงกันในทุกระยะ ดังรูปที่ 27 หลังจากนั้นนำแถบของ PCR product ดังกล่าวไปวัดความเข้มของแถบด้วย Document gel รุ่น BioDoc-IT™ system โปรแกรม Labworks 4.0 แล้วหาอัตราส่วนระหว่างความเข้มแถบของยีน *dxs2* เทียบกับ *18S rRNA* (Relative intensity) สำหรับใช้ในการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *dxs2* ในผลปาล์มน้ำมันระยะต่างๆ พบว่าค่า Relative intensity ต่ำสุดที่ระยะที่ 1 และค่อยๆเพิ่มขึ้นตามระยะของผลปาล์มน้ำมันที่เพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงสุดในระยะที่ 6 หลังจากระยะที่ 6 ค่า Relative intensity มีแนวโน้มลดลง ดังตารางที่ 23 และรูปที่ 27 (กราฟ C) แสดงให้เห็นว่า การแสดงออกของยีน *dxs2* ในชั้นเนื้อของผลปาล์มน้ำมันแปรผันตามอายุของผลปาล์มน้ำมันที่เพิ่มมากขึ้นและสูงสุดในระยะที่ 6 จากนั้นการแสดงออกของยีน *dxs2* จะคงที่และมีแนวโน้มลดลงอย่างช้าๆ จนกระทั่งผลปาล์มน้ำมันสุก



รูปที่ 27 การแสดงออกของยีน *dxs2* และ *18S rRNA* บริเวณชั้นเนื้อของผลปาล์มน้ำมันโดยวิธี semiquantitative RT-PCR

1-8 เป็นระยะการเจริญของผลปาล์มน้ำมันอายุ 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 และ 22 สัปดาห์ หลังจากการผสมพันธุ์; (A),(B) แสดงแถบ PCR product จากการทำ RT-PCR แบบสอง ขั้นตอนของยีน *dxs2* และ *18S rRNA* ตามลำดับ; (C) แสดงแถบอาร์เอ็นเอรวมของผลปาล์มน้ำมันทั้ง 8 ระยะ; (D) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าอัตราส่วนของความเข้มแถบของยีน *dxs2* และ *18S rRNA* กับผลปาล์มน้ำมันทั้ง 8 ระยะ วัดโดยการใช้ Document gel รุ่น BioDoc-It™ system โปรแกรม 4 Labworks 4.0

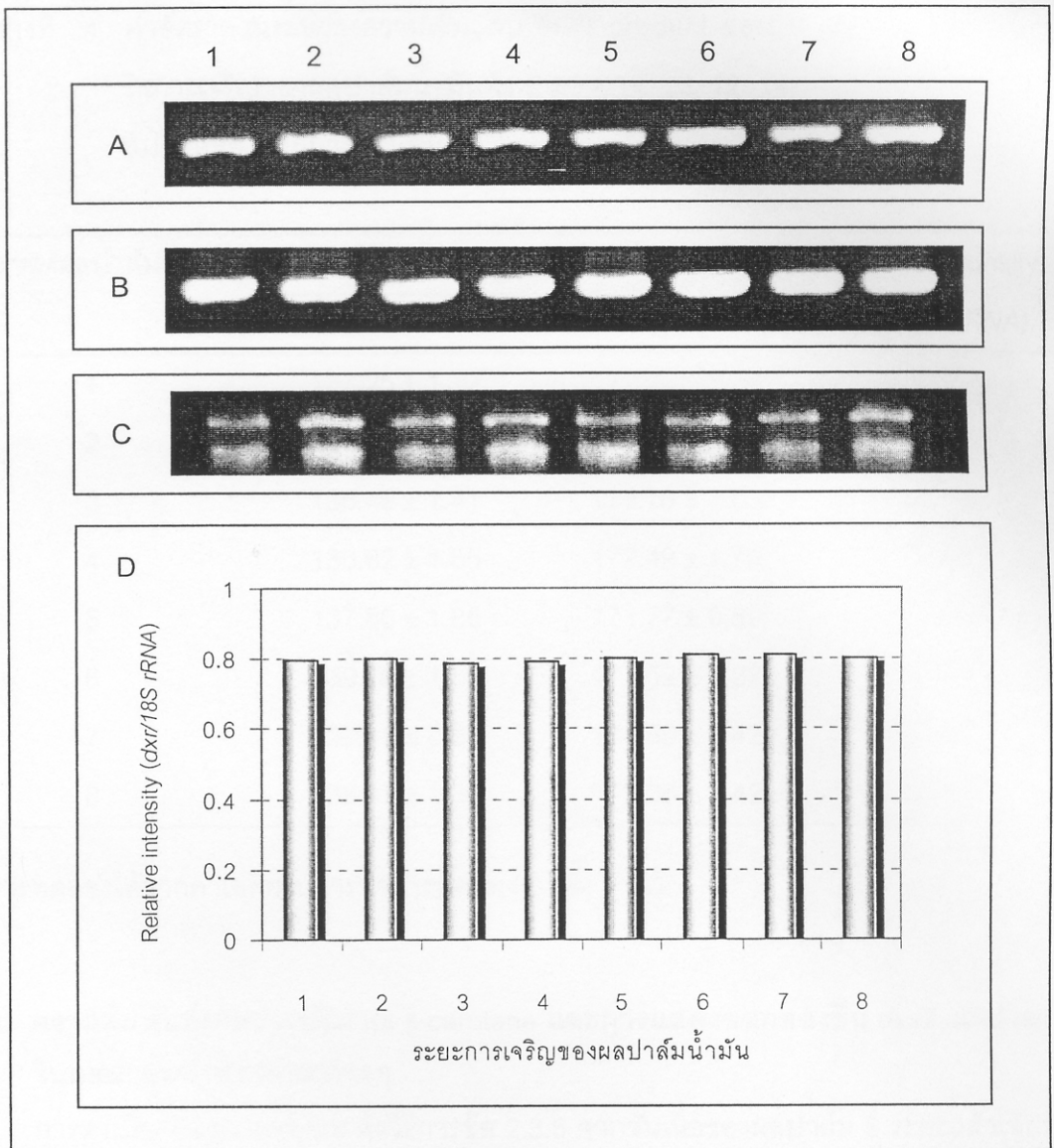
ตารางที่ 23 อัตราส่วนระหว่างความเข้มแถบ PCR product ของยีน *dxs2* กับ *18S rRNA* กับผลปาล์มน้ำมันทั้ง 8 ระยะ (8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 และ 22 สัปดาห์หลังจากการผสมพันธุ์)

ระยะการเจริญของผลปาล์มน้ำมัน	ความเข้มแถบ (band intensity)		Relative intensity (<i>dxs2/18S rRNA</i>)
	<i>dxs2</i>	<i>18S rRNA</i>	
1	69.97 ± 1.29	172.02 ± 1.33	0.406
2	121.47 ± 2.15	172.30 ± 1.64	0.705
3	154.02 ± 1.89	173.70 ± 1.00	0.886
4	169.80 ± 1.10	172.49 ± 1.70	1.015
5	177.15 ± 1.09	171.77 ± 0.89	1.031
6	185.27 ± 1.82	171.52 ± 1.22	1.080
7	183.43 ± 1.07	171.89 ± 1.42	1.067
8	183.17 ± 1.15	172.36 ± 1.42	1.062

ผลการทดลองได้จากค่าเฉลี่ยในการทำการทดลอง 3 ครั้ง ± SD

3.9.2 ศึกษาการแสดงออกของยีน *dxr* ในผลปาล์มน้ำมัน

การแสดงออกของยีน *dxr* ด้วยวิธี semiquantitative RT-PCR ในชั้นเนื้อของผลปาล์มน้ำมันทั้ง 8 ระยะ ดังวิธีการข้อ 2.3.4 โดยใช้ไพรเมอร์สำหรับยีน *dxr* ดังข้อ 3.8.1 และใช้ primer สำหรับยีน *18S rRNA* ดังข้อ 3.9.1 แล้วนำ PCR product มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิส บนเจลอะกาโรส 1.5% ใน 0.5X TAE buffer พบว่าแถบ PCR product ของยีน *dxr* มีขนาดใกล้เคียงกันในผลปาล์มน้ำมันทุกระยะเช่นเดียวกับแถบ PCR product ของยีน *18S rRNA* ดังรูปที่ 28 และหลังจากนำแถบของ PCR product ดังกล่าวไปวัดความเข้มของแถบด้วย Document gel รุ่น BioDoc-IT™ system โปรแกรม Labworks 4.0 แล้วหาอัตราส่วนระหว่างความเข้มแถบของยีน *dxr* เทียบกับ *18S rRNA* เพื่อให้เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *dxr* ในผลปาล์มน้ำมันระยะต่างๆ พบว่าค่า Relative intensity ของผลปาล์มน้ำมันมีค่าใกล้เคียงกันดังตารางที่ 24 แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของยีน *dxr* มีค่าใกล้เคียงกันไม่ขึ้นอยู่กับอายุของผลปาล์มน้ำมัน



รูปที่ 28 การแสดงออกของยีน *dxr* และ *18S rRNA* ในระหว่างการเจริญของผลปาล์มน้ำมัน โดยวิธี semiquantitative RT-PCR

1-8 เป็นระยะการเจริญของผลปาล์มน้ำมันอายุ 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 และ 22 สัปดาห์หลังจากการผสมพันธุ์; (A),(B) แสดงแถบ PCR product จากการทำให้ RT-PCR แบบสองขั้นตอนของยีน *dxr* และ *18S rRNA* ตามลำดับ; (C) แสดงแถบอาร์เอ็นเอรวมของผลปาล์มน้ำมันทั้ง 8 ระยะ; (D) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าอัตราส่วนของความเข้มแถบของยีน *dxr* และ *18S rRNA* กับผลปาล์มน้ำมันทั้ง 8 ระยะ วัดโดยใช้ Document gel รุ่น BioDoc-It™ system โปรแกรม Labworks 4.0

ตารางที่ 24 ค่าอัตราส่วนระหว่างความเข้มแถบ PCR product ของยีน *dxr* กับ *18S rRNA* ในการเจริญของผลปาล์มน้ำมันทั้ง 8 ระยะ (8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 และ 22 สัปดาห์หลังจากการผสมพันธุ์)

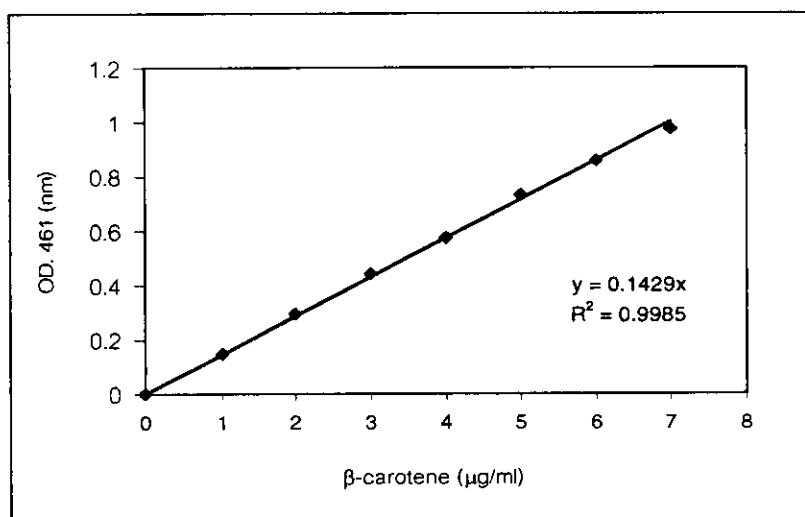
ระยะของผลปาล์มน้ำมัน	ความเข้มแถบ (band intensity)		Relative intensity (<i>dxr</i> / <i>18S rRNA</i>)
	<i>dxr</i>	<i>18S rRNA</i>	
1	137.25 ± 1.12	172.02 ± 1.33	0.797
2	137.72 ± 1.59	172.30 ± 1.64	0.799
3	136.49 ± 1.41	173.70 ± 1.00	0.785
4	136.62 ± 1.55	172.49 ± 1.70	0.792
5	137.86 ± 1.86	171.77 ± 0.89	0.802
6	139.26 ± 1.53	171.52 ± 1.22	0.811
7	139.41 ± 0.61	171.89 ± 1.42	0.811
8	138.47 ± 1.36	172.36 ± 1.42	0.803

ผลการทดลองได้จากค่าเฉลี่ยในการทำการทดลอง 3 ครั้ง ± SD

3.10 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ β -carotene และการแสดงออกของยีน *dxs2* และ *dxr* ในผลปาล์มน้ำมันระยะต่างๆ

การหาปริมาณ β -carotene ดังวิธีการข้อ 2.3.5 จากชิ้นเนื้อของผลปาล์ม 8 ระยะแล้วเทียบกับกราฟมาตรฐาน β -carotene (รูปที่ 28) พบว่าปริมาณ β -carotene มีความแตกต่างกันในแต่ละระยะ โดยปริมาณ β -carotene มีน้อยสุดในระยะแรกคือ $6.58 \pm 0.22 \mu\text{g/g}$ fresh weight จากนั้นปริมาณ β -carotene จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆตามอายุของผลปาล์มน้ำมันที่เพิ่มขึ้นจนสูงสุดในระยะที่ 6 คือมีปริมาณ β -carotene $97.64 \pm 3.02 \mu\text{g/g}$ fresh weight หลังจากนั้นปริมาณ β -carotene มีแนวโน้มคงที่จนกระทั่งผลปาล์มน้ำมันสุก ดังตารางที่ 25 และเมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *dxs2* และ *dxr* กับปริมาณ β -carotene ซึ่งเป็นผลผลิตสุดท้ายของวิถี MEP ในผลปาล์มน้ำมันทุกระยะ พบว่าในระยะที่ 1 และ 2 การแสดงออกของยีน *dxs2* เพิ่มขึ้นเร็วกว่าการเพิ่มปริมาณ β -carotene โดย β -carotene อยู่ในระดับต่ำกว่า $20 \mu\text{g/g}$ fresh weight และในช่วงระยะที่ 3-6 การแสดงออกของยีน *dxs2* จะเพิ่มขึ้นโดยมีความสัมพันธ์กับปริมาณ β -carotene และถึงจุดสูงสุดในระยะที่ 6 แต่เมื่อผลปาล์มน้ำมันมีอายุเพิ่มมากขึ้น ปริมาณการแสดงออกของยีน *dxs* และปริมาณ

β -carotene มีแนวโน้มคงที่จนผลปาล์มน้ำมันสุก ส่วนการแสดงออกของยีน *dxr* ไม่มีเปลี่ยนแปลงในช่วงเวลาดังกล่าว ดังรูปที่ 29

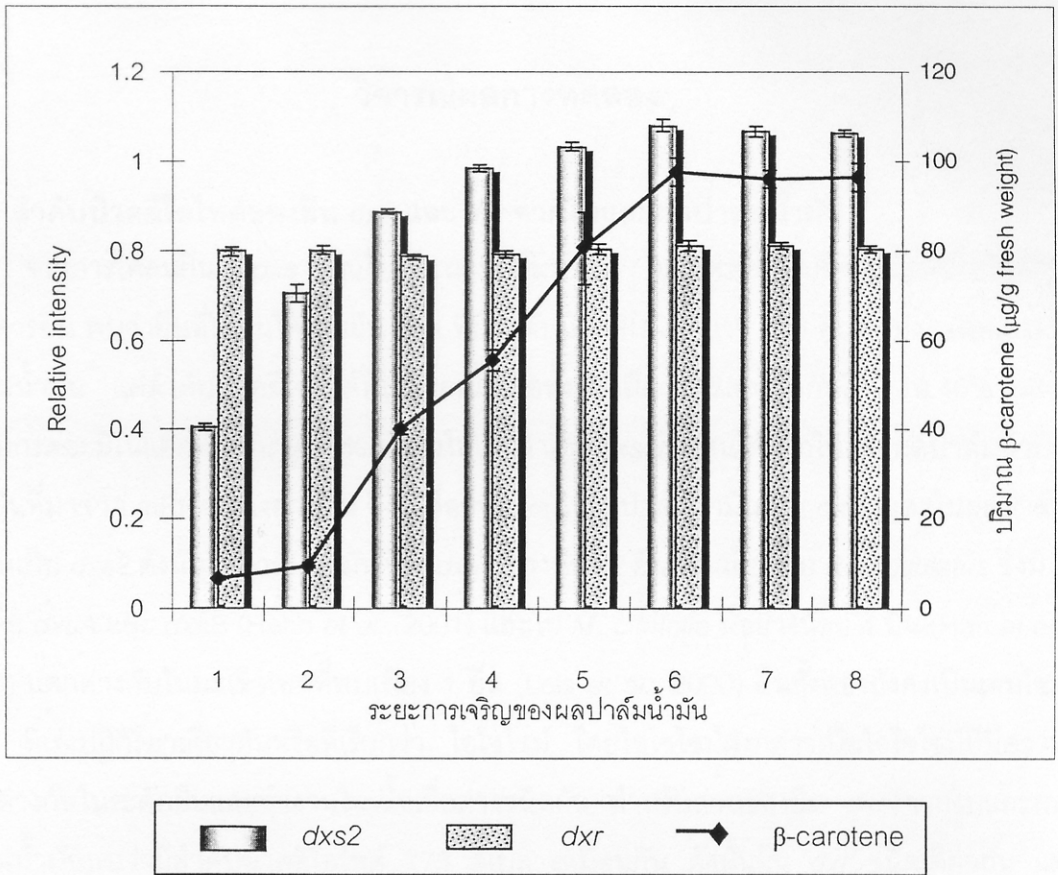


รูปที่ 29 กราฟมาตรฐาน β -carotene

ตารางที่ 25 ปริมาณ β -carotene ในการเจริญของผลปาล์มน้ำมันทั้ง 8 ระยะ

ระยะของผลปาล์มน้ำมัน	ค่า OD. 461 nm.	ปริมาณ β -carotene	
		$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/g fresh weight}$
1	0.18 \pm 0.01	1.31 \pm 0.06	6.58 \pm 0.22
2	0.27 \pm 0.02	1.73 \pm 0.46	9.50 \pm 0.55
3	0.57 \pm 0.01	4.00 \pm 0.12	40.00 \pm 1.03
4	0.79 \pm 0.04	5.54 \pm 0.28	55.40 \pm 2.39
5	1.15 \pm 0.14	8.05 \pm 0.87	80.54 \pm 8.12
6	1.39 \pm 0.06	9.76 \pm 0.39	97.64 \pm 3.02
7	1.37 \pm 0.04	9.60 \pm 0.26	95.96 \pm 1.91
8	1.37 \pm 0.06	9.64 \pm 0.42	96.38 \pm 3.06

ผลการทดลองได้จากค่าเฉลี่ยในการทำการทดลอง 6 ครั้ง \pm SD



รูปที่ 30 การแสดงออกของยีน *dxs2* และ *dxr* กับปริมาณ β -carotene ของผลปาล์มน้ำมัน ทั้ง 8 ระยะ