

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 การโคลนส่วนของยีน *dxs* จากใบและผลปาล์มน้ำมัน

ยีน *dxs* ที่โคลนโดยใช้ไพรเมอร์ FDXS และ RDXS ได้สายนิวคลีโอไทด์ยาว 938 คู่เบส แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 312 กรดอะมิโน ทั้งในใบและผลปาล์มน้ำมัน โดยลำดับนิวคลีโอไทด์มีความแตกต่างกัน 19.18% (ความคล้ายคลึง 80.81%) และลำดับกรดอะมิโน 8.65% (ความคล้ายคลึง 91.35%) แต่เป็นยีนสำหรับเอนไซม์ DXS เช่นเดียวกัน ดังนั้นยีน *dxs* จากใบและผลปาล์มน้ำมันจึงมาจากอาร์เอ็นเอส่งข่าว (mRNA) ที่ต่างกัน และให้ชื่อยีน *dxs* ในใบเป็น *dxs1* และผลปาล์มน้ำมันเป็น *dxs2*

5.2 การโคลนส่วนของยีน *dxr* จากใบและผลปาล์มน้ำมัน

ยีน *dxr* โคลนโดยไพรเมอร์ FDXR และ RDXR ได้สายนิวคลีโอไทด์ยาว 773 คู่เบส แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 257 กรดอะมิโน ดังนั้นยีน *dxr* จากใบและผลปาล์มน้ำมันจึงมาจากอาร์เอ็นเอส่งข่าวเดียวกัน

5.3 การโคลนยีน *dxs1* ที่สมบูรณ์จากใบปาล์มน้ำมันด้วยวิธี RLM-RACE

การโคลนยีนทางปลาย 5' และ 3' ให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ยาว 993 และ 609 คู่เบสตามลำดับ และเมื่อหาลำดับที่สมบูรณ์ของยีน *dxs1* พบว่ามีความยาวทั้งหมด 2,301 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วยส่วนที่ไม่สามารถแปลเป็นรหัสสำหรับเอนไซม์ DXS ทางปลาย 5' และ 3' จำนวน 45 และ 135 นิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ และส่วนที่เป็นรหัสสำหรับเอนไซม์ DXS จำนวน 2,121 นิวคลีโอไทด์ โดยมีนิวคลีโอไทด์ที่เป็นรหัสเริ่มต้นในการสังเคราะห์เอนไซม์ DXS คือ ATG และส่วนที่เป็นรหัสสำหรับสิ้นสุดการสังเคราะห์เอนไซม์ DXS คือ TAG ซึ่งสามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนสำหรับเอนไซม์ DXS ได้ 707 กรดอะมิโน มวลโมเลกุล 76.4 กิโลดาลตัน และมีค่า Isoelectric point เท่ากับ 7.0 โดยกรดอะมิโนของ DXS ในปาล์มน้ำมันใกล้เคียงกับ *C. annuum* มากที่สุด 86% รองลงไปได้แก่ *L. esculentum* 85%

5.4 ความยาวและลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่นำโปรตีนเข้าสู่คลอโรพลาสต์

เปปไทด์ที่นำเอนไซม์ DXS เข้าสู่คลอโรพลาสต์สำหรับปาล์มน้ำมันมีขนาด 44 กรดอะมิโน อยู่ในช่วงของพืชชั้นสูง (30-58 กรดอะมิโน) ดังนั้นเอนไซม์ DXS ของปาล์มน้ำมันในคลอโรพลาสต์ จึงมี 663 กรดอะมิโน

5.5 ลำดับกรดอะมิโนที่เป็นบริเวณตำแหน่งตัดของ signal peptidase บนเอนไซม์ DXS เพื่อให้ได้เอนไซม์ที่ทำงานในคลอโรพลาสต์

ตำแหน่งในการตัดเปปไทด์ที่นำโปรตีนจากไซโทพลาสซึมเพื่อเข้าสู่คลอโรพลาสต์ โดยเอนไซม์ signal peptidase จะอยู่ในบริเวณกิ่งอนุรักษ์ 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 ปาล์มน้ำมัน, *C. annum*, *L. esculentum*, *M. truncatula* (1), *A. annua*, *A. thaliana*, *T. aestivum* และ *A. paniculata* พืชกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย *C. roseus*, *S. rebaudiana*, *M. truncatula* (2), *O. sativa*, *N. pseudonarcissus*, *M. citrifolia* และ *T. erecta*

5.6 วิวัฒนาการของเอนไซม์ DXS ในปาล์มน้ำมันเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่น

การทำ phylogenetic tree ของ DXS ด้วยโปรแกรม Progressive alignment สามารถแบ่งกลุ่มสิ่งมีชีวิตเป็นกลุ่ม ได้ 3 กลุ่ม คือ แบคทีเรีย สาหร่าย และพืชชั้นสูง ซึ่งกลุ่มพืชชั้นสูงแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยชนิดพืชคือ *C. annum*, *L. esculentum*, *M. truncatula* (1), *A. annua*, *A. thaliana*, *T. aestivum*, *A. paniculata* รวมทั้งปาล์มน้ำมัน และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยชนิดพืชคือ *C. roseus*, *S. rebaudiana*, *M. truncatula* (2), *O. sativa*, *N. pseudonarcissus*, *M. citrifolia* และ *T. erecta* สอดคล้องกับกลุ่มที่แบ่งได้โดยใช้ตำแหน่งเฉพาะในการตัดของเอนไซม์ signal peptidase

5.7 บริเวณจับของ Thiamine diphosphate บนเอนไซม์ DXS ในระหว่างการเกิดปฏิกิริยา

DXS ในปาล์มน้ำมันจะจับกับ Thiamine diphosphate หรือ Thiamine pyrophosphate ตรงกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 204-234 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) เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งจับพืชชั้นสูงอื่นอีก 14 ชนิดพบว่าบริเวณจับมีลำดับดังนี้ 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(FY)LD(S/A)(D/N)(M/L)IV(IV)LNDN) และตำแหน่งที่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ DXS จากปาล์มน้ำมันตรงกับตำแหน่งที่ 102 ซึ่งเป็นกรดอะมิโนคือ His

5.8 สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน *dxs* และ *dxr* ในการทำ RT-PCR แบบสองขั้นตอน

สภาวะที่เหมาะสมในการทำ RT-PCR แบบสองขั้นตอนสำหรับใช้ศึกษาการแสดงออกของยีน *dxs2* และ *dxr* ในผลปาล์มน้ำมันระยะต่างๆ คือ ปริมาณดีเอ็นเอ 87.5 นาโนกรัม, ความเข้มข้น $MgCl_2$ 2 มิลลิโมลาร์ และจำนวนรอบของ PCR 35 รอบ ตามลำดับ

5.9 การแสดงออกของยีน *dxs2* และ *dxr* ในผลปาล์มน้ำมันระยะต่างๆ

การแสดงออกของยีน *dxs2* ในชั้นเนื้อของผลปาล์มน้ำมันจะแปรผันตามอายุของผลปาล์มน้ำมันที่เพิ่มมากขึ้นและสูงสุดในระยะที่ 6 (อายุ 18 สัปดาห์หลังจากการผสมพันธุ์) หลังจากนั้นการแสดงออกจะคงที่ และลดลงอย่างช้าๆจนกระทั่งผลปาล์มน้ำมันสุก ส่วนการแสดงออกของยีน *dxr* มีค่าใกล้เคียงกันไม่ขึ้นอยู่กับการเพิ่มอายุของผลปาล์มน้ำมัน

5.10 ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *dxs2* และ *dxr* กับ β -carotene ในผลปาล์มน้ำมันระยะต่างๆ

การแสดงออกของยีน *dxs2* ในระยะที่ 1 และ 2 เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วมากกว่าการเพิ่มปริมาณของ β -carotene แต่ในระยะที่ 3-6 การแสดงออกของยีน *dxs2* เพิ่มขึ้นโดยสอดคล้องกับ β -carotene และสูงสุดในระยะที่ 6 เมื่อผลปาล์มน้ำมันมีอายุเพิ่มมากขึ้นการแสดงออกของยีน *dxs2* และ β -carotene จะคงที่จนผลปาล์มน้ำมันสุก ส่วนการแสดงออกของยีน *dxr* ไม่เปลี่ยนแปลงในช่วงเวลาดังกล่าว