บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *dxs* และ *dxr* จากใบและผลปาล์มน้ำมัน

จากการโคลนยีน *dxs* ในใบและผลปาล์มน้ำมัน แล้วตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์กับธนาคารยีน พบว่ายีนที่โคลนได้เป็นยีน *dxs* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ยาว 938 คู่เบส ทั้งในใบและผลปาล์มน้ำมัน แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากเนื้อเยื่อทั้งสองมีความแตกต่างกันถึง 19.40% และลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกัน 8.65% แสดงให้เห็นว่ายีน *dxs* ที่โคลนได้จากใบและผลปาล์มน้ำมันเป็นยีนที่มาจาก mRNA ต่างสายกัน จึงให้ชื่อยีน *dxs* ในใบปาล์มน้ำมันเป็น *dxs1* และในผลปาล์มน้ำมันเป็น *dxs2* ดังนั้นในปาล์มน้ำมันจึงมี *dxs* อย่างน้อย 2 ยีน เช่นเดียวกับ *R.capsulatus* ซึ่งมี 2 ยีน คือ *dxsA* และ *dxsB* (Hahn *et al.*, 2001) และใน *M. citrifolia* มีอย่างน้อย 4 ยีน (Han *et al.*, 2003) แตกต่างกับในมะเขือเทศที่พบเพียง 1 ยีน (Lois *et al.*, 2000) ยีนทั้งสองยังคงเป็นเอนไซม์ DXS ที่เร่งปฏิกิริยาเดียวกันหรือที่เรียกว่า ไอโซไซม์ โดยไอโซไซม์ดังกล่าวเป็นไอโซไซม์ที่มีความแตกต่างกันในระดับยีนและทำงานในเนื้อเยื่อต่างชนิดกัน สำหรับส่วนของยีน *dxr* จากใบและผลปาล์มน้ำมันพบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ 773 คู่เบส เหมือนกัน ดังนั้นยีน *dxr* ชนิดเดียวกัน แต่สามารถทำงานในเนื้อเยื่อต่างชนิดกันได้

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน *dxs1*, บางส่วนของยีน *dxs2* และ *dxr* ได้เสนอต่อธนาคารยีนและมี accession number คือ AY583783, AY611205 และ AY583784 ตามลำดับ

4.2 ลำดับกรดอะมิโนที่นำเอนไซม์ DXS จากไซโทพลาสมเข้าสู่คลอโรพลาสต์ (chloroplast transit peptide, CTP)

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ DXS บริเวณ coding region ของยีน *dxs1* ในปาล์มน้ำมันรวมทั้งแบคทีเรีย *E. coli*, สาหร่ายสีเขียว *C. reinhardii* และพืชชั้นสูงชนิดอื่นอีก 14 ชนิด มาเรียงให้อยู่ในแนวเส้นตรงโดยใช้โปรแกรม ClustalX 1.81 ทำให้พบว่าเปปไทด์ในช่วงต้นของเอนไซม์ DXS จากสาหร่ายและพืชยาวมากกว่าในแบคทีเรีย *E. coli* โดยเปปไทด์ที่เพิ่มขึ้นมานี้อาจเป็นส่วนที่นำเอนไซม์จากไซโทพลาสซึมเข้าสู่คลอโรพลาสต์ ประกอบกับข้อมูลที่พบว่ามีจำนวนกรดอะมิโนในช่วงต้นของเอนไซม์ DXS 60 กรดอะมิโนมี Ser (S) และ Thr (T) ค่อนข้างสูงถึง 18.33% สอดคล้องกับ CTP ของ cystathionine γ-synthase จากถั่วเหลืองที่มี S และ T สูงถึง 20% (Hughes *et al.*, 1999) และมีกรดอะมิโนที่เป็นกรด (acidic amino acid) Glu (E) และ Asp

(D) น้อยเพียง 5% ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าเอนไซม์ DXS มีส่วนของเปปไทด์ที่นำเอนไซม์ DXS สำหรับไปทำงานที่คลอโรพลาสต์ เพราะ CTP จะมีกรดอะมิโนที่กลุ่ม hydroxy คือ S และ T มาก (Gavel and Heijne, 1990; Heijne and Nishikawa, 1991; Tsutsumi *et al.*, 1996) รวมถึงมีกรดอะมิโนที่เป็นกรดเพียงเล็กน้อย (Gavel and Heijne, 1990; Heijne and Nishikawa, 1991) และเมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม TargetP, SignalP (Nielsen *et al.*, 1997; Nielsen *et al.*, 1999; www.cbs.dtu.dk/services/SignalP) และ Predator (www.inra/servilete/webPredator) ทำให้ทราบว่าเอนไซม์ DXS ทำงานในคลอโรพลาสต์และมีส่วนของเปปไทด์ที่นำ DXS จากไซโทพลาสซึมเข้าสู่คลอโรพลาสต์ด้วย จึงสรุปได้ว่าเอนไซม์ DXS ได้จากการแปลรหัสจากดีเอ็นเอที่นิวเคลียสแต่ทำงานบริเวณคลอโรพลาสต์

เมื่อเปรียบเทียบ CTP ของ DXS จากปาล์มน้ำมันกับสาหร่ายและพืชชั้นสูงชนิดอื่น จะเห็นได้ว่า CTP ของเอนไซม์ DXS มีความแตกต่างกันทั้งความยาวและลำดับกรดอะมิโน เช่นเดียวกับ Heijne และ Abrahmsen (1989) ที่พบว่า CTP จากสิ่งมีชีวิตทั้งกลุ่มโพรคารีโอท์และยูคารีโอท์มีความยาวและลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกันและมีความจำเพาะกับสิ่งมีชีวิตนั้นๆ (Heijne and Abrahmsen, 1989) เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของ CTP จากพืชชั้นสูงชนิดอื่นอีก 14 ชนิดมาจัดเรียง พบบริเวณที่มีลักษณะอนุรักษ์ที่มีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ signal peptidase สำหรับตัดส่วนที่นำโปรตีนจากไซโทพลาสมเข้าสู่คลอโรพลาสต์ เพื่อให้ได้เอนไซม์ที่ทำงานในคลอโรพลาสต์ บริเวณอนุรักษ์ที่ในส่วนของ CTP จากเอนไซม์ DXS ในพืชชั้นสูงแบ่งได้ 2 กลุ่มคือ 1) (Arg/Lys)-X_3-(Val/Ile)-X-↓(Ala/Ser)-Leu-(Ala/Ser)-Glu และ 2) (Arg/Lys)-X_2-(Phe/Leu)-X-(Val/Leu)-X-↓Ala-Ser เมื่อ X คือ กรดอะมิโนใดก็ได้

เมื่อเปรียบเทียบบริเวณอนุรักษ์ทั้ง 2 กลุ่ม แม้มีกรดอะมิโนบางตำแหน่งแตกต่างกัน แต่มีส่วนที่ใกล้เคียงกันคือ ก่อนตำแหน่งตัดของ signal peptidase ที่ Arg อยู่ระหว่างตำแหน่ง -5 ถึง -7 ตามด้วย (Val/Leu)-X-↓Ala ลักษณะดังกล่าวสอดคล้องกับ Gavel และ Heijne (1990) ที่พบ Arg ก่อนถึงตำแหน่งตัดด้วย signal peptidase ระหว่างตำแหน่ง -6 ถึง -10 และมีความแตกต่างในบางตำแหน่ง คือ (Val/Ile)-X-(Ala/Cys)↓Ala จะเห็นได้ว่าตำแหน่งตัดของเอนไซม์ signal peptidase อยู่ระหว่าง Ala/Cys และ Ala แต่ปาล์มน้ำมันและพืชชั้นสูงชนิดอื่นๆเป็น X และ Ala จะขาดส่วนของ Ala/Cys ไป 1 ตำแหน่ง อาจเป็นเพราะเอนไซม์ DXS เกิดการกลายทำให้กรดอะมิโนบางตัวขาดหายไปในระหว่างวิวัฒนาการ (deletion mutant) บริเวณอนุรักษ์ในปาล์มน้ำมัน (กลุ่มที่ 1) มีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ก่อนหน้า Ala 1 กรดอะมิโน และใน *A. paniculata* มีตำแหน่งตัดหลังจาก

Ala 1 กรดอะมิโน อาจเกิดจาก signal peptidase ต่างชนิดกันทำให้ตำแหน่งในการตัดต่างกัน (Gavel and Heijne, 1990)

4.3 สายสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ DXS ในปาล์มน้ำมันเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่น

การทำ phylogenetic tree ของ DXS ด้วยโปรแกรม Progressive alignment (Feng and Doolittle, 1990) สามารถจัดกลุ่มพืชชั้นสูงออกเป็น 2 กลุ่มอย่างชัดเจน สอดคล้องกับกลุ่มที่แบ่งโดยใช้ตำแหน่งในการตัดของเอนไซม์ signal peptidase อาจเนื่องมาจากเอนไซม์ DXS ที่ตัดส่วน CTP ออกไปจากพืชแต่ละชนิด มีลักษณะอนุรักษ์มากเกือบทั้งหมดของเอนไซม์แม้ทางปลาย C (C-terminal) และเมื่อพิจารณาทั้งเอนไซม์ก็พบลักษณะอนุรักษ์เช่นเดียวกัน แต่จะมีบริเวณที่แตกต่างกันของลำดับกรดอะมิโนอย่างมากทางปลาย N (N-terminal) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มี CTP สอดคล้องกับการศึกษาในข้าว โดย Tsutsumi และคณะ (1996) ที่พบว่า DXS ที่ทำงานมีลำดับกรดอะมิโนที่อนุรักษ์มากกว่าเอนไซม์ที่มีส่วนของ transit peptide (Tsutsumi *et al.*, 1996) ดังนั้นการศึกษาสายสัมพันธ์ของเอนไซม์ DXS โดยการทำ phylogenetic tree ส่วนที่บอกความแตกต่างของ DXS ได้ดีคือส่วน CTP ทำให้ข้อมูลที่ได้จากการแบ่งกลุ่มพืชด้วยการทำ phylogenetic tree และแบ่งกลุ่มตามตำแหน่งในการตัดของเอนไซม์ signal peptidase จากบริเวณ chloroplast transit peptide จึงสอดคล้องกัน

4.4 บริเวณจับของ DXS กับ Thiamine diphosphate บนเอนไซม์ ในระหว่างการเกิดปฏิกิริยา (Thiamine diphosphate binding site)

การศึกษาบริเวณจับของ Thiamine diphosphate (ThDP) หรือ Thiamine pyrophos phate (TPP) บนเอนไซม์ DXS ในปาล์มน้ำมัน พบว่าอยู่ในช่วงของกรดอะมิโนที่ 204-234 มีลำดับคือ 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 (GDGAMTAGQAYEAMNNAGYLDSDMIVI LNDN) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งจับของพืชทั้งหมด 14 ชนิดและของ *E. coli* จะเห็นได้ว่าบริเวณจับกับ Thiamine diphosphate ในพืชชั้นสูงมีลักษณะอนุรักษ์อย่างมาก โดยมีลำดับดังนี้ 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 (GDGAMTAGQAY EAMNNAG(F/Y)LD(S/A)(D/N)(M/L)IV(I/V)LNDN)

จากข้อมูลที่ได้ สอดคล้องกับการศึกษาใน peppermint (*Mentha x piperita*) โดย Lange และคณะ ในปี 1998 ที่เปรียบเทียบบริเวณจับของ Thiamine diphosphate บนเอนไซม์ DXS กับ *A. thaliana*, *R. capsulate*, *Synechocystis sp.* Strain PC6803 และ *E. coli* แล้วพบว่าบริเวณจับของ Thiamine diphosphate มีลำดับกรดอะมิโนในบางตำแหน่งแตกต่างกับที่ศึกษาในปาล์มน้ำมัน แต่มีความยาว 31 กรดอะมิโนเท่ากัน และมีลำดับดังนี้ Gly-Asp-Gly-(Ala/Ser)-X-Thr-(Ala/Gly)-Gly-(Gln/Arg)-Ala-X-Glu-Ala-X-Asn-(Asn/His)-Ala-Gly-$(X)_{7-8}$-(Ile/Val)-(Val/Ile)-Leu-Asn-Asp-Asn (GDG(A/S)XT(A/G)G(Q/R)AXEAXN(N/H)AG $(X)_{7-8}$(I/V)(V/I)LNDN (Lange *et al.*, 1998) ต่างจากการศึกษาโดย Hahn และคณะในปี 2001 ที่ศึกษาในเอนไซม์ DXP_{ase} A และ B (DXS A และ B) จาก *R. capsulatus* ซึ่งมีลำดับคือ Gly-Asp-Gly-(Ser/Ala)-(Ile/Met)-Thr-(Ala/Gly)-Gly-Met-Ala-(Tyr/Phe)-Glu-Ala-Leu-Asn-His-(Ala/Gly)-Gly-His-Leu-(Lys/Gly-(Ser/Lys)-Arg-Met-Phe-Val-Ile-Leu-Asn-Asp-Asn (GDG(S/A)(I/M)T(A/G)GMA(Y/F)EALNH (A/G)GHL(K/G)(S/K)RMFVILNDN) (Hahn *et al.*, 2001)

เมื่อเปรียบเทียบตำแหน่งที่เกี่ยวกับการเร่งปฏิกิริยา DXS จากปาล์มน้ำมันและ *E. coli* ที่ศึกษาแล้วโดย Querol และคณะ (2001) พบว่าน่าจะเป็น His ตำแหน่งที่ 102 เพราะเมื่อเปรียบเทียบ His ตำแหน่งที่ 49 ของ *E. coli* ตรงกับ His ตำแหน่งที่ 102 ในปาล์มน้ำมัน และเมื่อพิจารณาสิ่งมีชีวิตอื่น พบว่าบริเวณเร่งมีการที่อนุรักษ์อย่างมากโดยเฉพาะในพืชชั้นสูง แสดงว่าบริเวณนี้มีความสำคัญในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ สิ่งมีชีวิตจึงพยายามรักษาบริเวณนี้ไม่ให้เกิดการกลายของ His ในบริเวณเร่ง (active site) ซึ่งมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการถ่ายโอนโปรตอน (proton transfer) จากตัวสับสเตรทในระหว่างที่เกิดปฏิกิริยา (Querol., *et al.*, 2001)

4.5 สภาวะที่เหมาะสมในการทำ RT-PCR แบบสองขั้นตอน ของยีน *dxs2* และ *dxr*

สภาวะที่เหมาะสมในการทำ RT-PCR แบบสองขั้นตอน เพื่อใช้ศึกษาการแสดงออกของยีน *dxs2* และ *dxr* เน้นปัจจัยที่มีอาจผลต่อการทำ PCR คือ ปริมาณดีเอ็นเอ ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ และจำนวนรอบในการทำ PCR โดยเฉพาะปริมาณดีเอ็นเอและจำนวนรอบในการทำ PCR ได้เลือกในช่วงซึ่งมีปริมาณ PCR product ที่มีความชันมากที่สุด (exponential phase) (Serazin-Leroy *et al.*, 1998) เนื่องจากในระยะนี้หากมีการเปลี่ยนแปลงปัจจัยใดๆ จะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณ PCR product มากเช่นเดียวกัน ทำให้เห็นความแตกต่างของ PCR product ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น ส่วน $MgCl_2$ มีความสำคัญในการทำ PCR เนื่องจากเอนไซม์ *Taq* polymerase ต้องการ Mg^{2+} ในการเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชัน เพื่อเพิ่มความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ แต่จากการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ $MgCl_2$ มากกว่า 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ PCR product

ลดลง อาจเนื่องจากหมู่ฟอสเฟสในนิวคลีโอไทด์ซึ่งมีประจุลบจับกับ Mg^{2+} ที่มีมากเกินในปฏิกิริยา ทำให้ประสิทธิภาพในการเพิ่มความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์จากการทำ PCR ลดลง ส่งผลให้ PCR product ที่ได้ลดลงด้วย ดังนั้นจึงต้องใช้ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ที่เหมาะสมที่สุดในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ (อุไรวรรณ วิจารณกุล, 2545)

4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของยีน *dxs* และ *dxr* กับปริมาณแคโรทีนอยด์จากชั้นเนื้อผลปาล์มน้ำมันในระยะต่าง ๆ

การศึกษาการแสดงออกของยีน *dxs2* และ *dxr* ในผลปาล์มน้ำมันระยะต่างๆ โดยวิธี semiquantitative RT-PCR แทนการวิเคราะห์ด้วยวิธี Northern blot เนื่องจากวิธีนี้ใช้วัดหรือเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนที่มีการแสดงออกในระดับต่ำได้ดีกว่า (Serazin-Leroy *et al.*, 1998; Burleigh, 2001) รวมทั้งในบางกรณีให้ผลในการศึกษาไม่แตกต่างกัน (Nicoletti and Sassy-Prigent, 1996; Serazin-Leroy *et al.*, 1998)

การศึกษาพบว่าปริมาณการแสดงออกของยีน *dxs2* และ *dxr* จะแตกต่างกัน โดยการแสดงออกของยีน *dxs2* เพิ่มขึ้นตามอายุของผลปาล์มน้ำมันที่เพิ่มขึ้นและสอดคล้องกับปริมาณ β-carotene ที่เพิ่มขึ้นด้วย โดยการแสดงออกของยีน *dxs2* สูงสุดในระยะที่มีปริมาณ β-carotene สูงสุดเช่นเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับการแสดงออกของยีน *CapTKT2* หรือ *dxs2* ในมะเขือเทศ ที่สัมพันธ์กับการสะสมแคโรทีนอยด์ตามระยะการพัฒนาของผล (Bouvier *et al.*, 1998; Lois *et al.*, 2000) แตกต่างกับการแสดงออกของยีน *dxr* ที่คงที่ไม่เปลี่ยนแปลงตลอดช่วงเวลาที่ศึกษา

จากผลการทดลองสรุปได้ว่ายีน *dxs2* มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในระหว่างการเจริญของผลปาล์มน้ำมัน รวมทั้งสนับสนุนข้อมูลที่ว่ายีน *dxs* เป็นยีนสำหรับเอนไซม์ DXS ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักในการควบคุมปฏิกิริยาของวิถี MEP (Estevez *et al.*, 2001; Affek and Yakir, 2003) แต่ยีน *dxr* สำหรับเอนไซม์ DXR ไม่ใช่เอนไซม์หลักในการควบคุมปฏิกิริยาของวิถี MEP (Rodriguez-Concepcion *et al.*, 2001)