



การโคลนและการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างวิตามินอีจากผักเสี้ยนผี



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

การโคลนและการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างวิตามินอีจากผักเสี้ยนผี



วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "การโคลนและการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างวิตามินอีจากผักเสี้ยนผี"
ของ อัจฉราภรณ์ ใจเอื้อน
ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
(รองศาสตราจารย์ ดร.วรรณรดา สุราช)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พัทธมน แสงอินทร์)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มลิวรรณ นาคขุนทด)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิตติศักดิ์ พุทธชาติ)

อนุมัติ

.....
(ศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล มุณีสว่าง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	การโคลนและการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างวิตามินอีจาก ผักเสี้ยนผี
ผู้วิจัย	อัจฉราภรณ์ ใจเอื้อน
ประธานที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พัทธมน แสงอินทร์
ประเภทสารนิพนธ์	วิทยานิพนธ์ วท.ม. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2563
คำสำคัญ	ผักเสี้ยนผี, โทโคฟีรอล, โฮโมเจนติซิเคอสิคพรีนิลทรานสเฟอเรส, วิตามินอี

บทคัดย่อ

ผักเสี้ยนผี (*Cleome viscosa* (Cv) L.) เป็นพืชปีเดียวที่เมล็ดมีการสะสมน้ำมันและวิตามินอีปริมาณสูง โดยวิตามินอีที่มีประสิทธิภาพในการเกิดปฏิกิริยามากที่สุดคือ โทโคฟีรอล (α , β , γ และ δ) อนุพันธ์เหล่านี้ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในพืช และยังเป็นสารที่จำเป็นต่อสุขภาพของมนุษย์ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของยีนและลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนโทโคฟีรอลไซเคส (tocopherol cyclase (CvVTE1)) โฮโมเจนติซิเคอสิคพรีนิลทรานสเฟอเรส (homogentisic acid prenyltransferase (CvVTE2)) เอ็มพีบีคิว เมทิลทรานสเฟอเรส (MPBQ methyl transferase (CvVTE3)) แกรมม่าโทโคฟีรอล เมทิลทรานสเฟอเรส (gamma tocopherol methyltransferase (CvVTE4)) ไฮดรอกซีฟีนิล ไพรูเวต ไดออกซิเจเนส (hydroxyphenyl pyruvate dioxygenase (CvHPPD)) และโฮโมเจนติเซต โซลานีสซิลทรานสเฟอเรส (homogentisate solanesyltransferase (CvHST)) ซึ่งเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ในวิถีการสังเคราะห์โทโคฟีรอล ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน CvVTE1 มีขนาด 695 คู่เบส CvVTE2 มีขนาด 376 คู่เบส CvVTE3 มีขนาด 387 คู่เบส CvVTE4 มีขนาด 366 คู่เบส CvHPPD มีขนาด 334 คู่เบส และ CvHST มีขนาด 461 คู่เบส ซึ่งมีความคล้ายยีน ThVTE1 ThVTE2 ThVTE3 ThVTE4 ThHPPD และ ThHST จาก *Tarenaya hassleriana* การวิเคราะห์ระดับแสดงออกของยีน CvVTE1 CvVTE2 CvVTE3 CvVTE4 CvHPPD และ CvHST ในใบ 3 ระยะ (L1 L2 และ L3) และเมล็ด 4 ระยะ (1-4 สัปดาห์หลังการติดผล) ด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่าการแสดงออกของยีน CvVTE3 และ CvHPPD ในระดับที่สูงในใบ ขณะที่ในเมล็ดยีน CvVTE2 มีระดับการแสดงออกสูงช่วง

ระยะ 2 และ 3 สัปดาห์หลังการติดผล ที่ 231 และ 224 เท่า ตามลำดับ เช่นเดียวกันกับการแสดงออกของยีน CvVTE1 และ CvVTE3 การแสดงออกร่วมกันระหว่าง CvVTE4 และ CvHPPD ในระดับสูงที่ระยะ 4 สัปดาห์หลังการติดผล โดยไม่มีการลดระดับการแสดงออกช่วยในการสังเคราะห์โทโคฟีรอล นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด พบว่าในเมล็ดมีปริมาณมากกว่าในใบ โดยมีปริมาณสูงที่สุดในระยะ 2 สัปดาห์หลังการติดผล ซึ่งสัมพันธ์กับรูปแบบการแสดงออกของยีน CvVTE2 อย่างมีนัยสำคัญที่ 0.05 ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า CvVTE2 มีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์โทโคฟีรอลในเมล็ดของผักเสี้ยนผี



Title	MOLECULAR CLONING AND EXPRESSION OF VITAMIN E REGULATOR GENES FROM <i>CLEOME VISCOSA</i> L.
Author	AUDSHARAPORN JAI-EUN
Advisor	Assistant Professor Pattamon Sangin, Ph.D.
Academic Paper	M.S. Thesis in Biotechnology, Naresuan University, 2020
Keywords	Cleome viscosa, tocopherol, homogentisic acid prenyltransferase

ABSTRACT

Cleome viscosa (Cv) L. is an annual oilseed crop plant that has high vitamin E, with the most active form are represented as the tocopherols (α , β , γ and δ). These act as antioxidants in plants and are also essential components for human health. The objectives of this research were to determine the genes expression profile and partial-length cDNA encoding tocopherol cyclase (CvVTE1), homogentisic acid prenyltransferase (CvVTE2), MPBQ methyltransferase (CvVTE3), gamma-tocopherol methyltransferase (CvVTE4), hydroxyphenyl pyruvate dioxygenase (CvHPPD) and homogentisate solanesyltransferase (CvHST) genes, which involve the tocopherol biosynthetic enzyme. Partial cDNA sequences of six genes as 695 bp CvVTE1, 376 bp CvVTE2, 387 bp CvVTE3, 366 bp CvVTE4, 334 bp CvHPPD and 461 bp CvHST had a high degree of sequence homology with ThVTE1, ThVTE2, ThVTE3, ThVTE4, ThHPPD and ThHST from *Tarenaya hassleriana*. Expression levels of CvVTE1, CvVTE2, CvVTE3, CvVTE4, CvHPPD and CvHST genes were analyzed in 3 degrees of plant nodes (L1, L2 and L3) in leaves and 4 stages of seeds (1-4 weeks after fruit set (WAF)) by real-time quantitative PCR (qPCR). The high expression level of CvVTE3 and CvHPPD were found in leaves, while the seeds showed that the expression of CvVTE2 was high in both 2 and 3 WAF at 231-fold and 224-fold respectively same as CvVTE1 and CvVTE3 expression. Co-expression of CvVTE4 and CvHPPD at 4 WAF without any down-

regulation supported high levels of flux toward the synthesis of tocopherols. Moreover, total phenolic content in seeds showed higher than leaves. The highest level was 2 WAF that the correlation was significant with the *CvVTE2* gene expression pattern (p -value = 0.05). The results of this study indicated that *CvVTE2* played a key role in tocopherol biosynthesis in the seed of *C. viscosa*.



ประกาศคุณูปการ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงในความอนุเคราะห์ของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พัทธมน แสงอินทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ซึ่งให้ความรู้ คำปรึกษา และข้อเสนอแนะแก้ปัญหาต่าง ๆ ในระหว่างการดำเนินงานวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขเพื่อให้วิทยานิพนธ์นี้มีความสมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอกราบขอบคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณทุนโครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย) ระดับปริญญาโท

ขอกราบขอบพระคุณกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่าน และอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพที่กรุณาแนะนำ ให้คำปรึกษาและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสิ้นสมบูรณ์

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์ และขอบคุณสมาชิกหน่วยวิจัยพันธุศาสตร์โมเลกุล ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่คอยให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยตลอดการทำวิทยานิพนธ์

เหนือสิ่งอื่นใดขอกราบขอพระคุณบิดา มารดา น้องสาว คุณปู่ คุณย่า พลุ่โต เนปจุน คุณนครเรศน์ พงษ์ศรีลา คุณสุตารัตน์ เกษมชลธาร คุณศิริพัฒน์ ม่วงป่า และผู้มีอุปการะคุณทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือทุก ๆ ด้าน ทั้งกำลังใจ กำลังใจ และทุนทรัพย์ในการสนับสนุนแก่ข้าพเจ้าเสมอมา

อีกทั้งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยบัณฑิตศึกษาด้านการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตรจากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) ประจำปีงบประมาณ 2563

คุณค่าและคุณประโยชน์อันพึงจะมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบและอุทิศแต่ผู้มีพระคุณทุก ๆ ท่าน ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่างานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจบ้างไม่มากก็น้อย

อัจฉราภรณ์ ใจเอื้อน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
ประกาศคุณูปการ.....	ช
สารบัญ.....	ซ
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฒ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
จุดมุ่งหมายของการวิจัย.....	2
ขอบเขตการวิจัย.....	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
ผักเสี้ยนผี.....	3
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์.....	4
การกระจายพันธุ์.....	5
วิตามินอี.....	6
โครงสร้างและประเภทของวิตามินอี.....	6
กระบวนการสังเคราะห์วิตามินอี.....	7
ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์วิตามินอี.....	10
สารประกอบฟีนอลิก.....	12
สารต้านอนุมูลอิสระ.....	13

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	14
ตัวอย่างพืชที่นำมาใช้ในการศึกษา.....	14
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	14
สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย.....	15
การสกัดอาร์เอ็นเอ.....	18
การกำจัดดีเอ็นเอออกจากอาร์เอ็นเอตัวอย่าง.....	19
ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณอาร์เอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิลีคโตโฟรีซิส.....	20
วัดค่าดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตโดยใช้ NanoDrop Spectrophotometer.....	20
การแปลงอาร์เอ็นเอให้เป็นคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ (cDNA).....	20
การออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ.....	21
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR).....	21
การทำ PCR product ให้บริสุทธิ์โดยใช้ E.Z.N.A.® Cycle-Pure Kit.....	22
การเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้ากับพาหะโดยใช้ Clone JET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific).....	23
การเตรียม competent cell.....	23
การนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน.....	24
การสกัดพลาสมิดจากเซลล์แบคทีเรียโดยใช้ชุด Plasmid miniPREP Kit (PureDireX).....	24
การหาลำดับดีเอ็นเอของยีน และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์.....	25
วิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Quantitative PCR (qPCR).....	26
การสกัดสารสกัดหยาบ.....	26
การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content).....	27
การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการแสดงออกของยีนแต่ละยีน และปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด.....	28

บทที่ 4 ผลการวิจัย	29
ตัวอย่างพืชที่นำมาใช้ในการศึกษา.....	29
การสกัดอาร์เอ็นเอ และการตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอ	29
การออกแบบไพรเมอร์เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์	31
การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR).....	32
การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน.....	33
การสร้างแผนภูมิกความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree).....	41
การออกแบบไพรเมอร์เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของยีน	44
วิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Quantitative PCR (qPCR)	48
การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)	51
การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการแสดงออกของยีน และ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด.....	52
บทที่ 5 บทสรุป.....	53
อภิปรายผลการวิจัย.....	53
สรุปผลการวิจัย.....	57
บรรณานุกรม.....	57
ภาคผนวก ก แสดงชนิดของพืชต้นแบบที่นำมาออกแบบไพรเมอร์ชุดที่ 1.....	63
ภาคผนวก ข การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Quantitative PCR (qPCR).....	68
ภาคผนวก ค ผลการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ระหว่างระดับการแสดงออก ของยีนในตัวอย่างใบ 3 ระยะ.....	72
ภาคผนวก ง ผลการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ระหว่างระดับการแสดงออก ของยีนในตัวอย่างเมล็ด 4 ระยะ	79

ภาคผนวก จ ค่าดูดกลืนแสงสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด
 (Total phenolic content).....86

ประวัติผู้วิจัย88



สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์วิตามินอี	11
ตาราง 2 ความเข้มข้นและปริมาณของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR.....	22
ตาราง 3 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยเทคนิค PCR.....	22
ตาราง 4 ความเข้มข้นและปริมาณของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา qPCR.....	26
ตาราง 5 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยเทคนิค qPCR.....	26
ตาราง 6 ผลการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณอาร์เอ็นเอจากใบด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตโดยใช้ NanoDrop Spectrophotometer	30
ตาราง 7 ผลการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณอาร์เอ็นเอจากเมล็ดด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตโดยใช้ NanoDrop Spectrophotometer	31
ตาราง 8 ไพรมอร์จำเพาะสำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (ไพรมอร์ชุดที่ 1).....	31
ตาราง 9 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์วิตามินอีในผักเสี้ยนผี.....	35
ตาราง 10 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>VTE1</i>	37
ตาราง 11 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>VTE2</i>	38
ตาราง 12 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>VTE3</i>	38
ตาราง 13 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>VTE4</i>	39
ตาราง 14 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>HPPD</i>	40
ตาราง 15 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>HST</i>	40
ตาราง 16 ไพรมอร์จำเพาะสำหรับเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของยีน (ไพรมอร์ชุดที่ 2)	44

ตาราง 17 ตำแหน่งของไพรมอร์บนบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของยีน	45
ตาราง 18 ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการแสดงออกของยีน CvVTE1 CvVTE2 CvVTE3 CvVTE4 CvHPPD และ CvHST และปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด	52
ตาราง 19 ผลการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ของระดับการแสดงออกของยีน CvVTE1 ในตัวอย่างใบ 3 ระยะ	73
ตาราง 20 ผลการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ของระดับการแสดงออกของยีน CvVTE2 ในตัวอย่างใบ 3 ระยะ	74
ตาราง 21 ผลการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ของระดับการแสดงออกของยีน CvVTE3 ในตัวอย่างใบ 3 ระยะ	75
ตาราง 22 ผลการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ของระดับการแสดงออกของยีน CvVTE4 ในตัวอย่างใบ 3 ระยะ	76
ตาราง 23 ผลการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ของระดับการแสดงออกของยีน CvHPPD ในตัวอย่างใบ 3 ระยะ	77
ตาราง 24 ผลการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ของระดับการแสดงออกของยีน CvHST ในตัวอย่างใบ 3 ระยะ	78
ตาราง 25 ผลการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ของระดับการแสดงออกของยีน CvVTE1 ในตัวอย่างเมล็ด 3 ระยะ	80
ตาราง 26 ผลการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ของระดับการแสดงออกของยีน CvVTE2 ในตัวอย่างเมล็ด 3 ระยะ	81
ตาราง 27 ผลการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ของระดับการแสดงออกของยีน CvVTE3 ในตัวอย่างเมล็ด 3 ระยะ	82
ตาราง 28 ผลการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ของระดับการแสดงออกของยีน CvVTE4 ในตัวอย่างเมล็ด 3 ระยะ	83

ตาราง 29 ผลการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ของระดับการแสดงออกของยีน CvHPPD ในตัวอย่างเมล็ด 3 ระยะ	84
ตาราง 30 ผลการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ของระดับการแสดงออกของยีน CvHST ในตัวอย่างเมล็ด 3 ระยะ	85
ตาราง 31 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร ของสารละลายกรดแกลลิก.....	87
ตาราง 32 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร ของสารละลายสารสกัดหยาบ	87



สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพ 1 ลักษณะของผักเสี้ยนผี.....	3
ภาพ 2 การกระจายพันธุ์ของผักเสี้ยนผี	6
ภาพ 3 โครงสร้างของโทโคโครมานอล	7
ภาพ 4 ปฏิกิริยาและสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้องกับวิถีการสังเคราะห์วิตามินอี	8
ภาพ 5 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารตั้งต้นกรดโฮโมเจนติซิก	9
ภาพ 6 วิถีการสังเคราะห์วิตามินอี	10
ภาพ 7 ตัวอย่างใบและเมล็ดของผักเสี้ยนผี	29
ภาพ 8 ผลการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณอาร์เอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส...30	
ภาพ 9 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ด้วยไพรเมอร์ชุดที่ 1.....	32
ภาพ 10 ไดอะแกรมเทียบเคียงโครงสร้างบางส่วนของยีน CvVTE1 ของผักเสี้ยนผีกับโครงสร้างที่สมบูรณ์ของยีน VTE1 ของ <i>A. thaliana</i> (GeneBank accession no. NC_003075.7 (15804784..15808084)).....	34
ภาพ 11 ไดอะแกรมเทียบเคียงโครงสร้างบางส่วนของยีน CvVTE2 ของผักเสี้ยนผีกับโครงสร้างที่สมบูรณ์ของยีน VTE2 ของ <i>A. thaliana</i> (GeneBank accession no. NC_003071.7 (8207199..8210513)).....	34
ภาพ 12 ไดอะแกรมเทียบเคียงโครงสร้างบางส่วนของยีน CvVTE3 ของผักเสี้ยนผีกับโครงสร้างที่สมบูรณ์ของยีน VTE3 ของ <i>A. thaliana</i> (GeneBank accession no. NC_003074.8 (23415589..23417119)).....	34

<p>ภาพ 13 ไดอะแกรมเทียบเคียงโครงสร้างบางส่วนของยีน CvVTE4 ของผักเสี้ยนผีกับ โครงสร้างที่สมบูรณ์ของยีน VTE4 ของ <i>A. thaliana</i> (GeneBank accession no. NC_003070.9 (24134085..24136109)).....</p>	34
<p>ภาพ 14 ไดอะแกรมเทียบเคียงโครงสร้างบางส่วนของยีน CvHPPD ของผักเสี้ยนผีกับ โครงสร้างที่สมบูรณ์ของยีน HPPD ของ <i>A. thaliana</i> (GeneBank accession no. NC_003070.9 (2011885..2013545)).....</p>	34
<p>ภาพ 15 ไดอะแกรมเทียบเคียงโครงสร้างบางส่วนของยีน CvHST ของผักเสี้ยนผีกับ โครงสร้างที่สมบูรณ์ของยีน HST ของ <i>A. thaliana</i> (GeneBank accession no. NC_003074.8 (3779839..3782981)).....</p>	34
<p>ภาพ 16 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน tocopherol cyclase ของผักเสี้ยนผี (CvVTE1) กับตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลพันธุกรรม Genbank ด้วยแบบจำลอง Maximum likelihood (Tamura-Nei +G +I (TN93 +G +I)).....</p>	41
<p>ภาพ 17 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน homogentisic acid prenyltransferase ของ ผักเสี้ยนผี (CvVTE2) กับตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลพันธุกรรม GenBank ด้วย แบบจำลอง Maximum likelihood (Tamura 3-parameter +G (T92 +G)).....</p>	42
<p>ภาพ 18 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน MPBQ methyltransferase ของผักเสี้ยน ผี (CvVTE3) กับตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลพันธุกรรม GenBank ด้วยแบบจำลอง Maximum likelihood (General Time Reversible +G +I (GTR +G +I))....</p>	42
<p>ภาพ 19 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน gamma-tocopherol methyltransferase ของผักเสี้ยนผี (CvVTE4) กับตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลพันธุกรรม GenBank ด้วยแบบจำลอง Maximum likelihood (Tamura 3-parameter +G (T92 +G)).....</p>	43
<p>ภาพ 20 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน hydroxyphenyl pyruvate dioxygenase ของ ผักเสี้ยนผี (CvHPPD) กับตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลพันธุกรรม GenBank ด้วย แบบจำลอง Maximum likelihood (Tamura 3-parameter +G (T92 +G)).....</p>	43

ภาพ 21 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน *homogentisate solanesyltransferase* ของผักเสี้ยนผี (*CvHST*) กับตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลพันธุกรรม GenBank ด้วยแบบจำลอง Maximum likelihood (Tamura 3-parameter +G +(T92 +G+I))44

ภาพ 22 ระดับการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ในการสังเคราะห์วิตามินอี ได้แก่ *CvVTE1* *CvVTE2* *CvVTE3* *CvVTE4* *CvHPPD* และ *CvHST* ในเนื้อเยื่อใบ 3 ระยะ48

ภาพ 23 รูปแบบการแสดงออกของยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ในการสังเคราะห์วิตามินอี ได้แก่ *CvVTE1* *CvVTE2* *CvVTE3* *CvVTE4* *CvHPPD* และ *CvHST* ในเนื้อเยื่อเมล็ด 4 ระยะ 49

ภาพ 24 ระดับการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ในการสังเคราะห์วิตามินอี ได้แก่ *CvVTE1* *CvVTE2* *CvVTE3* *CvVTE4* *CvHPPD* และ *CvHST* ในเนื้อเยื่อเมล็ด 4 ระยะ .50

ภาพ 25 กราฟของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก51

ภาพ 26 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content) ของสารสกัดหยาบจากตัวอย่างใบ และเมล็ดของผักเสี้ยนผี ด้วยการสกัดในตัวทำละลายอินทรีย์ hexane/dichloromethane (1:1, v/v).....51

ภาพ 27 Melt peak ของการเพิ่มปริมาณด้วยไพรมเมอร์ *qVTE1_F* และ *qVTE1_R*69

ภาพ 28 Melt peak ของการเพิ่มปริมาณด้วยไพรมเมอร์ *qVTE2_F* และ *qVTE2_R*69

ภาพ 29 Melt peak ของการเพิ่มปริมาณด้วยไพรมเมอร์ *qVTE3_F* และ *qVTE3_R*70

ภาพ 30 Melt peak ของการเพิ่มปริมาณด้วยไพรมเมอร์ *qVTE4_F* และ *qVTE4_R*70

ภาพ 31 Melt peak ของการเพิ่มปริมาณด้วยไพรมเมอร์ *qHPPD_F* และ *qHPPD_R*71

ภาพ 32 Melt peak ของการเพิ่มปริมาณด้วยไพรมเมอร์ *qHST_F* และ *qHST_R*.....71

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันการดำเนินชีวิตในสังคมมีการเปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีและระบบสาธารณสุขที่ดีขึ้น ทั้งหมดล้วนเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดกระแสสุขภาพใหม่ ๆ นอกเหนือจากการใส่ใจเรื่องอาหาร และการออกกำลังกาย โดยวิตามินเสริมสุขภาพก็ได้รับความสนใจมากขึ้น โดยเฉพาะวิตามินอีซึ่งเป็นวิตามินจากธรรมชาติที่ได้รับการยอมรับมากที่สุดในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพป้องกันการสลายตัวของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนในเยื่อหุ้มเซลล์จากการทำปฏิกิริยากับออกซิเจน (Dörmann, 2003) วิตามินอีพบได้จากอาหารตามธรรมชาติ ได้แก่ธัญพืชต่าง ๆ และผักใบเขียวบางชนิด โดยที่มนุษย์และสัตว์ไม่สามารถที่จะสังเคราะห์วิตามินอีได้ จึงจำเป็นต้องรับวิตามินอีจากอาหารเท่านั้น ทำให้การทราบกลไกการสังเคราะห์วิตามินอีในพืชจึงน่าสนใจที่จะศึกษา

การศึกษายืนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์วิตามินอีในพืชหลากหลายชนิด เช่น ปาล์มน้ำมัน (Kong และคณะ, 2016) พบว่าในปาล์มน้ำมันมีส่วนประกอบของวิตามินอี หรือโทโคไตรอีนอล (Tocotrienols) ที่มีบทบาทสำคัญคล้ายกับโทโคฟีรอลที่มีในพืชน้ำมันทั่วไป ทั้งยังพบว่าพืชสะสมน้ำมันอีกหลายชนิดที่มีปริมาณวิตามินอีสะสมอยู่เช่นกัน รวมไปถึงกลุ่มของวัชพืชเช่น ผักเสี้ยนผี (*Cleome viscosa* L.) พืชชนิดนี้พบได้ทั่วไปตามที่รกร้าง ป่าไม้ ทุ่งหญ้า นาข้าว และไร่อ้อย ทุกภาคของประเทศไทย ทั้งมีรายงานการใช้ประโยชน์ด้านพฤกษศาสตร์พื้นบ้าน โดยใช้แก้ลม ปวดท้อง พืชผีแก้ใช้ช่วยขับหนอง (วงศ์สฤติย์ ฉั่วกุล และคณะ, 2539) แต่การใช้งานยังไม่แพร่หลายนัก นอกจากนี้ยังพบว่าภายในเมล็ดของผักเสี้ยนผีมีปริมาณน้ำมันสะสม (Kumari และคณะ, 2012) เมื่อนำมาสกัดน้ำมันและวิเคราะห์องค์ประกอบพบว่ามีวิตามินอีเป็นองค์ประกอบในปริมาณค่อนข้างสูงถึง 31.8 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด ซึ่งมีปริมาณสูงเมื่อเทียบกับพืชชนิดอื่น เช่น แดงความีปริมาณวิตามินอี 0.03 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด มะละกามีปริมาณวิตามินอี 0.73 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด อะโวคาโดมีปริมาณวิตามินอี 2.10 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด เมล็ดอัลมอลต์มีปริมาณวิตามินอี 26.20 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด และเมล็ดทานตะวันมีปริมาณวิตามินอี 42.30 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด (Pillai และคณะ, 2013)

งานวิจัยนี้ได้สังเกตเห็นว่าวิตามินอีที่มีปริมาณสูงในผักเสี้ยนผีนั้นสามารถนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ได้อย่างมากมาย แต่ไม่มีการศึกษาวิตามินอีในเชิงโมเลกุลของผักเสี้ยนผี ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงได้มุ่งเน้นศึกษาการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์สำคัญในการสร้างวิตามินอีในผักเสี้ยนผี 6 ชนิด ได้แก่ tocopherol cyclase (CvVTE1) homogentisic acid prenyltransferase (CvVTE2) MPBQ methyl-transferase (CvVTE3) gamma-tocopherol methyltransferase (CvVTE4) hydroxyphenyl-pyruvate dioxygenase (CvHPPD) และ ๕ homogentisate solanesyltransferase (CvHST)

จุดมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน CvVTE1 CvVTE2 CvVTE3 CvVTE4 CvHPPD และ CvHST ในผักเสี้ยนผี
2. เพื่อศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีนที่มีคุณสมบัติในการควบคุมการสังเคราะห์วิตามินอีของใบและเมล็ดผักเสี้ยนผีในแต่ละช่วงอายุ
3. เพื่อหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของใบและเมล็ดผักเสี้ยนผีในแต่ละช่วงอายุ

ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้ทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ในการสังเคราะห์วิตามินอีในผักเสี้ยนผี 6 ชนิด ได้แก่ tocopherol cyclase (CvVTE1) homogentisic acid prenyltransferase (CvVTE2) MPBQ methyltransferase (CvVTE3) gamma-tocopherol methyltransferase (CvVTE4) hydroxyphenyl pyruvate dioxygenase (CvHPPD) และ ๕ homogentisate solanesyltransferase (CvHST) ด้วยเทคนิคการโคลน (Cloning) แล้วออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อยีนดังกล่าว นำไปตรวจสอบรูปแบบของยีนที่แสดงออกของแต่ละช่วงอายุการเจริญเติบโตในใบ และเมล็ดของผักเสี้ยนผี ด้วยเทคนิค Quantitative PCR (qPCR) อีกทั้งทำการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ผักเสี้ยนผี

ผักเสี้ยนผี (ชื่อวิทยาศาสตร์: *Cleome viscosa* L.) หรือชื่ออื่นเช่น ส้มเสี้ยนผี (ภาคเหนือ) ผักเสี้ยนตัวเมีย และโปนิพพานไม่รู้กลับ (ภาพ 1) เป็นพืชในสกุล *Cleome* ซึ่งเป็นสกุลที่ใหญ่ที่สุดในวงศ์ Cleomaceae มีสมาชิกมากกว่า 200 ชนิด โดยในประเทศไทยปรากฏเพียง 5 ชนิด ได้แก่ ผักเสี้ยน (*C. gynandra* L.) ผักเสี้ยนผี (*C. viscosa* L.) ผักเสี้ยนขน (*C. rutidosperma* DC.) ผักเสี้ยนป่า (*C. chelidonii* L. f.) ซึ่งเป็นวัชพืช และผักเสี้ยนฝรั่ง (*C. hassleriana* Chodat) ที่นิยมนำมาปลูกเป็นไม้ประดับ (วงศ์สตีตย์ ฉั่วกุล และคณะ, 2539)



ภาพ 1 ลักษณะของผักเสี้ยนผี

โดยที่ ก:ลักษณะวิสัย ข:ใบ ค:ดอก ง:ช่อดอก จ:ผลแก่

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (Flora of China Editorial Committee, 2015)

รากเป็นระบบรากแก้วประกอบด้วยรากแรกเริ่มที่งอกออกจากเมล็ดและหยั่งลงสู่ดิน มีขนาดใหญ่กว่ารากอื่น ๆ เรียกว่ารากแก้ว มีรากแขนงขนาดเล็กกว่ารากแก้ว โดยรากแขนงจะแตกออกจากรากแก้วในลักษณะแผ่กระจายออกไปรอบ ๆ รากแก้ว รากแก้วมีทิศทางเอียงลงสู่ดิน ในขณะที่รากแขนงยังแตกแขนงออกไปอีกเป็นทอด ๆ รากผักเสี้ยนมีสีเขียวชุน โดยรากที่มีอายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลอ่อน มีกลิ่นเหม็น รสขม รากแก้วมีความยาวประมาณ 16 เซนติเมตร ความยาวเส้นรอบวงบริเวณโคนรากประมาณ 1.5 เซนติเมตร รากแขนงยาวประมาณ 7 เซนติเมตร

ลำต้นเป็นไม้ล้มลุก ลำต้นตั้งตรงเหนือดิน มีกิ่งแตกออกจากลำต้นทุกทิศทาง ข้อและปล้องเห็นไม่ชัดเจน ลำต้นอายุน้อยมีสีเขียว ส่วนลำต้นที่อายุมากมีสีน้ำตาลปนม่วง ผิวของลำต้นไม่เรียบ มีรอยนูนเป็นเส้นตามความยาวของลำต้น มีขนอ่อนสีขาวนวลปกคลุมที่ผิวลำต้น มีกลิ่นเหม็น รสขม ภายในลำต้นมีน้ำยางใสและเหนียว เมื่อโตเต็มที่มีความสูงได้ถึง 1 เมตรครึ่ง ความยาวเส้นรอบวงบริเวณโคนลำต้นประมาณ 3 เซนติเมตร

ใบเป็นใบประกอบแบบขนนก เรียงสลับ มีใบย่อย 3 – 7 ใบ แต่ส่วนใหญ่มีใบย่อย 3 – 5 ใบ ลักษณะเป็นรูปไข่ ยาวประมาณ 2 เซนติเมตร กว้างประมาณ 1 เซนติเมตร หนาประมาณ 0.3 เซนติเมตร ปลายแหลม โคนใบสอบคล้ายรูปลิ้ม ขอบใบหยักเล็กน้อย เส้นใบสานเป็นร่างแห ด้านหลังใบจะมีสีเขียวเข้มกว่าด้านท้องใบ มีขนอ่อนสีขาวนวลปกคลุมอยู่ทั่วไป ใบอ่อนมีลักษณะม้วนงอตามแนวความยาวของใบ เมื่อคลี่ออกจะค่อย ๆ คลี่ออกทางด้านกว้างของใบ ก้านใบยาวประมาณ 2 เซนติเมตร มีกลิ่นเหม็น รสขม

ดอกเป็นดอกช่อแบบช่อเชิงหลั่น เป็นดอกสมบูรณ์เพศ มีเกสรเพศผู้และเกสรเพศเมียอยู่ในดอกเดียวกัน และเป็นดอกสมบูรณ์ มีส่วนประกอบครบทั้ง 4 ส่วน ได้แก่ กลีบเลี้ยง กลีบดอก เกสรเพศผู้ และเกสรเพศเมีย ดอกออกตามซอกใบ กลีบเลี้ยงสีเขียวอ่อน เรียวยาว ปลายกลีบแหลม มี 4 กลีบเป็นกลีบใหญ่ 1 กลีบ กลีบเล็ก 3 กลีบ กลีบเลี้ยงที่มีขนาดใหญ่อยู่ตรงกับตำแหน่งที่เว้นว่างระหว่างกลีบดอก โดยความยาวประมาณ 0.6 เซนติเมตร กว้างประมาณ 0.2 เซนติเมตร หนาประมาณ 0.1 มิลลิเมตร กลีบเลี้ยงเล็กมีความยาวและความหนาเท่า ๆ กับกลีบเลี้ยงใหญ่ แต่มีความกว้างน้อยกว่า คือประมาณ 1.5 มิลลิเมตร กลีบดอกมีสีเหลือง 4 กลีบเรียงชิดกัน มีช่องว่างเหลือประมาณความกว้างของ 1 กลีบดอก กลีบดอกมีลักษณะแผ่แบนคล้ายเล็บ ขอบเรียบโค้งมน ยาวประมาณ 1 เซนติเมตร กว้างประมาณ 0.4 เซนติเมตร หนาประมาณ 0.1 มิลลิเมตร ก้านดอก สีเขียวอ่อน ยาวประมาณ 0.6 เซนติเมตร ฝังอยู่ในเนื้อของกลีบ แต่ละดอกประกอบด้วยเกสรเพศเมีย 1 อัน

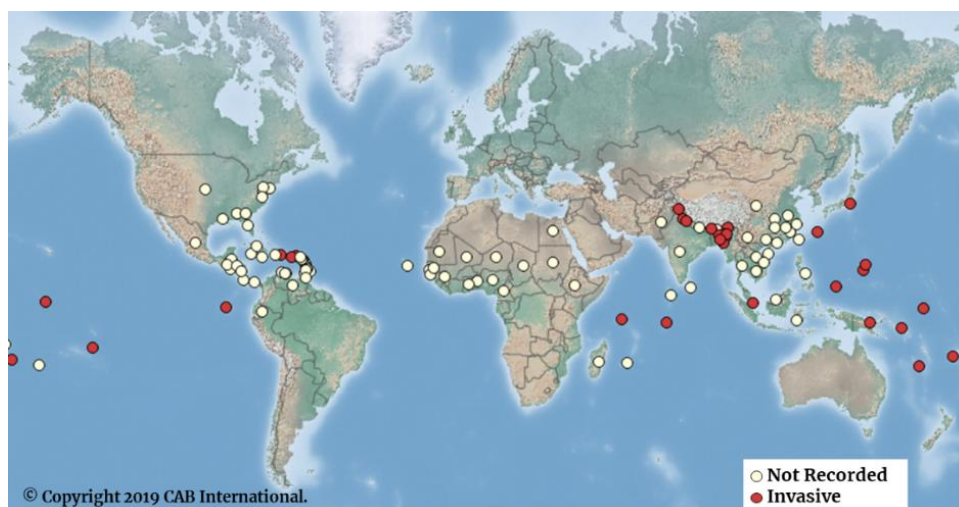
และเกสรเพศผู้ประมาณ 8-30 อัน อับละอองเรณูเป็นเส้นยาวที่ปลายมีสีน้ำเงิน มีกลิ่นเหม็นเขียว รสขม ผักเสี้ยนฝักจะออกดอกเมื่ออายุประมาณ 1 เดือนครึ่ง – 2 เดือน

ผลเป็นผลเดี่ยว แห้งแล้วแตกตามตะเข็บด้านข้าง มีลักษณะเป็นฝัก กลมยาว ปลายแหลม มีจะงอยที่ปลายผล ผิวหยาบ ผลสดมีสีเขียว ผลแก่ที่แห้งแล้วสีน้ำตาล มีขนสีขาวนวนลปกคลุมทั่วทั้งผล ยาวประมาณ 6 เซนติเมตร ความยาวเส้นรอบวงตรงกลางผลประมาณ 1 เซนติเมตร ก้านผลยาวประมาณ 1.4 เซนติเมตร มีกลิ่นเหม็น รสขม อายุของผลตั้งแต่เริ่มเกิดผลจนกระทั่งแก่และฝักแตก ใช้เวลาประมาณ 4 สัปดาห์

เมล็ดเป็นรูปทรงกลม แบน เมล็ดอ่อนมีสีเขียวอ่อน เมล็ดแก่มีสีน้ำตาลแดง ผิวหยาบ มีเส้นลายนูนต่ำแผ่ออกจากตรงกลางที่เป็นรอยบุ๋ม เส้นผ่านศูนย์กลางยาวประมาณ 1.2 มิลลิเมตร หนาประมาณ 0.6 มิลลิเมตร จำนวนเมล็ดต่อผลประมาณ 150 เมล็ด มีกลิ่นเหม็น รสขม

การกระจายพันธุ์

เดิมที่คาดว่าผักเสี้ยนฝักมีแหล่งกำเนิดจากทวีปเอเชีย แต่เนื่องจากสามารถกระจายพันธุ์ผ่านน้ำ ลม หรืออาศัยสัตว์เป็นตัวพา โดยกระบวนการกระจายพันธุ์เกิดจากฝักแก่จะแตกออกเป็น 2 ซีก ตรงแนวตะเข็บ เมล็ดจะตกกระจายลงในดิน ถ้าดินมีความชื้นเหมาะสมเมล็ดจะงอกเป็นต้นใหม่โดยไม่มีการพักตัวของเมล็ด โดยมีวงชีวิตประมาณ 3 เดือน จะเริ่มออกดอกเมื่อมีอายุตั้งแต่ 1 เดือนถึง 1 เดือนครึ่ง เมื่อเกิดการปฏิสนธิเกิดการติดฝักภายในฝักจะบรรจุเมล็ด โดยเมล็ดจะมีอายุประมาณ 4 สัปดาห์ (สุรชัย มัจฉาชีพ, 2538) ด้วยเหตุนี้ทำให้ผักเสี้ยนฝักจึงสามารถกระจายพันธุ์ไปยังบริเวณใหม่ได้ดี ส่งผลให้ปัจจุบันผักเสี้ยนฝักกระจายอยู่ทั่วไปบริเวณเขตร้อน และกึ่งเขตร้อนทั่วโลก (ภาพ 2) ในประเทศไทยพบได้ทั่วไปทุกภูมิภาค ตามบริเวณที่รกร้าง ป่าไม้ พุ่มหญ้า นาข้าว และไร่อ้อย



ภาพ 2 การกระจายพันธุ์ของผักเสี้ยนผี

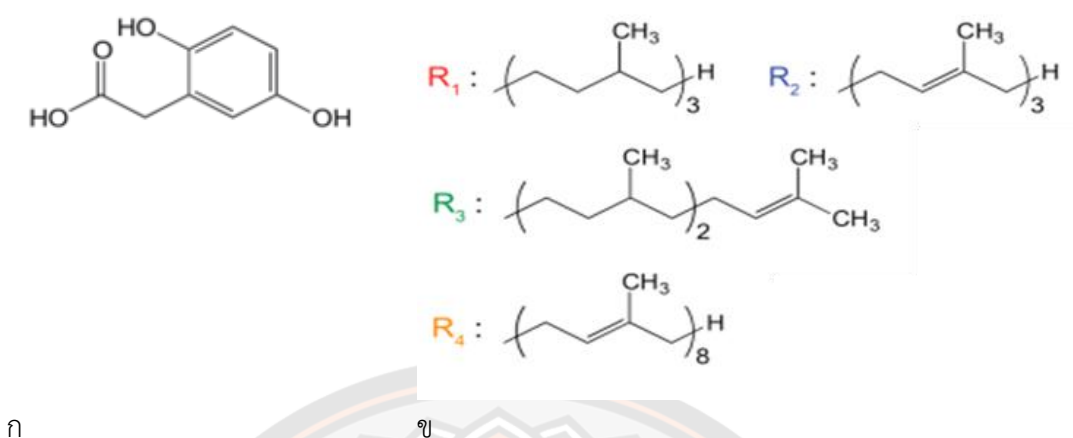
ที่มา: (CABI, 2019)

วิตามินอี

วิตามินอี (vitamin E) หรือชื่อทางเคมี โทโคโครมานอล (tocochromanols) เป็นกลุ่มสารต้านอนุมูลอิสระประเภทลิโปฟิลิก (lipophilic) ซึ่งถูกสังเคราะห์ขึ้นจากสิ่งมีชีวิตที่สังเคราะห์แสงได้ เช่น พืช สาหร่าย และไซยาโนแบคทีเรียบางประเภท (Falk และคณะ, 2010) โดยมีสรรพคุณหลายด้าน เช่น เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกันต้านทาน ป้องกันโรคต่าง ๆ เช่น โรคความดันเลือด โรคไต โรคมะเร็ง และโรคหลอดเลือดตีบ เป็นต้น

โครงสร้างและประเภทของวิตามินอี

วิตามินอีมีโครงสร้างประกอบไปด้วยส่วนหัวที่เป็นวงแหวนโครมานอลที่ชอบน้ำ (hydrophilic chromanol head group) และส่วนหางที่เป็นไฟติลไดฟอสเฟตที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic phytyl diphosphate tail) ซึ่งส่วนหาง (หมู่ R) ที่เป็นหมู่ฟังก์ชันต่างกัน ได้แก่ ไฟติลไดฟอสเฟต (phytyl diphosphate: PPP) เจอรานิลไดฟอสเฟต (geranylgeranyl diphosphate: GGPP) เตตระไฮโดรเจอรานิลเจอรานิลไดฟอสเฟต (tetrahydrogeranylgeranyl diphosphate: THGGPP) และโซลานิลไดฟอสเฟต (solaneyl diphosphate: SPP) จะกำหนดประเภทของโทโคโครมานอลเป็นโทโคโครมานอลประเภทโทโคฟีรอล (tocopherols) โทโคไตรอีนอล (tocotrienols) โทโคโมนอีนอล (tocomonoenols) และ พลาสโตโครมานอล-8 (plastochromanol-8 : PC-8) ตามลำดับ (ภาพ 3)



ก

ข

ภาพ 3 โครงสร้างของโทโคโครมานอล

โดยที่ ก : ส่วนหัวที่เป็นวงแหวนโครมานอลที่ขบบน้ำ ข : ส่วนหางที่เป็นไฟติลไดฟอสเฟตที่ไม่ขบบน้ำ (R1: PPP, R2 : GGPP, R3 : THGGPP, R4 : SPP)

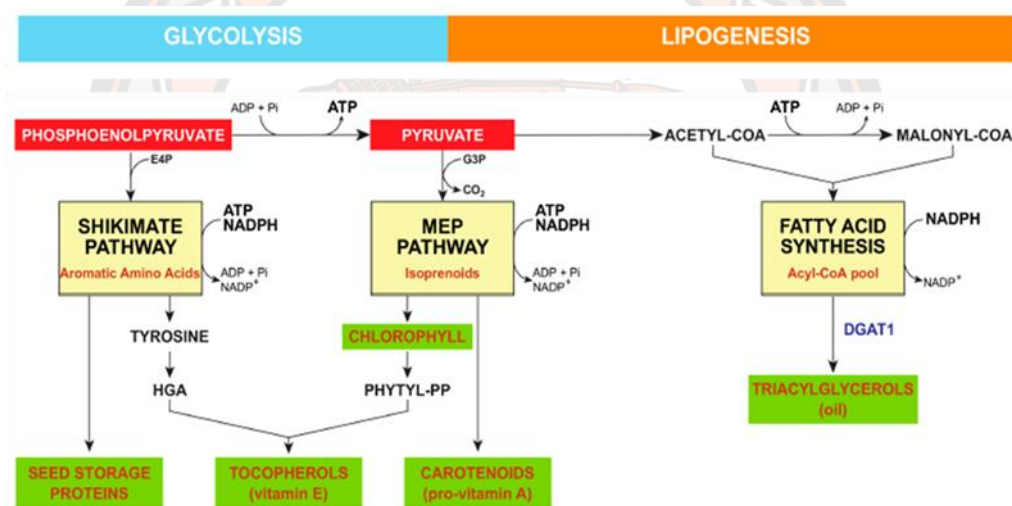
ที่มา: (Mène-Saffrané, 2017)

วิตามินอีประเภทโทโคฟีรอลมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยสามารถแบ่งได้เป็น 4 อนุพันธ์ ได้แก่ อนุพันธ์อัลฟา เป็นอนุพันธ์ที่มีหมู่เมทิล 3 กลุ่ม (α -tocopherol) อนุพันธ์เบต้า และอนุพันธ์แกมมา เป็นอนุพันธ์ที่มีหมู่เมทิล 2 กลุ่ม (β -tocopherol และ γ -tocopherol) และอนุพันธ์เดลต้า เป็นอนุพันธ์ที่มีหมู่เมทิล 1 กลุ่ม (δ -tocopherol) (Mène-Saffrané, 2017) ซึ่งอนุพันธ์ของโทโคฟีรอลแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพในการเกิดปฏิกิริยาการทำงานต่อร่างกายมนุษย์แตกต่างกัน โดยที่อนุพันธ์ α -tocopherol มีปฏิกิริยาการทำงานได้ 100 เปอร์เซ็นต์ อนุพันธ์ β -tocopherol ทำงานได้เพียง 50 เปอร์เซ็นต์ อนุพันธ์ γ -tocopherol ทำงานได้เพียง 10 เปอร์เซ็นต์ และอนุพันธ์ δ -tocopherol ทำงานได้เพียง 3 เปอร์เซ็นต์ (Kamal-Eldin และคณะ, 1996)

กระบวนการสังเคราะห์วิตามินอี

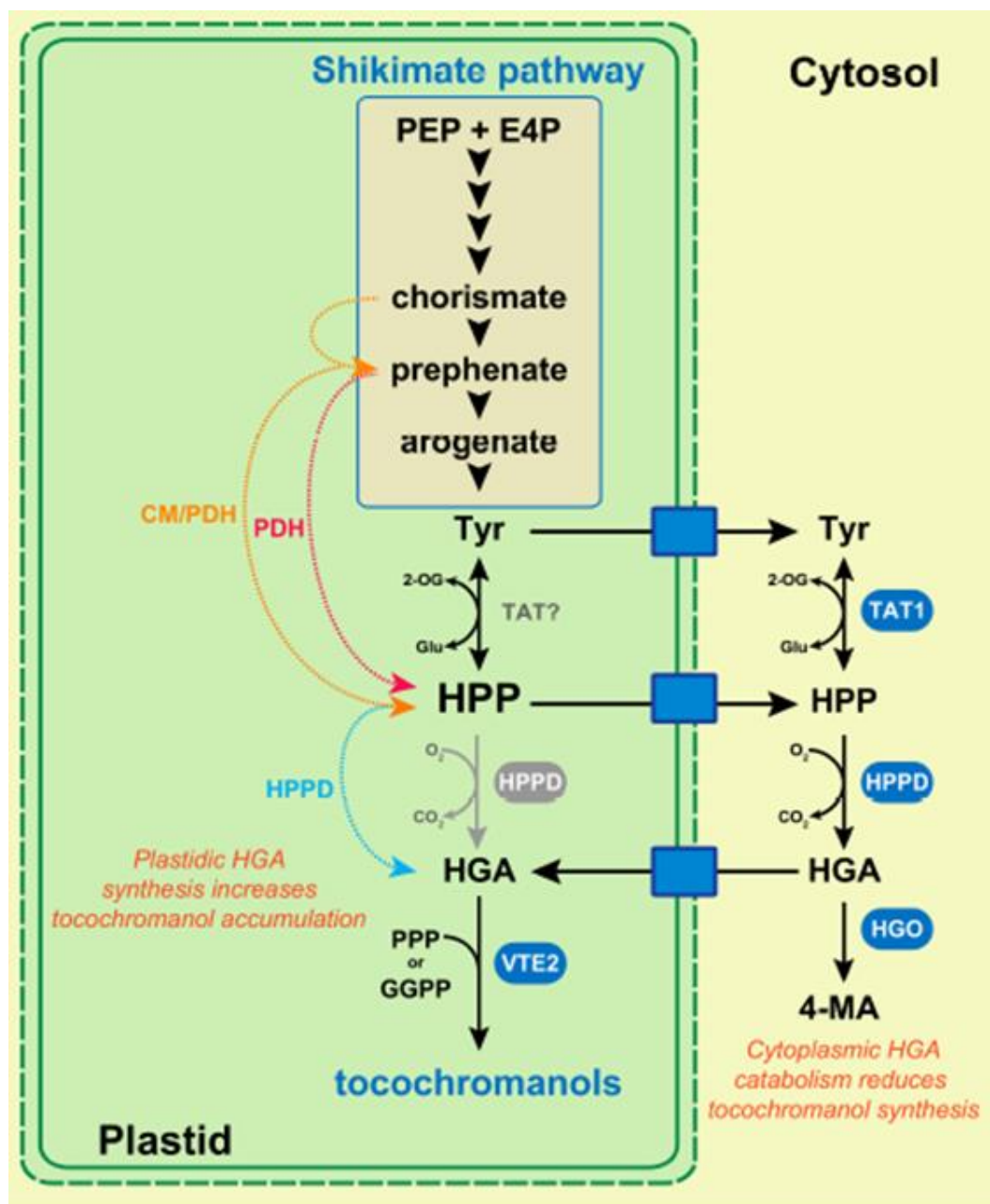
การสังเคราะห์วิตามินอีเกิดจากการรวมตัวของสารตั้งต้น กรดโฮโมเจนติซิก (Homogentisic acid : HGA) ซึ่งเป็นสารตัวกลางของวิถีชิคิเมต (Shikimate pathway) จากปฏิกิริยาย่อยสลายหมู่เอโรมาติกของกรดอะมิโนในไฮโดพลาสซึม และไฟติลไดฟอสเฟต (PPP) ที่เกิดจากการสลายตัวของคลอโรฟิลล์จากวิถีเมทิลเลรีไทรทอลฟอสเฟต (Methylerythritol phosphate (MEP))

ซึ่งเป็นวิธีที่เกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรดไขมันต่าง ๆ ขึ้นในพลาสมิด (Mène-Saffrané, 2017) (ภาพ 4) ปฏิกิริยาการรวมตัวระหว่างกรดโฮโมเจนติซิก และไฟติลโดฟอสเฟตเป็นสารตัวกลาง 2-methyl-6-phytylbenzoquinol (MPBQ) อาศัยเอนไซม์ homogentisate phytyl transferase (HPTase หรือ VTE2) โดยที่สารตั้งต้นกรดโฮโมเจนติซิกเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจาก 4-hydroxyphenylpyruvate (HPP) ผ่านการทำงานของเอนไซม์ 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPDase) (ภาพ 5) โดยที่สารตัวกลาง methyl-6-phytylbenzoquinol (MPBQ) สามารถเปลี่ยนรูปโดยตรง หรือผ่านการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยเอนไซม์ tocopherol cyclase (TCase หรือ VTE1) ไปเป็น δ -tocopherol และ γ -tocopherol ตามลำดับ ซึ่ง δ -tocopherol จะเปลี่ยนไปเป็น β -tocopherol และ γ -tocopherol จะเปลี่ยนไปเป็น α -tocopherol โดยการเติมเมทิลด้วย γ -tocopherol methyl transferase (γ -TMTase หรือ VTE4) (ภาพ 6)



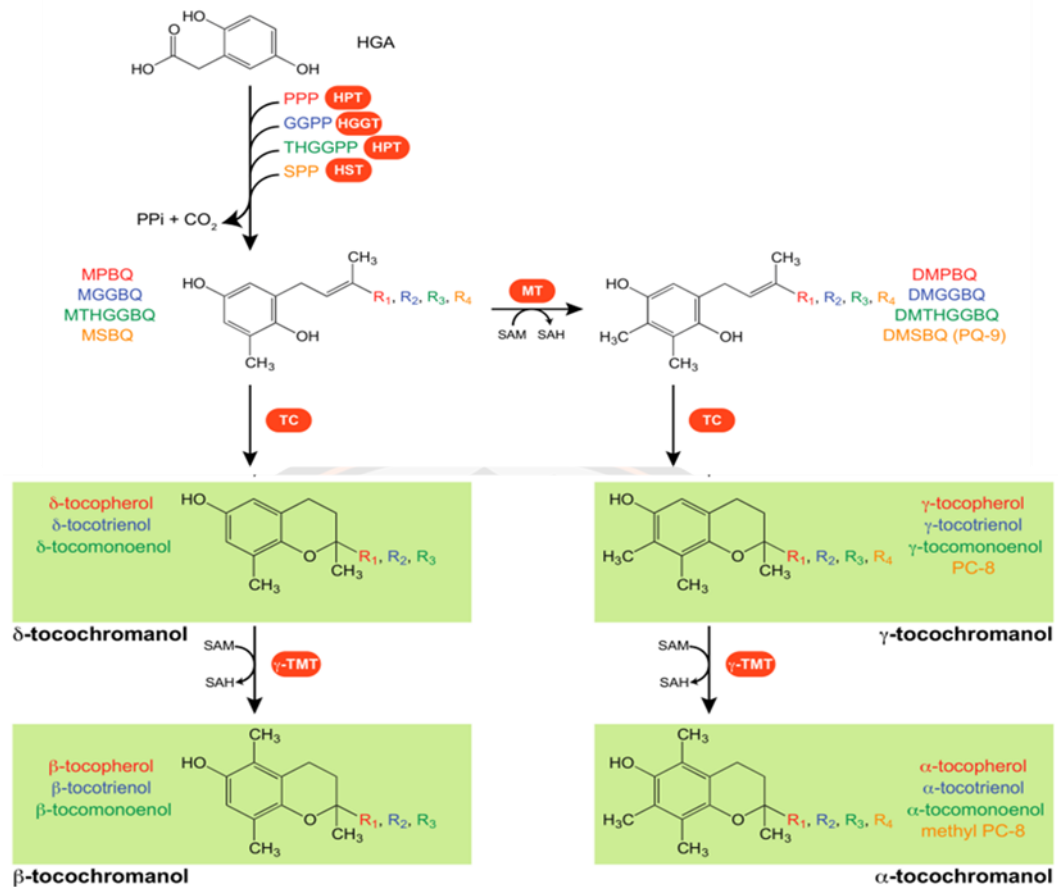
ภาพ 4 ปฏิกิริยาและสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้องกับวิถีการสังเคราะห์วิตามินอี

ที่มา: (Mène-Saffrané, 2017)



ภาพ 5 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารตั้งต้นกรดโฮโมเจนติซิก

ที่มา: (Mène-Saffrané, 2017)



ภาพ 6 วิธีการสังเคราะห์วิตามินอี

ที่มา: (Mène-Saffrané, 2017)

ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์วิตามินอี

ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์วิตามินอี (ตาราง 1) พบได้ในกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ ได้แก่พืช สาหร่าย และแบคทีเรีย ในกระบวนการสังเคราะห์วิตามินอีขึ้นกำหนดประเภทของวิตามินอีนั้น อาศัยเอนไซม์ที่แปลรหัสมาจากยีนต่างชนิดกัน ซึ่งจำเพาะต่อหมู่ฟังก์ชันที่ต่างกัน เช่น ยีน *slr1736* (*VTE2*- Ortholog) ในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (cyanobacteria) ยีน *VTE2* ใน *Arabidopsis* และยีน *HGGT* (*VTE2*-paralog) ในข้าว ข้าวบาร์เลย์ และข้าวสาลี นอกจากนี้การแสดงออกของยีนอื่นในวิถียังสนับสนุนการสังเคราะห์วิตามินอีโดยพบว่าระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของยีน *HPPD* ในผักกาดหอม (*Lactuca sativa*) (Ren และคณะ, 2011) มีบทบาทสำคัญต่อการสังเคราะห์โทโคฟีรอลชนิดอัลฟา (α -tocopherol) เป็นหลัก อีกทั้งยีน *HPPD* ซึ่งเป็นยีนในขั้นตอนแรก ในขณะที่ยีน *VTE4* เป็นยีนในขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการ

สังเคราะห์วิตามินอี เมื่อยืนดังกล่าวมีระดับการแสดงออกที่สูงส่งผลเกี่ยวข้องต่อการสะสมวิตามินอีในเมล็ดของข้าวโอ๊ต (*Avena sativa*) (Gutierrez-Gonzalez และคณะ, 2016) เช่นเดียวกันกับเรพซีด (*Brassica napus*) พบว่ายีน *VTE4* มีบทบาทสำคัญในการสะสมโทโคฟีรอลชนิดอัลฟา (α -tocopherol) (Hunter และคณะ, 2007)

การศึกษาการแสดงออกของยีน *HGGT* และ *HPT* (*VTE2*) จากเปลือกชั้นกาบและเนื้อใน (mesocarp kernel) ใบ และราก ที่ระยะหลังดอกบานเต็มที่ 7, 10, 12, 15, 17 และ 19 สัปดาห์ ในปาล์มน้ำมัน 2 ชนิด คือ *Elaeis guineensis* และ *E. oleifera* (Kong และคณะ, 2016) พบการแสดงออกของยีน *HGGT* ใน mesocarp ของ *E. guineensis* เพิ่มขึ้น 17 เท่า และ 54 เท่า ในระยะหลังดอกบานเต็มที่ 17 และ 19 สัปดาห์ตามลำดับ ในขณะที่ *E. oleifera* มีการแสดงออกของยีนนี้ค่อนข้างต่ำและไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละระยะ ในขณะที่การแสดงออกของยีน *VTE2* ใน mesocarp ของ *E. guineensis* มีระดับการแสดงออกที่ต่ำและไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละระยะ

หลังจากดอกบานเต็มที่ โดยยีน *VTE2* จาก *E. oleifera* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นตั้งแต่ระยะหลังดอกบานเต็มที่ 12 สัปดาห์ และสูงที่สุดในระยะหลังดอกบานเต็มที่ 17 สัปดาห์ อีกทั้งเมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *VTE2* ใน *E. guineensis* พบว่าบริเวณเนื้อเยื่อใบมีระดับการแสดงออกสูงที่สุด

ตาราง 1 ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์วิตามินอี

ยีน	เอนไซม์	สารตั้งต้น	ผลิตภัณฑ์
<i>HPPD</i>	HPPDase	4-Hydroxyphenylpyruvate (HPP)	Homogentisate (HGA)
<i>VTE2</i>	HPTase หรือ <i>VTE2</i>	HGA + PPP	2-Methyl-6-phytylbenzoquinol 2-Methyl-6-solanosylbenzoquinol
<i>HGGT</i>	HGGTase	HGA + GGPP	2-Methyl-6-geranylgeranylbenzoquinol

ยีน	เอนไซม์	สารตั้งต้น	ผลิตภัณฑ์
<i>HST</i>	HSTase	HGA + THGGPP	2-Methyl-6-tetrahydrogeranylgeranylbenzoquinol
<i>VTE1</i>	TCase หรือ <i>VTE1</i>	2-Methyl-6-phytylbenzoquinol	δ -Tocopherol
		2-Methyl-6-geranylgeranylbenzoquinol	δ -Tocotrienol
		2,3-Dimethyl-5-phytylbenzoquinol	γ -Tocopherol
		2,3-Dimethyl-5-geranylgeranylbenzoquinol	γ -Tocotrienol
<i>VTE3</i>	MPBQ MTase หรือ <i>VTE3</i>	2-Methyl-6-phytylbenzoquinol	2,3-Dimethyl-5-phytylbenzoquinol
		2-Methyl-6-geranylgeranylbenzoquinol	2,3-Dimethyl-5-geranylgeranylbenzoquinol
<i>VTE4</i>	γ -TMTase หรือ <i>VTE4</i>	δ -Tocopherol	β -Tocopherol
		δ -Tocotrienol	β -Tocotrienol
		γ -Tocopherol	α -Tocopherol
		γ -Tocotrienol	α -Tocotrienol

สารประกอบฟีนอลิก

สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds : PCs) เป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolites) หรือพฤกษเคมี (phytochemical) กลุ่มใหญ่ที่สุดพบได้ในพืช ซึ่งจะมีปริมาณแตกต่างกันออกไปตามชนิดของพืช และระดับความสุก โดยสารกลุ่มนี้มีโครงสร้างทางเคมีเป็นวงแหวนอะโรมาติก และมีหมู่ไฮดรอกซิลอย่างน้อย 1 หมู่ อีกทั้งพบว่ามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยจะแตกต่างกันไปในแต่ละชนิด สารประกอบฟีนอลิกหลัก (major) เป็นสารประกอบไฮโดรฟิสิกฟีนอลิก

(hydrophilic phenolic compound: Hydro-PCs) ในขณะที่สารประกอบลิโปฟิลิกฟีนอลิก (lipophilic phenolic compound: Lipo-PCs) เป็นส่วนรอง (minor) โดยกลุ่มนี้มีประสิทธิภาพสูงในการทำปฏิกิริยาต้านอนุมูลอิสระ (Liu และคณะ, 2014)

สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระหรือสารแอนติออกซิแดนท์ (antioxidant) เป็นสารที่ยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) โดยจะเข้าทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรง เพื่อกำจัดอนุมูลให้หมดไปหรือหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ออกซิเดชันของไขมันและโมเลกุลอื่น ๆ ไม่ให้ดำเนินต่อ (Veliloglu และคณะ, 1998) สารต้านอนุมูลอิสระแต่ละชนิดมีหน้าที่แตกต่างกัน เช่น กรดยูริก บิลิรูบิน จะทำหน้าที่กำจัดอนุมูล ในขณะที่วิตามินซี วิตามินอี กลูตาไทโอน เบตาแคโรทีน และยูบิควิโนน จะทำหน้าที่หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูล ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการทำให้ออกซิเดชันลดลง

วิตามินอีจัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์แรงสามารถหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ได้ เนื่องจากความสามารถในการละลายในไขมันได้ดีจึงสามารถทำปฏิกิริยาที่เยื่อหุ้มเซลล์ โดยวิตามินอี (T-OH) จะให้ไฮโดรเจนแกลลิทที่อยู่ในรูปอนุมูล (L•) เพื่อขจัดอนุมูลลิพิดเปอร์ออกไซด์ และเปลี่ยนไปเป็นอนุมูลวิตามินอี (T-O•) อนุมูลวิตามินอีนี้ป้อนอนุมูลที่มีความไวต่ำจึงไม่เกิดลิพิดออกซิเดชันต่อไปได้ อีกทั้งอนุมูลวิตามินอีสามารถถูกรีดิวซ์ด้วยวิตามินซีเพื่อกลับไปอยู่ในสภาพเดิม (T-OH) ที่มีความสามารถในการทำงานได้อีกครั้ง โดยวิตามินซีที่รับอิเล็กตรอนจากอนุมูลวิตามินอีจะถูกขับออกทางปัสสาวะ (โอภา วัชรคุปต์ และคณะ, 2550)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ตัวอย่างพืชที่นำมาใช้ในการศึกษา

รวบรวมตัวอย่างใบ 3 ระยะ และเมล็ด 4 ระยะ ได้แก่ L1 (ใบข้อที่ 1-5) L2 (ใบข้อที่ 10-15) L3 (ใบตั้งแต่ข้อที่ 20) S1 (เมล็ดหลังการติดผล 1 สัปดาห์) S2 (เมล็ดหลังการติดผล 2 สัปดาห์) S3 (เมล็ดหลังการติดผล 3 สัปดาห์) และ S4 (เมล็ดหลังการติดผล 4 สัปดาห์) โดยนำมาจุ่มไนโตรเจนเหลว และเก็บรักษาที่อุณหภูมิที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

1. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอ
 - 1) โกร่งบดตัวอย่าง
 - 2) ไมโครปิเปตชนิดปรับขนาดได้ (micropipette)
 - 3) Disposable tips ขนาดต่าง ๆ
 - 4) หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ (microcentrifuge) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
 - 5) เครื่องชั่งไฟฟ้า
 - 6) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water-bath)
 - 7) เครื่องหมุนเหวี่ยงแรงหนีศูนย์กลาง (centrifuge)
 - 8) เครื่องผสมสาร (vortex mixer)
2. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส
 - 1) เตอบไมโครเวฟ
 - 2) เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส
 - 3) เครื่องแปลงไฟ
 - 4) แผ่น parafilm
 - 5) UV transilluminator

3. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในกาวัดความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ
 - 1) เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมชนิดละเอียด (Nanodrop spectrophotometer)
4. อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction: PCR)
 - 1) เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ BIO RAD T100 Thermal Cycler
 - 2) เครื่องเพิ่มปริมาณแบบเรียลไทม์ FQD 96A Linegene 9600 Plus Real Time Pcr Machine Qpcr
 - 3) หลอดไมโครเซนตริฟิวส์ (microcentrifuge) ขนาด 0.2 มิลลิลิตร
5. อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการโคลน
 - 1) ตะเกียงแอลกอฮอล์
 - 2) หัวเข็มฉีดยา
 - 3) Spreader
 - 4) หลอดเซนตริฟิวส์ (centrifuge) ขนาด 50 มิลลิลิตร
 - 5) หลอดทดลอง
 - 6) ขวดรูปชมพู่
 - 7) จานเลี้ยงเชื้อ
 - 8) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water-bath)
 - 9) กล้องโพรบใส่น้ำแข็ง
 - 10) เครื่องหมุนเหวี่ยงแรงหนีศูนย์กลาง (centrifuge)
 - 11) ตู้ปลอดเชื้อ
 - 12) ตู้บ่มเชื้อ

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

1. สารเคมีสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ
 - 1) Extraction buffer (0.1M LiCl, 0.1M Tris HCl (pH 8), 10mM EDTA, 1% SDS (w/v))
 - 2) 800 mM β -mercaptoethanol
 - 3) Liquid nitrogen
 - 4) Phenol
 - 5) Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1)

- 6) 4 M LiCl
 - 7) 3 M NaOAc
 - 8) 100% Ethanol
 - 9) 70% Ethanol
 - 10) Deionized water
2. สารเคมีสำหรับกำจัดดีเอ็นเอ
- 1) 10X Reaction buffer with $MgCl_2$
 - 2) DNase I, RNase-free (#EN0521)
 - 3) Water, nuclease-free
 - 4) EDTA
3. สารเคมีสำหรับการทำ cDNA
- 1) 5X Reaction buffer
 - 2) RiboLock RNase Inhibitor (20U/ μ L)
 - 3) 10 mM dNTP Mix
 - 4) Oligo (dT)₁₈ primer
 - 5) Total RNA
 - 6) RevertAid M-MuL V RT (200U/ μ L)
 - 7) Water, nuclease-free
4. สารเคมีสำหรับเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction: PCR)
- 1) *i-Taq*TM DNA Polymerase (5U/ μ L)
 - 2) 10X Reaction buffer
 - 3) 25 mM $MgCl_2$
 - 4) 10 mM dNTP
 - 5) 10 μ M Forward primer
 - 6) 10 μ M Reverse primer
 - 7) First-strand cDNA
 - 8) Deionized water

5. สารเคมีสำหรับการทำวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส
 - 1) Agarose powder
 - 2) HyperLadder™ 1kb (bioline)
 - 3) Solis Biodyne 100 bp
 - 4) Ethidium bromide
 - 5) 6X DNA Loading Dye
 - 6) 1X TAE buffer

6. สารเคมีสำหรับการทำ PCR product ให้บริสุทธิ์ (ชุด Kit Nucleospin® Gel and PCR Clean up)
 - 1) NT1 buffer
 - 2) NT3 buffer
 - 3) Deionized water

7. สารเคมีสำหรับใช้ในการเชื่อมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเข้ากับพาหะ
 - 1) 2X Reaction buffer
 - 2) pJET1.2/blunt cloning vector
 - 3) T4 DNA ligase
 - 4) PCR product

8. สารเคมีสำหรับใช้ในการเตรียมคอมพลีเมนต์เซลล์ และการนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านโดยวิธี Heat shock
 - 1) *Esherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α
 - 2) LB agar
 - 3) SOB
 - 4) CaCl₂
 - 5) SOC
 - 6) 2X YT plate
 - 7) 10 mg/mL Ampicilin

9. สารเคมีที่ใช้การสกัดพลาสมิดจากแบคทีเรีย

- 1) 2X YT broth ที่มี ampicillin
- 2) Solution I
- 3) RNaseA
- 4) Solution II
- 5) Solution III
- 6) Deionized water

การสกัดอาร์เอ็นเอ

1. การสกัดอาร์เอ็นเอจากใบโดยวิธีดัดแปลงมาจาก (Verwoerd และคณะ, 1989)

- 1) เตรียม Extraction ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ที่เติม β -mercaptoethanol ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 ไมโครลิตร ที่ผ่านการล้างด้วย DEPC แล้วทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส
- 2) ชั่งตัวอย่าง 0.1 กรัม โดยนำมาบดในโกร่งที่แช่ ณ -20 องศาเซลเซียส จนเย็น โดยใช้ไนโตรเจนเหลวเพื่อให้เซลล์แตกละเอียดและย้ายลงในหลอดทดลองที่เตรียมไว้ในข้อ 1) จากนั้นเติม Phenol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
- 3) ทำการแยกชั้นโปรตีนออกจากอาร์เอ็นเอโดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ที่ผ่านการล้างด้วย DEPC
- 4) ตกตะกอนโปรตีนซ้ำอีกรอบด้วย Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1) โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ที่ผ่านการล้างด้วย DEPC
- 5) เติม 4 M LiCl ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายเพื่อตกตะกอนอาร์เอ็นเอ จากนั้นกลับหลอดเบา ๆ ให้สารละลายผสมกัน แล้วนำไปปั่น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ตามด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
- 6) ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน แล้วตกตะกอนอาร์เอ็นเอซ้ำอีกรอบ โดยเติม 3 M NaOAc ปริมาตร 0.1 เท่าของสารละลายอาร์เอ็นเอ และ 100% ethanol ปริมาตร 2 เท่า จากนั้นกลับหลอดเบา ๆ ให้สารละลายผสมกัน แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ

-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

- 7) ดูดส่วนใสทิ้ง จากนั้นล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 70% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำตะกอนที่ได้ไปตากตะกอนให้แห้ง
- 8) ละลายตะกอนโดยใช้น้ำกลั่นที่ปราศจาก RNase ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2. การสกัดอาร์เอ็นเอจากเมล็ดด้วยสกัดด้วยชุดรีจรูป NucleoSpin® RNA Plant and Fungi

- 1) บดตัวอย่าง 0.1 กรัม ลงใน PFL ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ที่เติม PFR 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
- 2) ย้ายตัวอย่างลงในคอลัมน์ที่ประกอบด้วยหลอดคอลเล็กชัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อกรองอาร์เอ็นเอออกจากเนื้อเยื่อขนาดใหญ่
- 3) นำส่วนใสที่ได้เติม PFB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที
- 4) ย้ายตัวอย่างลงในคอลัมน์ที่ประกอบด้วยหลอดคอลเล็กชันอันใหม่ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
- 5) ล้างคอลัมน์ด้วย PFW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร 2 รอบและ PFW ปริมาตร 500 ไมโครลิตร อีก 1 รอบ
- 6) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้คอลัมน์แห้ง
- 7) เติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนปริมาณ 50 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

การกำจัดดีเอ็นเอออกจากอาร์เอ็นเอตัวอย่าง

- 1) เตรียมส่วนผสมของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา ได้แก่
 - อาร์เอ็นเอความเข้มข้น 1 ไมโครกรัม
 - 10X Reaction Buffer with MgCl₂ ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
 - DNase I, RNase-free (#EN0521) ปริมาตร 1 หน่วยต่อไมโครลิตร
 - ปรับปริมาตรด้วยน้ำปราศจากนิวคลีโอไซด์เป็น 10 ไมโครลิตร
- 2) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

- 3) เติม 50mM EDTA เพื่อหยุดปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ DNase I ปริมาตร 1 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นต่อที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณอาร์เอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตโฟรีซิส

- 1) เตรียมถาดสำหรับเทเจลและหวี
- 2) เตรียมเจลที่มีความเข้มข้น 1% ของ agarose โดยใช้ TAE buffer ในการทำละลาย ใส่ในขวดรูปชมพู่แล้วนำไปละลายด้วยเครื่องไมโครเวฟ (microwave)
- 3) หลังจากนั้นวางทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 50-60 องศาเซลเซียสแล้วจึงเติม Ethidium Bromide ปริมาตร 0.1 เปอร์เซ็นต์ แก้วให้เข้ากัน และเทลงในถาดที่เตรียมไว้ในข้อที่ 1)
- 4) นำสารละลายอาร์เอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับสี 6x loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปหยอดใส่ในหลุมเจล โดยหยอดดีเอ็นเอมาตรฐานในหลุมแรก (1 Kb DNA ladder marker) เพื่อใช้เทียบขนาดดีเอ็นเอ
- 5) เปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที หรือสังเกตจากการเคลื่อนตัวของสีให้อยู่ประมาณ 3 ใน 4 ของขนาดเจล จากนั้นนำไปส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตโดยใช้เครื่อง UV transilluminator และทำการบันทึกภาพไว้

วัดค่าดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตโดยใช้ NanoDrop Spectrophotometer

- 1) ใช้น้ำกลั่นปราศจากไอออนเป็นสารละลายมาตรฐาน (Blank)
- 2) หยดสายละลายอาร์เอ็นเอปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อวัดค่าดูดกลืนแสงของสารละลายอาร์เอ็นเอที่ความยาวคลื่น 230 260 และ 280 นาโนเมตร

การแปลงอาร์เอ็นเอให้เป็นคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ (cDNA)

ทำการแปลงอาร์เอ็นเอให้เป็นคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ (cDNA) โดยปฏิกิริยา Reverse Transcription โดยใช้ RevertAid First Stand cDNA Synthesis Kit

- 1) เตรียมส่วนผสมของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา ได้แก่
 - อาร์เอ็นเอปริมาณ 2 ไมโครกรัม สำหรับตัวอย่างใบ และ 0.7 ไมโครกรัม สำหรับตัวอย่างเมล็ด
 - Oligo (dT) primer ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์
 - ปรับปริมาณด้วยน้ำปราศจากนิวคลีเอสเป็น 12 ไมโครลิตร
- 2) นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

- 3) เติมส่วนผสมที่เหลือดังนี้
 - 5X Reaction buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
 - RiboLock RNase Inhibitor (20 U/ μ L) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
 - dNTP Mix ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์
 - RevertAid M-MuLV RT (200 U/ μ L) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
- 4) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที
- 5) ทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

การออกแบบไพรเมอร์จำเพาะ

ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อบริเวณส่วนของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ในการสังเคราะห์วิตามินอีในผักเสี้ยนผี ได้แก่ CvVTE1 CvVTE2 CvVTE3 CvVTE4 CvHPPD CvHST และ CvHGGT

- 1) ไพรเมอร์จำเพาะสำหรับการเพิ่มปริมาณเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน (ไพรเมอร์ชุดที่ 1)

สืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าวจากฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาจัดเรียงและเปรียบเทียบเพื่อหาค่าตำแหน่งอนุรักษ์ (conserve) ด้วยโปรแกรม ClustaX แล้วเลือกบริเวณสำหรับ forward primer และ reverse primer และตรวจสอบความเหมาะสมของไพรเมอร์ที่ออกแบบด้วยโปรแกรม OligoCalc: oligonucleotide Properties Calculator

- 2) ไพรเมอร์จำเพาะสำหรับเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของยีน (ไพรเมอร์ชุดที่ 2)

เลือกบริเวณสำหรับ forward primer และ reverse primer จากลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนที่ได้จากการโคลนยีนที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ชุดที่ 1 โดยตรวจสอบความเหมาะสมของไพรเมอร์ที่ออกแบบด้วยโปรแกรม OligoCalc: oligonucleotide Properties Calculator

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

การเพิ่มปริมาณคอมพลีเมนต์ดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ชุดที่ 1 โดยมีความเข้มข้นและปริมาณของสารที่ใช้ในปฏิกิริยาดังตาราง 2 และอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ cDNA ดังตาราง 3

ตาราง 2 ความเข้มข้นและปริมาณของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

ความเข้มข้น	ปริมาตร (μL)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X Reaction buffer	2.5	1X
25 mM MgCl_2	2.5	2.5 mM
10 mM dNTP	1	0.4 mM
10 μM Forward primer	0.5	0.2 mM
10 μM Reverse primer	0.5	0.2 mM
<i>i-Taq</i> TM DNA Polymerase 5U/ μL	0.2	
First-strand cDNA	1	50 ng
Deionized water	16.8	
ปริมาตรรวม	25	

ตาราง 3 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยเทคนิค PCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94	5 (นาที)	1
Denaturation	94	30 (วินาที)	35
Annealing	52	30 (วินาที)	
Extension	72	30 (วินาที)	
Final extension	72	10 (นาที)	1

การทำ PCR product ให้บริสุทธิ์โดยใช้ E.Z.N.A.® Cycle-Pure Kit

- นำ PCR Product ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 ml
- เติม CP buffer 5 เท่าของปริมาตร PCR Product ผสมให้เข้ากัน
- ดูดสารละลายในข้อ 2) ลงในคอลัมน์ที่ประกอบด้วยหลอดคอลเล็กชัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทส่วนใสในหลอดคอลเล็กชันทิ้ง
- เติม 700 μl ของ Wash buffer ลงในคอลัมน์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสในหลอดคอลเล็กชันทิ้ง
- เติม 500 μl ของ Wash buffer ลงในคอลัมน์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทส่วนใสในหลอดคอลเล็กชันทิ้ง

- 6) นำหลอดเปล่าไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที ของคอลัมน์เปล่า เพื่อให้เยื่อกรองแห้ง
- 7) ย้ายคอลัมน์ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ ขนาด 1.5 ml แล้วเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปริมาตร 20 μ l แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที
- 8) ตรวจสอบด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

การเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้ากับพาหะโดยใช้ Clone JET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific)

- 1) เตรียมส่วนผสมของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา ดังนี้
 - 2X Reaction Buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร
 - Purified PCR product ปริมาตร 7 ไมโครลิตร
 - DNA Blunting Enzyme ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
- 2) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
- 3) เตรียมส่วนผสมของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา ดังนี้
 - pJET 1.2 /blunt Cloning Vector ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
 - T4 DNA Ligase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
- 4) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียม competent cell

- 1) ทำการ streak เชื้อแบคทีเรีย *Escherichai coli* สายพันธุ์ DH5 α บนอาหารแข็ง LB แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง
- 2) แบ่งอาหารเหลว SOB 50 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง 2 มิลลิลิตร แล้วย้ายโคโลนีเดี่ยวลงในอาหาร SOB แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง
- 3) ดูดเชื้อจากอาหารเหลวในข้อ 2) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ที่มีอาหารเหลว SOB เหลืออยู่ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง
- 4) แบ่งเชื้อในข้อ 3) ลงในหลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

- 5) เติสสารละลายด้านบนทิ้ง เติมสารละลาย 100 mM CaCl_2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อละลายเชื้อ แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (ทำซ้ำอีก 1 รอบ)
- 6) เติมสารละลาย 100 mM CaCl_2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อละลายเชื้อแล้วแบ่งเชื้อลงในหลอดเซนตริฟิวส์หลอดละ 200 μl แช่ในถังน้ำแข็งจนกว่าจะนำมาใช้

การนำพลาสมิดเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน

- 1) เติมพลาสมิดที่เชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอแล้วลงในหลอดคอมพลีเทนต์เซลล์ 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการปิเปตขึ้นลงเบา ๆ ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 30 นาที
- 2) นำหลอดข้อที่ 1) ย้ายลงใน water bath เป็นเวลา 60 วินาที จากนั้นย้ายลงในถังน้ำแข็งทันที ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที
- 3) เติมหาอาหารเหลว SOC ลงในหลอดปริมาตร 800 ไมโครลิตรจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที 1 ชั่วโมง
- 4) นำหลอดดังกล่าวไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
- 5) ดูดสารละลายด้านบนทิ้งปริมาตร 700 ไมโครลิตร จากนั้นละลายเชื้อที่เหลือโดยการดูดขึ้นลงแล้วแบ่ง spread เป็น 50 ไมโครลิตร และ 100 ไมโครลิตร บนอาหารแข็ง 2X YT ที่มี Ampicillin ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (25 ไมโครลิตร)
- 6) นำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน แล้วคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับ พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการ

การสกัดพลาสมิดจากเซลล์แบคทีเรียโดยใช้ชุด Plasmid miniPREP Kit (PureDireX)

- 1) เชื้อเชื้อแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดและมีชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการจากงานเลี้ยงเชื้อไปเลี้ยงในอาหารเหลว 2X YT broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มี ampicillin ผสมอยู่ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง
- 2) เทเชื้อแบคทีเรียลงในหลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วเทอาหารด้านบนทิ้ง จากนั้นละลายตะกอนเชื้อด้วย Buffer S1 ที่เติม RNaseA แล้ว 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยนำไป vortex ให้ตะกอนละลาย
- 3) เติม Buffer S2 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกหลอดคว่ำหงาย 10 ครั้งเบา ๆ จนได้สารละลายใส โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที

- 4) เติม Buffer S3 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกหลอดคว่ำหงาย 10 ครั้งเบา ๆ จนเห็นตะกอนสีขาวขุ่น
- 5) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- 6) ประกอบคอลัมน์กับหลอดคอลเล็กชันจากนั้นดูดส่วนใสในข้อ 5) ใส่ลงไปในคอลัมน์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- 7) ล้างเยื่อกรองด้วย Buffer W1 ปริมาตร 400 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และเทสารละลายทิ้ง
- 8) ล้างตะกอนด้วย Buffer W2 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร และเทสารละลายทิ้ง
- 9) จากนั้นนำคอลัมน์เปล่าไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เยื่อกรองแห้ง
- 10) ย้ายคอลัมน์ลงในหลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 1.5 ไมโครลิตร จากนั้นละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนปริมาตร 50 ไมโครลิตร โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

การหาลำดับดีเอ็นเอของยีน และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์

- 1) นำพลาสมิดที่สกัดได้หาลำดับดีเอ็นเอ (DNA sequencing) โดยใช้เครื่องอัตโนมัติของบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี
- 2) นำข้อมูลที่ได้มารวมกัน (sequence assembly) โดยใช้โปรแกรม GeneStudio™ Pro (GeneStudio, Inc.)
- 3) นำลำดับดีเอ็นเอที่ได้แต่ละยีนเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI database โดยเลือกใช้ nucleotide-nucleotide basic local alignment search tool (BLASTn) แบบ somewhat similar sequences (Blastn) (Altschul และคณะ, 1990)
- 4) เลือกลำดับ coding sequences ของพืชที่ได้จากข้อที่ 3) เปรียบเทียบกัน (multiple sequence alignment) โดยใช้โปรแกรม clustalX (Larkin และคณะ, 2007)
- 5) นำข้อมูลที่ได้สร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ด้วยวิธี maximum-likelihood method โดยทำ 1,000 ซ้ำ (Bootstap =1000) ด้วยโปรแกรม Mega X (S. Kumar และคณะ, 2018)

วิเคราะห์การแสดงผลของยีนด้วยเทคนิค Quantitative PCR (qPCR)

การเพิ่มปริมาณคอมพลีเมนต์อาร์เอ็นเอด้วยไพรเมอร์ชุดที่ 2 โดยมีความเข้มข้นและปริมาณของสารที่ใช้ในปฏิกิริยาดังตาราง 4 และอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ cDNA ดังตาราง 5

ตาราง 4 ความเข้มข้นและปริมาณของสารที่ใช้ในปฏิกิริยา qPCR

ความเข้มข้น	ปริมาตร (μL)	ความเข้มข้นสุดท้าย
SensiFAST SYBR® No-ROX mix (2x)	5	1X
10 μM Forward primer	0.2	0.2 mM
10 μM Reverse primer	0.2	0.2 mM
First-strand cDNA	1	50 ng
Deionized water	3.6	
ปริมาตรรวม	10	

ตาราง 5 อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยเทคนิค qPCR

ขั้นตอน	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	เวลา	จำนวนรอบ
Initial denaturation	95	5 (นาที)	1
Denaturation	95	30 (วินาที)	35
Annealing	56	30 (วินาที)	
Extension	72	30 (วินาที)	

การสกัดสารสกัดหยาบ

ทำการสกัดตัวอย่างใบ 3 ระยะ และเมล็ด 4 ระยะ ได้แก่ L1 (ใบข้อที่ 1-5) L2 (ใบข้อที่ 10-15) L3 (ใบตั้งแต่ข้อที่ 20) S1 (เมล็ดหลังการติดผล 1 สัปดาห์) S2 (เมล็ดหลังการติดผล 2 สัปดาห์) S3 (เมล็ดหลังการติดผล 3 สัปดาห์) และ S4 (เมล็ดหลังการติดผล 4 สัปดาห์) โดยวิธีดัดแปลงจาก (Liu และคณะ, 2014)

- 1) บดตัวอย่างใบ และเมล็ด ประมาณ 5-15 กรัม แล้วแช่ในสารละลาย hexane/dichloromethane (1:1, v/v) เป็นเวลา 1 คืน ที่อุณหภูมิห้อง
- 2) กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

- 3) เขย่าบนเครื่องเขย่าสารแนวราบที่ความเร็ว 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศา
- 4) ละลายด้วยอะซิโตนปริมาตร 500 ไมโครลิตร

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content) จากสารสกัดหยาบของตัวอย่างใบ 3 ระยะ และเมล็ด 4 ระยะ ได้แก่ L1 (ใบข้อที่ 1-5) L2 (ใบข้อที่ 10-15) L3 (ใบตั้งแต่ข้อที่ 20) S1 (เมล็ดหลังการติดผล 1 สัปดาห์) S2 (เมล็ดหลังการติดผล 2 สัปดาห์) S3 (เมล็ดหลังการติดผล 3 สัปดาห์) และ S4 (เมล็ดหลังการติดผล 4 สัปดาห์) โดยวิธีดัดแปลงจาก (Singleton และคณะ, 1999)

- 1) สารสกัดหยาบปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติม 10% Folin-Ciocalteu phenol reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที
- 2) ทำการเติม 7.5 % Sodium carbonate (Na_2CO_3) ปริมาตร 80 มิลลิตรผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในที่มืด 45 นาที
- 3) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร ของสารละลาย และใช้ Gallic acid ความเข้มข้น 0, 5, 10, 20, 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรเป็นสารมาตรฐาน จากนั้นนำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน
- 4) นำผลที่ได้จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน และคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลกรดแกลลิกต่อพืชแห้ง 1 กรัม (mgGAE/gDW) จากสมการที่ (1)

$$T = \frac{CV}{M} \quad (1)$$

- เมื่อ T หมายถึง ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (mgGAE/gDW)
 C หมายถึง ความเข้มข้นที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน (mg/mL)
 V หมายถึง ปริมาตรสารละลาย (mL) (ปริมาตรที่ใช้ทำปฏิกิริยา* dilution factor*ปริมาตรทำละลาย)
 M หมายถึง น้ำหนักของพืชแห้ง (g) ที่ใช้ทำสารสกัดหยาบ

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการแสดงออกของยีนแต่ละยีน และ ปริมาณพินอลิกทั้งหมด

- 1) ทำการจัดเรียงรูปแบบการการแสดงออกของยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์วิตามินอีโดยใช้ *Actin* เป็นยีนอ้างอิง ($2^{-\Delta Ct}$) ได้แก่ยีน *CvVTE1* *CvVTE2* *CvVTE3* *CvVTE4* *CvHPPD* *CvHST* และข้อมูลปริมาณพินอลิกทั้งหมด (TPC)
- 2) วิเคราะห์ข้อมูลข้อ 1) ด้วยการหาความสัมพันธ์ด้วย Pearson's chi-squared ที่ค่านัยสำคัญทางสถิติ 0.05

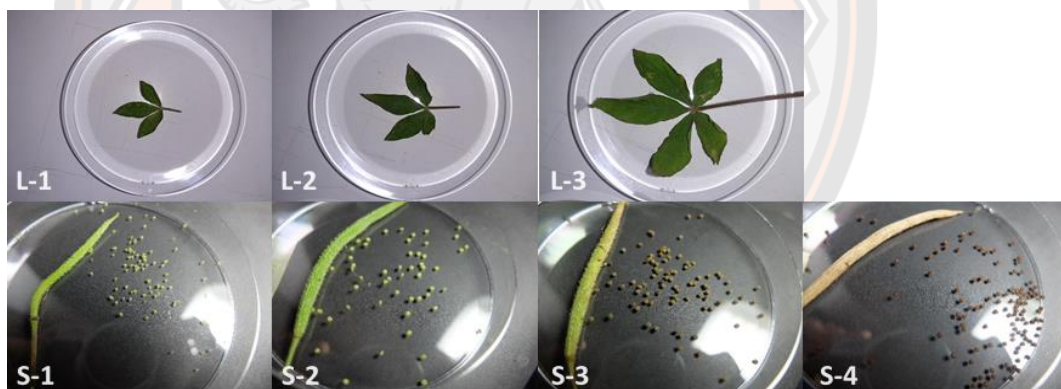


บทที่ 4

ผลการวิจัย

ตัวอย่างพืชที่นำมาใช้ในการศึกษา

จากการรวบรวมตัวอย่างใบและเมล็ดของผักเสี้ยนผีที่มีอายุประมาณ 1 เดือนครึ่ง (ภาพ 7) พบว่าใบเป็นแบบประกอบแบบขนนก เรียงสลับ โดยที่ L-1 คือใบข้อที่ 1-5 มีจำนวน 3 ใบย่อย L-2 คือใบข้อที่ 10-15 มีจำนวน 4 ใบย่อย และ L-3 คือใบตั้งแต่ข้อที่ 20 มีจำนวน 5 ใบย่อย เมล็ดเป็นรูปทรงกลม มีรอยบุ๋มตรงกลาง บรรจุอยู่ในฝักโดยที่ S-1 คือเมล็ดหลังการติดผล 1 สัปดาห์ เมล็ดขนาดเล็กสีเขียวอ่อน มีความอ่อนนุ่ม S-2 คือเมล็ดหลังการติดผล 2 สัปดาห์ เมล็ดสีเขียวเข้มกว่า และมีความแข็งกว่าในระยะแรก S-3 คือเมล็ดหลังการติดผล 3 สัปดาห์ เมล็ดสีเขียวเข้มอมน้ำตาล เมล็ดมีความแข็งกระด้าง และ S-4 คือเมล็ดหลังการติดผล 4 สัปดาห์ เมล็ดสีน้ำตาล มีความแข็งกระด้างและแห้ง



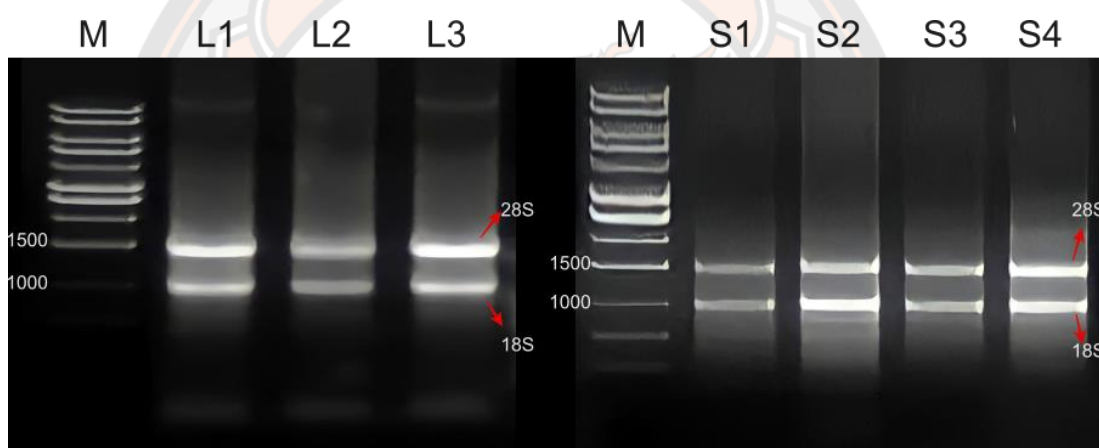
ภาพ 7 ตัวอย่างใบและเมล็ดของผักเสี้ยนผี

โดยที่ L-1 (ใบข้อที่ 1-5) L-2 (ใบข้อที่ 10-15) L-3 (ใบตั้งแต่ข้อที่ 20) S-1 (เมล็ดหลังการติดผล 1 สัปดาห์) S-2 (เมล็ดหลังการติดผล 2 สัปดาห์) S-3 (เมล็ดหลังการติดผล 3 สัปดาห์) และ S-4 (เมล็ดหลังการติดผล 4 สัปดาห์)

การสกัดอาร์เอ็นเอ และการตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอ

ผลการสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างใบ 3 ระยะ (L-1, L-2 และ L-3) สกัดด้วยวิธีดัดแปลงจาก (Verwoerd และคณะ, 1989) อาร์เอ็นเอจากตัวอย่างเมล็ด 4 ระยะ (S-1, S-2, S-3 และ S-4) สกัดด้วยชุดรีจูรูป NucleoSpin® RNA Plant and Fungi (ภาพ 8) เมื่อตรวจสอบด้วยการแยกด้วย

กระแสไฟฟ้าโดยใช้ 1% agarose gel ใน 1X TAE buffer พบว่าวิธีการสกัดดังกล่าวสามารถสกัดอาร์เอ็นเอได้ในทุกตัวอย่าง ปรากฏแถบอาร์เอ็นเอ 2 แถบ คือ ขนาด 28S และ 18S อย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณอาร์เอ็นเอด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตโดยใช้ NanoDrop Spectrophotometer (ตาราง 6-7) คือผลผลิตอาร์เอ็นเอที่ได้อยู่ในช่วง 22.43-241.29 ไมโครกรัม โดยค่าอัตราส่วนการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260/280 มีค่าใกล้เคียงอาร์เอ็นเอในอุดมคติคือประมาณ 2.0 ยกเว้นในตัวอย่างเมล็ด S-4 (เมล็ดหลังการติดผล 4 สัปดาห์) พบว่ามีค่าอัตราส่วนค่อนข้างต่ำคือ 1.25 อีกทั้งค่าอัตราส่วนการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260/230 มีค่าใกล้เคียงอาร์เอ็นเอในอุดมคติคือประมาณ 2.0-2.2 ในตัวอย่าง ใบและเมล็ด S-1 (เมล็ดหลังการติดผล 1 สัปดาห์) ส่วนใน S-2 S-3 และ S-4 มีค่าค่อนข้างต่ำคือ 1.03 1.56 และ 0.35 ตามลำดับ



ภาพ 8 ผลการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณอาร์เอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตโฟรีซิส

ตาราง 6 ผลการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณอาร์เอ็นเอจากใบด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ตโดยใช้ NanoDrop Spectrophotometer

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา	ปริมาณ (RNA) ng/ μ L	คุณภาพ		Yield μ g
		OD260/28	OD260/23	
		0	0	
L-1 (ใบข้อที่ 1-5)	3,237.1	2.20	2.38	161.86
L-2 (ใบข้อที่ 10-15)	1,509.6	2.13	2.38	75.48
L-3 (ใบตั้งแต่ข้อที่ 20)	4,825.8	1.97	2.22	241.29

ตาราง 7 ผลการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณอาร์เอ็นเอจากเมล็ดด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสง อัลตราไวโอเล็ตโดยใช้ NanoDrop Spectrophotometer

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา	ปริมาณ (RNA) ng/ μ L	คุณภาพ		Yield μ g
		OD260/28	OD260/23	
		0	0	
S-1 (เมล็ดหลังการติดผล 2 สัปดาห์)	747.5	2.13	2.05	22.43
S-2 (เมล็ดหลังการติดผล 2 สัปดาห์)	2,129.8	1.86	1.03	63.89
S-3 (เมล็ดหลังการติดผล 3 สัปดาห์)	1,420.2	2.02	1.56	42.61
S-4 (เมล็ดหลังการติดผล 4 สัปดาห์)	2,129.8	1.25	0.35	63.89

การออกแบบไพรเมอร์เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบจากการสืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนจากฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยมีทั้งหมด 6 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ VTE1_F คู่กับ VTE1_R VTE2_F คู่กับ VTE2_R VTE3_F คู่กับ VTE3_R VTE4_F คู่กับ VTE4_R VTE1_F คู่กับ VTE1_R HPPD_F คู่กับ HPPD_R HST_F คู่กับ HST_R และ HGGT_F คู่กับ HGGT_R (ไพรเมอร์ชุดที่ 1) เพื่อใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CvVTE1* *CvVTE2* *CvVTE3* *CvVTE4* *CvHPPD* *CvHST* และ *CvHGGT* ตามลำดับ ดังตาราง 8

ตาราง 8 ไพรเมอร์จำเพาะสำหรับการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (ไพรเมอร์ชุดที่ 1)

Gene	Primer	5'Nucleotide sequence 3'	Tm ($^{\circ}$ C)
<i>CvVTE1</i>	VTE1_F	AGTTCCTTCGAGGGATGGTAT	56.4
	VTE1_R	TGCAGTNARAGCAACTTCTCC	57.4
<i>CvVTE2</i>	VTE2_F	CAATCAGTTGTCTGATGTTGAAAT	58.4
	VTE2_R	GAAGCTCATAAACGCAGTGG	58.4
<i>CvVTE3</i>	VTE3_F	TGCNGAGGATCTYCCTTTTC	56.4

Gene	Primer	5'Nucleotide sequence 3'	Tm (°C)
	VTE3_R	ACRTCCTCTTCCTTBGGACC	58.4
CvVTE4	VTE4_F	GGGGAGATCATATGCATCA	55.2
	VTE4_R	CATTGACCAAACAAGATCGAA	55.5
CvHPPD	HPPD_F	GGCGATGTTGTTCTCCGAT	57.3
	HPPD_R	TCTGAATCTGACTCTTCCTCT	57.4
CvHST	HST_F	TTGCTCTTATATGTGGGAATGG	58.4
	HST_R	GCAACTGGAAATCTCTTCATTC	58.4
CvHGGT	HGGT_F	CTT GGA ACT GCA TAT TCC ATT G	58.4
	HGGT_R	TTA ATG CAA AGC CAA AAC ACT CTT	58.4

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

การเพิ่มปริมาณคอมพลีเมนทาลิตีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ชุดที่ 1 พบว่ามีไพรเมอร์ 6 คู่ที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้คือ VTE1_FR VTE2_FR VTE3_FR VTE4_FR HPPD_FR และ HST_FR (ภาพ 9) โดยยีน *VTE1* มีขนาดประมาณ 600-700 คู่เบส ยีน *VTE2* *VTE3* *VTE4* และ *HPPD* มีขนาดประมาณ 200-300 คู่เบส และยีน *HST* มีขนาดประมาณ 400-500 คู่เบส



ภาพ 9 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ด้วยไพรเมอร์ชุดที่ 1

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ในการสังเคราะห์หัวตามินอีจาก ผักเสี้ยนผี (*Cleome viscosa*: Cv) ได้แก่ CvVTE1 CvVTE2 CvVTE3 CvVTE4 CvHPPD และ CvHST (ตาราง 9) พบว่า ยีน VTE1 ซึ่งมีขนาด 3,301 คู่เบส 10 เอกซอน 9 อินตรอน โดยที่ CvVTE1 (MW193603) มีความยาว 695 คู่เบส (231 กรดอะมิโน) อยู่บริเวณแอกซอนที่ 2-6 คิดเป็นร้อยละ 52.53 (ภาพ10) ยีน VTE2 ซึ่งมีขนาด 3,315 คู่เบส 12 เอกซอน 11 อินตรอน โดยที่ CvVTE2 (MW193601) มีความยาว 376 คู่เบส (125 กรดอะมิโน) อยู่บริเวณแอกซอนที่ 5-8 คิดเป็นร้อยละ 31.89 (ภาพ11) ยีน VTE3 ซึ่งมีขนาด 1,531 คู่เบส 3 เอกซอน 2 อินตรอน โดยที่ CvVTE3 (MW193602) มีความยาว 387 คู่เบส (128 กรดอะมิโน) อยู่บริเวณแอกซอนที่ 1-3 คิดเป็นร้อยละ 36.26 (ภาพ12) ยีน VTE4 ซึ่งมีขนาด 1,531 คู่เบส 4 เอกซอน 3 อินตรอน โดยที่ CvVTE4 (MW193604) มีความยาว 366 คู่เบส (121 กรดอะมิโน) อยู่บริเวณแอกซอนที่ 2-4 คิดเป็นร้อยละ 36.55 (ภาพ13) ยีน HPPD ซึ่งมีขนาด 3,315 คู่เบส 2 เอกซอน 1 อินตรอน โดยที่ CvHPPD (MW193600) มีความยาว 334 คู่เบส (111 กรดอะมิโน) อยู่บริเวณแอกซอนที่ 1 คิดเป็นร้อยละ 24.47 (ภาพ14) และยีน HST ซึ่งมีขนาด 3,315 คู่เบส 11 เอกซอน 10 อินตรอน โดยที่ CvHST (MW193605) มีความยาว 461 คู่เบส (153 กรดอะมิโน) อยู่บริเวณแอกซอนที่ 5-7 คิดเป็นร้อยละ 40.02 (ภาพ15) เมื่อดำเนินการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวทำการเปรียบเทียบฐานข้อมูลเอ็นซีบีไอ (NCBI databases) พบว่ายีน CvVTE1 มีความคล้ายยีน VTE1 จาก *T. hassleriana* (92.21%), *Eutrema salsugineum* (86.77%) และ *Thellungiella halophila* (86.77%) (ตาราง 10) ยีน CvVTE2 มีความคล้ายยีน VTE2 จาก *T. hassleriana* (90.13%), *Arabidopsis lyrata* subsp. *lyrata* (88.24%) และ *Camelina sativa* (88.24%) (ตาราง 11) ยีน CvVTE3 มีความคล้ายยีน VTE3 จาก *T. hassleriana* (90.13%), *Raphanus sativus* และ *Brassica rapa* (85.79%) (ตาราง 12) ยีน CvVTE4 มีความคล้ายยีนมากกว่าร้อยละ 75 ของยีน VTE4 จาก *T. hassleriana* (82.61%), *E. salsugineum* (79.57%) และ *B. napus* (76.50%) (ตาราง 13) ยีน CvHPPD มีความคล้ายยีน HPPD จาก *T. hassleriana* (88.82%), *E. salsugineum* (84.32%) และ *Raphanus raphanistrum* (81.98%) (ตาราง 14) และยีน CvHST มีความคล้ายยีน HST จาก *B. rapa* (91.76%), *B. napus* (91.76%) และ *T. hassleriana* (91.58%) (ตาราง 15)



ภาพ 10 ไดอะแกรมเทียบเคียงโครงสร้างบางส่วนของยีน CvVTE1 ของผักเสี้ยนผีกับโครงสร้างที่สมบูรณ์ของยีน VTE1 ของ *A. thaliana* (GeneBank accession no. NC_003075.7 (15804784..15808084))



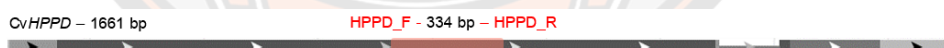
ภาพ 11 ไดอะแกรมเทียบเคียงโครงสร้างบางส่วนของยีน CvVTE2 ของผักเสี้ยนผีกับโครงสร้างที่สมบูรณ์ของยีน VTE2 ของ *A. thaliana* (GeneBank accession no. NC_003071.7 (8207199..8210513))



ภาพ 12 ไดอะแกรมเทียบเคียงโครงสร้างบางส่วนของยีน CvVTE3 ของผักเสี้ยนผีกับโครงสร้างที่สมบูรณ์ของยีน VTE3 ของ *A. thaliana* (GeneBank accession no. NC_003074.8 (23415589..23417119))



ภาพ 13 ไดอะแกรมเทียบเคียงโครงสร้างบางส่วนของยีน CvVTE4 ของผักเสี้ยนผีกับโครงสร้างที่สมบูรณ์ของยีน VTE4 ของ *A. thaliana* (GeneBank accession no. NC_003070.9 (24134085..24136109))



ภาพ 14 ไดอะแกรมเทียบเคียงโครงสร้างบางส่วนของยีน CvHPPD ของผักเสี้ยนผีกับโครงสร้างที่สมบูรณ์ของยีน HPPD ของ *A. thaliana* (GeneBank accession no. NC_003070.9 (2011885..2013545))



ภาพ 15 ไดอะแกรมเทียบเคียงโครงสร้างบางส่วนของยีน CvHST ของผักเสี้ยนผีกับโครงสร้างที่สมบูรณ์ของยีน HST ของ *A. thaliana* (GeneBank accession no. NC_003074.8 (3779839..3782981))

ตาราง 9 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ในการสังเคราะห์วิตามินอี
ในผักเสี้ยนผี

ยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')
CvVTE1	<p>>MW193603 <i>Cleome viscosa</i> tocopherol cyclase, mRNA, partial cds</p> <p><u>AGTTCTTCGAGGGATGGTATTT</u>CAAGGTCTCAATACCAGAGAGGA AGCAGAGCTTTTGCTTTATGTATTCTGTGGAGAACCCCGCATTTCAG AAGAAATTGTCAACTTTGGATGTGGCACTATATGGACCAAGATTAC CGGAGTCGGGGCTCAAATTCTTGGTGCTTATGATAAATATATATGCC AATTCACGCAAGAGTCTCAGAACTTCTGGGGAGATAGGCATGAGCTA GTTTTGGGAAATACGTTTGCAGCTGTGGAAGGTGCAAGGCCTCCAAG TAAGGAGGTTCTCCAGAGGAATTTAACAAAAGAGTGTTGGAAGGGT TTCAAGTTACTCCGCTCTGGCATCAAGGTTATATTTGCGATGATGGC AGGACAAAATATTTGGAACTGTGAAATCAGCTCGCTGGGAGTATAG TACCCGGCCTGTGTATGGTTGGGGTAATGTCGGGTCGAAACAAAAGT CCACTGCAGGATGGCTAGCAGCTTTTCTGTGTTTGAGCCTCATTGG CAGATATGCATGGCAGGAGGCCTTTCAACAGGATGGATAGAATGGG ATGGTGAAAGGTTGAGTTTGAAGACGCACCATCTTATTCGGAGAAG AATTGGGGTGGAGGTTTCCCTAGAAAATGGTTTTGGGTTTCAGTGAA CGTCTTTGAAGGAGCAAGT<u>GGAGAAGTTGCTCTAACTGCA</u></p>
CvVTE2	<p>>MW193601 <i>Cleome viscosa</i> homogentisate phytyltransferase 1 ,mRNA, partial cds</p> <p><u>CAATCAGTTGTCTGATGTTGAAAT</u>TGATAAGGTTAACAAGCCATA TCTCCCGTTGGCATCAGGGGAGTATTCCATAAAGACCGGCATCGCGA TAGTAGCCTCCTTTTCTATCATGAGTTTCTGGCTCGGGTGGATTGTT GGTTTCGTGGCCATTGTTTTGGGCCCTCTCCGTGAGTTTCTTGCTCGG TACTGCATACTCTATCAATGTGCCACTTTTGAGGTGGAAAAGATTTCG CTCTAGTTGCAGCAATGTGTATCCTAGCTGTTTCGAGCTGTCATCGTT CAGATTGCCTTTTATCTACACATTCAGAGCCACGTGTTTGGGAAGACC</p>

ยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')
	AGCCGTGTTACCAGGCCTCTGATTTTCG <u>CCACTGCGTTTATGAG</u> <u>CTTC</u>
CvVTE3	>MW193602 <i>Cleome viscosa</i> 2-methyl-6-phytyl-1,4- hydroquinone methyltransferase, mRNA, partial cds <u>TGCAGAGGATCTTCCTTTTC</u> G TACTGATTACGCCGACAGATACAT TTCTGCCGGAAGTATTGAGTACTGGCCAGATCCGCAGCGGGGCATC AGGGAAGCGTACAGGGTCTGAAGCTCGGGGTAAAGCCTGTATCA TTGGACCCGTGTACCCGACGTTCTGGCTCTCCCGCTTCTTCGCTGGT GTCTGGATGCTCTTCCCAAGGAGGAAGAGTACATAGAGTGGTTCAA GAAAGCAGGGTTCAAGGATGTGCAGCTGAAGAGGATTGGTCCCAAG TGGTACCGCGGTGTTTCGCAGACACGGACTGATTATGGGGTGTCTGT CACTGGTGTCAAACCTGCCTCCGGTGACTCTCCTCTGCAGCTG <u>GGT</u> <u>CCAAAGGAAGAGGATGT</u>
CvVTE4	>MW193604 <i>Cleome viscosa</i> O-methyltransferase, mRNA, partial cds <u>GGGAGATCATATGCA</u> T CACGGCTTCTACGATCCCAAATCCGACG TCGGATTGAGCGATTCCGGTCACCGGAAAGCTCAGATCCGTATGATC GAGGAGGCTCTCCGTTTCGCCGGCGTTTCTGAGGAAGAGGGTGAGA AGCCAAGGAGTGTGGTTGATGTGGGGTGTGGAATAGGAGGAAGcTC AAGGTAcTGGTGGGAAGATGAGAGAAAACGAGtGACCGTGGCATCAC TCTCAGCCCTTTTCAAGCTCAACGAGCCAACGATCTCGCCGCTGCTC AGGGACTCTCTACAAGGTCTCGTTTCAAGTGGCGGACGCGTTGCA GCAGCCGTTTGAAGACGGGAAA <u>TTCGATCTTGTGGTCAAT</u>
CvHPPD	>MW193600 <i>Cleome viscosa</i> 4-hydroxyphenyl-pyruvate dioxygenase, mRNA, partial cds <u>GGCGATGTTGTTCTCCGAT</u> ATGTCAGTTACGCCAACAGAGCTGAT TTCGAGTTCCTCCAGGATTCGAGCCGGTGGAGGAGACGTCGTCGT

ยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')
	TTCCGGTGGATTACGGGATACGACGGCTCGACCACGCGGTGGGAAA CGTCCCGGAGCTTGCTCCGGCGGTGACGTACGTGCGCCGGGTTCCACC GGGTTTCACGATTTGCGCCGAGTTCACGGCGGAGGACGTGGGGACCG CCGAGAGCGGTCTGAATTCGGTGGTTTTGGCGAACACGAGGGGAC GGTGCTTTTGCCGATGAACGAGCCAGTGCACGGGACGA <u>AGAGGAA</u> <u>GAGTCAGATTCAGA</u>
CvHST	>MW193604 <i>Cleome viscosa</i> homogentisate prenyltransferase (HST), mRNA, partial cds <u>TTGCTCTTATATGTGGGAAT</u> GGCTATATAGTTGGCATCAACCAGA TCTACGACATTGGAATTGACAAAGTGAACAAACCATACTGCCATA GCAGCAGGGGATCTTTCAGTGCAGTCTGCGTGGTTGTTGGTAATATT TTTTCGAGTAGCAGGGGTTTCAGTTGTTGCATTAACCTTTGGTCCAT TCATTACTGGCCTATACTCTTGGTCTTTTTCTGGGGACCATCTAT TCTGTTCCACCACTTAGAATGAAAAGATTTCTGTTGCAGCGTTTCT TATAATTGCCACGGTACGAGGTTTCCTTCTTAATTTTGGTGTATACT ATGCTACAAGAGCTGCTCTTGGACTTCCATTTTCAGTGGAGCGCACCT GTGGCTTTCATCACATCTTTTGTGACATTGTTGCACTTGTGCATAGC TATTACGAAAGATCTTCAG <u>ATGTTGAAGGAGATCGCAAGT</u>

ตาราง 10 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VTE1

No.	Organism	NCBI Reference Sequence	Per. Iden	Total Score
1	<i>Tarenaya hassleriana</i>	XM_010527875.2	92.21	981
2	<i>Eutrema salsugineum</i>	XM_006412370.2	86.77	824
3	<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	XM_021019223.1	85.90	812
4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_119430.5	85.18	790
5	<i>Capsella rubella</i>	XM_006283478.2	84.75	776

6	<i>Camelina sativa</i>	XM_010434366.2	84.32	763
7	<i>Raphanus sativu</i>	XM_018624820.1	83.45	736
8	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>	XM_013738149.1	83.45	736
9	<i>Brassica napus</i>	XM_013851919.2	83.31	731
10	<i>Brassica rapa</i>	XM_009139895.3	83.02	722

ตาราง 11 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VTE2

No.	Organism	NCBI Reference Sequence	Per. Iden	Total Score
1	<i>Tarenaya hassleriana</i>	XM_010550313.2	90.13	508
2	<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	XM_021031427.1	88.24	465
3	<i>Camelina sativa</i>	XM_010469432.2	88.41	465
4	<i>Brassica rapa</i>	XM_033275508.1	87.77	458
5	<i>Brassica napus</i>	XM_013797304.2	87.77	458
6	<i>Eutrema salsugineum</i>	XM_006409032.2	87.73	456
7	<i>Raphanus sativus</i>	XM_018579500.1	87.50	452
8	<i>Solanum tuberosum</i>	HM217350.1	87.43	448
9	<i>Capsella rubella</i>	XM_006297790.2	87.20	444
10	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>	XM_013738461.1	86.44	429

ตาราง 12 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VTE3

No.	Organism	NCBI Reference Sequence	Per. Iden	Total Score
1	<i>Tarenaya hassleriana</i>	XM_019203601.1	86.05	455
2	<i>Raphanus sativus</i>	XM_018591319.1	85.79	451
3	<i>Brassica rapa</i>	XM_009106166.3	85.79	451

4	<i>Camelina sativa</i>	XM_010514456.2	85.79	451
5	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>	XM_013737058.1	85.79	451
6	<i>Brassica napus</i>	XM_013793076.2	85.53	446
7	<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	XM_021026461.1	87.09	445
8	<i>Capsella rubella</i>	XM_006291384.2	85.27	442
9	<i>Eutrema salsugineum</i>	XM_006402217.2	85.01	437
10	<i>Prosopis alba</i>	XM_028902575.1	84.75	433

ตาราง 13 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน VTE4

No.	Organism	NCBI Reference Sequence	Per. Iden	Total Score
1	<i>Tarenaya hassleriana</i>	XM_010530367.2	83.47	380
2	<i>Eutrema salsugineum</i>	XM_006391517.2	77.24	272
3	<i>Brassica napus</i>	XM_022697337.1	76.90	271
4	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>	XM_013757122.1	76.90	271
5	<i>Brassica rapa</i>	XM_009129127.3	76.63	267
6	<i>Brassica juncea</i>	DQ864978.1	76.09	258
7	<i>Arabidopsis lyrata</i>	XM_021035268.1	75.47	250
8	<i>Camelina sativa</i>	XM_010441080.2	74.87	240
9	<i>Raphanus sativus</i>	XM_018588868.1	75.00	240
10	<i>Capsella rubella</i>	XM_006302430.2	73.32	214

ตาราง 14 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *HPPD*

No.	Organism	NCBI Reference Sequence	Per. Iden	Total Score
1	<i>Tarenaya hassleriana</i>	XM_010544411.2	88.53	439
2	<i>Eutrema salsugineum</i>	XM_006417838.2	81.47	331
3	<i>Arabidopsis lyrata subsp. lyrata</i>	XM_002892303.2	81.18	326
4	<i>Raphanus sativus</i>	XM_018617120.1	80.18	298
5	<i>Brassica rapa</i>	XM_009120801.3	79.04	288
6	<i>Brassica napus</i>	XM_013840187.2	79.04	288
7	<i>Camelina sativa</i>	XM_019238827.1	79.34	286
8	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	KJ725151.1	78.53	286
9	<i>Raphanus raphanistrum</i>	MN244458.2	81.98	281
10	<i>Capsella rubella</i>	XM_006307445.2	78.24	281
11	<i>Brassica oleracea var. oleracea</i>	XM_013730334.1	81.63	277

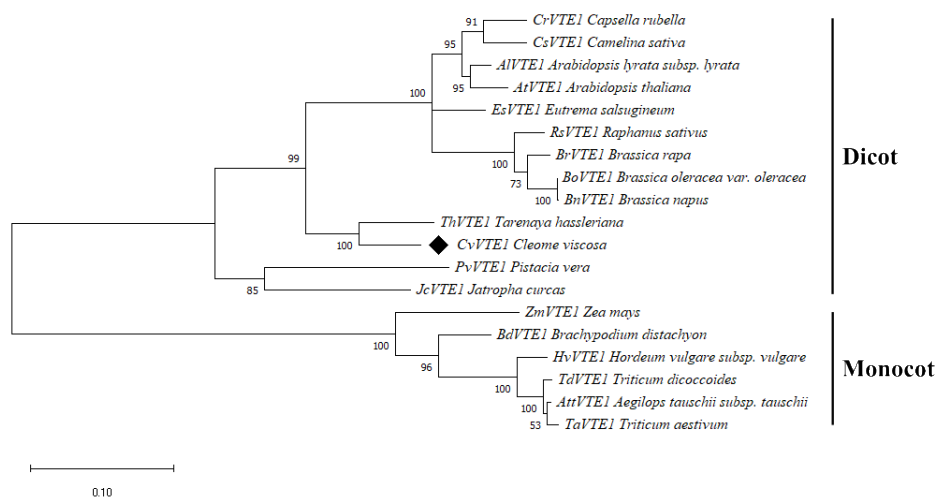
ตาราง 15 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *HST*

No.	Organism	NCBI Reference Sequence	Per. Iden	Total Score
1	<i>Tarenaya hassleriana</i>	XM_010521695.1	91.54	653
2	<i>Arabidopsis lyrata subsp. lyrata</i>	XM_002884828.2	90.46	630
3	<i>Raphanus sativus</i>	XM_018631216.1	90.46	630
4	<i>Eutrema salsugineum</i>	XM_006407328.2	90.24	626
5	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_001084669.2	90.53	626
6	<i>Brassica napus</i>	XM_013792745.2	89.80	617
7	<i>Brassica rapa</i>	XM_033288266.1	89.59	612

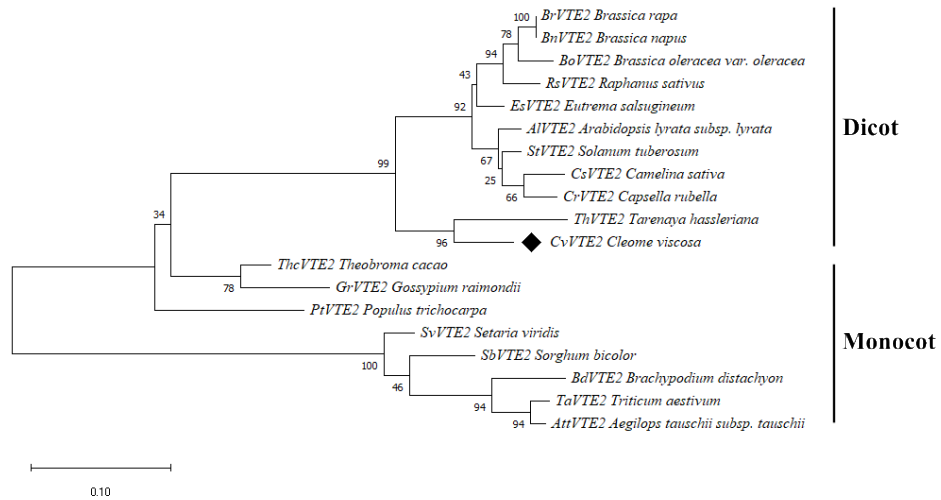
No.	Organism	NCBI Reference Sequence	Per. Iden	Total Score
8	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>oleracea</i>	XM_013767293.1	89.15	603
9	<i>Camelina sativa</i>	XM_010488567.2	88.72	594
10	<i>Capsella rubella</i>	XM_006297706.2	88.55	585

การสร้างแผนภูมิต้นไม้ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

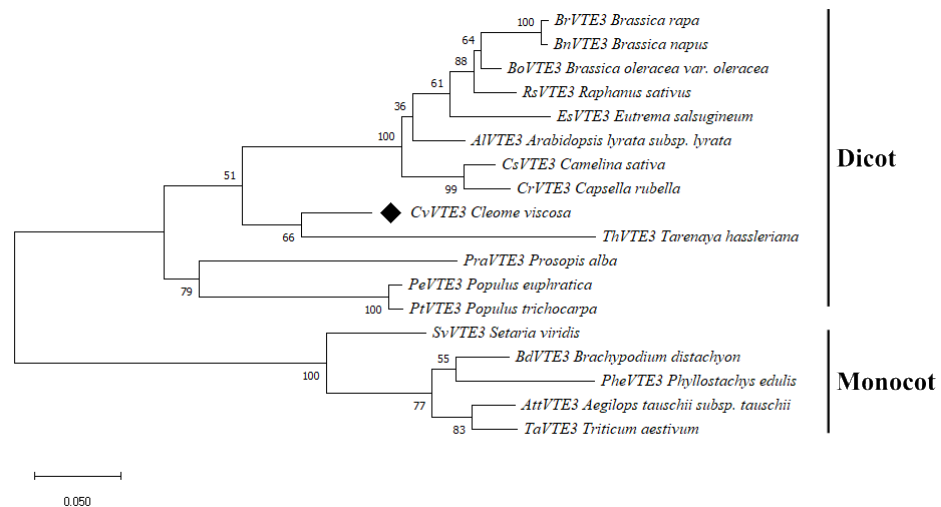
จากแผนภูมิต้นไม้ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ในการสังเคราะห์วิตามินอีจากผักเสี้ยนผี (*Cleome viscosa*: Cv) และพืชชนิดอื่น สามารถจัดกลุ่มได้ 2 กลุ่มได้แก่ กลุ่มพืชใบเลี้ยงคู่ (dicot) และกลุ่มพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (monocot) โดยที่ CvVTE1 CvVTE2 CvVTE3 CvVTE4 CvHPPD และ CvHST จัดอยู่กลุ่มพืชใบเลี้ยงคู่ และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน (sister group) กับ ThVTE1 ThVTE2 ThVTE3 ThVTE4 ThHPPD และ ThHST จาก *T. hassleriana* ตามลำดับ โดยมีค่าความเชื่อมั่น (bootstrap) ที่สูง (ภาพ 16-21)



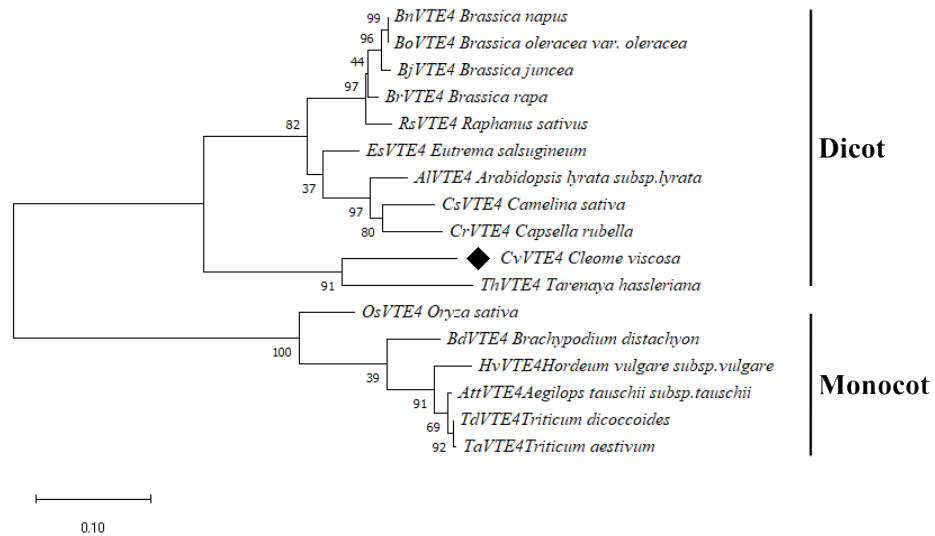
ภาพ 16 แผนภูมิต้นไม้ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน tocopherol cyclase ของผักเสี้ยนผี (CvVTE1) กับตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลพันธุกรรม Genbank ด้วยแบบจำลอง Maximum likelihood (Tamura-Nei +G +I (TN93 +G +I))



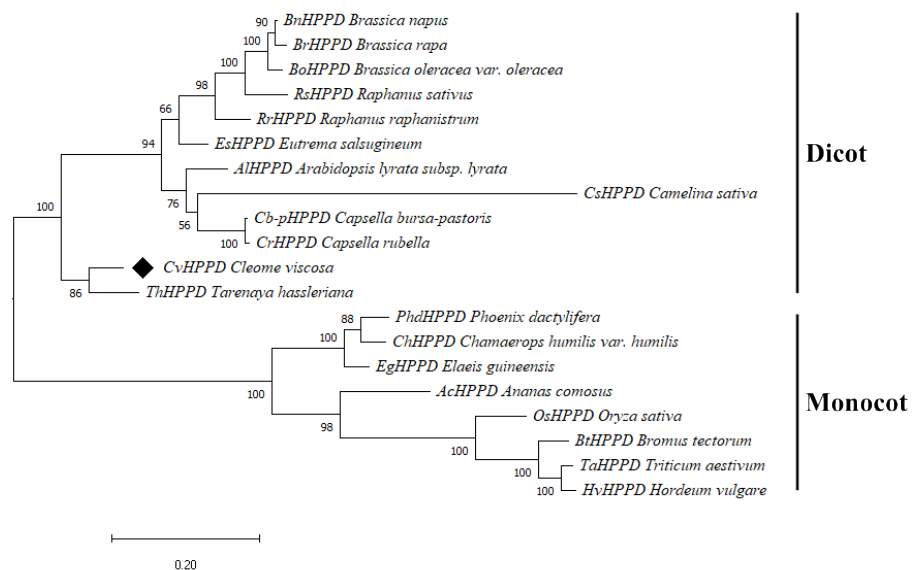
ภาพ 17 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน homogentisic acid prenyltransferase ของผักเสี้ยนผี (CvVTE2) กับตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลพันธุกรรม GenBank ด้วยแบบจำลอง Maximum likelihood (Tamura 3-parameter +G (T92 +G))



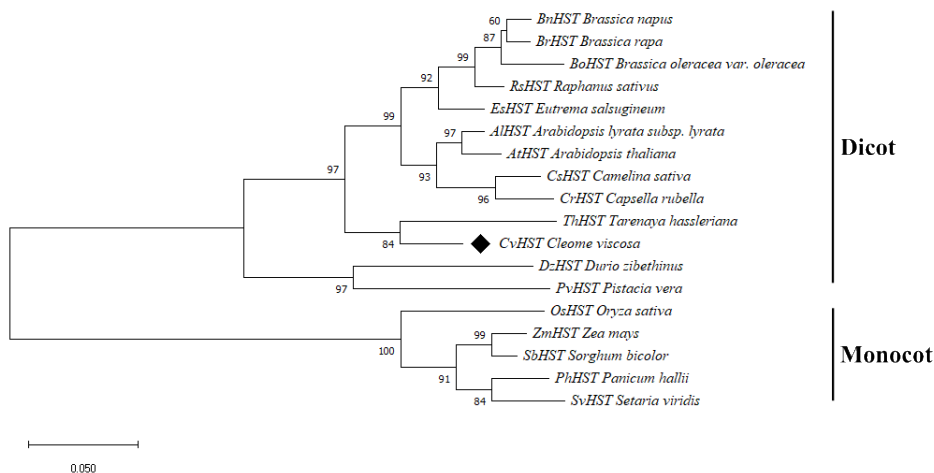
ภาพ 18 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน MPBQ methyltransferase ของผักเสี้ยนผี (CvVTE3) กับตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลพันธุกรรม GenBank ด้วยแบบจำลอง Maximum likelihood (General Time Reversible +G +I (GTR +G +I))



ภาพ 19 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน gamma-tocopherol methyltransferase ของผักเสี้ยนผี (*CvVTE4*) กับตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลพันธุกรรม GenBank ด้วยแบบจำลอง Maximum likelihood (Tamura 3-parameter +G (T92 +G))



ภาพ 20 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน hydroxyphenyl pyruvate dioxygenase ของผักเสี้ยนผี (*CvHPPD*) กับตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลพันธุกรรม GenBank ด้วยแบบจำลอง Maximum likelihood (Tamura 3-parameter +G (T92 +G))



ภาพ 21 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของยีน homogentisate solanesyltransferase ของผักเสี้ยนผี (*CvHST*) กับตัวอย่างลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลพันธุกรรม GenBank ด้วยแบบจำลอง Maximum likelihood (Tamura 3-parameter +G +I(T92 +G+I))

การออกแบบไพรเมอร์เพื่อเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของยีน

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของยีน ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการโคลนในหัวข้อที่ 5 (ตาราง 16) ซึ่งมีตำแหน่งของไพรเมอร์บนบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงในตาราง 17

ตาราง 16 ไพรเมอร์จำเพาะสำหรับเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของยีน (ไพรเมอร์ชุดที่ 2)

Gene	Primer	Nucleotide sequence (5'-3')	Tm (°C)
<i>CvVTE1</i>	qVTE1_F	AGGTGCAAGGCCTCCAAGTAA	61.2
	qVTE1_R	CCTGCCATCATCGCAAATATAAC	60.9
<i>CvVTE2</i>	qVTE2_F	CGTTGGCATCAGGGGAGTAT	60.5
	qVTE2_R	GCCACGAACCAACAATCCAC	60.5
<i>CvVTE3</i>	qVTE3_F	TGCAGCTGAAGAGGATTGGTC	61.2
	qVTE3_R	TGACACCAGTGACAGAACACC	61.2
<i>CvVTE4</i>	qVTE4_F	CGAGGAGGCTCTCCGTTTC	61.6
	qVTE4_R	ACACCCACATCAACCACACT	61.2

Gene	Primer	Nucleotide sequence (5'-3')	Tm (°C)
CvHPPD	qHPPD_F	AGCTGATTTTCGAGTTCCTCCC	61.2
	qHPPD_R	GAGCAAGCTCCGGGACGTT	61.6
CvHST	qHST_F	CACGGTACGAGGTTTCCTTCT	61.2
	qHST_R	TGTGATGAAAGCCACAGGTGC	61.2

ตาราง 17 ตำแหน่งของไพรเมอร์บนบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับเปรียบเทียบรูปแบบการ
แสดงออกของยีน

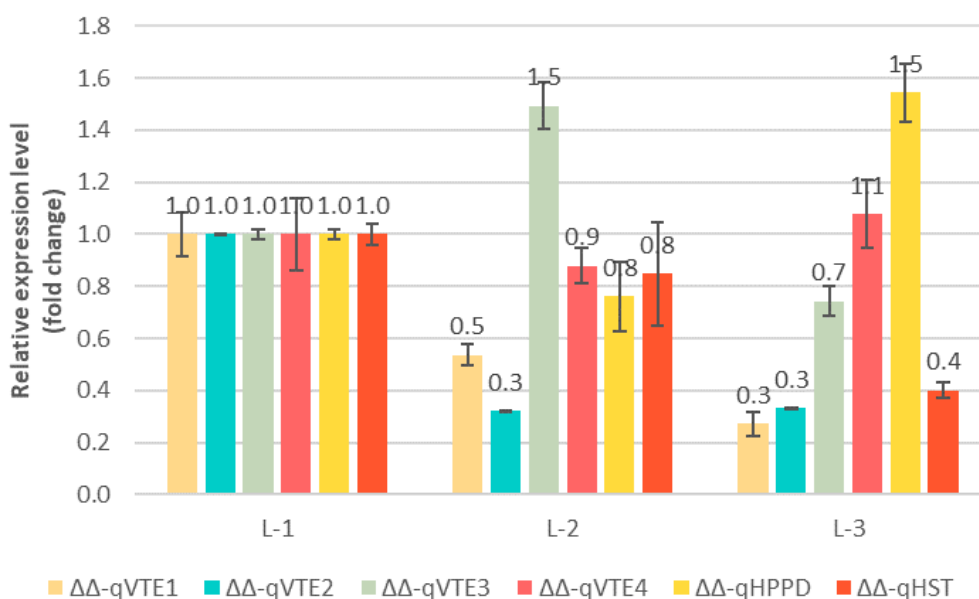
ยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')
CvVTE1	<p>>MW193603 <i>Cleome viscosa</i> tocopherol cyclase, mRNA, partial cds</p> <p>AGTTCTTCGAGGGATGGTATTTCAAGGTCTCAATACCAGAGAGGA AGCAGAGCTTTTGCTTTATGTATTCTGTGGAGAACCCCGCATTTC AGAAGAAATTGTCAACTTTGGATGTGGCACTATATGGACCAAGAT TCACCGGAGTCGGGGCTCAAATTCCTGGTGCTTATGATAAATATA TATGCCAATTCACGCAAGAGTCTCAGAACTTCTGGGGAGATAGGC ATGAGCTAGTTTTGGGAAATACGTTTGCAGCTGTGGAAGGTGCA AGGCCTCCAAGTAAGGAGGTTCTCCAGAGGAATTTAACAAAA GAGTGTTGGAAGGGTTTCAAGTTACTCCGCTCTGGCATCAAGGT TATATTTGCGATGATGGCAGGACAAAATATTTGGAAACTGTGA AATCAGCTCGCTGGGAGTATAGTACCCGGCCTGTGTATGGTTGG GGTAATGTCGGGTCGAAACAAAAGTCCACTGCAGGATGGCTAGC AGCTTTTCCTGTGTTTGAGCCTCATTGGCAGATATGCATGGCAGG AGGCCTTTCAACAGGATGGATAGAATGGGATGGTGAAAGGTTTCG AGTTTGAAGACGCACCATCTTATTCGGAGAAGAATTGGGGTGGGA GGTTTCCCTAGAAAATGGTTTTGGGTTTCAGTGTAACGTCTTTGAA GGAGCAAGTGGAGAAGTTGCTCTAACTGCA</p>

ยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')
CvVTE2	<p>>MW193601 <i>Cleome viscosa</i> homogentisate phytyltransferase 1 ,mRNA, partial cds</p> <p>CAATCAGTTGTCTGATGTTGAAATTGATAAGGTTAACAAGCCATA TCTCC<u>CGTTGGCATCAGGGGAGTAT</u>TCCATAAAGACCGGCATC GCGATAGTAGCCTCCTTTTCTATCATGAGTTTCTGGCTCGG<u>GTG</u> <u>GATTGTTGGTTCGTGGC</u>CATTGTTTTGGCCCTCTCCGTGAGT TTCTTGCTCGGTACTGCATACTCTATCAATGTGCCACTTTTGAGG TGGAAAAGATTCGCTCTAGTTGCAGCAATGTGTATCCTAGCTGTT CGAGCTGTCATCGTTCAGATTGCCTTTTATCTACACATTCAGAGC CACGTGTTTGAAGACCAGCCGTGTTACCAGGCCTCTGATTTTC GCCACTGCGTTTATGAGCTTC</p>
CvVTE3	<p>>MW193602 <i>Cleome viscosa</i> 2-methyl-6-phytyl-1,4- hydroquinone methyltransferase, mRNA, partial cds</p> <p>TGCAGAGGATCTTCCTTTTCGTA CTGATTACGCCGACAGATACAT TTCTGCCGGAAGTATTGAGTACTGGCCAGATCCGCAGCGGGGCA TCAGGGAAGCGTACAGGGTTCTGAAGCTCGGGGGTAAAGCCTGT ATCATTGGACCCGTGTACCCGACGTTCTGGCTCTCCCGCTTCTTC GCTGGTGTCTGGATGCTCTTCCCAAGGAGGAAGAGTACATAGA GTGGTTCAAGAAAGCAGGGTTCAAGGATG<u>TGCAGCTGAAGAGG</u> <u>ATTGGTCC</u>CAAGTGGTACCCGCGGTGTTGCAGACACGGACTGAT TATGG<u>GGTGTTCGTCACTGGTGTCA</u>AACCTGCCTCCGGTGAC TCTCCTCTGCAGCTGGGTCCAAAGGAAGAGGATGT</p>
CvVTE4	<p>>MW193604 <i>Cleome viscosa</i> O-methyltransferase, mRNA, partial cds</p> <p>GGGGAGATCATATGCATCACGGCTTCTACGATCCCAAATCCGAC GTCGGATTGAGCGATTCCGGTCACCGGAAAGCTCAGATCCGTAT GAT<u>CGAGGAGGCTCTCCGTTTC</u>GCCGGCGTTTCTGAGGAAGAG GGTGAGAAGCCAAGG<u>AGTGTGGTTGATGTGGGGTGT</u>GGAATA</p>

ยีน	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3')
	GGAGGAAGcTCAAGGTAcTGGTGGGAAGATGAGAGAAAACGAGtG ACCGTGGCATCACTCTCAGCCCTTTTCAAGCTCAACGAGCCAACG ATCTCGCCGCTGCTCAGGGACTCTCTACAAGGTCTCGTTTCAAG TGGCGGACGCGTTGCAGCAGCCGTTTGAAGACGGGAAATTCGAT CTTGTTTGGTCAAT
CvHPPD	>MW193600 <i>Cleome viscosa</i> 4-hydroxyphenyl-pyruvate dioxygenase, mRNA, partial cds GGCGATGTTGTTCTCCGATATGTCAGTTACGCCAACAG AGCTGA TTTCGAGTTCCTCCC AGGATTCGAGCCGGTGGAGGAGACGTGC TCGTTTCCGGTGGATTACGGGATACGACGGCTCGACCACGCGGT GGGA AACGTCCCGGAGCTTGCTC CGGCGGTGACGTACGTGCG CGGGTTCACCGGGTTTACGATTTGCCCAGTTCACGGCGGAGG ACGTGGGGACCGCCGAGAGCGGTCTGAATTCGGTGGTTTTGGCG AACAAACGAGGGGACGGTGCTTTTGCCGATGAACGAGCCAGTGCA CGGGACGAAGAGGAAGAGTCAGATTCAGA
CvHST	>MW193604 <i>Cleome viscosa</i> homogentisate prenyltransferase (HST), mRNA, partial cds TTGCTCTTATATGTGGGAATGGCTATATAGTTGGCATCAACCAGA TCTACGACATTGGAATTGACAAAGTGAACAAACCATACCTGCCCA TAGCAGCAGGGGATCTTTCAGTGCAGTCTGCGTGGTTGTTGGTAA TATTTTTCGCAGTAGCAGGGTTTCAGTTGTTGCATTAAACTTTG GTCCATTCATTACTGGCCTATACTCTCTTGGTCTTTTTCTGGGGA CCATCTATTCTGTTCCACCACTTAGAATGAAAAGATTTCTGTTG CAGCGTTTCTTATAATTGCC CACGGTACGAGGTTTCCTTCT TAA TTTTGGTGTATACTATGCTACAAGAGCTGCTCTTGGACTIONCCATT TCAGTGGAGC GCACCTGTGGCTTTCATCACA TCTTTTTGTGACA TTGTTCCGCACTTGCATAGCTATTACGAAAGATCTTCCAGATGTT GAAGGAGATCGCAAGT

วิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Quantitative PCR (qPCR)

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ในการสังเคราะห์วิตามินอี จากผักเสี้ยนผี (*Cleome viscosa*: Cv) ได้แก่ CvVTE1 CvVTE2 CvVTE3 CvVTE4 CvHPPD และ CvHST ในใบ 3 ระยะ ได้แก่ L1 คือใบข้อที่ 1-5 L2 คือใบข้อที่ 10-15 L3 คือใบตั้งแต่ข้อที่ 20 เนื้อเยื่อเมล็ด 4 ระยะ ได้แก่ S1 คือเมล็ดหลังการติดผล 1 สัปดาห์ S2 คือเมล็ดหลังการติดผล 2 สัปดาห์ S3 คือเมล็ดหลังการติดผล 3 สัปดาห์ และ S4 คือเมล็ดหลังการติดผล 4 สัปดาห์ ด้วยเทคนิค Quantitative PCR (qPCR) โดยใช้ไพรเมอร์ชุดที่ 2 ในการตรวจสอบ ระดับการแสดงออกใน ระยะต่าง ๆ เปรียบเทียบกับระยะแรกของแต่ละเนื้อเยื่อด้วยวิธี $2^{-\Delta\Delta Ct}$ โดยใช้ *Actin* เป็นยีนอ้างอิง (reference gene) พบว่าในเนื้อเยื่อใบมีการแสดงออกของยีน CvVTE1 CvVTE2 CvVTE4 และ CvHST ระดับลดต่ำลงเมื่อใบมีอายุมากขึ้น ในขณะที่ CvVTE3 และ CvHPPD มีรูปแบบการแสดงออกที่แตกต่างออกไปคือ CvVTE3 มีระดับการแสดงออกสูงสุดในระยะ L2 เป็น 1.5 เท่า และ CvHPPD มีระดับการแสดงออกสูงสุดในระยะ L3 เป็น 1.5 เท่า (ภาพ 22)



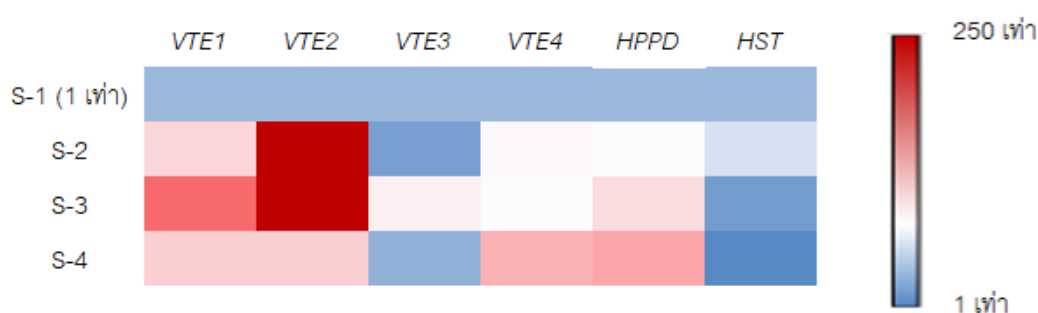
ภาพ 22 ระดับการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ในการสังเคราะห์วิตามินอี ได้แก่ CvVTE1 CvVTE2 CvVTE3 CvVTE4 CvHPPD และ CvHST ในเนื้อเยื่อใบ 3 ระยะ โดยที่ (L-1 คือใบข้อที่ 1-5 L-2 คือใบข้อที่ 10-15 L-3 คือใบตั้งแต่ข้อที่ 20) โดยวิเคราะห์ความแตกต่างด้วยวิธีวิเคราะห์ทางสถิติ one-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น (level of confidence) 95%

ขณะที่การแสดงออกของยีนในเมล็ดนั้นค่อนข้างเด่นชัด เนื่องจากการสังเคราะห์วิตามินอีในเนื้อเยื่อใบเกิดขึ้นในบริเวณคลอโรพลาสต์ ส่วนเมล็ดจะเกิดขึ้นในบริเวณพลาสติด และมีแนวโน้มการสะสมวิตามินอีมากกว่าเนื้อเยื่ออื่นอย่างมีนัยสำคัญ (Dellapenna, 2005) โดยแบ่งเป็น 3 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบการแสดงออกสูงช่วงกลางของการเจริญเติบโต (CvVTE1 CvVTE2 และ CvVTE3) รูปแบบการแสดงออกสูงช่วงท้ายของการเจริญเติบโต (CvVTE4 และ CvHPPD) และรูปแบบการแสดงออกที่ต่ำอย่างคงที่ทุกระยะ (CvHST) (ภาพ 23)

โดย CvVTE1 CvVTE2 และ CvVTE3 ซึ่งมีรูปแบบการแสดงออกไปในทิศทางเดียวกัน และมีระดับการแสดงออกที่สูงในระยะกลางของการเจริญเติบโต (middle stage) และลดลงเมื่อเมล็ดเข้าสู่ระยะแก่ โดยระดับการแสดงออกของยีน CvVTE1 CvVTE3 จะสูงที่สุดในระยะ เมล็ดหลังการติดผล 3 สัปดาห์ (S3) เป็น 28 และ 4 เท่าตามลำดับ ส่วนยีน CvVTE2 จะมีรูปแบบที่ต่างออกไปเล็กน้อยโดยมีระดับการแสดงออกของยีนสูงที่สุดใน 2 ระยะคือ เมล็ดหลังการติดผล 2 สัปดาห์ (S2) และเมล็ดหลังการติดผล 3 สัปดาห์ (S3) เป็น 231 และ 224 เท่าตามลำดับ

ในขณะที่ยีน CvVTE4 และ CvHPPD มีรูปแบบการแสดงออกที่ต่างจากยีนชนิดอื่น ซึ่งระดับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นแปรผันตรงกับอายุของเมล็ดที่เพิ่มมากขึ้น โดยระดับการแสดงออกสูงที่สุดในเมล็ดหลังการติดผล 4 สัปดาห์ (S4) เป็น 15 และ 17 เท่าตามลำดับ

นอกจากนี้ยีน CvHST ยังมีรูปแบบการแสดงออกที่แตกต่างออกไปจากรูปแบบที่กล่าวมา โดยยีน CvHST มีระดับการแสดงออกที่ค่อนข้างคงที่ทุกระยะ (ภาพ 24)



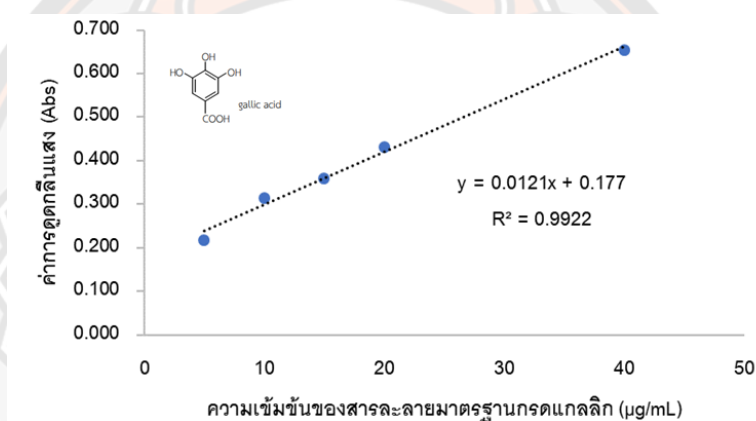
ภาพ 23 รูปแบบการแสดงออกของยีนควบคุมการสร้างเอนไซม์ในการสังเคราะห์วิตามินอี ได้แก่ CvVTE1 CvVTE2 CvVTE3 CvVTE4 CvHPPD และ CvHST ในเนื้อเยื่อเมล็ด 4 ระยะ โดยที่ S-1 คือเมล็ดหลังการติดผล 1 สัปดาห์ S-2 คือเมล็ดหลังการติดผล 2 สัปดาห์ S-3 คือเมล็ดหลังการติดผล 3 สัปดาห์ และ S-4 คือเมล็ดหลังการติดผล 4 สัปดาห์



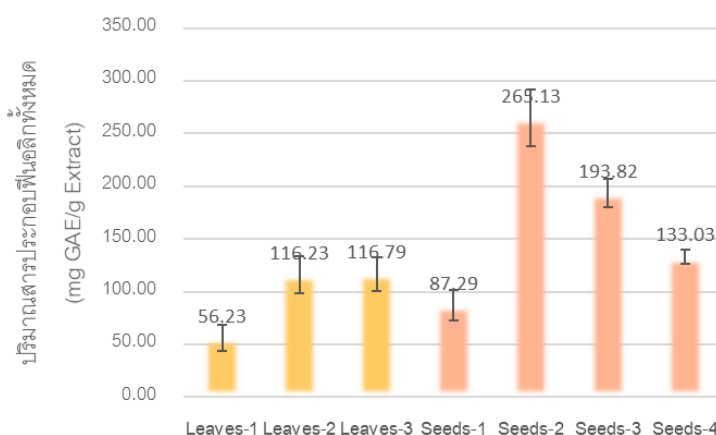
ภาพ 24 ระดับการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ในการสังเคราะห์วิตามินอี ได้แก่ *CvVTE1* *CvVTE2* *CvVTE3* *CvVTE4* *CvHPPD* และ *CvHST* ในเนื้อเยื่อเมล็ด 4 ระยะ ได้แก่ S-1 คือเมล็ดหลังการติดผล 1 สัปดาห์ S-2 คือเมล็ดหลังการติดผล 2 สัปดาห์ S-3 คือเมล็ดหลังการติดผล 3 สัปดาห์ และ S-4 คือเมล็ดหลังการติดผล 4 สัปดาห์ โดยวิเคราะห์ความแตกต่างด้วยวิธีวิเคราะห์ทางสถิติ one-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น (level of confidence) 95%

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดหยาบจากใบและเมล็ดของผักเสี้ยนผีด้วยการสกัดในตัวทำละลายอินทรีย์ hexane/dichloromethane (1:1, v/v) เป็นเวลา 1 คืน ที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร โดยคำนวณจากสมการกราฟมาตรฐานของ Gallic acid ได้สมการคือ $y = 0.0121x - 0.1774$ และมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9922 (ภาพ 25) เมื่อคำนวณค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัดหยาบ พบว่าในใบมีปริมาณฟีนอลิกสูงถึง 116.23 และ 116.79 mgGAE/gDW ในระยะที่ 2 และ 3 ตามลำดับ ในขณะที่ในเมล็ดมีปริมาณสูงในระยะ 2 และ 3 สัปดาห์หลังการติดผล เป็น 265.13 และ 193.82 mgGAE/gDW ตามลำดับ (ภาพ 26)



ภาพ 25 กราฟของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก



ภาพ 26 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content) ของสารสกัดหยาบจากตัวอย่างใบ และเมล็ดของผักเสี้ยนผี ด้วยการสกัดในตัวทำละลายอินทรีย์ hexane/dichloromethane (1:1, v/v)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการแสดงออกของยีน และปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระดับการแสดงออกยีน CvVTE1 CvVTE2 CvVTE3 CvVTE4 CvHPPD CvHST และปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (TPC) พบว่า รูปแบบการแสดงออกของยีนที่มีความสัมพันธ์เชิงบวกได้แก่คู่ความสัมพันธ์ระหว่าง CvVTE1-CvVTE2 CvVTE4-CvHPPD และ CvVTE3-CvHST นั่นคือมีค่าเป็นบวกเข้าใกล้ 0.9 เมื่อวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของยีนต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด พบว่ายีน CvVTE2 มีความสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญที่ 0.05 (ตาราง 18)

ตาราง 18 ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบการแสดงออกของยีน CvVTE1 CvVTE2 CvVTE3 CvVTE4 CvHPPD และ CvHST และปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

	CvVTE1	CvVTE2	CvVTE3	CvVTE4	CvHPPD	CvHST	TPC
CvVTE1	1						
CvVTE2	0.6388	1					
CvVTE3	0.1294	-0.2233	1				
CvVTE4	-0.0555	-0.2859	-0.4141	1			
CvHPPD	0.2201	-0.1349	-0.4215	0.9387**	1		
CvHST	0.0888	-0.2229	0.8989*	-0.3676	-0.4492	1	
TPC	0.2070	0.7740*	-0.4514	0.0421	0.0972	-0.5772	1

บทที่ 5

บทสรุป

อภิปรายผลการวิจัย

วิธีการสกัดอาร์เอ็นเอที่ดัดแปลงจาก Verwoerd และคณะ (1989) สามารถสกัดอาร์เอ็นเอใบ 3 ระยะ (L-1, L-2 และ L-3) (รูป 4.2 A) โดยมีอัตราส่วนการดูดกลืนแสงที่ 260/280 และ 260/230 ใกล้เคียงกับ 2.0 แต่เนื่องด้วยในเมล็ดการสะสมของแป้ง ไชมัน โปรตีน น้ำตาล และน้ำมัน ส่งผลให้ค่าอัตราส่วนการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260/280 และ 260/230 มีค่าต่ำกว่า 1.8 เกิดจากการปนเปื้อนของโปรตีนในปริมาณมาก คุณภาพไม่เหมาะสมสำหรับการแปลงอาร์เอ็นเอให้เป็นคอมพลีตดีเอ็นเอ (cDNA) โดยปฏิกิริยา Reverses Transcription อาร์เอ็นเอจากเมล็ด 4 ระยะ (S-1, S-2, S-3 และ S-4) จึงถูกสกัดด้วยชุดสำเร็จรูป NucleoSpin® RNA Plant and Fungi พบว่าอัตราส่วนการดูดกลืนแสงที่ 260/280 ใกล้เคียงกับ 2.0 ในขณะที่อัตราส่วนการดูดกลืนแสงที่ 260/230 ในเมล็ดระยะ S-2, S-3 และ S-4 นั้นต่ำกว่า 1.8 เนื่องจากความยาวคลื่นที่ 230 นาโนเมตร ถูกดูดกลืนแสงได้ด้วยกลุ่มของโปรตีนส่วน backbone (α -carbon) กลีอ และฟีนอล ในขณะที่ความยาวคลื่นที่ 280 นาโนเมตร ถูกดูดกลืนแสงได้ด้วยกลุ่มของโปรตีนส่วน side chain ที่เป็นวงแหวนอะโรมาติก (aromatic protein ring) (Wilfinger และคณะ, 1997) แสดงว่าอาร์เอ็นเอของเมล็ดที่สกัดด้วยชุดสำเร็จรูป NucleoSpin® RNA Plant and Fungi มีการปนเปื้อนของโปรตีนส่วน side chain ในปริมาณต่ำ ในขณะที่ยังคงมีการปนเปื้อนส่วน backbone ในตัวอย่าง S-2, S-3 และ S-4

การเพิ่มปริมาณคอมพลีเมนทาลีดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์จำเพาะเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน (ไพรเมอร์ชุดที่ 1) พบว่ามีเพียง 6 คู่ไพรเมอร์ที่ทำการเพิ่มปริมาณได้สำเร็จคือ VTE1_FR VTE2_FR VTE3_FR VTE4_FR HPPD_FR และ HST_FR (รูป 4.2) โดยไพรเมอร์ HGGT_FR สำหรับเพิ่มปริมาณบริเวณยีน HGGT ที่สังเคราะห์เอนไซม์ homogentisate geranylgeranyl transferase เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โทโคไตรอีนอลไม่สามารถทำการเพิ่มปริมาณได้ทั้งคอมพลีเมนทาลีดีเอ็นเอ และดีเอ็นเอ เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าโทโคไตรอีนอลจะพบได้เพียงในเอ็นโดสเปิร์มในเมล็ดของพืชใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น ข้าว ข้าวสาลี และข้าวบาร์เลย์ เป็นต้น (Kamal-Eldin และคณะ, 1996) แต่ต่อมาพบว่ายีน HGGT มีการแสดงออกในพืชใบเลี้ยงคู่บางชนิดได้แก่อะราบิดอบซิส (E. B. Cahoon และคณะ, 2003) และ เมล็ดของถั่วเหลือง (E. B. Cahoon, Coughlan, S.J.,

Cahoon, R.E. and Butler, K.H. , 2006) ทำให้การศึกษาครั้งนี้ยังไม่สามารถสรุปได้ว่ายีนดังกล่าวไม่มีการแสดงออก และไม่มีการสะสมวิตามินอีชนิดโทโคไตรอีนอลในผักเสี้ยนผี

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ในการสังเคราะห์วิตามินอีจากผักเสี้ยนผี (*Cleome viscosa*: Cv) เป็นยีนบริเวณคลอโรพลาสต์ ซึ่งสังเคราะห์ในบริเวณพลาสต์ติด (Mène-Saffrané, 2017) ได้แก่ CvVTE1 CvVTE2 CvVTE3 CvVTE4 CvHPPD และ CvHST มีความยาว 695 คู่เบส (231 กรดอะมิโน) 376 คู่เบส (125 กรดอะมิโน) 387 คู่เบส (128 กรดอะมิโน) 366 คู่เบส (121 กรดอะมิโน) 334 คู่เบส (111 กรดอะมิโน) 461 คู่เบส (153 กรดอะมิโน) ตามลำดับ โดยเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลเอ็นซีบีไอ (NCBI databases) พบว่าแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของยีนดังกล่าวกับกลุ่มพืชใบเลี้ยงคู่ ซึ่งถูกจัดกลุ่มแยกกับพืชใบเลี้ยงเดี่ยวอย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับการใช้ข้อมูลจากจีโนมคลอโรพลาสต์ พบว่าพืชใบเลี้ยงคู่และใบเลี้ยงเดี่ยวแยกออกจากกันเมื่อ 140-150 ล้านปีก่อน (Chaw และคณะ, 2004) อีกทั้งพบว่ามี ความสัมพันธ์ใกล้ชิด (sister group) กับ ThVTE1 ThVTE2 ThVTE3 ThVTE4 ThHPPD และ ThHST จาก *T. hassleriana* แม้ว่า *T. hassleriana* มีการเปลี่ยนสกุลจาก *Cleome hassleriana* ด้วย ลักษณะทางสัณฐานบางประการ ได้แก่ ขนาดของต้นพืช สีดอก และลักษณะของเปลือกหุ้มเมล็ด (Iltis, 2009) อย่างไรก็ตามข้อมูลความสัมพันธ์ดังกล่าวยังคงสนับสนุนความใกล้ชิดกันระหว่างพืชสองชนิดนี้

รูปแบบและระดับการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ในการสังเคราะห์วิตามินอี ในเนื้อเยื่อต่างชนิดกันมีผลต่อชนิด และปริมาณการสะสมวิตามินอี โดยยีน CvVTE1 CvVTE2 CvVTE3 CvVTE4 CvHPPD และ CvHST มีการแสดงออกค่อนข้างคงที่ในใบ โดยรูปแบบการแสดงออกของยีน CvHPPD มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเมื่อใบผักเสี้ยนผีมีอายุเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการแสดงออกของยีน LsHPPD ในใบผักกาดหอม (*L. sativa*) (Ren และคณะ, 2011) และ HPPD ในใบอะราบิโดพซิส ที่มีระดับการแสดงออกสูงที่สุดในเนื้อเยื่อใบแก่ (mature leaves) ในขณะ ที่การศึกษาของ Georgiadou และคณะ (2015) พบระดับการแสดงออกของยีน HPPD นั้นมีรูปแบบที่ สูงขึ้นในผลที่เข้าสู่ระยะสุกงอม (over-ripening processes) เนื่องจากเมื่อพืชเข้าสู่ระยะชราจะ เกิดปฏิกิริยาย่อยสลายหมู่เอโรมาติกของกรดอะมิโนในไซโตพลาสซึมส่งผลให้ HPP ที่เป็นสารตั้งต้นใน การสังเคราะห์ HGA โดยอาศัยเอนไซม์ HPPDase เพิ่มมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับระดับการแสดงออก ของยีน HPPD ที่สูงในระยะแก่เต็มวัย (Mène-Saffrané, 2017)

ขณะที่ในเมล็ดแบ่งรูปแบบการแสดงออกเป็น 3 รูปแบบ ได้แก่ รูปแบบที่หนึ่งมีแสดงออกเด่นชัดในเมล็ดระยะกลางของการเจริญเติบโต (middle stage) คือยีน *CvVTE1* *CvVTE2* และ *CvVTE3* โดยการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า การแสดงออกของยีน *VTE2* ที่เพิ่มมากขึ้น (overexpression) ในเมล็ดของพืชที่มีการสะสมน้ำมัน เช่น ผักกาดก้านขาว (*B. napus*) (Raclaru และคณะ, 2006) และถั่วเหลือง (Karunanandaa และคณะ, 2005) ทำให้มีการสะสมโทโคฟีรอลสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยเมล็ดของผักกาดก้านขาว (*B. napus*) ยีน *VTE2* มีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้การสะสมโทโคฟีรอลสูงขึ้น 2-2.5 เท่า สอดคล้องกับการแสดงออกของยีน *VTE1* และ *HPPD* ที่สูงขึ้นด้วย (co-expression) (R. Kumar และคณะ, 2005) นอกจากนี้การแสดงออกของยีน *VTE2* ที่เพิ่มมากขึ้น (overexpression) ส่งผลให้เมล็ดอะราบิโดบซิสมีการสะสมโทโคฟีรอลเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 40 เป็นร้อยละ 100 (Collakova และคณะ, 2003)

รูปแบบที่สองยีนที่มีการแสดงออกที่เด่นชัดในเมล็ดระยะท้ายของการเจริญเติบโต (late stage) คือยีน *CvVTE4* และ *CvHPPD* โดยยีนดังกล่าวมีความสัมพันธ์กัน ยีน *HPPD* ซึ่งเป็นยีนขั้นแรกของปฏิกิริยาการสังเคราะห์โทโคโครมานอลที่ส่งผลให้เกิดการสังเคราะห์สารตั้งต้น HGA และยีน *VTE4* ซึ่งเป็นยีนขั้นสุดท้ายในกระบวนการสังเคราะห์โทโคโครมานอล การเข้าสู่ระยะสุกและระยะแก่ตัว (ripening and senescence) จะทำให้ระดับความเครียดในพืชสูงขึ้น เนื่องจากการสลายตัวของคลอโรฟิลล์ และลิปิด (Alagna และคณะ, 2009; Dangl, 2000; Paliyath และคณะ, 1992) การสลายตัวของคลอโรฟิลล์ส่งผลให้ปริมาณของไฟติลไดฟอสเฟส (phytyl-PP) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์โทโคฟีรอลเพิ่มขึ้น (Ischebeck และคณะ, 2006; Valentin และคณะ, 2006) ส่งผลต่อรูปแบบการแสดงออกที่เพิ่มสูงขึ้นของยีน *CvVTE4* และ *CvHPPD* ในระยะเมล็ดหลังการติดผล 4 สัปดาห์ (S4) นอกจากนี้การศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน *HPPD* ในมะม่วง พบว่าเมื่อปริมาณการแสดงออกของยีน *HPPD* เพิ่มสูงขึ้นส่งผลต่อปริมาณการสะสมโทโคฟีรอลสูงขึ้นเช่นกันเมื่อเข้าสู่ระยะแก่ตัว (Singh และคณะ, 2011) ความสัมพันธ์ดังกล่าวจึงอาจเป็นขั้นที่ใช้กำหนดปฏิกิริยา (rate-limiting step) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในเมล็ดข้าวโอ๊ตพบว่ายีน *VTE4* และ *HPPD* เป็นขั้นสำคัญส่งเสริมให้เกิดการสะสมวิตามินอีที่มากขึ้น (Gutierrez-Gonzalez และคณะ, 2016) การเพิ่มขึ้นของยีน *VTE4* ในเมล็ดพืชสะสมน้ำมันเช่น ถั่วเหลือง (Karunanandaa และคณะ, 2005; Van Eenennaam และคณะ, 2003) และผักกาดเขียว (*Brassica juncea*) (Yusuf และคณะ, 2007) ส่งผลต่อการเปลี่ยนจากอนุพันธ์ γ -tocopherol ไปเป็นอนุพันธ์ α -tocopherol

อีกหนึ่งรูปแบบคือการแสดงออกยีน *CvHST* ที่ค่อนข้างต่ำ และคงที่ในทุกระยะ โดยการศึกษาในพืชอะราบิโดรอปซิสพบว่ายีน *HST* มีการแสดงออกที่สูงบริเวณลำต้น และใบ ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่มีสีเขียว ในขณะที่มีการแสดงออกต่ำบริเวณดอก และราก อย่างไรก็ตามในเมล็ดผักเสี้ยนฝั ระยะ 1-2 สัปดาห์หลังการติดผล ซึ่งเมล็ดมีสีเขียวมีระดับการแสดงออกที่สูงกว่าเมล็ดระยะ 3-4 สัปดาห์หลังการติดผลอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (Chao และคณะ, 2014)

เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกข้างต้นระหว่าง *CvHST* และ *CvVTE2* ซึ่งเป็นยีนสำคัญในการกำหนดประเภทวิตามินอีระหว่างพลาสโตโครมานอล-8 และโทโคฟีรอล ตามลำดับ จะเห็นว่าระดับการแสดงออกที่ค่อนข้างต่ำในยีน *CvHST* และระดับการแสดงออกที่สูงใน *CvVTE2* แสดงถึงแนวโน้มการสังเคราะห์วิตามินอีประเภทโทโคฟีรอลมากกว่าพลาสโตโครมานอล-8 (Venkatesh และคณะ, 2006) (รูป 6) โดย อนุพันธ์ของวิตามินอีอาจมีอัตราส่วนแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับรูปแบบการแสดงออกของยีน *CvVTE1* *CvVTE3* และ *CvVTE4* ซึ่ง *CvVTE1* มีการแสดงออกที่สูงขึ้นตั้งแต่เมล็ดระยะ 2-4 สัปดาห์หลังการติดผล และสูงที่สุดในเมล็ด 3 สัปดาห์หลังการติดผล ในเมล็ดระยะ 2 สัปดาห์หลังการติดผล จะเริ่มมีการสะสมอนุพันธ์เตลต้าโทโคฟีรอลเป็นหลัก และเริ่มเปลี่ยนเป็นอนุพันธ์แกมมาโทโคฟีรอลเมื่อเข้าสู่เมล็ด 3 สัปดาห์หลังการติดผล ด้วยการแสดงออกของยีน *CvVTE3* และเริ่มสะสมอนุพันธ์เบต้าโทโคฟีรอล และแอลฟาโทโคฟีรอลในเมล็ดระยะ 4 สัปดาห์หลังการติดผล ด้วยการแสดงออกของยีน *CvVTE4* ที่เพิ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตามแม้ว่าการแสดงออกของยีนจะลดลงแล้ว เอนไซม์ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นสามารถคงอยู่ได้หลายเดือน นั่นคือการสะสมวิตามินอีชนิดโทโคฟีรอลในรูปแบบต่างๆ เริ่มขึ้นที่เมล็ด 2 สัปดาห์หลังการติดผล

การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วย Folin-Ciocalteu reagent ใช้หลักการแตกตัวฟีนอลิกเป็นโปรตอนและไอออนลบ โดยในวิตามินอีจะเกิดการแตกตัวบริเวณวงแหวนอะโรมาติกจากหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) โดยปรีดิคซ์ Folin-Ciocalteu reagent ทำให้บริเวณ Mo^{6+} เปลี่ยนเป็น Mo^{5+} ซึ่งมีสีน้ำเงิน ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร (Munteanu และคณะ, 2021) การวิเคราะห์เทียบผลจากสารละลาย Gallic acid ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิกโครงสร้างอย่างง่าย สมการกราฟมาตรฐานของ Gallic acid ที่ได้คือ $y = 0.121x - 0.1774$ และมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9922 โดยในเมล็ดที่แกะจากฝักหลังการติดผล 2 สัปดาห์มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงที่สุดคือ 265.13 mgGAE/gDW ซึ่งสูงกว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในใบ ต่างจากการศึกษาของ (สุทธิจิต ศรีวัชรกุล, 2558) พบว่าเมื่อสกัดผักเสี้ยนด้วย 95% เอทานอล ปริมาณฟีนอลิกจากใบคือ 10.40 mgGAE/gDW สูงกว่าจากฝักคือ 8.54 mgGAE/gDW นอกจากนี้ปริมาณฟีนอลิกในใบที่สกัดด้วย 75% เมทานอลคือ 66.38

mgGAE/gDW (Gupta และคณะ, 2011) จะเห็นได้ว่าสารละลายที่ใช้ในการสกัดที่แตกต่างกันมีผลทำให้ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดที่ได้นั้นแตกต่างกันไปด้วย

เมื่อวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกของยีนต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด พบว่ายีนที่ควบคุมปฏิกิริยาขั้นกำหนดประเภทของวิตามินอีมีเพียงยีน CvVTE2 ที่ควบคุมการสังเคราะห์วิตามินอีประเภทโทโคฟีรอลมีความสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญที่ 0.05 ในขณะที่ยีน CvHST เกิดความสัมพันธ์เชิงลบ ผลการศึกษานี้สนับสนุนแนวโน้มการสะสมวิตามินอีประเภทโทโคฟีรอลในเมล็ดผักเสี้ยนผีเป็นไปตามการกำหนดของยีน CvVTE2

สรุปผลการวิจัย

ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ในการสังเคราะห์วิตามินอีจากผักเสี้ยนผี (*Cleome viscosa*: Cv) ได้แก่ CvVTE1 CvVTE2 CvVTE3 CvVTE4 CvHPPD และ CvHST มีความยาว 695 376 387 366 334 และ 461 คู่เบส ตามลำดับ

รูปแบบการแสดงออกของยีนที่มีคุณสมบัติในการควบคุมการสังเคราะห์วิตามินอีของใบผักเสี้ยนผีมีระดับลดต่ำลงเมื่อใบมีอายุมากขึ้น ยกเว้นยีน CvHPPD มีระดับการแสดงออกสูงที่สุดในระยะ L3

รูปแบบการแสดงออกของยีนที่มีคุณสมบัติในการควบคุมการสังเคราะห์วิตามินอีของผักเสี้ยนผีแบ่งเป็น 3 รูปแบบ คือ รูปแบบการแสดงออกสูงช่วงกลางของการเจริญเติบโต (CvVTE1 CvVTE2 และ CvVTE3) รูปแบบการแสดงออกสูงช่วงท้ายของการเจริญเติบโต (CvVTE4 และ CvHPPD) และรูปแบบการแสดงออกที่ต่ำอย่างคงที่ทุกระยะ (CvHST)

ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของใบระยะ L1 L2 และ L3 เป็น 56.23 116.23 116.79 mgGAE/gDW ตามลำดับ และของเมล็ดระยะ S1 S2 S3 และ S4 เป็น 87.29 265.13 193.82 133.03 mgGAE/gDW ตามลำดับ ซึ่งมีความสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญที่ 0.05 กับยีน VTE2

บรรณานุกรม

- สุทธิจิต ศรีวัชรกุล. (2558). รายงานฉบับสมบูรณ์: การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากส่วนต่าง ๆ ของผักเสี้ยนผีที่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียบางชนิดและคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง.
- สุรัชย์ มัจฉาชีพ. (2538). วัชพืชในประเทศไทย กรุงเทพฯ : แพรวพิทยา.
- วงศ์สถิตย์ ฉั่วกุล, พร้อมจิต ศรีลัมพ์, วิจิต เปานิล, & รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล. (2539). สมุนไพรพื้นบ้านล้านนา. ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์คณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล: อมรินทร์พริ้นติ้ง แอนด์พับลิชชิ่ง.
- โอภา วัชรคุปต์, ปรีชา บุญจุง, บุญยรัตน์, จ., & อัดดีสินทอง, แ. (2550). สารต้านอนุมูลอิสระ กรุงเทพฯ: นิวไทยมิตรการพิมพ์.
- Alagna, F., D'Agostino, N., Torchia, L., Servili, M., Rao, R., Pietrella, M., . . . Perrotta, G. (2009). Comparative 454 pyrosequencing of transcripts from two olive genotypes during fruit development. *BMC Genomics*, *10*(1), 399. doi: 10.1186/1471-2164-10-399
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, *215*(3), 403-410. doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- CABI, U. (2019). *CABI Compendium: Status inferred from regional distribution*. Wallingford, UK: CABI.
- Cahoon, E. B., Coughlan, S.J., Cahoon, R.E. and Butler, K.H. . (2006). Compositions and methods for altering tocotrienol content. . *United States Patent Application*, *7*, 154-029.
- Cahoon, E. B., Hall, S. E., Ripp, K. G., Ganzke, T. S., Hitz, W. D., & Coughlan, S. J. (2003). Metabolic redesign of vitamin E biosynthesis in plants for tocotrienol production and increased antioxidant content. *Nat Biotechnol*, *21*(9), 1082-1087. doi: 10.1038/nbt853
- Chao, Y., Kang, J., Zhang, T., Yang, Q., Gruber, M. Y., & Sun, Y. (2014). Disruption of the Homogentisate Solanesyltransferase Gene Results in Albino and Dwarf Phenotypes and Root, Trichome and Stomata Defects in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS ONE*, *9*(4), e94031. doi: 10.1371/journal.pone.0094031

- Chaw, S. M., Chang, C. C., Chen, H. L., & Li, W. H. (2004). Dating the monocot-dicot divergence and the origin of core eudicots using whole chloroplast genomes. *J Mol Evol*, *58*(4), 424-441. doi: 10.1007/s00239-003-2564-9
- Collakova, E., & DellaPenna, D. (2003). Homogentisate Phytlytransferase Activity Is Limiting for Tocopherol Biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *131*(2), 632. doi: 10.1104/pp.015222
- Dangl, J. L., Dietrich, R. A. and Thomas, H. (2000). Senescence and programmed cell death. In: Biochemistry & Molecular Biology of Plants (Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL eds.). *American Society of Plant Physiologists*, Rockville 1044-1100.
- Dörmann, P. (2003). Corn with enhanced antioxidant potential. *Nat Biotechnol*, *21*(9), 1015-1016. doi: 10.1038/nbt0903-1015
- Falk, J., & Munné-Bosch, S. (2010). Tocochromanol functions in plants: antioxidation and beyond. *Journal of Experimental Botany*, *61*(6), 1549-1566. doi: 10.1093/jxb/erq030
- Flora of China Editorial Committee. (2015). Flora of China. St. Louis, Missouri and Cambridge, Massachusetts, USA: Missouri Botanical Garden and Harvard University Herbaria. http://www.efloras.org/flora_page.aspx?flora_id=2.
- Georgiadou, E. C., Ntourou, T., Goulas, V., Manganaris, G. A., Kalaitzis, P., & Fotopoulos, V. (2015). Temporal analysis reveals a key role for VTE5 in vitamin E biosynthesis in olive fruit during on-tree development. *Frontiers in plant science*, *6*, 871. doi: 10.3389/fpls.2015.00871
- Gupta, P., Sharma, N., & Rao, C. (2011). Comparison of the antioxidant activity and total phenolic, flavonoid content of aerial part of *Cleome viscosa* L. *International Journal of Phytomedicine*, *3*, 386-391.
- Gutierrez-Gonzalez, J. J., & Garvin, D. F. (2016). Subgenome-specific assembly of vitamin E biosynthesis genes and expression patterns during seed development provide insight into the evolution of oat genome. *Plant Biotechnol J*, *14*(11), 2147-2157. doi: 10.1111/pbi.12571
- Hunter, S., & Cahoon, E. (2007). Enhancing Vitamin E in Oilseeds: Unraveling Tocopherol and Tocotrienol Biosynthesis. *Lipids*, *42*, 97-108. doi: 10.1007/s11745-007-3028-6

- Iltis, H. (2009). Studies in the Cleomaceae V: A New Genus and Ten New Combinations for the Flora of North America. *Novon: A Journal for Botanical Nomenclature*, 17, 447-451. doi: 10.3417/1055-3177(2007)17[447:SITCVA]2.0.CO;2
- Ischebeck, T., Zbierzak, A. M., Kanwischer, M., & Dörmann, P. (2006). A salvage pathway for phytol metabolism in Arabidopsis. *J Biol Chem*, 281(5), 2470-2477. doi: 10.1074/jbc.M509222200
- Kamal-Eldin, A., & Appelqvist, L. A. (1996). The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31(7), 671-701. doi: 10.1007/bf02522884
- Karunanandaa, B., Qi, Q., Hao, M., Baszis, S. R., Jensen, P. K., Wong, Y.-H. H., . . . Valentin, H. E. (2005). Metabolically engineered oilseed crops with enhanced seed tocopherol. *Metabolic Engineering*, 7(5), 384-400. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2005.05.005>
- Kong, S. L., Abdullah, S. N. A., Ho, C. L., & Amiruddin, M. D. (2016). Molecular cloning, gene expression profiling and in silico sequence analysis of vitamin E biosynthetic genes from the oil palm. *Plant Gene*, 5, 100-108. doi: <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2016.01.003>
- Kumar, R., Raclaru, M., Schüßeler, T., Gruber, J., Sadre, R., Lühs, W., . . . Weier, D. (2005). Characterisation of plant tocopherol cyclases and their overexpression in transgenic Brassica napus seeds. *FEBS Letters*, 579(6), 1357-1364. doi: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.01.030>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol*, 35(6), 1547-1549. doi: 10.1093/molbev/msy096
- Kumari, R., Tyagi, A., Sharma, V., Jain, V. K., & Kumar, S. (2012). Variability in the accessions from Aravali range assessed for domestication of the Cleomaceae biodiesel plant *Cleome viscosa* Linn. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 3, 246-255.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., . . . Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947-2948. doi: 10.1093/bioinformatics/btm404

- Liu, L., Jin, C., & Zhang, Y. (2014). Lipophilic phenolic compounds (Lipo-PCs): Emerging antioxidants applied in lipid systems. *RSC Advances*, 4, 2879-2891. doi: 10.1039/c3ra44792h
- Mène-Saffrané, L. (2017). Vitamin E Biosynthesis and Its Regulation in Plants. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 7(1), 2. doi: 10.3390/antiox7010002
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021). Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. 22(7). doi: 10.3390/ijms22073380
- Paliyath, G., & Droillard, M. (1992). The mechanisms of membrane deterioration and disassembly during senescence. *Plant Physiology and Biochemistry*, 30, 789-812.
- Pillai, L., & Nair, B. (2013). Proximate composition, mineral elements and anti-nutritional factors in *Cleome viscosa* L. and *Cleome burmanni* W. & A. (Cleomaceae). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5, 384-387.
- Raclaru, M., Gruber, J., Kumar, R., Sadre, R., Lühs, W., Zarhloul, M., . . . Weier, D. (2006). Increase of the tocopherol content in transgenic *Brassica napus* seeds by overexpression of key enzymes involved in prenylquinone biosynthesis. *Molecular Breeding*, 18, 93-107. doi: 10.1007/s11032-006-9014-5
- Ren, W., Zhao, L., Zhang, L., Wang, Y., Cui, L., Tang, Y., . . . Tang, K. (2011). Molecular cloning and characterization of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase gene from *Lactuca sativa*. *J Plant Physiol*, 168(10), 1076-1083. doi: 10.1016/j.jplph.2010.12.017
- Singh, R. K., Ali, S. A., Nath, P., & Sane, V. A. (2011). Activation of ethylene-responsive p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase leads to increased tocopherol levels during ripening in mango. *J Exp Bot*, 62(10), 3375-3385. doi: 10.1093/jxb/err006
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent *Methods in Enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178): Academic Press.
- Valentin, H. E., Lincoln, K., Moshiri, F., Jensen, P. K., Qi, Q., Venkatesh, T. V., . . . Last, R. L. (2006). The *Arabidopsis* vitamin E pathway gene5-1 mutant reveals a critical role for phytyl kinase in seed tocopherol biosynthesis. *Plant Cell*, 18(1), 212-224. doi: 10.1105/tpc.105.037077

- Van Eenennaam, A. L., Lincoln, K., Durrett, T. P., Valentin, H. E., Shewmaker, C. K., Thorne, G. M., . . . Last, R. L. (2003). Engineering vitamin E content: from Arabidopsis mutant to soy oil. *Plant Cell*, *15*(12), 3007-3019. doi: 10.1105/tpc.015875
- Velioglu, Y., Mazza, G., Gao, L., & Oomah, B. D. (1998). Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 4113-4117. doi: 10.1021/jf9801973
- Venkatesh, T. V., Karunanandaa, B., Free, D. L., Rottnek, J. M., Baszis, S. R., & Valentin, H. E. (2006). Identification and characterization of an Arabidopsis homogentisate phytyltransferase paralog. *Planta*, *223*(6), 1134-1144. doi: 10.1007/s00425-005-0180-1
- Verwoerd, T. C., Dekker, B. M., & Hoekema, A. (1989). A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic acids research*, *17*(6), 2362-2362. doi: 10.1093/nar/17.6.2362
- Wilfinger, W. W., Mackey, K., & Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques*, *22*(3), 474-476, 478-481. doi: 10.2144/97223st01
- Yusuf, M. A., & Sarin, N. B. (2007). Antioxidant value addition in human diets: genetic transformation of Brassica juncea with gamma-TMT gene for increased alpha-tocopherol content. *Transgenic Res*, *16*(1), 109-113. doi: 10.1007/s11248-006-9028-0



ภาคผนวก ก

แสดงชนิดของพืชต้นแบบที่นำมาออกแบบไพรเมอร์ชุดที่ 1

ภาคผนวก ก

แสดงชนิดของพืชต้นแบบที่นำมาออกแบบไพรเมอร์ชุดที่ 1

ยีน VTE1

<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_119430.5
<i>Arabidopsis lyrata subsp. lyrata</i>	XM_021019223.1
<i>Capsella rubella</i>	XM_006283478.2
<i>Camelina sativa</i>	XM_010434366.2
<i>Eutrema salsugineum</i>	XM_006412370.2
<i>Raphanus sativus</i>	XM_018624820.1
<i>Brassica oleracea var. oleracea</i>	XM_013738149.1
<i>Brassica napus</i>	XM_013851919.2
<i>Brassica rapa</i>	XM_009139895.3
<i>Vitis riparia</i>	XM_034827541.1
<i>Citrus clementina</i>	XM_024177527.1
<i>Citrus sinensis</i>	XM_006475999.3
<i>Carica papaya</i>	XM_022052128.1

VTE2

<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_179653.4
<i>Solanum tuberosum</i>	HM217350.1
<i>Capsella rubella</i>	XM_006297790.2
<i>Camelina sativa</i>	XM_010469432.2
<i>Eutrema salsugineum</i>	XM_006409032.2
<i>Brassica rapa</i>	XM_033275508.1
<i>Brassica napus</i>	XM_013797304.2
<i>Raphanus sativus</i>	XM_018579500.1
<i>Brassica oleracea var. oleracea</i>	XM_013738460.1
<i>Tarenaya hassleriana</i>	XM_010550310.2
<i>Citrus sinensis</i>	XM_006474143.3
<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>	XM_011464034.1

Prunus dulcis XM_034344700.1

VTE3

Arabidopsis thaliana AK316671.1
Arabidopsis lyrata subsp. lyrata XM_002878470.2
Eutrema salsugineum XM_006402217.2
Camelina sativa XM_019227270.1
Capsella rubella XM_006291384.2
Brassica rapa XM_009106166.3
Brassica napus XM_022711665.1
Brassica oleracea var. oleracea XM_013737058.1
Raphanus sativus XM_018591319.1
Arachis hypogaea XM_025787246.2
Arachis duranensis XM_016093057.2
Noccaea caerulescens AY486009.1
Glycine max XM_003519110.4
Prunus dulcis XM_034373423.1

VTE4

Arabidopsis thaliana NM_105171.3
Camelina sativa XM_010483756.2
Capsella rubella XM_006302430.2
Camelina sativa XM_010441080.2
Brassica rapa XM_009129127.3
Brassica oleracea var. oleracea XM_013757122.1
Brassica juncea DQ864978.1
Eutrema salsugineum XM_006391517.2
Brassica rapa XM_033284271.1
Brassica napus NM_001316229.1
Raphanus sativus XM_018588854.1
Juglans regia XM_018982095.2

Nicotiana tomentosiformis XM_009621391.3

HPPD

Arabidopsis thaliana NM_100536.4
Capsella rubella XM_006307445.2
Camelina sativa XM_010488048.2
Eutrema salsugineum XM_006417838.2
Capsella bursa-pastoris KJ725151.1
Raphanus sativus XM_018637977.1
Brassica rapa XM_009120801.3
Brassica napus XM_013840187.2
Brassica rapa XM_009120285.3
Brassica oleracea var. oleracea XM_013747994.1
Raphanus sativus LR778313.1
Arabis alpina LT669788.1
Tarenaya hassleriana XM_010544411.2
Raphanus sativus LR778316.1

HST

Arabidopsis thaliana NM_001084669.2
Arabidopsis lyrata subsp. lyrata XM_002884828.2
Capsella rubella XM_006297706.2
Camelina sativa XM_010500000.2
Brassica napus XM_013855704.2
Eutrema salsugineum XM_006407328.2
Brassica rapa XM_033291524.1
Raphanus sativus XM_018631216.1
Brassica oleracea var. oleracea XM_013731362.1
Raphanus sativus XM_018635556.1
Tarenaya hassleriana XM_010521695.1
Pistacia vera XM_031426644.1

Hypseocharis bilobata

KM461325.1

Gossypium hirsutum

XM_016815946.1



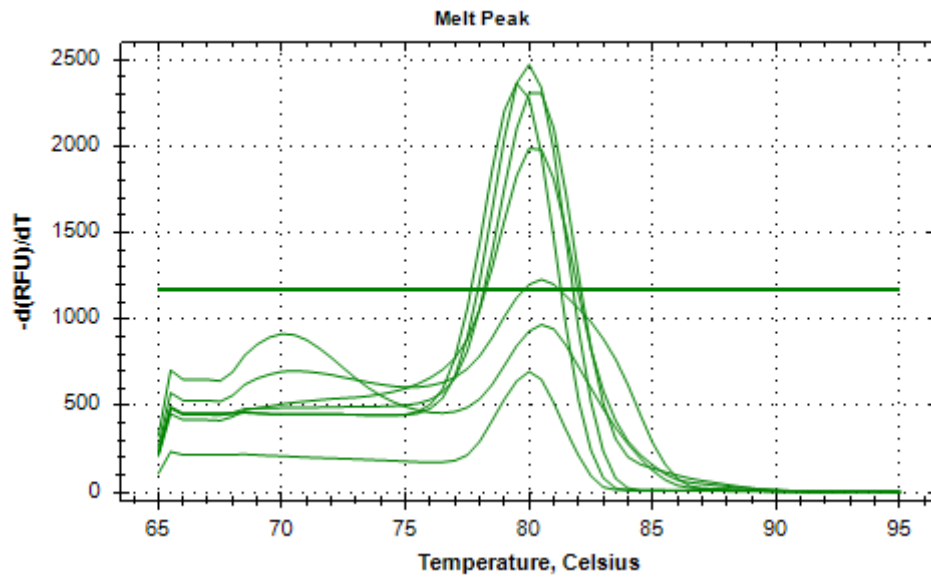


ภาคผนวก ข

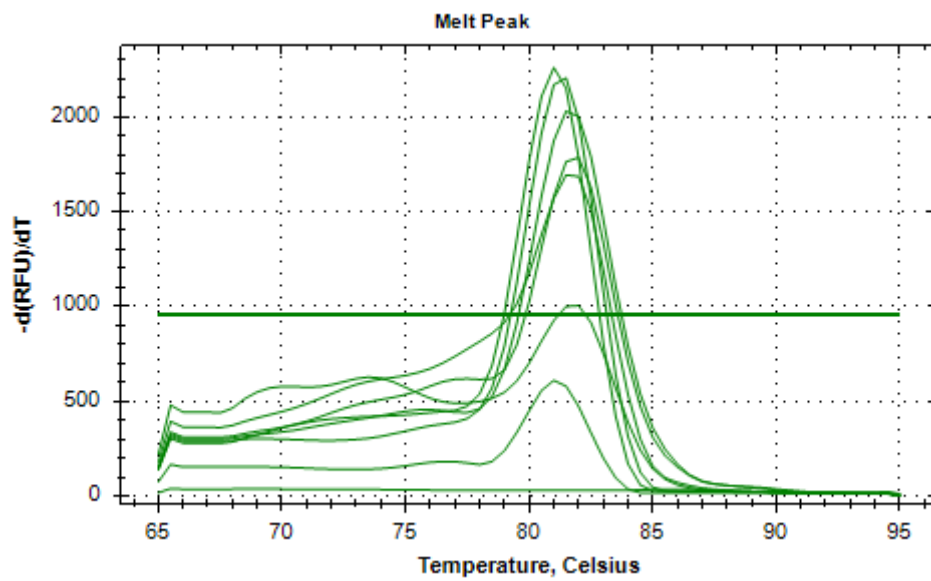
การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Quantitative PCR (qPCR)

ภาคผนวก ข

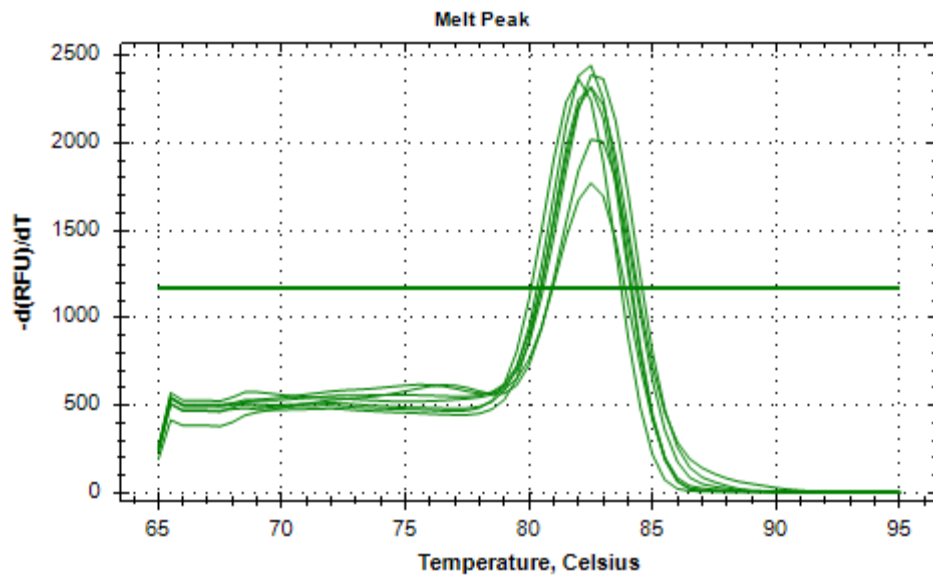
การแสดงผลของยีนด้วยเทคนิค Quantitative PCR (qPCR)



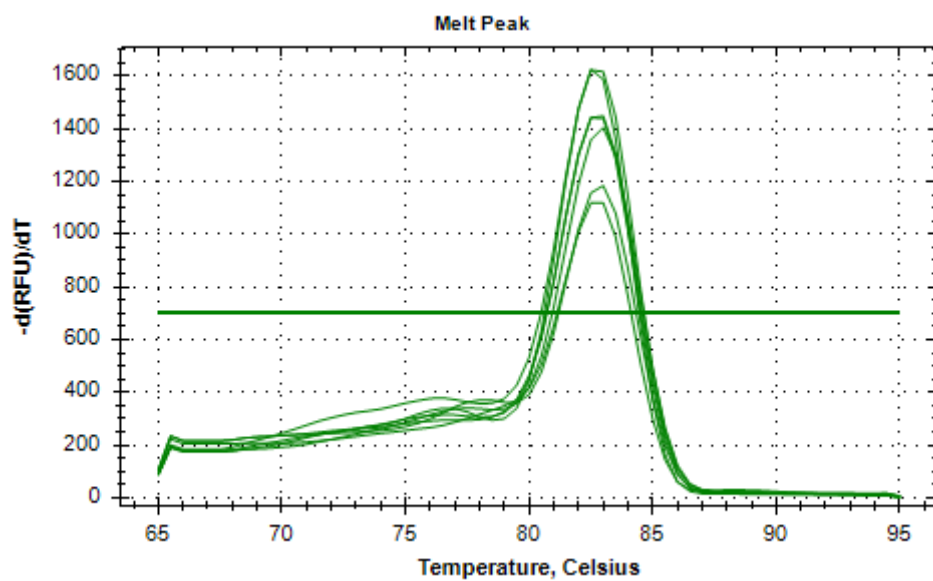
ภาพ 27 Melt peak ของการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ qVTE1_F และ qVTE1_R



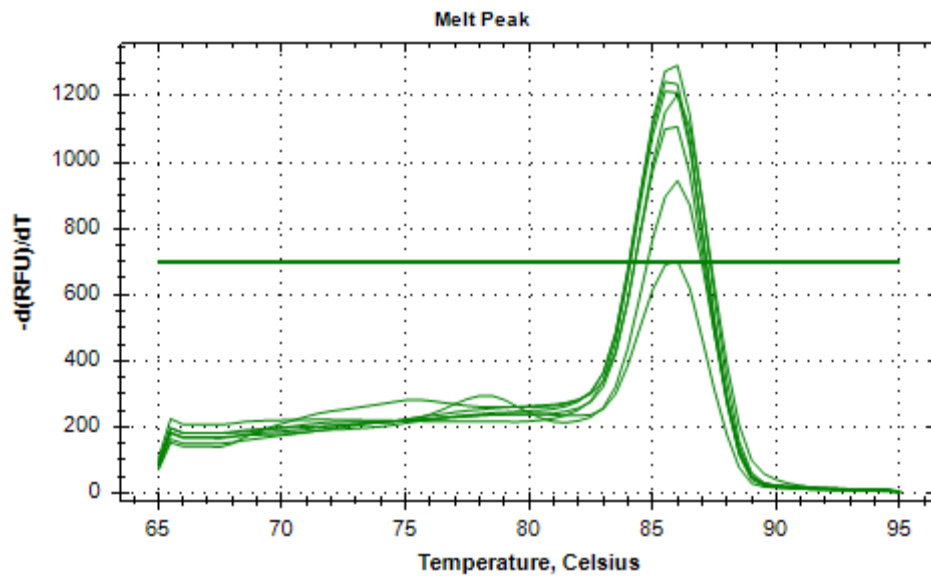
ภาพ 28 Melt peak ของการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ qVTE2_F และ qVTE2_R



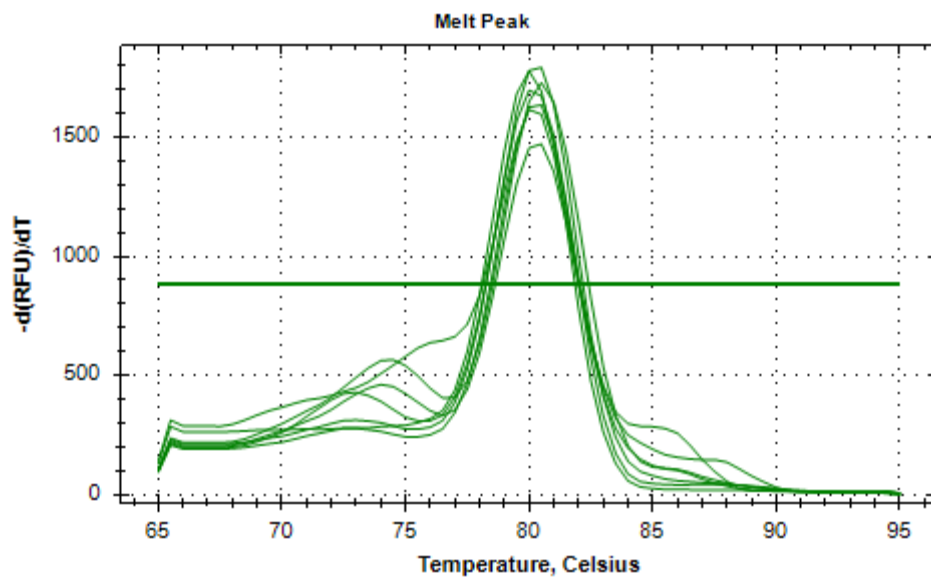
ภาพ 29 Melt peak ของการเพิ่มปริมาณด้วยไพโรเมอร์ qVTE3_F และ qVTE3_R



ภาพ 30 Melt peak ของการเพิ่มปริมาณด้วยไพโรเมอร์ qVTE4_F และ qVTE4_R



ภาพ 31 Melt peak ของการเพิ่มปริมาณด้วยไพโรเมอร์ qHPPD_F และ qHPPD_R



ภาพ 32 Melt peak ของการเพิ่มปริมาณด้วยไพโรเมอร์ qHST_F และ qHST_R



ภาคผนวก ค

ผลการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ระหว่างระดับการแสดงออกของยีนใน
ตัวอย่างใบ 3 ระยะ

ภาคผนวก ค

ผลการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ระหว่างระดับการแสดงออกของยีนในตัวอย่างใบ

3 ระยะ

ตาราง 19 ผลการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ของระดับการแสดงออกของยีน

CvVTE1 ในตัวอย่างใบ 3 ระยะ

Dependent Variable:CvVTE1

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Dunnett T3	L1	L2	.467*	.096	.041	.03	.90
		L3	.727*	.097	.011	.30	1.15
	L2	L1	-.467*	.096	.041	-.90	-.03
		L3	.260*	.062	.035	.03	.49
	L3	L1	-.727*	.097	.011	-1.15	-.30
		L2	-.260*	.062	.035	-.49	-.03

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตาราง 20 ผลการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ของระดับการแสดงออกของยีน
CvVTE2 ในตัวอย่างใบ 3 ระยะ

Dependent Variable:CvVTE2

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Dunnett T3	L1	L2	.605	.224	.131	-.24	1.45
		L3	.691	.158	.097	-.28	1.67
	L2	L1	-.605	.224	.131	-1.45	.24
		L3	.086	.161	.926	-.91	1.08
	L3	L1	-.691	.158	.097	-1.67	.28
		L2	-.086	.161	.926	-1.08	.91

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



ตาราง 21 ผลการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ของระดับการแสดงออกของยีน
CvVTE3 ในตัวอย่างใบ 3 ระยะ

Dependent Variable:CvVTE3

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Dunnett T3	L1	L2	-.499	.093	.059	-1.04	.04
		L3	.252	.061	.086	-.07	.57
	L2	L1	.499	.093	.059	-.04	1.04
		L3	.751*	.108	.010	.31	1.19
	L3	L1	-.252	.061	.086	-.57	.07
		L2	-.751*	.108	.010	-1.19	-.31

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



ตาราง 22 ผลการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ของระดับการแสดงออกของยีน
CvVTE4 ในตัวอย่างใบ 3 ระยะ

Dependent Variable:CvVTE4

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Dunnett T3	L1	L2	.133	.154	.782	-.57	.83
		L3	-.075	.190	.968	-.79	.64
	L2	L1	-.133	.154	.782	-.83	.57
		L3	-.208	.146	.504	-.86	.44
	L3	L1	.075	.190	.968	-.64	.79
		L2	.208	.146	.504	-.44	.86

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตาราง 23 ผลการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ของระดับการแสดงออกของยีน
CvHPPD ในตัวอย่างใบ 3 ระยะ

Dependent Variable:CvHPPD

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Dunnett T3	L1	L2	.216	.134	.465	-.60	1.03
		L3	-.551	.112	.074	-1.22	.12
	L2	L1	-.216	.134	.465	-1.03	.60
		L3	-.767*	.172	.030	-1.42	-.11
	L3	L1	.551	.112	.074	-.12	1.22
		L2	.767*	.172	.030	.11	1.42

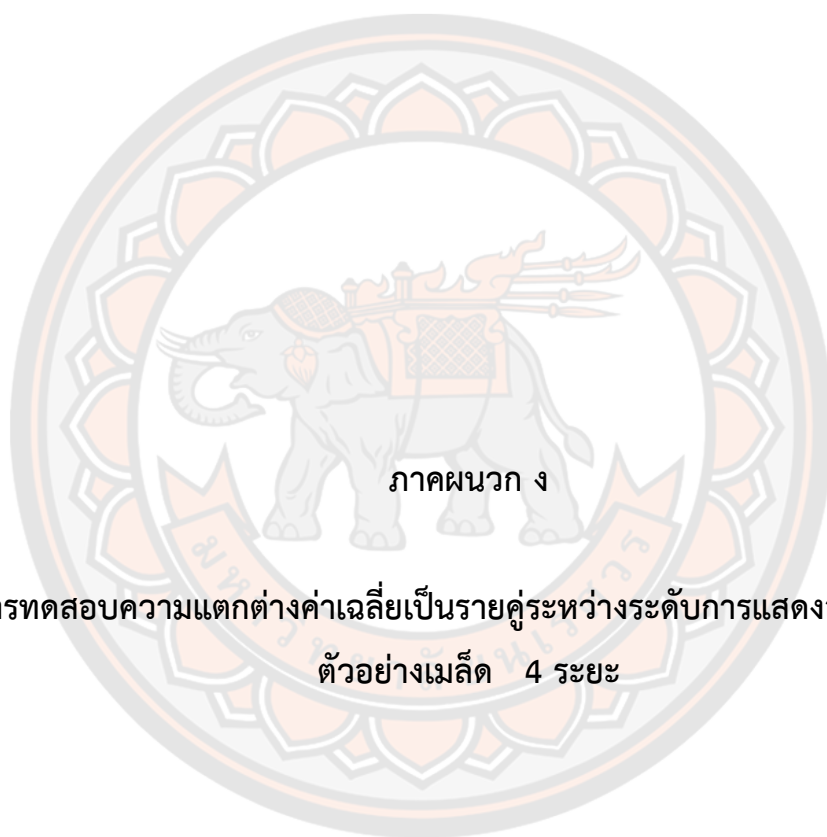
*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตาราง 24 ผลการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ของระดับการแสดงออกของยีน
CvHST ในตัวอย่างใบ 3 ระยะ

Dependent Variable:CvHST

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Dunnett T3	L1	L2	.101	.203	.938	-1.09	1.29
		L3	.599*	.049	.001	.41	.79
	L2	L1	-.101	.203	.938	-1.29	1.09
		L3	.498	.201	.257	-.72	1.72
	L3	L1	-.599*	.049	.001	-.79	-.41
		L2	-.498	.201	.257	-1.72	.72

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



ภาคผนวก ง

ผลการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ระหว่างระดับการแสดงออกของยีนใน
ตัวอย่างเมล็ด 4 ระยะ

ภาคผนวก ง

ผลการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ระหว่างระดับการแสดงออกของยีนในตัวอย่าง
เมล็ด 4 ระยะ

ตาราง 25 ผลการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ของระดับการแสดงออกของยีน
CvVTE1 ในตัวอย่างเมล็ด 3 ระยะ

Dependent Variable:CvVTE1

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Dunnett T3	S1	S2	-7.248*	.861	.041	-13.80	-.70
		S3	-26.869*	2.880	.034	-48.88	-4.86
		S4	-8.531*	.688	.019	-13.76	-3.30
	S2	S1	7.248*	.861	.041	.70	13.80
		S3	-19.621*	3.005	.048	-38.93	-.31
		S4	-1.283	1.101	.796	-6.22	3.65
	S3	S1	26.869*	2.880	.034	4.86	48.88
		S2	19.621*	3.005	.048	.31	38.93
		S4	18.338	2.960	.061	-1.77	38.45
	S4	S1	8.531*	.688	.019	3.30	13.76
		S2	1.283	1.101	.796	-3.65	6.22
		S3	-18.338	2.960	.061	-38.45	1.77

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตาราง 26 ผลการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ของระดับการแสดงออกของยีน CvVTE2
ในตัวอย่างเมล็ด 3 ระยะ

Dependent Variable:CvVTE2

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Dunnett T3	S1	S2	-234.701*	30.199	.048	-465.57	-3.83
		S3	-224.176*	14.047	.012	-331.54	-116.81
		S4	-9.405	3.266	.287	-34.23	15.42
	S2	S1	234.701*	30.199	.048	3.83	465.57
		S3	10.525	33.305	.999	-171.85	192.90
		S4	225.296	30.374	.050	-.83	451.43
	S3	S1	224.176*	14.047	.012	116.81	331.54
		S2	-10.525	33.305	.999	-192.90	171.85
		S4	214.771*	14.420	.009	116.26	313.28
	S4	S1	9.405	3.266	.287	-15.42	34.23
		S2	-225.296	30.374	.050	-451.43	.83
		S3	-214.771*	14.420	.009	-313.28	-116.26

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตาราง 27 ผลการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ของระดับการแสดงออกของยีน
CvVTE3 ในตัวอย่างเมล็ด 3 ระยะ

Dependent Variable:CvVTE3

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Dunnett T3	S1	S2	.124	.148	.920	-.98	1.23
		S3	-2.891*	.363	.020	-4.92	-.86
		S4	.049	.153	.999	-.95	1.04
	S2	S1	-.124	.148	.920	-1.23	.98
		S3	-3.015*	.332	.035	-5.54	-.49
		S4	-.075	.046	.583	-.34	.19
	S3	S1	2.891*	.363	.020	.86	4.92
		S2	3.015*	.332	.035	.49	5.54
		S4	2.940*	.334	.035	.48	5.40
	S4	S1	-.049	.153	.999	-1.04	.95
		S2	.075	.046	.583	-.19	.34
		S3	-2.940*	.334	.035	-5.40	-.48

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตาราง 28 ผลการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ของระดับการแสดงออกของยีน
CvVTE4 ในตัวอย่างเมล็ด 3 ระยะ

Dependent Variable:CvVTE4

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Dunnett T3	S1	S2	-1.231	.317	.093	-2.76	.30
		S3	-.605	.225	.212	-1.60	.39
		S4	-13.801*	.247	.000	-14.88	-12.72
	S2	S1	1.231	.317	.093	-.30	2.76
		S3	.626	.306	.413	-.93	2.19
		S4	-12.571*	.323	.000	-14.09	-11.05
	S3	S1	.605	.225	.212	-.39	1.60
		S2	-.626	.306	.413	-2.19	.93
		S4	-13.197*	.233	.000	-14.24	-12.16
	S4	S1	13.801*	.247	.000	12.72	14.88
		S2	12.571*	.323	.000	11.05	14.09
		S3	13.197*	.233	.000	12.16	14.24

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตาราง 29 ผลการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ของระดับการแสดงออกของยีน
CvHPPD ในตัวอย่างเมล็ด 3 ระยะ

Dependent Variable:CvHPPD

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Dunnett T3	S1	S2	-.390	.105	.089	-.86	.08
		S3	-6.102	.911	.062	-12.94	.74
		S4	-16.528	3.193	.104	-40.90	7.85
	S2	S1	.390	.105	.089	-.08	.86
		S3	-5.712	.910	.071	-12.59	1.16
		S4	-16.138	3.193	.109	-40.53	8.25
	S3	S1	6.102	.911	.062	-.74	12.94
		S2	5.712	.910	.071	-1.16	12.59
		S4	-10.425	3.319	.223	-32.05	11.20
	S4	S1	16.528	3.193	.104	-7.85	40.90
		S2	16.138	3.193	.109	-8.25	40.53
		S3	10.425	3.319	.223	-11.20	32.05

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

ตาราง 30 ผลการทดสอบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ของระดับการแสดงออกของยีน
CvHST ในตัวอย่างเมล็ด 3 ระยะ

Dependent Variable:CvHST

	(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Dunnett T3	S1	S2	-.016	.468	1.000	-3.29	3.26
		S3	.276	.469	.980	-2.98	3.53
		S4	.352	.464	.944	-3.01	3.71
	S2	S1	.016	.468	1.000	-3.26	3.29
		S3	.292	.136	.349	-.30	.89
		S4	.369	.118	.149	-.17	.90
	S3	S1	-.276	.469	.980	-3.53	2.98
		S2	-.292	.136	.349	-.89	.30
		S4	.076	.122	.979	-.48	.64
	S4	S1	-.352	.464	.944	-3.71	3.01
		S2	-.369	.118	.149	-.90	.17
		S3	-.076	.122	.979	-.64	.48

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



ภาคผนวก จ

ค่าดูดกลืนแสงสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

ภาคผนวก จ

ค่าดูดกลืนแสงสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic content)

ตาราง 31 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร ของสารละลายกรดแกลลิก

ความเข้มข้นแกลลิก	จำนวนซ้ำ			ค่าเฉลี่ย	SD
	1	2	3		
0 ppm	0.236	0.236	0.236	0.236	0
5 ppm	0.455	0.451	0.453	0.453	0.002
10 ppm	0.549	0.551	0.549	0.55	0.001
15 ppm	0.597	0.595	0.597	0.596	0.001
20 ppm	0.67	0.664	0.665	0.666	0.003
40 ppm	0.897	0.884	0.89	0.89	0.007
60 ppm	1.076	1.073	1.075	1.075	0.002
80 ppm	1.307	1.3	1.308	1.305	0.004
100 ppm	1.402	1.399	1.403	1.401	0.002

ตาราง 32 ค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร ของสารละลายสารสกัดหยาบ

ความเข้มข้นแกลลิก	จำนวนซ้ำ			ค่าเฉลี่ย	SD
	1	2	3		
Leaves-1	0.486	0.484	0.493	0.488	0.005
Leaves-2	0.644	0.641	0.647	0.644	0.003
Leaves-3	0.672	0.674	0.672	0.673	0.001
Seeds-1	0.586	0.543	0.594	0.574	0.027
Seeds-2	1.213	1.199	1.197	1.203	0.009
Seeds-3	1.261	1.272	1.269	1.267	0.006
Seeds-4	1.298	1.297	1.212	1.269	0.049

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-นามสกุล อัจฉราภรณ์ ใจเอื้อน
วัน เดือน ปี เกิด - - - -
ที่อยู่ปัจจุบัน
ตำแหน่งหน้าที่ปัจจุบัน กำลังศึกษา (วท.ม.) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ประวัติการศึกษา (วท.บ.) สาขาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

