

การระบุยีนในวิถีชีวสังเคราะห์เทอร์ปีนอยด์จากผลสบู่ดำ *Jatropha curcas* L.



นางสาวสุภา แก้วสุริวงษ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

IDENTIFICATION OF GENE(S) IN TERPENOID BIOSYNTHESIS PATHWAY FROM FRUITS OF
PHYSIC NUT *Jatropha curcas* L.

Miss Supha Kaeowsuriwong



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Genetics
Department of Botany
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2014
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การระบุยีนในวิถีชีวสังเคราะห์เทอร์ปีนอยด์จากผลสบูดำ <i>Jatropha curcas</i> L.
โดย	นางสาวสุภา แก้วสุริวงษ์
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณ์านุกูล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ต่อศักดิ์ สีลานันท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณ์านุกูล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศุภจิตรา ชัชวาลย์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.อัจฉริยา รั้งขีรุจี)

สุภา แก้วสุริวงษ์ : การระบุยีนในวิถีชีวสังเคราะห์เทอร์พีนอยด์จากผลสบู่ดำ *Jatropha curcas* L. (IDENTIFICATION OF GENE(S) IN TERPENOID BIOSYNTHESIS PATHWAY FROM FRUITS OF PHYSIC NUT *Jatropha curcas* L.) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร.วรวิทย์ จุฬาลักษณ์นกุล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล, 112 หน้า.

วิถีชีวสังเคราะห์เทอร์พีนอยด์ในสบู่ดำ จัดเป็นวิถีที่มีบทบาทสำคัญในการสร้างสารในกลุ่ม ไดเทอร์พีนส์ (สารพอร์บอลเอสเทอร์) จากการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนและปริมาณสารพอร์บอลเอสเทอร์จากเนื้อผลและเนื้อในเมล็ดสบู่ดำทั้ง 5 ระยะ พบโปรตีน 1316 ชนิด ที่มีการแสดงออกในทุกตัวอย่าง มีโปรตีนอยู่ 2 ชนิด ที่สามารถระบุหน้าที่ได้ว่ามีความเกี่ยวข้องกับวิถีชีวสังเคราะห์เทอร์พีนอยด์ ได้แก่ Diphosphomevalonate decarboxylase และ Geranyl diphosphate synthase (GPPS) และจากการศึกษาปริมาณสารพอร์บอลเอสเทอร์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่ามีการสะสมสารพอร์บอลเอสเทอร์ไว้ในเนื้อผลและเนื้อในเมล็ดสูงสุดในระยะ Premature fruits โดยมีอยู่ 1.79 มิลลิกรัมต่อกรัม และ 5.30 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ขณะที่เนื้อผลระยะ Dried fruits มีการสะสมสารพอร์บอลเอสเทอร์ไว้น้อยสุด (0.13 มิลลิกรัมต่อกรัม) และเนื้อในเมล็ดระยะ Mature ripe fruits (yellow) มีการสะสมสารพอร์บอลเอสเทอร์ไว้น้อยสุด (2.36 มิลลิกรัมต่อกรัม)

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *Geranyl diphosphate synthase* (GPPS) ที่สร้างเอนไซม์ Geranyl diphosphate synthase ในเนื้อในเมล็ดแต่ละระยะพบว่าการแสดงออกไม่แตกต่างกันมาก จากการวิเคราะห์ด้วย Real-time PCR ซึ่งยีนมีการแสดงออกสูงสุด (0.67) ในระยะ Dried fruits ขณะที่โปรตีนมีการแสดงออกสูงสุด (21.43) ในระยะ Senescent fruits (black) และจากการเปรียบเทียบการแสดงออกระหว่างยีนและโปรตีน พบว่ามีแนวโน้มของความสัมพันธ์ไม่ได้เป็นไปในทิศทางเดียวกัน ทั้งนี้จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *Casbene synthase homolog* (CS) และ *Geranylgeranyl diphosphate synthase* (GGPPS) ซึ่งเป็นยีนที่เคยมีรายงานว่าสร้างสารพอร์บอลเอสเทอร์ พบว่ายีน CS มีการแสดงออกของยีนสูงกว่าการแสดงออกของยีน GGPPS และ GPPS ตามลำดับ

ภาควิชา	พฤกษศาสตร์	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก
ปีการศึกษา	2557	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5472140823 : MAJOR GENETICS

KEYWORDS:

SUPHA KAEOWSURIWONG: IDENTIFICATION OF GENE(S) IN TERPENOID BIOSYNTHESIS PATHWAY FROM FRUITS OF PHYSIC NUT *Jatropha curcas* L..
 ADVISOR: ASSOC. PROF. WARAWUT CHULALAKSANANUKUL, Ph.D., CO-ADVISOR: SITTIROK ROYTRAKUL, Ph.D., 112 pp.

Terpenoids biosynthesis pathway is the pathway to produce diterpene compound (Phorbol esters, PEs) in *Jatropha curcas* L.. In this study, proteins expression level and amount of PEs were studied from pulp and seed kernel in 5 developmental stages of fruits. Among 1316 proteins expressed in every samples, there were 2 proteins related to terpenoids biosynthesis pathway, diphosphomevalonate decarboxylase and geranyl diphosphate synthase (GPPS). From PEs testing used HPLC analysis, the results showed that the highest PEs accumulation of pulp and seed kernel were 1.79 mg/g and 5.30 mg/g, respectively in premature fruits stage. Whereas, accumulation of PEs in pulp was lowest (0.13 mg/g) in dried fruits stage and seed kernel was lowest (2.36 mg/g) in mature ripe fruits (yellow) stage.

In this study, the *geranyl diphosphate synthase (GPPS)* gene expression level that transcript encoding for GPPS in seed kernel was slightly different when evaluated by Real-time PCR. The gene expression was highest (0.67) in dried fruits stage, whereas the protein expression was highest (21.43) in senescent fruits (black) stage. By comparing, the expression level of gene was not related to the protein expression level. Otherwise, the expression level of *Casbene synthase homolog (CS)* and *Geranylgeranyl diphosphate synthase (GGPPS)* that reported to produce PEs compound. The CS was observed and the result was showed that the gene expression is higher than GGPPS and GPPS, respectively.

Department: Botany

Field of Study: Genetics

Academic Year: 2014

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีด้วยความสนับสนุน และความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ ดร. วรวิทย์ จุฬาลักษณ์านุกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ที่กรุณาสละเวลาให้คำแนะนำแนวทางการทำวิจัย ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ และคำปรึกษา ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ด้วยความเอาใจใส่เสมอมา

กราบขอบพระคุณ ดร. สิทธิรักษ์ รอยตระกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาสละเวลาให้คำแนะนำ คำปรึกษา ข้อคิดเห็นและความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ในการทำวิจัย ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ด้วยความเอาใจใส่เสมอมา

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ต่อศักดิ์ สีลานันท์ ที่กรุณามาเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ รองศาสตราจารย์ ดร. ศุภจิตรา ชัชวาลย์ และรองศาสตราจารย์ ดร. อัจฉริยา รั้งศิริจิ ที่กรุณาสละเวลามาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ พร้อมให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นในการปรับปรุงวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ สาขาหลักสูตรพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ สำหรับความช่วยเหลือเงินทุนสนับสนุนเพื่อการตีพิมพ์เผยแพร่งานวิจัย

ขอขอบคุณ สถาบันจีโนม ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่างๆ ตลอดจนการทำวิจัย รวมถึงพี่ๆ ที่สถาบันฯ ที่ให้คำแนะนำและคำปรึกษาที่ดีเสมอมา

ขอขอบคุณ หน่วยปฏิบัติการวิจัยการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่างๆ ในการทำวิจัย ตลอดจนน้องๆ ทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือให้คำปรึกษาและเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

ท้ายสุดนี้ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และสมาชิกในครอบครัวทุกคนที่ให้การสนับสนุน ให้ความรัก ความเอาใจใส่ คอยให้กำลังใจและคำปรึกษาดีๆ แก่ข้าพเจ้ามาโดยตลอด

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ลักษณะทั่วไปของสบู่ดำ	3
2.2 การใช้ประโยชน์จากสบู่ดำ	4
2.3 สารต้านอนุมูลอิสระและสารพิษที่พบในสบู่ดำ.....	7
2.4 สารฟอร์บอลเอสเทอร์.....	9
2.5 ผลของสารฟอร์บอลเอสเทอร์ต่อสิ่งมีชีวิต.....	13
2.6 การแยกสารฟอร์บอลเอสเทอร์.....	15
2.7 วิธีชีวสังเคราะห์เทอร์พีนอยด์ (Terpenoid biosynthesis pathway)	17
2.8 วิธีชีวสังเคราะห์ไดเทอร์พีนส์ (Diterpene biosynthesis pathway).....	19
2.9 วิธีชีวสังเคราะห์สารฟอร์บอลเอสเทอร์ (Phorbol esters biosynthesis pathway)	21
2.10 การศึกษาทางด้านโปรตีโอมิกส์	21

2.11 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารพอร์บอลเอสเทอร์.....	22
2.12 การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Real-time PCR	24
2.13 ยีน housekeeping: <i>Ubiquitin (UBQ)</i>	24
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	26
3.1 วัสดุอุปกรณ์.....	26
3.2 สารเคมี.....	27
3.3 การเตรียมตัวอย่างผลสบูตาระยะต่างๆ.....	29
3.4 การศึกษาระดับการแสดงออกของโปรตีนด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์	30
3.4.1 การสกัดโปรตีนรวม	30
3.4.2 การแยกโมเลกุลโปรตีนโปรตีนด้วย Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE gel).....	31
3.4.3 การระบุโปรตีนด้วยเครื่องแยกสารและวิเคราะห์มวลสาร (Liquid chromatography mass spectrometry/ mass spectrometry, LC-MS/MS)....	32
3.4.4 การประมวลผลข้อมูลโมเลกุลเพปไทด์	34
3.4.5 การระบุชนิดและหน้าที่ของโปรตีน	35
3.5 ศึกษาการแยกและวิเคราะห์ปริมาณสารพอร์บอลเอสเทอร์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟี ของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC).....	35
3.5.1 การเตรียมตัวอย่างและการสกัดสารพอร์บอลเอสเทอร์ด้วยวิธี Soxhlet extraction	35
3.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารพอร์บอลเอสเทอร์ด้วยเครื่อง HPLC	36
3.6 หาความสัมพันธ์เพื่อนำไปสู่การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการชีว สังเคราะห์สารกลุ่มไดเทอร์พินส์.....	36
3.7 การตรวจสอบและติดตามการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการชีวสังเคราะห์สารกลุ่ม ไดเทอร์พินส์ด้วยเทคนิค Real-time PCR	37

3.7.1 การเตรียมตัวอย่างและการสกัดอาร์เอ็นเอจากสบู่น้ำ.....	37
3.7.2 การสังเคราะห์ cDNA.....	39
3.7.3 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมชิ้นยีน เป้าหมาย	39
3.7.4 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมชิ้นส่วนยีนเป้าหมาย	40
3.7.5 การตรวจสอบชิ้นส่วนยีนเป้าหมาย	41
3.7.6 การโคลนยีนและการคัดเลือก recombinant plasmid.....	41
3.7.7 การตรวจสอบผลการโคลนยีน	43
3.7.8 การสกัดแยก recombinant plasmid	44
3.7.9 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Real-time PCR.....	44
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	47
4.1 ระดับการแสดงออกของโปรตีนจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์.....	47
4.2 การแยกและวิเคราะห์ปริมาณสารฟอรับอลเอสเทอร์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลว แบบสมรรถนะสูง (HPLC)	60
4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนและปริมาณสารเพื่อนำไปสู่การศึกษาการแสดงออกของยีนที่ เกี่ยวข้องกับการชีวสังเคราะห์สารในกลุ่มไดเทอร์พินส์.....	61
4.4 ตรวจสอบและติดตามการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการชีวสังเคราะห์สารกลุ่มได เทอร์พินส์ ด้วยเทคนิค Real-time PCR.....	64
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	78
5.1 ระดับการแสดงออกของโปรตีนจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์.....	78
5.2 ปริมาณสารฟอรับอลเอสเทอร์จากตัวอย่างเนื้อเยื่อสบู่น้ำ.....	78
5.3 โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการชีวสังเคราะห์สารในกลุ่มไดเทอร์พินส์.....	79
5.4 การตรวจสอบและติดตามการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการชีวสังเคราะห์สารใน กลุ่มไดเทอร์พินส์	80

ญ

หน้า

รายการอ้างอิง	82
ภาคผนวก.....	88
ภาคผนวก ก	89
ภาคผนวก ข	93
ภาคผนวก ค	103
ภาคผนวก ง.....	109
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	112



สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันสบู่ดำเทียบกับน้ำมันพืชชนิดต่างๆ	6
ตารางที่ 2.2 การใช้ประโยชน์ทางยาจากสบู่ดำ.....	7
ตารางที่ 2.3 สารเคมีที่แยกได้จากส่วนต่างๆ ของสบู่ดำ.....	14
ตารางที่ 2.4 ปริมาณสารฟอร์บอลเอสเทอร์ที่แยกได้จากส่วนต่างๆ ของสบู่ดำ	15
ตารางที่ 2.5 ปริมาณสารฟอร์บอลเอสเทอร์ที่แยกได้จากน้ำมันที่มาจากประเทศต่างๆ	17
ตารางที่ 3.1 ลักษณะพัฒนาการทางสัณฐานวิทยาของผลสบู่ดำทั้ง 5 ระยะ	30
ตารางที่ 3.2 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์ cDNA ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม	39
ตารางที่ 3.3 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มการปริมาณสารพันธุกรรม ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม	40
ตารางที่ 3.4 องค์ประกอบของสารสำหรับปฏิกิริยาการเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนเป้าหมายเข้าสู่เวกเตอร์	43
ตารางที่ 3.5 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตั้งค่าการทำงานของเครื่อง Real-time PCR.....	45
ตารางที่ 4.1 ความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้จากตัวอย่างเนื้อเยื่อสบู่ดำทั้ง 2 ชนิด จากการวัด 3 ครั้งต่อตัวอย่างแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย (mean±SD).....	48
ตารางที่ 4.2 โปรตีนบางส่วนจากทั้งหมด 1316 ชนิด ที่พบการแสดงออกในเนื้อผลและเนื้อในเมล็ดสบู่ดำ ทุกๆ ระยะพัฒนาการของผล	52
ตารางที่ 4.3 ปริมาณสารฟอร์บอลเอสเทอร์ชนิด DHPB ที่แยกได้จากตัวอย่างเนื้อเยื่อสบู่ดำทั้ง 2 ชนิด จากการวัด 3 ครั้งต่อตัวอย่างแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย (mean±SD).....	61
ตารางที่ 4.4 ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างเนื้อผลและเนื้อในเมล็ดสบู่ดำ	65
ตารางที่ 4.5 โปรแกรมสำหรับใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมขึ้นยีนเป้าหมาย ที่ออกแบบโดยใช้โปรแกรม Primer-BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)	68
ตารางที่ 4.6 ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเป้าหมาย 4 ชนิด เทียบกับลำดับ	72

สารบัญภาพ

ภาพที่ 2.1 ลักษณะทั่วไปของสปู่ดำ.....	4
ภาพที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของสารทิกเลน	10
ภาพที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของสารฟอร์บออล (12-hydroxy-16-hydroxyphorbol)	10
ภาพที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของสารฟอร์บออลเอสเทอร์ จากเมล็ดสปู่ดำ.....	12
ภาพที่ 2.5 วิธีชีวสังเคราะห์ไอโซพรีนอยด์ในเซลล์พืช.....	18
ภาพที่ 2.6 โครงสร้างทางเคมีของไอโซพรีนส์	19
ภาพที่ 2.7 วิธีชีวสังเคราะห์ไดเทอร์พินอยด์.....	20
ภาพที่ 2.8 โครงสร้างทางเคมีของสารในกลุ่มไดเทอร์พินส์.....	21
ภาพที่ 3.1 โปรตีนจากตัวอย่างเนื้อผลและเนื้อในเมล็ดที่แยกได้ด้วย 12.5% SDS-PAGE gel.....	33
ภาพที่ 3.2 แผนที่เอ็นไซม์ตัดจำเพาะของเวกเตอร์ pTZ57R/T (Fermentas).....	42
ภาพที่ 3.3 การแทรก PCR product เข้าสู่เวกเตอร์ pTZ57R/T (Fermentas).....	42
ภาพที่ 4.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน	47
ภาพที่ 4.2 การแสดงออกของโมเลกุลโปรตีนที่แยกได้ด้วยเจล 12% SDS-PAGE.....	49
ภาพที่ 4.3 การแบ่งกลุ่มตามหน้าที่ของโปรตีน 1316 ชนิด.....	52
ภาพที่ 4.4 กราฟเทียบระดับการแสดงออกของโปรตีนชนิดเดียวกันในเนื้อเยื่อต่างชนิด.....	58
ภาพที่ 4.5 กราฟเทียบระดับการแสดงออกของโปรตีนทั้ง 2 ชนิด ในตัวอย่างเนื้อเยื่อชนิดเดียวกัน .	59
ภาพที่ 4.6 กราฟมาตรฐานของสารละลายฟอร์บออลเอสเทอร์ ชนิด TPA.....	60
ภาพที่ 4.7 กราฟเทียบปริมาณสารฟอร์บออลเอสเทอร์ชนิด DHPB ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อสปู่ดำ.....	62
ภาพที่ 4.8 กราฟเทียบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของโปรตีนและปริมาณสารฟอร์บออล เอสเทอร์ชนิด DHPB ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อสปู่ดำ	63
ภาพที่ 4.9 ตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>UBQ</i> ที่เลือกนำมาออกแบบ.....	66
ภาพที่ 4.10 ตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน <i>CS</i> ที่เลือกนำมาออกแบบไพรเมอร์.....	66

ภาพที่ 4.11 ตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *GGPPS* ที่เลือกนำมาออกแบบไพรเมอร์ 67

ภาพที่ 4.12 ตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *GPPS* ที่เลือกนำมาออกแบบไพรเมอร์..... 67

ภาพที่ 4.13 การแสดงออกของยีน *UBQ* จากตัวอย่างเนื้อในเมล็ด จากการตรวจสอบด้วย 2% agarose gel 69

ภาพที่ 4.14 PCR product จากการทำโคลนนิ่งยีนที่มีชิ้นส่วนของยีนเป้าหมายแทรกอยู่ (ตรวจสอบการแสดงออกด้วยเจล 2% agarose)..... 71

ภาพที่ 4.15 กราฟมาตรฐานลอกการิทึมของยีนทั้ง 4 ชนิด..... 75

ภาพที่ 4.16 ระดับการแสดงออกของยีนทั้ง 3 ชนิด จากตัวอย่างเนื้อในเมล็ดสับดูดำ..... 76

ภาพที่ 4.17 กราฟเทียบการแสดงออกของยีน *GPPS* และโปรตีน *GPPS* ในตัวอย่างเนื้อในเมล็ด 77

ภาพที่ 4.18 กราฟเทียบระดับการแสดงออกของยีนทั้ง 3 ชนิด จากตัวอย่างเนื้อในเมล็ดสับดูดำ 77

ภาพที่ 5.1 ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนและยีนในวิถีชีวสังเคราะห์เทอร์ปีนอยด์ที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการสร้างสารฟอร์บอลเอสเทอร์ในผลสับดูดำ 80

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สบู่ดำ *Jatropha curcas* L. จัดเป็นพืชที่มนุษย์รู้จักและคุ้นเคยกันมายาวนานเนื่องจากเป็นพืชที่ทุกส่วนสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ เช่น ใบนำมาใช้เป็นยาแผนโบราณป้องกันการติดเชื้อ และบรรเทาอาการไอ น้ำมันใช้ในการห้ามเลือด น้ำมันที่สกัดจากเมล็ดนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอดีเซล และทำสบู่ กากที่เหลือจากการสกัดน้ำมันนำมาใช้ในการทำปุ๋ยอินทรีย์ (Emil และคณะ, 2010) ปัจจุบันสบู่ดำกำลังได้รับความสนใจกันอย่างกว้างขวางในแง่ของพืชที่มีศักยภาพในการนำเมล็ดมาสกัดเอาน้ำมัน เพื่อนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพทดแทนเชื้อเพลิงที่มาจากฟอสซิล (fossil fuel) ส่งผลให้ในประเทศอินเดีย จีน อเมริกาใต้ และแอฟริกา ได้มีการวางแผนการปลูกพืชสบู่ดำเพื่อนำมาใช้ในการผลิตไบโอดีเซล (Devappa และคณะ, 2010) นอกจากนี้ในส่วนของกากที่เหลือจากการสกัดน้ำมันก็ยังพบว่ามีปริมาณโปรตีนอยู่สูงกว่ากากถั่วเหลือง จึงเหมาะสมอย่างมากที่จะนำมาใช้ทำเป็นอาหารสัตว์ (Devappa และคณะ, 2010; Yunping และคณะ, 2012) แต่ทั้งนี้ในการนำน้ำมันและกากที่เหลือจากการสกัดน้ำมันมาใช้เพื่อเพิ่มมูลค่าก็ยังมีปัญหาและข้อจำกัด เนื่องจากสบู่ดำมีสารพิษที่เป็นอันตรายต่อคนและสัตว์อยู่หลายชนิด

สารพิษที่พบในสบู่ดำ ยกตัวอย่างเช่น เคอร์ซิน (Curcin) ทริปซินอินฮิบิเตอร์ (Trypsin inhibitor) เลคติน (Lectin) ไฟเตต (Phytates) ซาโปนิน (Saponins) แทนนิน (Tannins) และสารฟอรับอลเอสเทอร์ (Phorbol esters, PEs) (He, 2011) ซึ่งสามารถพบได้ทั่วไปตามส่วนต่างๆ ของสบู่ดำ โดยเฉพาะสารฟอรับอลเอสเทอร์จัดเป็นสารพิษหลักที่พบมากที่สุดในเมล็ด ทั้งนี้ปริมาณสารฟอรับอลเอสเทอร์ที่พบยังเป็นดัชนีชี้วัดความเป็นพิษของสบู่ดำแต่ละสายพันธุ์ด้วย

การวิเคราะห์ทางด้านโปรตีโอมิกส์ คือ การวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนทั้งหมดในเนื้อเยื่อที่นำมาศึกษา จัดเป็นเทคนิคในการวิเคราะห์โปรตีนที่มีประสิทธิภาพและมีความแม่นยำสูงเนื่องจากเป็นผลการพิสูจน์โมเลกุลของโปรตีนที่พร้อมทำงานจริง ณ เวลานั้นๆ (Booranasrisak และคณะ, 2013) ทั้งนี้ข้อมูลโปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์สามารถนำมาอธิบายกลไกการทำงาน การทำหน้าที่ รวมถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนด้วยกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงสนใจนำเอาการวิเคราะห์ทางด้านโปรตีโอมิกส์มาใช้อธิบายกลไกการทำงาน การทำหน้าที่ และทำนายยีนที่เกี่ยวข้องในวิถีชีวสังเคราะห์เทอร์ปีนอยด์ เพื่อนำมาสู่ความเข้าใจในการชีวสังเคราะห์สารฟอรับอลเอสเทอร์ในผลสบู่ดำ ซึ่งข้อมูลต่างๆ เหล่านี้จะสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานและนำมาประยุกต์ในงานการแพทย์และการเกษตรได้ เช่น การสกัดเอาสารพิษ

เคมีมาใช้เป็นยารักษาโรค สารควบคุมหรือกำจัดศัตรูพืช การหาวิธีในการกำจัดหรือลดปริมาณปริมาณสารจากน้ำมันหรือกากที่เหลือจากการสกัดน้ำมันเพื่อลดข้อจำกัดในการนำมาใช้ประโยชน์ รวมถึงการหาวิธีในการควบคุมการแสดงออกของยีนเพื่อนำมาใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์สบู่ดำที่ไม่มีหรือมีสารฟอรับอลเอสเทอร์น้อยที่สุดได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อระบุยีนในวิถีชีวสังเคราะห์เทอร์ปีนอยด์จากผลสบู่ดำ *Jatropha curcas* L.

1.3 วิธีดำเนินการวิจัย

1. รวบรวมเอกสาร และข้อมูลต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย
2. เตรียมตัวอย่างผลสบู่ดำระยะต่างๆ โดยแบ่งออกเป็น 5 ระยะ ได้แก่ Premature fruits (P), Mature green fruits (M), Mature ripe fruits (yellow) (R), Senescent fruits (black) (S) และ Dried fruits (D) รวมถึงสารเคมี วัสดุ และอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องที่จะนำมาใช้ในการทดลอง
3. ศึกษาาระดับการแสดงออกของโปรตีนด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์
4. ศึกษาการแยกและวิเคราะห์ปริมาณสารฟอรับอลเอสเทอร์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC)
5. หาความสัมพันธ์เพื่อนำไปสู่การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการชีวสังเคราะห์สารกลุ่มไคเทอร์ปีนส์
6. การตรวจสอบและติดตามการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการชีวสังเคราะห์สารกลุ่มไคเทอร์ปีนส์ด้วยเทคนิค Real-time PCR
7. วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการวิจัย สรุปผลและเขียนวิทยานิพนธ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีชีวสังเคราะห์เทอร์ปีนอยด์ หรือวิถีชีวสังเคราะห์สารในกลุ่มไคเทอร์ปีนส์ (สารฟอรับอลเอสเทอร์) เพื่อนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการปรับปรุงสายพันธุ์สบู่ดำและนำมาประยุกต์ในงานทางด้านอื่นๆ ต่อไปในอนาคต

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทั่วไปของสบู่ดำ

สบู่ดำเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Euphorbiaceae ซึ่งพบว่ามีอยู่ทั้งหมดประมาณ 175 สกุล สบู่ดำมีชื่อเรียกทางวิทยาศาสตร์ว่า *Jatropha curcas* Linnaeus และมีชื่อเรียกทั่วไปแตกต่างกันไป เช่น

ชาวแอฟริกา	เรียกว่า purgeerboontjie
ชาวจีน	เรียกว่า yu-lu-tzu
ชาวอังกฤษ	เรียกว่า Barbados nut, castor oil, physic nut, pig nut, purging nut, wild oil nut
ชาวฟิลิปปินส์	เรียกว่า tubang-bakod
ชาวอินโดนีเซีย	เรียกว่า jarak budge
ชาวไทย	เรียกว่า sabudam (Devappa และคณะ, 2010)

ส่วนในประเทศไทยสบู่ดำมีชื่อเรียกเฉพาะถิ่นแตกต่างกันไป เช่น

ภาคใต้	เรียกว่า หงเทศ
ภาคกลาง	เรียกว่า สบู่ดำ
ภาคเหนือ	เรียกว่า มะหุ้งฮั่ว
ภาคอีสาน	เรียกว่า บักเยาหรือบักสีหลอด (รักษ พฤษชาชาติ, 2552)

สบู่ดำจัดเป็นพืชที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศแถบอเมริกาใต้ และพบขึ้นกระจายทั่วไปในพื้นที่ร้อนชื้นและพื้นที่เขตร้อนของประเทศแถบแอฟริกา พื้นที่ทางตอนกลางรวมถึงตอนใต้ของอเมริกา และประเทศในแถบเอเชียรวมถึงเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ประเทศอินเดีย จีน พม่า ฯลฯ (He, 2011; Kumar และ Sharma, 2008; Siang และคณะ, 2014)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ทั่วไป สบู่ดำจัดเป็นไม้พุ่มยืนต้นขนาดกลาง มีความสูงประมาณ 5-7 เมตร ผิวลำต้นเกลี้ยง (ภาพที่ 2.1) ลักษณะใบโดยทั่วไปจะมีสีเขียวหรือเขียวอ่อน ใบเรียบ ขอบใบมีลักษณะเป็นแฉกตื้นๆ ดอกมีสีเขียวอมเหลือง หนึ่งต้นประกอบด้วยดอกตัวผู้และดอกตัวเมียโดยมีอัตราส่วนประมาณ 10-20 : 1 ดอก ผลมีสีเขียวอ่อนจนถึงสีเขียวเข้ม ผิวเรียบ เมื่อผลเริ่มสุกจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและจะเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือสีดำเมื่อผลเริ่มแก่จนกระทั่งผลแห้ง ภายในผลประกอบด้วยเมล็ดประมาณ 2-3 เมล็ด มีลักษณะเป็นวงรี มีความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร และหนาประมาณ 1 เซนติเมตร โดยความสมบูรณ์ของเมล็ดจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ปริมาณน้ำฝนรวมถึงปริมาณแสงที่ได้รับในแต่ละพื้นที่ (He, 2011)



ภาพที่ 2.1 ลักษณะทั่วไปของสบู่ดำ A: ต้นสบู่ดำ B: ผลแห้งของสบู่ดำ C: ลักษณะช่อดอก
D: พัฒนาการของผลสุดำระยะต่างๆ และลักษณะเมล็ด

สบู่ดำจัดเป็นพืชที่มีอายุยาวนานหลายสิบปี และมีลักษณะพิเศษคือสามารถปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมและดินในแต่ละพื้นที่ได้ดี ทนความแห้งแล้ง โตเร็ว มีปัญหาโรคและแมลงรบกวนน้อย (รักษ์ พฤษชาติ, 2552)

จากรายงานของ Ahmed และ Salimon (2009) และ Goel และคณะ (2007) สามารถแบ่งสบู่ดำออกเป็น 2 สายพันธุ์ โดยใช้ปริมาณสารฟอรับอลเอสเทอร์เป็นดัชนีในการแยก ได้แก่ สายพันธุ์ที่มีพิษ จะมีปริมาณสารฟอรับอลเอสเทอร์มากกว่า 2.49 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสายพันธุ์ที่ไม่มีพิษ (สายพันธุ์เม็กซิโก) จะมีปริมาณสารฟอรับอลเอสเทอร์ไม่เกิน 0.27 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2 การใช้ประโยชน์จากสบู่ดำ

ปัจจุบันสบู่ดำกำลังได้รับความสนใจและรู้จักกันอย่างแพร่หลายในแง่ของพืชน้ำมัน และพืชที่ทุกส่วนสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้โดยเฉพาะน้ำมันที่สกัดจากเมล็ด น้ำมันสบู่ดำเป็นน้ำมันที่ไม่ใช่

เพื่อการบริโภค (Non-edible oils) จึงเหมาะสมอย่างมากที่จะนำมาใช้ในการผลิตไบโอดีเซลได้โดยไม่ส่งผลกระทบต่อความมั่นคงทางด้านอาหาร โดยมีรายงานว่าในประเทศอินเดีย จีน อเมริกาใต้ และแอฟริกาใต้มีการปลูกสบู่ดำเพื่อนำมาใช้ในการผลิตไบโอดีเซล (Xu และคณะ, 2011) ทั้งนี้นอกจากน้ำมันสบู่ดำจะนำมาใช้ในการผลิตไบโอดีเซลแล้วยังสามารถนำมาทำเทียนไข สบู่ และใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง (Akbar และคณะ, 2009)

จากรายงานของ He (2011) เมล็ดสบู่ดำมีน้ำมันสะสมอยู่ประมาณ 54-58 เปอร์เซ็นต์ โดยกรดไขมันที่สร้างและถูกสะสมไว้ในเมล็ดจะอยู่ในรูปของไตรเอซิลกลีเซอรอล และที่สำคัญองค์ประกอบของกรดไขมันที่พบยังเหมือนกันกับกรดไขมันที่เป็นสารอาหารของมนุษย์อีกด้วย และจากรายงานการวิจัยของ Akbar และคณะ (2009) กรดไขมันหลักที่พบในน้ำมันสบู่ดำ คือ กรดโอเลอิก กรดลิโนเลอิก กรดปาล์มิติก และกรดสเตียริก ซึ่งจากการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดไขมันด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography, GC) และเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) พบว่ามีกรดโอเลอิกอยู่ 44.7 เปอร์เซ็นต์ และกรดลิโนเลอิกอยู่ 32.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และจากการเปรียบเทียบองค์ประกอบของกรดไขมันที่พบในน้ำมันสบู่ดำกับน้ำมันพืชชนิดอื่น สามารถสรุปได้ดังตารางที่ 2.1

สำหรับเมล็ดสบู่ดำมีรายงานว่าโปรตีนอยู่สูงประมาณ 22-28 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งยังอุดมไปด้วยกรดอะมิโนที่สำคัญ (ยกเว้นกรดอะมิโนลิวซีน) จึงเหมาะสมอย่างมากที่จะนำมาใช้ผลิตอาหารสัตว์ แต่จากข้อจำกัดในเรื่องของสารพิษที่พบ จึงเป็นที่น่าเสียดายที่ในปัจจุบันกากเมล็ดที่เหลือจากการสกัดน้ำมันส่วนใหญ่ยังถูกทิ้งหรือนำไปใช้ในการทำปุ๋ยอยู่ ดังนั้นจึงได้มีความพยายามในการหาวิธีกำจัดหรือลดปริมาณสารพิษออกกากที่เหลือจากการสกัดน้ำมันเพื่อที่จะสามารถนำกากเมล็ดที่เหลือมาใช้ประโยชน์ได้อย่างคุ้มค่าและปลอดภัย (Devappa และคณะ, 2010; Nithyanantham และคณะ, 2012)

สบู่ดำนอกจากจะเป็นที่รู้จักในแง่ของพืชที่ประกอบด้วยน้ำมันและโปรตีนอยู่สูงแล้วยังเป็นที่รู้จักกันมาเป็นเวลายาวนานในแง่ของสมุนไพรพื้นบ้านที่มีสรรพคุณทางยา และเนื่องด้วยสบู่ดำประกอบด้วยสารพฤกษเคมี (Phytochemical) เช่น อัลคาลอยด์ ไซคลิกเพปไทด์ เทอร์ปีนส์ ปัจจุบันจึงได้มีการศึกษาวิจัยการใช้ประโยชน์จากสารดังกล่าวจากส่วนต่างๆ ของสบู่ดำ แสดงดังตารางที่ 2.2 และจากการศึกษายังพบว่านอกจากความเป็นพิษของสารบางชนิดแล้วยังมีสารอีกหลายชนิดที่สามารถนำมาใช้ในการบำบัดรักษาโรค รวมถึงการนำมาใช้ประโยชน์ในงานด้านการเกษตรได้ เช่น ใช้ในการควบคุมแมลงและกำจัดศัตรูพืช รวมถึงแบคทีเรียและเชื้อรา เป็นต้น

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมันสบู่ดำเทียบกับน้ำมันพืชชนิดต่างๆ (Akbar และคณะ, 2009)

กรดไขมัน	น้ำมัน สบู่ดำ	เนื้อผล ปาล์ม	น้ำมัน ดอกตะวัน	น้ำมัน ถั่วเหลือง	น้ำมัน ปาล์ม
กรดโอเลอิก (C18:1)	44.7	15.4	21.1	23.4	39.2
กรดลิโนเลอิก (C18:2)	32.8	2.4	66.2	53.2	10.1
กรดปาล์มิติก (C16:0)	14.2	8.4	-	11.0	44.0
กรดสเตียริก (C18:0)	7.0	2.4	4.5	4.0	4.5
กรดปาล์มิโตเลอิก (C16:1)	0.7	-	-	-	-
กรดลิโนเลนิก (C18:3)	0.2	-	-	7.8	0.4
กรดอะราซิติค (C20:0)	0.2	0.1	0.3	-	-
กรดมาจาริก (C17:0)	0.1	-	-	-	-
กรดกรดไมริสติก (C14:0)	0.1	16.3	-	0.1	1.1
กรดแคปโพรอิก (C6:0)	-	0.2	-	-	-
กรดแคปโรลิก (C8:0)	-	3.3	-	-	-
กรดลอริก (C12:0)	-	47.8	-	-	0.2
กรดแคพริก (C10:0)	-	3.5	-	-	-
กรดไขมันอิ่มตัว	21.6	82.1	11.3	15.1	49.9
กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว	45.4	15.4	21.1	23.4	39.2
กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน	33	2.4	66.2	61.0	10.5

ตารางที่ 2.2 การใช้ประโยชน์ทางยาจากสบู่ดำ (Sabandar และคณะ, 2013)

ส่วนของพืช	การใช้ประโยชน์ทางยา	อ้างอิง
ทั้งต้น	รักษาแผลสด แผลไฟไหม้ แผลฉีกขาด โรคมุมิแพ้ ท้องร่วง	Heller (1996), Kaushik และ Kumar (2004) Patil (2005)
น้ำมัน	ยาถ่าย ปวดในข้อ โรคผิวหนัง โรคเรื้อน	Kirtikar และ Basu (1980) Heller (1996)
ผลและเมล็ด	ปวดท้อง โรคบิด ขับปัสสาวะ ฝีค้อนทสุตร โรคหัวใจ ยาฆ่าพยาธิ	Kirtikar และ Basu (1980)
ลำต้นหรือเปลือก	รักษาโรคเอดส์ รักษาเนื้องอก	Heller (1996), Kaushik และ Kumar (2004)
น้ำยาง	รักษาอาการปวดฟัน ห้ามเลือด	Heller (1996), Kaushik และ Kumar (2004)

2.3 สารต้านโภชนาการและสารพิษที่พบในสบู่ดำ

แม้ว่าสบู่ดำจะเป็นที่รู้จักกันอย่างกว้างขวางในแง่ของพืชสารพัดประโยชน์ ขณะเดียวกันก็ยังมีข้อจำกัดในการใช้ประโยชน์บางประการ และจากการรวบรวมงานวิจัยที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับสารต่างๆ พบว่าในสบู่ดำมีสารพิษทุกชนิด สารต้านโภชนาการ รวมถึงสารที่เป็นอันตรายต่อคนและสัตว์อยู่หลายชนิด ที่มีผลขัดขวางการใช้ประโยชน์จากสบู่ดำ เช่น

2.3.1 แทนนิน (Tannins)

แทนนินเป็นสารพวกฟีนอลิกซัสแตนซ์ (phenolic substances) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึมสารอาหารและส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตในสัตว์ ในสบู่ดำสารดังกล่าวสามารถพบได้ในเปลือกไม้โดยปริมาณสารจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสีของเปลือกไม้ ขณะเดียวกันก็ไม่พบสารดังกล่าวในกากเมล็ดที่เหลือจากการสกัดน้ำมัน (Devappa และคณะ, 2010)

2.3.2 ซาโปนิน (Saponins)

ซาโปนินเป็นสารพวกสเตอรอลที่พบได้ทั่วไปในพืช สารดังกล่าวมีฤทธิ์ช่วยป้องกันพืชจากจุลินทรีย์และเชื้อรา ซาโปนินเป็นสารมีรสขมเมื่อร่างกายได้รับในปริมาณความเข้มข้นที่สูงเกินไปจะส่งผลทำให้ประสาทสัมผัสในการรับรสลดลง (Baldimi และคณะ, 2012; He, 2011) ซาโปนินไม่ได้เป็นสารที่กำหนดความเป็นพิษในสบูดำแต่ปริมาณสารดังกล่าวจะมีมากหรือน้อยแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับว่าเป็นสบูดำสายพันธุ์ที่มีหรือไม่มีพิษ (Devappa และคณะ, 2010)

2.3.3 ไฟเตต (Phytates)

ไฟเตตหรือกรดไฟติกเป็นสารที่ไม่ได้พบเฉพาะในสบูดำแต่ยังพบในเมล็ดธัญพืชและเมล็ดพืชที่มีน้ำมัน เช่น ถั่วเหลือง ฝ้าย เรพซีด และถั่วลิสง (Baldini, 2012) สารดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึมแร่ธาตุต่างๆ เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม สังกะสี เหล็ก และที่สำคัญคือมีผลต่อการดูดซึมโปรตีนในสัตว์ต่างๆ ยกเว้นสัตว์เคี้ยวเอื้อง ไฟเตตเป็นสารที่พบได้ทั้งในสบูดำสายพันธุ์ที่มีและไม่มีพิษ โดยหากเมล็ดที่เหลือจากการสกัดน้ำมันจะมีปริมาณสารดังกล่าวอยู่ระหว่าง 7.2 ถึง 10.1 เปอร์เซ็นต์ (Devappa และคณะ, 2010; He, 2011)

2.3.4 ทริปซินอินฮิบิเตอร์ (Trypsin inhibitor, TI)

ทริปซินอินฮิบิเตอร์หรือโปรตีเอสอินฮิบิเตอร์ เป็นกลุ่มโปรตีนที่มีลักษณะเป็นก้อนพบได้ในพืชทั่วไป เช่น กากถั่วเหลือง ในสบูดำสารดังกล่าวสามารถพบได้ทั่วไปทั้งในสายพันธุ์มีพิษและสายพันธุ์ไม่มีพิษ โดยปริมาณสารที่พบในกากที่เหลือจากการสกัดน้ำมันจะอยู่ระหว่าง 18.4 ถึง 21.3 มิลลิกรัมต่อกรัม ทริปซินอินฮิบิเตอร์จัดเป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีน ทั้งนี้สารดังกล่าวสามารถสลายตัวได้เมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 25 นาที (Devappa และคณะ, 2010; He, 2011)

2.3.5 เลคติน (Lectin)

เลคตินเป็นสารเป็นสารที่เกิดจากคาร์โบไฮเดรตจับอยู่กับโปรตีน (ไกลโคโปรตีน) ซึ่งสามารถพบได้ในพืชทั่วไป เมื่อสัตว์ได้รับสารดังกล่าวในปริมาณที่สูงจะส่งผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโต และความสมบูรณ์ของร่างกาย (He, 2011) โดยเลคตินจะไปทำลายกระบวนการเมตาบอลิซึมของกรดไขมัน คาร์โบไฮเดรต และโปรตีน เลคตินเป็นสารที่พบได้ในสบูดำทั้งสายพันธุ์มีพิษและไม่มีพิษ (Devappa และคณะ, 2010)

2.3.6 เคอร์ซีน (Curcin)

เคอร์ซีนเป็นสารพิษจำพวกโปรตีน (Toxalbumin) ที่อยู่ในกลุ่มของโปรตีนที่มีฤทธิ์ยับยั้งไรโบโซม (Ribosome inactivating proteins, RIP) ซึ่งคล้ายกันกับสารไรซิน (Ricin) ที่พบในละหุ่ง โดยทั่วไปเมื่อได้รับสารเคอร์ซีนในปริมาณความเข้มข้นที่สูงจะมีผลต่อการทำหน้าที่ของไรโบโซม รวมถึงส่งผลให้เกิดการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ จากรายงานการวิจัยพบว่าเคอร์ซีน มีอยู่ด้วยกัน 2 ชนิด คือ Type I RIP และ Type II RIPs ซึ่งจากการเปรียบเทียบความเป็นพิษพบว่า Type II RIPs มีความเป็นพิษรุนแรงกว่า Type I RIP ทั้งนี้ยังพบว่าเคอร์ซีนบริสุทธิ์ที่แยกได้จากเมล็ดสับดูต้าเป็นชนิด Type I RIP (Devappa และคณะ, 2010)

Pradhan และคณะ (2012) ได้รายงานไว้ว่าเคอร์ซีนเป็นสารที่สามารถพบได้ทั่วไปในเมล็ด ผล และน้ำยางของสับดูต้า

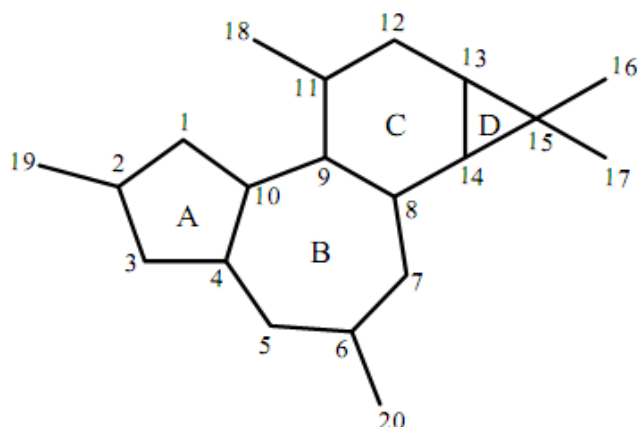
2.3.7 ฟอ์ربولเอสเทอร์ (Phorbol ester, PEs)

ฟอ์ربولเอสเทอร์จัดเป็นสารพิษหลักที่พบในสับดูต้า โดยจะสามารถพบสารดังกล่าวได้จากน้ำมันและเนื้อในเมล็ด นอกจากนี้ยังสามารถพบสารดังกล่าวได้ในส่วนของใบ ลำต้น ราก ดอก และเปลือกลำต้น ยกเว้นน้ำยาง (Ahmed และ Salimon, 2009) ฟอ์ربولเอสเทอร์จัดเป็นสารที่เมื่อคนและสัตว์ได้รับพิษจะแสดงอาการให้เห็นโดยใช้เวลาไม่นาน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณและความเข้มข้นของสารที่ได้รับด้วย

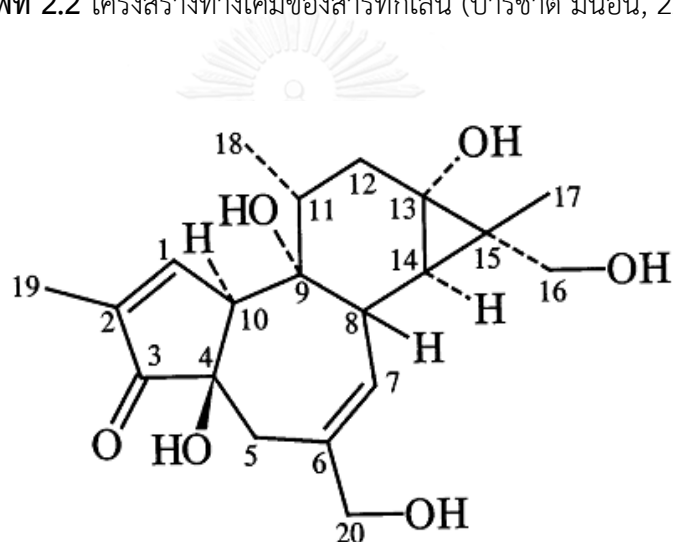
2.4 สารฟอ์ربولเอสเทอร์

ฟอ์ربولเอสเทอร์เป็นสารในกลุ่มทิกเลน (tigliane) หรือเตตราไซคลิกไดเทอร์พีนส์ คาร์บอนสเคลเลตัน (tetracyclic diterpene carbon skeleton) โดยฟอ์ربولเป็นสารที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกันกับโครงสร้างของสารทิกเลน แสดงดังภาพที่ 2.2

โครงสร้างทางเคมีของสารทิกเลนจะประกอบด้วยวงแหวน 4 วง และมีแอลกอฮอล์เป็นส่วนประกอบภายในโครงสร้าง ขณะที่โครงสร้างทางเคมีของสารฟอ์ربولเกิดจากการเกิดปฏิกิริยา hydroxylation (เติม -OH) กับโครงสร้างพื้นฐาน (ทิกเลน) ด้วยพันธะเอสเทอร์ในตำแหน่งที่ต่างกัน ส่งผลให้เกิดโครงสร้างของสารฟอ์ربول แสดงดังภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของสารทิกเลน (ปารีชาติ มั่นอัน, 2552)



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของสารฟอร์บออล (12-hydroxy-16-hydroxyphorbol)

(Haas และ Mittelbach, 2000)

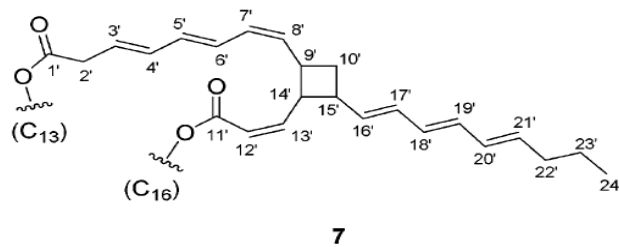
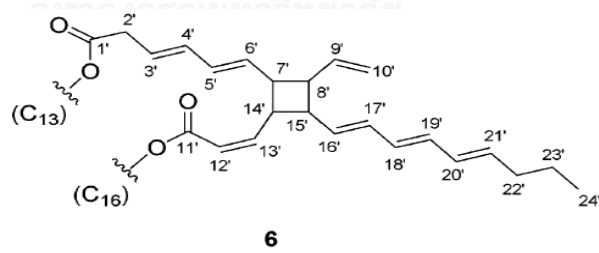
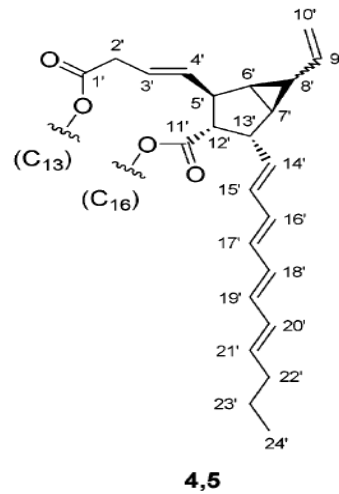
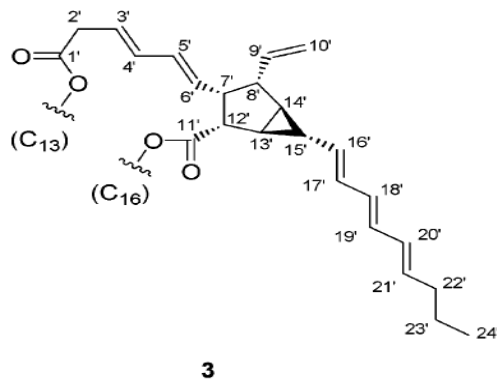
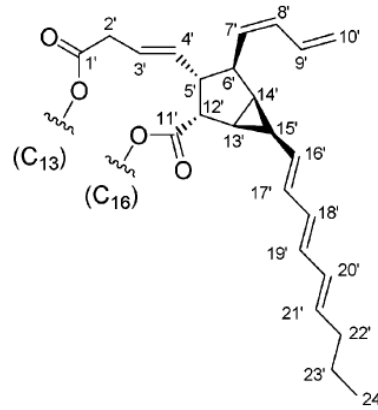
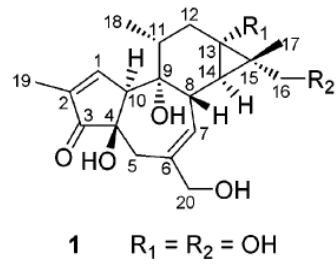
ฟอร์บออลเอสเทอร์มีสูตรทางเคมี คือ $C_{44}H_{54}O_8Na$ (Devappa และคณะ, 2010) จัดเป็นสารพิษที่พบได้ทั่วไปในพืชวงศ์ Euphorbiaceae และ Thymelaeaceae (Ahmed และ Salimon, 2009) ซึ่งมีรายงานการแยกสารดังกล่าวได้ในปี ค.ศ. 1934 จากน้ำมันสลอด (*Croton tiglium* oil) และสามารถระบุโครงสร้างทางเคมีได้ในปี ค.ศ. 1967 (Nokkaew, 2008)

โดยทั่วไปสารฟอร์บออลเอสเทอร์ที่พบในสบู่มักจะมีอยู่ด้วยกัน 2 ชนิด คือ ชนิด phorbol-12-myristant 13-acetate หรือ TPA และชนิด 12-hydroxy-16-deoxyphorbol-4'-[12'-14-butadienyl]-6'-[16'-18'-20'-nonatrienyl]-bicyclo-[3.1.0]hexane-(3-0)-2'-[carboxylate]-(16-0)-3'-[8'-butenoic-10']ate หรือ DHPB มีรายงานว่าจากการเทียบความเป็นพิษระหว่างสารทั้ง 2

ชนิด พบว่าพอร์บอลเอสเทอร์ชนิด TPA มีความรุนแรงมากกว่าชนิด DHPB สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ (Nokkaew, 2008) สารพอร์บอลเอสเทอร์ชนิด TPA ปริมาณ 2.5 ไมโครกรัม สามารถส่งเสริมการเกิดเนื้องอกในหนูได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 12 สัปดาห์ ขณะที่สารพอร์บอลเอสเทอร์ชนิด DHPB สามารถส่งเสริมการเกิดเนื้องอกในหนูได้เพียง 46.7 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 30 สัปดาห์

Haas และคณะ (2002) รายงานไว้ว่าโครงสร้างของสารพอร์บอลเอสเทอร์ที่สามารถแยกได้จากเมล็ดสบู่ดำมีอยู่ทั้งหมด 6 แบบ (2-7) แสดงดังภาพที่ 2.4





ภาพที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของสารฟอร์บอลเอสเทอร์ จากเมล็ดสบู่ดำ
(Haas และคณะ, 2002)

2.5 ผลของสารฟอร์บอลเอสเทอร์ต่อสิ่งมีชีวิต

โดยทั่วไปพืชส่วนใหญ่จะสามารถสร้างสารเคมีและสารพิษต่างๆ เพื่อป้องกันตัวเองจากสิ่งแวดล้อม แบคทีเรีย หรือแมลงกัดกินมนุษย์ (Devappa และคณะ, 2010) และสบู่ดำก็เป็นหนึ่งในนั้น ทุกๆ ส่วนของสบู่ดำสามารถพบการกระจายของสารพิษเคมี สารต้านโภชนาการ รวมถึงสารพิษอยู่หลายชนิด (ตารางที่ 2.3) โดยเฉพาะสารฟอร์บอลเอสเทอร์

ฟอร์บอลเอสเทอร์เป็นสารที่ไม่สามารถทำลายได้ด้วยความร้อนทั่วไป ซึ่งถ้าหากต้องการสลายสารดังกล่าวด้วยความร้อนต้องใช้อุณหภูมิสูงถึง 160 องศาเซลเซียส นานประมาณ 30 นาที อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่าสารเคมีบางชนิดสามารถนำมาใช้ลดปริมาณสารความเข้มข้นของสารฟอร์บอลเอสเทอร์ได้ (Kumar และ Sharma, 2008)

ฟอร์บอลเอสเทอร์จัดเป็นสารพิษหลักที่พบในสบู่ดำและพบมากสุดในเมล็ด ซึ่งเป็นส่วนที่นำมาใช้ประโยชน์มากที่สุด ดังนั้นจึงมีโอกาสสูงมากที่คนและสัตว์จะได้รับสารพิษดังกล่าว มีรายงานว่าถึงแม้จะความเข้มข้นของสารที่ได้รับจะมีปริมาณต่ำ แต่ก็สามารถส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ได้ ยกตัวอย่างเช่น อาการผิวหนังบวมแดง (Goel และคณะ, 2007) นอกจากนี้ความเป็นพิษของสารดังกล่าวยังส่งผลให้เกิดอาการท้องเสีย เกิดความผิดปกติของเซลล์ กระตุ้นการแบ่งเซลล์เม็ดเลือดขาว ลิมโฟไซต์ ชักนำให้เกิดการรวมตัวกันของเกล็ดเลือด และที่สำคัญที่สุดคือสามารถส่งเสริมการเกิดเนื้องอกได้ (Ahmed และ Salimon, 2009)

2.5.1 ฟอร์บอลเอสเทอร์กับการส่งเสริมการเกิดเนื้องอก

ฟอร์บอลเอสเทอร์จัดเป็นสารที่มีขั้วและไม่มีขั้วอยู่ในตัวเอง (amphiphillic molecules) สารดังกล่าวมีคุณสมบัติในการเข้าจับกับโปรตีนรีเซปเตอร์ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นฟอสโฟลิปิดได้ดี โดยปกติกระบวนการตอบสนองต่อสิ่งเร้าของเซลล์ ไดเอซิลกลีเซอรอล (diacylglycerol, DAG) จะไปกระตุ้นเอนไซม์ protein kinase C (PKC) ส่งผลให้ผลให้มีการเพิ่มขึ้นของฟอสฟาติดีลเซอริน (phosphatidylserine) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยในขั้นตอนการกระตุ้นเอนไซม์ PKC จะถูกเคลื่อนย้ายไปยังเยื่อหุ้มเซลล์และจับกับโปรตีนรีเซปเตอร์นำไปสู่การแปลสัญญาณต่างๆ ขณะเดียวกันสารฟอร์บอลเอสเทอร์ก็มีคุณสมบัติที่คล้ายกันกับ DAG คือสามารถไปกระตุ้นให้มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ที่ผิดปกติ ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) (Devappa และคณะ, 2010; Goel และคณะ, 2007)

ตารางที่ 2.3 สารเคมีที่แยกได้จากส่วนต่างๆ ของสบู่ดำ (Kumar และ Sharma, 2008)

ส่วนต่างๆ ของพืช	สารประกอบทางเคมี	อ้างอิง
ลำต้น	Organic acids (o and p-coumaric acid, p-OH-benzoic acid, protocatechuic acid, resorsilic acid, saponins และ tannins	Hemalatha และ Radhakrishnaiah (1993)
ใบ	Cyclic triterpenes stigmasterol, stigmasterol, 5-en-3 β , 7 α -diol, stigmasterol, 5-en-3 β , 7 β -diol, cholest-5-en-3 β , 7 α -diol, 7-keto- β -sitosterol, β -D-glucoside of β -sitosterol, Flavonoids apigenin, vitexin, isovitexin Triterpene alcohol (C ₆₃ H ₁₁₇ O ₉) และ flavonoidal glycosides	Mitra และคณะ (1970), Khafagy และคณะ (1977), Hufford และ Oguntimein (1987) Khafagy และคณะ (1997)
น้ำยาง	Curcacycline A, a cyclic octapeptide Curcain (a protease)	Vandenbers และคณะ (1995) Nath และ Dutta (1991)
เนื้อเมล็ด และกากที่ เหลือจาก การสกัด น้ำมัน	Phytates, saponins และ trypsin inhibitor	Areghore และคณะ (1997), Makkar and Becker (1997), Wink และคณะ (1997)
เปลือกไม้	β -amyrin, β -sitosterol และ taraxerolu	Mitra และคณะ (1970)
เมล็ด	Curcin และ lectin Phorbol esters Esterases (JEA) และ Lipase (JEB)	Stirpe และคณะ (1976) Adolf และคณะ (1984), Makkar และคณะ (1997) Staubmann และคณะ (1999)
ราก	β -sitosterol และ curculathyrans A และ B และ curcusones A-D, diterpenoids jatrophol และ jatropholone A และ B, coumarin tomentin, coumarino-lignan	Naengchomong และคณะ (1985, 1994)

2.6 การแยกสารฟอร์บอลเอสเทอร์

Goel และคณะ (2007) รายงานไว้ว่าโดยธรรมชาติแล้วฟอร์บอลเอสเทอร์เป็นสารที่ไม่เสถียรและไวต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ไฮโดรไลซิส ทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน และปฏิกิริยาอีพิเมอไรเซชัน โดยทั่วไปห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่นิยมนำเมทานอลมาใช้เป็นตัวทำละลายในการสกัดสารฟอร์บอลเอสเทอร์ นอกจากนี้ยังมีรายงานการนำสารเคมีอื่นๆ มาใช้เป็นตัวทำละลายในการสกัดสารดังกล่าวด้วย เช่น อะซิโตน ไตรคลอโรเอทิลีน บิโตรเลียมอีเทอร์ และไดคลอโรมีเทน (เมทิลีนคลอไรด์) เป็นต้น ทั้งนี้ปริมาณความเข้มข้นของสารที่แยกออกมาได้ก็จะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับส่วนต่างๆ ของพืชที่นำมาสกัดด้วย แสดงดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ปริมาณสารฟอร์บอลเอสเทอร์ที่แยกได้จากส่วนต่างๆ ของสบู่ดำ (Nithiyantham และคณะ, 2012)

ส่วนต่างๆ ของสบู่ดำ	ปริมาณสารฟอร์บอลเอสเทอร์ (มิลลิกรัมต่อกรัม)
เนื้อในเมล็ด	2.00-6.00
ใบ	1.83-2.75
ลำต้น	0.78-0.99
ดอก	1.39-1.83
ตาข้าง	1.18-2.10
ราก	0.55
น้ำยาง	ไม่พบ
เปลือกไม้ (เปลือกนอกสีน้ำตาล)	0.39
เปลือกไม้ (เปลือกนอกสีเขียว)	3.08
เนื้อไม้	0.09

สำหรับเครื่องมือในการวิเคราะห์สารฟอร์บอลเอสเทอร์ก็มีอยู่ด้วยกันหลายชนิด ดังนั้นในการเลือกใช้เครื่องมือจึงขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของงานที่ทำ เช่น ต้องการแยกสารอาจจะใช้เครื่อง HPLC, thin-layer chromatography (TLC) และ gas liquid chromatography (GLC) ส่วนการวิเคราะห์โครงสร้างของสารอาจใช้วิธี HPLC with electrospray ionization tandem mass spectrometry

(HPLC-MS-MS), Matrix assisted laser desorption ionization (MALDI) และเทคนิค Nuclear magnetic resonance (NMR)

2.6.1 การแยกสารฟอรับอลเอสเทอร์ด้วยเครื่อง HPLC

HPLC คือเครื่องมือทางเคมีที่สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์สารที่เราสนใจจากตัวอย่าง โดยหลักการทำงานของเครื่องในการแยกองค์ประกอบของสารประกอบด้วย 2 ส่วนที่สำคัญ ได้แก่

- เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) คือของแข็งที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ ซึ่งจะทำหน้าที่ในการแยกสาร

- เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ สารละลายที่ทำหน้าที่ในการแยกและพาสารผ่านเข้าไปในคอลัมน์

สำหรับขั้นตอนการแสดงผล ในส่วนของสารที่แยกออกมาได้นั้นจะถูกตรวจวัดด้วยตัวจับสัญญาณ (detector) จากนั้นจะอาศัยซอฟต์แวร์ทำหน้าที่ในการรับสัญญาณและแสดงผลออกมาในรูปของโครมาโทแกรม ทั้งนี้ความสามารถในการเข้ากันได้ดีของสารที่เราต้องการแยกกับเฟสเคลื่อนที่หรือเฟสอยู่กับที่จะมีผลต่อประสิทธิภาพในการแยกสารอย่างมาก รวมถึงในส่วนของคอลัมน์ HPLC ดังนั้นหัวใจสำคัญในการแยกสารด้วยเครื่อง HPLC จึงต้องเลือกเฟสเคลื่อนที่และคอลัมน์ให้เหมาะสมกับสารที่ต้องการแยก ในส่วนของการประมวลผลการวิเคราะห์สามารถทำได้ทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ โดยในเชิงคุณภาพจะอาศัยโครมาโทแกรมของสารเป็นตัวบ่งชี้ ดังนั้นจึงต้องทราบตำแหน่งโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานก่อน และเมื่อต้องการระบุว่ามีการปนเปื้อนของสารที่สนใจอยู่จริงหรือไม่ก็จะใช้ Retention time ระหว่างสารมาตรฐานและสารตัวอย่างเปรียบเทียบกับ ส่วนการวิเคราะห์เชิงปริมาณจะอาศัยโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานมาใช้ในการสร้างสมการกราฟมาตรฐานเพื่อนำไปสู่การคำนวณหาปริมาณสารที่สนใจ และจากประสิทธิภาพในการทำงานของเครื่อง HPLC ส่งผลให้ในปัจจุบันจึงนิยมนำมาใช้ในงานทางด้านการวิเคราะห์ทางด้านเภสัชกรรม และการเกษตร โดยงานทางด้านการเกษตรก็มีหลายๆ งานวิจัยที่ได้นำเอา HPLC มาใช้ในการแยกและวิเคราะห์สารต่างๆ ในพืชและสัตว์ ทั้งนี้ยังรวมถึงรายงานการวิจัยการแยกและวิเคราะห์สารในสบู่ดำที่มีอยู่มากมาย

Pradhan และคณะ (2012) จากการวิเคราะห์ปริมาณสารฟอรับอลเอสเทอร์จากน้ำมัน เนื่อในเมล็ด ใบโอดีเซล และกลีเซอรอล ที่ได้จากสบู่ดำ ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าปริมาณสารที่แยกได้จากน้ำมันมีอยู่สูงกว่าเนื่อในเมล็ด ขณะเดียวกันก็ไม่พบสารดังกล่าวในใบโอดีเซล และกลีเซอรอล

Ahmed และ Salimon (2009) จากการวิเคราะห์ปริมาณสารพอร์บอลเอสเทอร์ในน้ำสบู่ดำที่มาจากประเทศอินโดนีเซีย อินเดีย และมาเลเซีย ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าน้ำสบู่ดำที่มาจากประเทศอินโดนีเซียมีปริมาณสารมากที่สุด รองลงคือน้ำมันที่มาจากประเทศอินเดียและมาเลเซีย ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ปริมาณสารพอร์บอลเอสเทอร์ที่แยกได้จากน้ำมันที่มาจากประเทศต่างๆ (Ahmed และ Salimon, 2009)

ที่มาของสบู่ดำ	ชนิดของสาร PEs					% PEs
	1	2	3	4	5	
อินโดนีเซีย	0.22	0.44	0.33	0.24	0.3	1.58
อินเดีย	0.11	0.15	0.08	0.22	-	0.58
มาเลเซีย	0.14	0.09	-	-	-	0.23

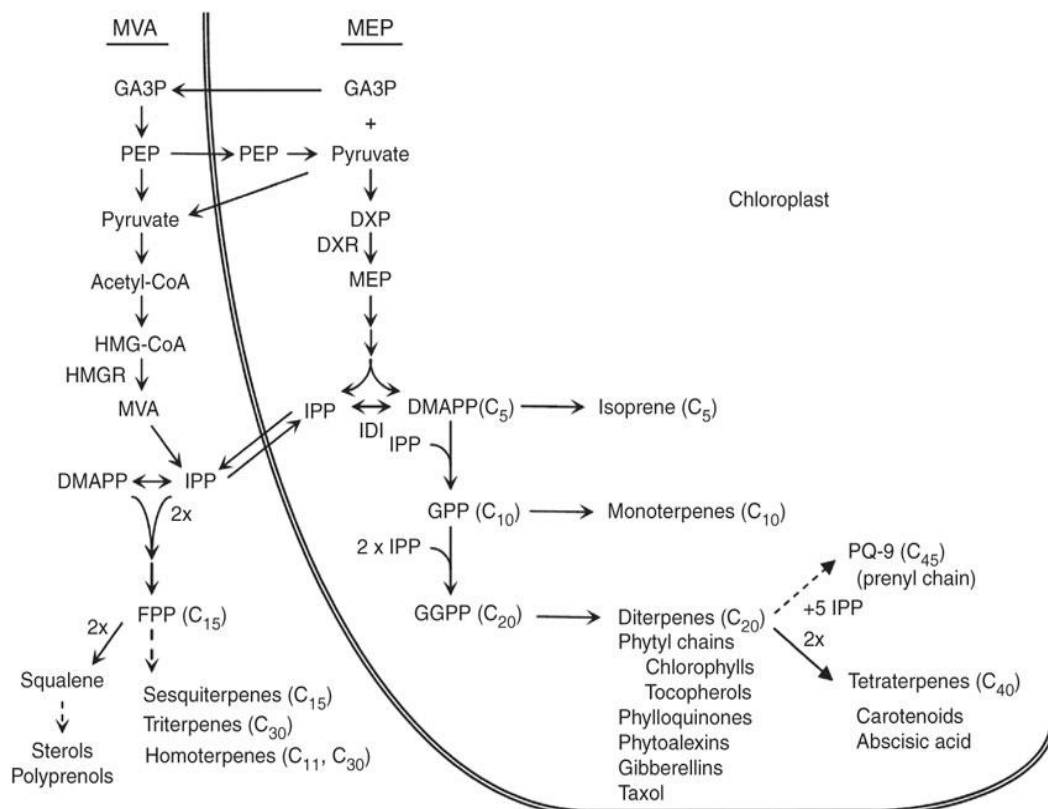
2.7 วิถีชีวสังเคราะห์เทอร์พินอยด์ (Terpenoid biosynthesis pathway)

สิ่งมีชีวิตทั่วไปวิถีชีวสังเคราะห์เทอร์พินอยด์หรือไอโซพรีนอยด์ ถือเป็นวิถีที่มีความสำคัญในการสร้างสารในกลุ่มเทอร์พินส์

เทอร์พินส์เป็นสารที่มีสูตรทั่วไปคือ $(C_5H_8)_n$ (สุदारัตน์ หอมหวล, 2007) โดยทั่วไปเราสามารถแบ่งกลุ่มเทอร์พินส์ได้โดยอาศัยจำนวนคาร์บอนอะตอมซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของโครงสร้างทางเคมีมาใช้เป็นเกณฑ์ ยกตัวอย่างเช่น มอโนเทอร์พินส์ (C₁₀) ไดเทอร์พินส์ (C₂₀) เตตระเทอร์พินส์ (C₄₀) และแคโรทีนอยด์ (C₄₀) เป็นต้น (Kirby และคณะ, 2010)

โดยทั่วไปวิถีชีวสังเคราะห์เทอร์พินอยด์ในสิ่งมีชีวิตเกิดขึ้นได้โดยอาศัย 2 วิถีย่อย ได้แก่ วิถีย่อย MEP/DOX (methylerythritol phosphate/1-deoxy-D-xylulose) ซึ่งเป็นวิถีที่พบได้ในยูแบคทีเรีย และวิถีย่อย mevalonic acid (MVA) หรือวิถี HMG-CoA reductase ซึ่งเป็นวิถีที่พบในยูแคริโอตและอาร์เคีย อย่างไรก็ตามยังคงมีข้อยกเว้น เช่น แบคทีเรียจำนวนหนึ่งใช้วิถีย่อย MVA ในการสังเคราะห์สารเทอร์พินอยด์แทนวิถีย่อย MEP (Devappa และคณะ, 2011; Kirby และคณะ, 2010)

ในอาณาจักรพืชวิถีชีวสังเคราะห์เทอร์พีนอยด์ แสดงดังภาพที่ 2.5 จัดเป็นวิถีที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมกระบวนการเมทาบอลิซึมต่างๆ เช่น การผสมเกสรดอกไม้ และการป้องกันตัวเองจากอันตราย รวมถึงการชีวสังเคราะห์สารพฤกษเคมีต่างๆ โดยทั่วไปวิถีชีวสังเคราะห์เทอร์พีนอยด์ในพืชประกอบด้วย 2 วิถีย่อย ได้แก่วิถี MVA (เกิดในไซโทซอล) และวิถี MEP (เกิดในคลอโรพลาสต์) ทำงานหน้าที่ปฏิสัมพันธ์เชื่อมโยงระหว่างกันในการแลกเปลี่ยนสารตั้งต้นในการสร้างสารในกลุ่มเทอร์พีนส์ (Devappa และคณะ, 2011)



ภาพที่ 2.5 วิถีชีวสังเคราะห์ไอโซพรีนอยด์ในเซลล์พืช (Vickers และคณะ, 2009)

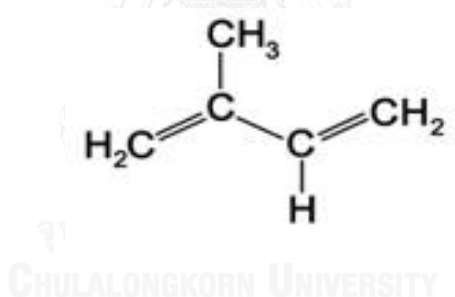
Miziorko (2011) วิถีชีวสังเคราะห์เทอร์พีนอยด์ที่พบในสัตว์ เชื้อรา และแบคทีเรีย พบว่ามีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับการชีวสังเคราะห์สารจำพวกสเตอรอล ฮอริโมน และฟีโรโมน สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Caballero และคณะ (2014) ที่นำเทคนิคโปรตีโอมิกส์มาศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ในวิถีย่อย MVA จากต่อมที่ผลิตฟีโรโมนในรีนฝอยทราย (*Lutzomyia longipalpis*) และพบว่ามีโปรตีนอยู่ 12 ชนิด ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของฟีโรโมนหรือกลิ่น ยกตัวอย่างเช่น glutaminyl-tRNA synthetase, phosphoglycerate kinase, succinylCo-A synthetase alpha subunit, transketolase, glutathione S transferase และ cytochrome family

proteins เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกของโปรตีนทั้งหมดสัมพันธ์กับเอนไซม์ 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGR) ซึ่งเป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาเคมีในวิถีย่อย MVA สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Nieto และคณะ (2009) ในตัวอย่างพืช *Arabidopsis thaliana* ที่มีเอนไซม์ 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGR, EC 1.1.1.34) เป็นเอนไซม์หลักในการเร่งปฏิกิริยาเคมีในวิถีย่อย MVA

2.8 วิถีชีวสังเคราะห์ไดเทอร์พีนส์ (Diterpene biosynthesis pathway)

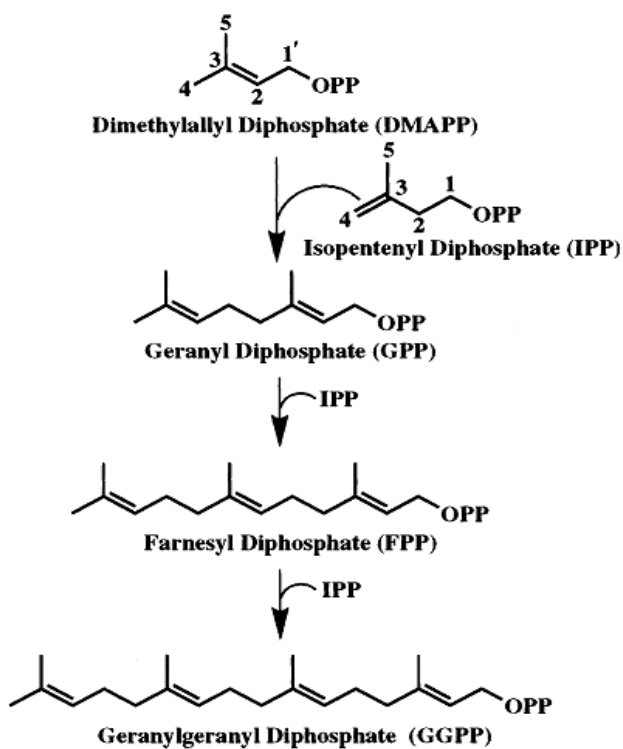
การสร้างสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิในพืช เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่ามีสารตั้งต้นในการสร้างเป็นสารประกอบจำพวกแอลคีน คือ ไอโซเพนทิลไดฟอสเฟต (Isopentyl diphosphate, IPP) และ ไดเมทิลอัลลิลไดฟอสเฟต (dimethylallyl-diphosphate, DMAPP)

Sandjo และ Kuete (2013) ไดเทอร์พีนส์เป็นสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิที่มีโครงสร้างประกอบด้วยคาร์บอน 20 อะตอม ซึ่งเกิดจากการรวมตัวกันของของโครงสร้างไอโซพรีนส์ 4 หน่วย แสดงดังภาพที่ 2.6



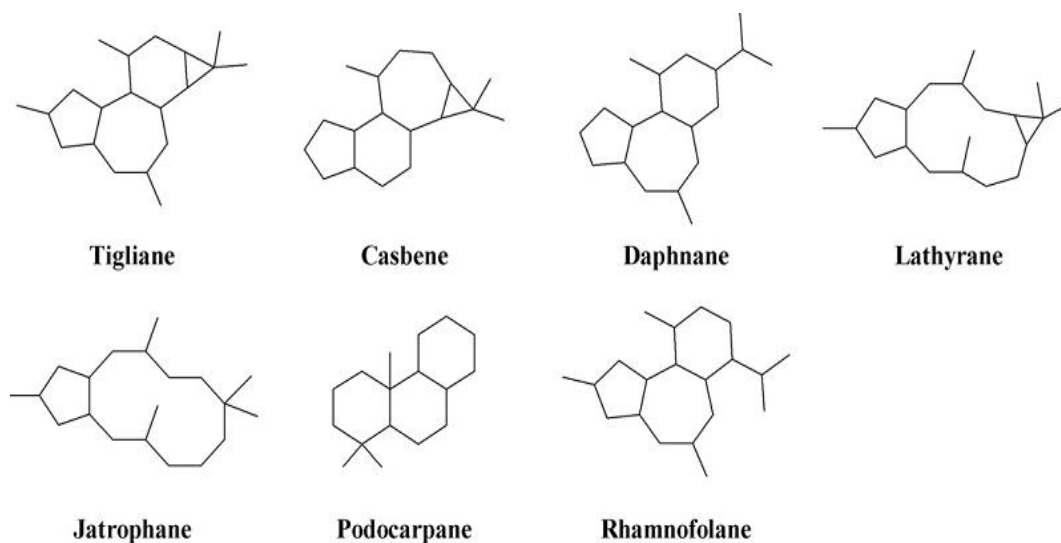
ภาพที่ 2.6 โครงสร้างทางเคมีของไอโซพรีนส์ (Freeman และ Beattie, 2008)

จากข้อมูลการสร้างสารไดเทอร์พีนส์พบว่ามีสารตั้งต้นในการสร้างคือ ไอโซเพนทิลไดฟอสเฟต และไดเมทิลอัลลิลไดฟอสเฟต เกิดกระบวนการเชื่อมต่อโมเลกุลกันแบบ head-to-tail โดยมีเอนไซม์ เพรนิลทรานสเฟอเรส (prenyl transferase) ทำหน้าที่เปลี่ยนให้อยู่ในรูปเจรานิลไดฟอสเฟส (geranyl diphosphate, GPP) และเมื่อโมเลกุลของเจรานิลไดฟอสเฟสมาเชื่อมต่อไอโซเพนทิลไดฟอสเฟต ก็จะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของฟานีสซิลไดฟอสเฟส (farnesyl diphosphate, FPP) หรือเจรานิลเจรานิลไดฟอสเฟส (geranylgeranyl diphosphate, GGPP) แสดงดังภาพที่ 2.7 ทั้งนี้กลไกการชีวสังเคราะห์สารไดเทอร์พีนส์จะมีกระบวนการสร้างที่ชัดเจนและแน่นอน



ภาพที่ 2.7 วิธีชีวสังเคราะห์ไดเทอร์พีนอยด์ (Burke และ Croteau, 2002)

Devappa และคณะ (2011) พืชในวงศ์ Euphorbiaceae ประกอบด้วยสายสารในกลุ่มไดเทอร์พีนส์และไตรเทอร์พีนส์อยู่มากมาย โดยเฉพาะพืชสปีชีส์เดียวกันกับสบู่ดำมีรายงานว่าพบสารไดเทอร์พีนส์มากกว่า 68 ชนิด เช่น ทิกเลน (tiglane) คาสบีนส์ (casbene) ดาปเนน (daphnane) ลาทีเลน (lathyrane) จาโทรเฟน (jatrophane) โปโดคาร์เพน (podocarpane) และแรมโนโฟเลน (rhamnofolane) เป็นต้น แสดงดังภาพที่ 2.8 ทั้งนี้มีรายงานว่าทิกเลนและคาสบีนส์เป็นสารในกลุ่มไดเทอร์พีนส์ที่มีความเป็นพิษในสบู่ดำ



ภาพที่ 2.8 โครงสร้างทางเคมีของสารในกลุ่มไดเทอร์พีนส์ (Sabandar และคณะ, 2013)

2.9 วิถีชีวสังเคราะห์สารฟอรบออลเอสเทอร์ (Phorbol esters biosynthesis pathway)

ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการวิจัยที่สามารถอธิบายวิถีชีวสังเคราะห์สารฟอรบออลเอสเทอร์ได้อย่างชัดเจน (Devappa และคณะ, 2011) แต่เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่าฟอรบออลเอสเทอร์เป็นสารพิษในกลุ่มทิกเลนไดเทอร์พีนส์ ซึ่งเกิดขึ้นภายใต้วิถีชีวสังเคราะห์เทอร์พีนอยด์

2.10 การศึกษาทางด้านโปรตีโอมิกส์

2.10.1 เทคนิคโปรตีโอมิกส์

โปรตีโอมิกส์คือ เทคนิคสำหรับวิเคราะห์การแสดงออกในเชิงปริมาณและคุณภาพของโปรตีนทั้งหมดในเนื้อเยื่อที่พร้อมทำงานจริงขณะเวลานั้นๆ โดยเทคนิคดังกล่าวถูกนำมาใช้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1990 และรู้จักกันอย่างแพร่หลายจนถึงปัจจุบัน (Vanderschuren และคณะ, 2013) โปรตีโอมิกส์จัดเป็นเทคนิคการวิเคราะห์โปรตีนที่มีประสิทธิภาพและมีความแม่นยำสูง ดังนั้นข้อมูลที่ได้จึงสามารถนำมาใช้อธิบายกลไกการทำงาน หน้าที่ รวมถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนได้เป็นอย่างดี ปัจจุบันแม้ว่าเทคนิคดังกล่าวจะเป็นที่รู้จักและยอมรับกันมาก ขณะเดียวกันก็ยังคงมีข้อจำกัดในเรื่องของฐานข้อมูลโปรตีนที่ยังไม่ครอบคลุม ส่งผลให้ยังไม่สามารถระบุชนิดและหน้าที่ของโปรตีนได้ทั้งหมด รวมถึงค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ที่ค่อนข้างสูงด้วย

2.10.2 เทคนิคโปรตีโอมิกส์กับการศึกษาในพืชสบูดำ

ปัจจุบันโปรตีโอมิกส์ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในงานทางด้านทางการแพทย์และการเกษตร ซึ่งในด้านการเกษตรได้นำเอาเทคนิคดังกล่าวมาใช้โดยมีวัตถุประสงค์ที่แตกต่างกันไป เช่น ในสบูดำ

Yang และคณะ (2009) นำการวิเคราะห์ทางด้านโปรตีโอมิกส์มาอธิบายการแสดงออกของโปรตีนที่สัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของกรดไขมันในเมล็ดสบูดำ โดยเริ่มตั้งแต่มองการงอกจนกระทั่งเมล็ดงอก ซึ่งพบว่าการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องอยู่ทั้งหมด 50 ชนิด และโปรตีนที่พบยังเกี่ยวข้องกับวิถีต่างๆ เช่น เบต้าออกซิเดชัน วัฏจักรไกลโคไลซิส และวัฏจักรเพนโตสฟอสเฟต เป็นต้น

Boornasrisak และคณะ, 2013 นำการวิเคราะห์ทางด้านโปรตีโอมิกส์มาอธิบายกลไกและหน้าที่ รวมถึงการแสดงออกของโปรตีนที่สัมพันธ์กับการสร้างและสะสมกรดไขมันในเมล็ดสบูดำระยะต่างๆ ซึ่งพบว่าการแสดงออกของโปรตีนอยู่ทั้งหมด 22 ชนิดที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมัน และจากการเลือกติดตามการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน 4 ชนิด ที่เกี่ยวข้องด้วยเทคนิค Real-time PCR พบว่าแนวโน้มการแสดงออกของยีนสัมพันธ์กับข้อมูลการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดไขมันที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography, GC)

Liu และคณะ (2009) นำการวิเคราะห์ทางด้านโปรตีโอมิกส์มาอธิบายการแสดงออกของโปรตีนในเมล็ดสบูดำแห้ง โดยแยกศึกษาเทียบระหว่างเอมบริโอและเอนโดสเปิร์ม พบว่าเนื้อเยื่อทั้ง 2 ชนิด มีการแสดงออกของโปรตีนที่แตกต่างกันอยู่ทั้งหมด 14 ชนิด ซึ่งจากการระบุหน้าที่พบโปรตีนในเอนโดสเปิร์มทำหน้าที่ในการสะสมสารอาหารสำหรับนำไปใช้ในช่วงที่เมล็ดงอก และโปรตีนที่พบในเอมบริโอทำหน้าที่ในการนำสารจากเอนโดสเปิร์มมาใช้ในการเจริญของต้นกล้า

จากรายงานการวิจัยจะเห็นว่าการศึกษาทางด้านโปรตีโอมิกส์สามารถที่จะนำมาใช้อธิบายกลไกการแสดงออกของโปรตีนได้เป็นอย่างดี ทั้งนี้ข้อมูลดังกล่าวยังสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลเป็นฐานในการศึกษาและต่อยอดงานด้านต่างๆ เช่น การหาความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนและยีน เป็นต้น

2.11 ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารฟอรับอลเอสเทอร์

ฟอรับอลเอสเทอร์เป็นสารที่พบมากในสบูดำ โดยปริมาณสารจะมากหรือน้อยนอกจากจะขึ้นอยู่กับลักษณะทางพันธุกรรมแล้วยังมีปัจจัยเสริมมาจากสิ่งแวดล้อมด้วย จากรายงานการวิจัยมีรายงานการศึกษายีนที่สร้างสารฟอรับอลเอสเทอร์ในสบูดำ เช่น

2.11.1 *J. curcas* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase

Liu และคณะ (2009) 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGR, EC: 1.1.1.34) จัดเป็นเอนไซม์ตัวแรกในวิถีชีวสังเคราะห์เทอร์พีนอยด์ที่มากกระตุ้นอะซิติลโคเอในวิถีย่อย MVA ให้มีการสร้างไอโซพรีนส์ จากการโคลนยีนจากตัวอย่างใบสบู่ดำด้วยเทคนิค RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends technique) พบว่า cDNA มีความยาว 1950 คู่เบส ประกอบด้วยบริเวณที่สามารถอ่านรหัสได้ 1752 คู่เบส แปลรหัสออกมาได้ 584 กรดอะมิโน มีมวลโมเลกุล 62.4 kDa มีค่า pI เท่ากับ 7.63 และจากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนใน *E. coli* Top 10F' พบว่าทำให้เกิดการสร้างและสะสมบีตาแคโรทีนขึ้นภายในเซลล์ *E. coli* โดยจะสังเกตได้จากสีโคลนของ *E. coli* ที่เปลี่ยนจากสีเหลืองไปเป็นสีเหลืองส้ม

2.11.2 *J. curcas* geranylgeranyl diphosphate synthase (*Jc*-GGPPS)

Geranylgeranyl diphosphate synthase (GGPPS) (EC: 2.5.1.29) เป็นเอนไซม์ในวิถีชีวสังเคราะห์เทอร์พีนอยด์ที่แยกได้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1972 จากผลพืกทอง (*Cucurbita moschata*) จากรายงานการศึกษาการแสดงออกของยีนใน *E. coli* และ *S. cerevisiae* ระบุว่ายีนดังกล่าวเกี่ยวข้องกับการสร้างสารในกลุ่มไดเทอร์พีนส์ (สารพอร์บอลเอสเทอร์)

Lin และคณะ (2010) ยีน *Jc*-GGPPS (Accession Number: GU585938) ในเมล็ดสบู่ดำจะสร้างเอนไซม์ GGPPS โดยมี Geranyl diphosphate (GPP) เป็นสารตั้งต้นในการสร้าง และจากการโคลนยีนดังกล่าวด้วยเทคนิค RACE พบว่ามีความยาวของ cDNA 1414 คู่เบส ประกอบด้วยบริเวณที่สามารถอ่านรหัสได้ 1113 คู่เบส แปลรหัสออกมาได้ 371 กรดอะมิโน จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนใน *E. coli* DH5 α พบว่าทำให้เกิดการสร้างและสะสมบีตาแคโรทีนขึ้นภายในเซลล์ *E. coli* โดยจะสังเกตได้จากสีโคลนของ *E. coli* ที่เปลี่ยนจากสีขาวไปเป็นสีเหลือง

2.11.3 *J. curcas* casbene synthase homolog (*Jc*CHS)

Casbene synthase เป็นเอนไซม์สำคัญในวิถีชีวสังเคราะห์ทิกเลนไดเทอร์พีนส์ เอนไซม์ดังกล่าวแยกได้ครั้งแรกจากสบู่แดง (*J. gossypifolia*) ในปี ค.ศ. 1979 โดย Purushothaman และ Chandrasekaran ต่อมาได้มีรายงานว่าสามารถพบ Casbene ได้ในรากของพืชที่อยู่ในที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกันกับสบู่ดำ เช่น ปัตตาเวีย (*J. integerrima*), *J. elliptica*, *J. glandulifera* เป็นต้น (Sabandar และคณะ, 2013)

Nakano และคณะ (2012) ยีน *J. curcas* casbene synthase homolog (*Jc*CHS) (Accession number: AB687998) จะสร้างเอนไซม์ Casbene synthase จากการโคลน

ยีนดังกล่าวจากใบสบู่ดำด้วยเทคนิค RACE พบว่า cDNA มีความยาว 2016 คู่เบส จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค quantitative RT-PCR พบการแสดงออกของยีนดังกล่าวในต้นกล้า (อายุ 10 วัน หลังการงอก) ใบแก่ และระยะพัฒนาการของผลสดทั้ง 4 ระยะ แต่ไม่พบการแสดงออกในระยะพัฒนาการของเมล็ด

2.12 การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Real-time PCR

ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน ความถูกต้องหรือความน่าเชื่อถือของข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ถือว่ามีความสำคัญอย่างมากต่อความเข้าใจในบทบาทและกลไกการทำงานของยีนนั้นๆ ในสิ่งมีชีวิต ซึ่งวิธีการศึกษาการแสดงออกของยีนก็มีหลากหลายวิธีแตกต่างกันไป เช่น Northern blotting, quantitative Real-time RT-PCR (qRT-PCR), microarray และ semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR หรือ Real-time PCR)

Real-time PCR เป็นเทคนิคหนึ่งในการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เป็นที่รู้จักและนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน (Meng และคณะ, 2013) และเนื่องจาก Real-time PCR เป็นการนำเอาเทคนิคในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม การวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของสารพันธุกรรม รวมถึงการวิเคราะห์ตามหลักสถิติรวมไว้ด้วยกัน ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์จึงมีความน่าเชื่อถือในระดับหนึ่ง อีกทั้ง Real-time PCR ยังเป็นที่ยอมรับว่าเป็นอีกหนึ่งเทคนิคในการวิเคราะห์หาปริมาณและคุณภาพของ messenger RNA (mRNA) ที่มีความไวและมีความแม่นยำสูงอีกด้วย

2.13 ยีน housekeeping: Ubiquitin (UBQ)

เนื้อเยื่อต่างชนิดกันรวมถึงเซลล์ชนิดเดียวกันภายใต้สภาวะการทดลองที่แตกต่างกัน จะมีการแสดงออกของยีนเปลี่ยนแปลงแตกต่างกัน (Meng และคณะ, 2013) ดังนั้นในการศึกษาการแสดงออกของยีนในสิ่งมีชีวิต ถ้าเลือกใช้อ้างอิงจากระดับการแสดงออกจากเนื้อเยื่อที่ต่างกันหรือเซลล์ชนิดเดียวกันแต่อยู่ภายใต้สภาวะที่แตกต่างกันโอกาสที่ผลการวิเคราะห์จะคลาดเคลื่อนจึงมีอยู่สูงมาก (Jain และคณะ, 2006) และเพื่อลดปัญหาดังกล่าวในการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิคต่างๆ จึงควรเลือกใช้ยีนอ้างอิงที่มีระดับการแสดงออกที่คงที่ หรือการแสดงออกของยีนที่อยู่ใต้สภาวะการทดลองเดียวกัน (Zheng และ Sun, 2011) ซึ่งรวมถึงการใช้ยีน housekeeping

ยีน housekeeping (HMGs) ถูกสันนิษฐานว่าเป็นยีนในสิ่งมีชีวิตที่มีระดับการแสดงออกที่คงที่และแน่นอนแม้ว่าจะมาจากต่างเนื้อเยื่อ ต่างระยะ หรือแม้แต่ต่างสภาวะการทดลอง (Løvdaal และ Lillo, 2009; Xia และคณะ, 2014) โดยยีน HMGs ที่เป็นที่ยอมรับและถูกนำมาใช้อ้างอิงในการศึกษา

การแสดงออกของยีนในพืชและสัตว์มากที่สุด ได้แก่ *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* , *18S rRNA*, *actin (ACT)* , *ubiquitin (UBQ)*, *elongation factor-1a (EF-1a)*, α -*tubulin (TUA)* และ β -*tubulin (TUB)* (Yang และคณะ, 2014)

UBQ เป็นโปรตีนขนาดเล็กที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 76 กรดอะมิโน และสามารถพบได้ทั่วไปในเซลล์ยูคาริโอต จากการเทียบลำดับเบสบน cDNA หรือลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน UBQ ระหว่างสิ่งมีชีวิตหลายๆ ชนิด พบว่าไม่แตกต่างกันมากนัก และจากการเทียบระหว่างลำดับกรดอะมิโนของมนุษย์ (*Homo sapiens*) พืช สัตว์ และยีสต์ พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกันประมาณ 1-5 กรดอะมิโน (Qiang และคณะ, 2013)

Zhu และ Altmann (2005) สามารถพบการแสดงออกของยีน *ACT*, *GAPDH* และ *UBQ* ได้ในเซลล์ส่วนใหญ่ โดยยีนมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทำงานของเซลล์ ยกตัวอย่างเช่น การเพิ่มจำนวนเซลล์และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพื่อไปทำหน้าที่ต่างๆ การส่งสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ การสลายตัวของโปรตีน และการสังเคราะห์ mRNA เป็นต้น ฉะนั้นเราจึงสามารถพบการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อต่างๆ ซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานของเซลล์และการทำหน้าที่ของเนื้อเยื่อนั้นๆ

ฐิติพร และคณะ (2552) พบว่าการแสดงออกของยีน *UBQ* จะคงที่ถึงแม้การทดลองจะใช้เนื้อเยื่อที่ต่างกัน สอดคล้องกับรายงานของ Jain และคณะ, 2006 ยีน *UBQ* และ *TUA* ในเนื้อเยื่อต้นปอปลาร์ (*poplar*) จะมีการแสดงออกที่คงที่

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

ผลสบูดำ 5 ระยะเวลา

โกร่งบดยา (Mortar and pestle)

เครื่องชั่งแบบละเอียด 4 ตำแหน่ง (Electric balance 4 digits) รุ่น OHAUS PioneerTM

เครื่องชั่งแบบละเอียด 2 ตำแหน่ง (Electric balance 2 digits) รุ่น OHAUS PioneerTM

เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Shaking incubator) รุ่น VS-8480SFN

เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerate centrifuge) รุ่น JS-5.3

หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (Microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 ไมโครลิตร

เครื่องดูดสารปริมาณต่ำ (Micro pipette) ขนาดต่างๆ

เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Mini centrifuge) รุ่น ExtraGene

เครื่องทำความร้อน (Heat box)

ไมโครเวลเพลท (Microwell plate)

เครื่องผสมสารเคมี (Vortex mixer) รุ่น Genine 2

เครื่องอ่านปริมาณสารตัวอย่างบนไมโครเพลท (Microplate reader) รุ่น RT-2100C

เครื่องแยกโมเลกุลโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า (MiniPAGE chamber) รุ่น AE-6530

เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าสำหรับงานอิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis power supply)

เครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล (Calibrate imaging densitometer) รุ่น GS-710

เครื่องไมโครมิกเซอร์ (Micromixer) รุ่น Mx2

เครื่องแยกสารและวิเคราะห์มวลสาร (LC-MS/MS) รุ่น Ultimate 3000

คอลัมน์สำหรับเครื่อง LC-MS μ -precolumn (Monolithic Trap Column, 200 μ m i.d.x5 cm.)

คอลัมน์สำหรับเครื่อง LC-MS nano column (Monolithic Nano Column, 100 μ m i.d.x5 cm.)

เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator)

กระดาษกรองเบอร์ 1 (Filter paper)

เครื่องปั่น (Blender)

เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)

เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge)
 เครื่องสกัดสารซอกซ์เลต (Soxhlet extractor)
 ชุดกรองสารแบบสุญญากาศ (Suction flask, Buchner funnel)
 ปัมมกรองสารสำหรับการวิเคราะห์ (Vacuum pump)
 ตัวกรองชนิดไนลอน (Syringe Filter Nylon, Dia. 13 mm, pore size 0.45 μ l)
 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) รุ่น LC-20A
 คอลัมน์สำหรับเครื่อง HPLC รุ่น Inertsil OD-3 size 4.6x250 mm.
 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine) รุ่น MyGenie 96
 เครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel Documentation) รุ่น SYNGENE
 0.2 ml opaque white 8-strip PCR Tube (Bioneer Trade, Korea)
 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometry) รุ่น Ultraspec 310 pro
 เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (Nanodrop spectrophotometry) รุ่น ND-1000
 เครื่องขยายจำนวนสารพันธุกรรมแบบเวลาจริง (Real-time PCR) รุ่น ExicylerTM 96
 Sequence Detection system (BIONEER, Korea)
 อุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆ

3.2 สารเคมี

น้ำกลั่นที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว
 น้ำกลั่นที่ปราศจากไอออน (DI water)
 น้ำ (HPLC grade) (Labscan, Thailand)
 Absolute Ethanol (AR grade) (Labscan, Thailand)
 Acetone (Labscan, Thailand)
 Acrylamide (BIO-RAD, China)
 Agarose (BIO-active)
 Ammonium persulfate (APS) (USB corporation, USA)
 Ammonium sulfate (Sigma Aldrich, France)
 Ammonium bicarbonate (Sigma, USA)
 Acetonitrile (AR grade) (Labscan, Thailand)
 β -mercaptoethanol (GE Healthcare, Sweden)

Bovine serum albumin (BSA)	(Damsladt, Germany)
Bromophenol blue	(Sigma, USA)
Boric acid	(Bioland Scientific)
Bis-N,N'-acrylamide	(Uppsala, Sweden)
Billiant blue G-250/CI 42655	(BIO-RAD, UK)
Calcium chloride (CaCl ₂ .2H ₂ O)	(BIO BASIC INC., Thailand)
Copper sulfate (CuSo ₄ .5H ₂ O)	(Fisher scientific, UK)
Chloroform	(Labscan, Thailand)
DEPC treat-water	(USB corporation, USA)
Dithiotheritol (DTT)	
Ethidium bromide	
EDTA	(USB Corporation, USA)
Filin-Ciocalteu phenol (Folin reagent)	(Merck, Germany)
Formic acid	(Scharlau, Spain)
Glycerol (80% w/w)	(GE Healthcare, UK)
Glacial acetic acid	(Labscan, Thailand)
GeneRuler™ Low Range DNA Ladder	(Thermo scientific)
Hydrochloric acid	(Labscan, Thailand)
Iodoacetamide (IAA)	(GE Healthcare, UK)
Isopropanol	(VWR International 201)
Isoamyl alcohol	(KOSHER, EU)
Lithium chloride	(Sigma Aldrich, France)
Liquid nitrogen	
Mercaptoethanol	(GE Healthcare, Sweden)
Methanol (AR grade)	(Labscan, Thailand)
Methanol (HPLC grade)	(Labscan, Thailand)
N,N',N'',N'''-tetramethylethylenediamine	(USB corporation, USA)
Oligo dT	(BioDesign, Thailand)
Phenol	(Amresco, Thailand)
InsTA clone™ PCR cloning kit	(Thermo scientific)
Polyvinylpyrrolidone (PVP)	(Fluka, Germany)






Protein standard marker	(Bio-Sciences AB, Sweden)
Phorbol-12-myristate-13-acetate	(Sigma Aldrich, France)
Phosphoric acid (85% Orthophosphoric acid)	(Carlo ERBA, Italy)
Sodium citrate	(Merck, Germany)
Sodium chloride	(Labscan, Thailand)
Sodium carbonate	(Sigma, Germany)
Sodium hydroxide	(Saharlau, Spain)
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	(Uppsala, Sweden)
Tartaric acid	(Carlo ERBA, Italy)
Tris [tris (hydroxyl methyl) aminomethane]	(USB corporation, USA)
Trizol reagent	(Invitrogen, USA)
Trypsin	(PROMEGA, USA)
Tryptone power	(BIO BASIC INC.)
SuprimeScript RT premix (2X)	(GENEI BIO)
2X PCR Master Mix	(Fermentas Life Sciences, UK)
SYBR Green	(KARA BIOSYSTEMS, Korea)
Yeast extracts	(BIO BASIC INC.)
QIaprep® Spin Miniprep Kit	(QIAGEN)

3.3 การเตรียมตัวอย่างผลสับุดำระยะต่างๆ

ผลสับุดำที่นำมาใช้ในการทดลองในครั้งนี้ได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์อนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพฯ สยามบรมราชกุมารี ต. คลองไผ่ อ. สีคิ้ว จ. นครราชสีมา ทั้งนี้ผลสับุดำหลังเก็บมาจากต้น นำเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

สำหรับขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างจะอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผล แบ่งตัวอย่างผลสับุดำที่จะใช้ในการศึกษาออกเป็น 5 ระยะ โดยแต่ละระยะพัฒนาการของผลได้เลือกแยกทำการศึกษาในส่วนของเนื้อผล (pulp) และเนื้อในเมล็ด (seed kernel) รวม 10 ตัวอย่าง แสดงดังภาพที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 ลักษณะพัฒนาการทางสัณฐานวิทยาของผลสบูดำทั้ง 5 ระยะ

ระยะพัฒนาการ ของผล	รูปลักษณะผล	สีผล	ลักษณะเนื้อในเมล็ด
Premature fruit (P)		สีเขียว	เนื้อเมล็ดสีขาว ฉ่ำน้ำ
Mature fruit (M)		สีเขียวเข้ม	เนื้อเมล็ดสีขาว ค่อนข้างฉ่ำน้ำ
Mature ripe fruit (yellow) (R)		สีเหลือง	เนื้อเมล็ดสีขาว ค่อนข้างแข็ง
Senescent fruit (black) (S)		สีดำ	เนื้อเมล็ดสีขาว ค่อนข้างแข็ง
Dried fruit (D)		สีดำ	เนื้อเมล็ดสีขาว ค่อนข้างแข็ง และเริ่ม แห้ง

3.4 การศึกษาระดับการแสดงออกของโปรตีนด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์

3.4.1 การสกัดโปรตีนรวม

ตัวอย่างเนื้อผลและเนื้อในเมล็ดสบูดำทั้ง 5 ระยะ นำมาบดด้วยโกร่งร่วมกับการเติมไนโตรเจนเหลวจนละเอียดกลายเป็นเนื้อเดียวกัน ทำการสกัดโปรตีนจากแต่ละตัวอย่างโดยใช้ 0.5% (w/v) Sodium dodecyl sulfate (SDS) อัตราส่วน ตัวอย่าง 250 มิลลิกรัม ต่อ 0.1% (w/v) (SDS) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง ตกตะกอนโปรตีนด้วย

เครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง ดูดส่วนของเหลวใสที่อยู่ด้านบนใส่หลอดใหม่ เติม Acetone เย็น ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อทำการตกตะกอนโปรตีน เก็บตะกอนโปรตีนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง เทส่วนใสทิ้ง แล้วเก็บเฉพาะตะกอนโปรตีนมาละลายด้วย 0.5% (w/v) SDS คงสภาพโปรตีนโดยนำเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์ในขั้นตอนถัดไป ทั้งนี้การสกัดโปรตีนจากเนื้อผลและเนื้อในเมล็ดสับดูดำแต่ละระยะจะทำทั้งหมด 2 ครั้ง แล้วนำมารวมกันก่อนจะนำวัดความเข้มข้นของโปรตีน

3.4.2 การแยกโมเลกุลโปรตีนโปรตีนด้วย Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE gel)

โปรตีนที่ได้จากการสกัดจากข้อ 3.4.1 นำมาวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry โดยการนำแต่ละตัวอย่างมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 690 นาโนเมตร (OD690) ค่าที่ได้จากการวัด 3 ครั้งต่อตัวอย่าง นำมาหาค่าเฉลี่ยและนำมาคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนโดยการแทนค่าลงในสมการกราฟมาตรฐานของสารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin, BSA) ที่สร้างจากการนำสารละลาย BSA ความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 0-50 ไมโครกรัม (ภาคผนวก ก) นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง

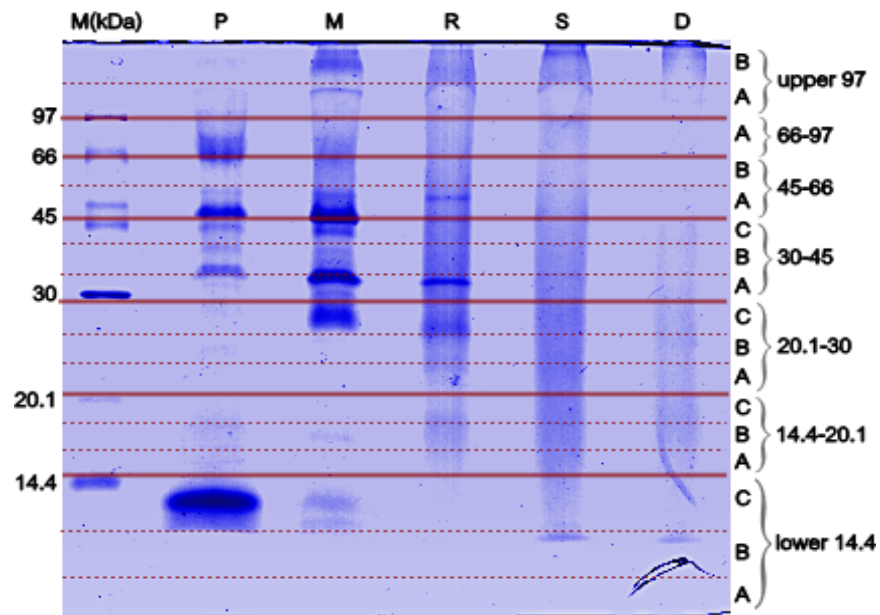
โปรตีนที่ทราบความเข้มข้นแล้วจากแต่ละตัวอย่าง นำมาแยกขนาดมวโมเลกุลบน SDS-PAGE gel โดยดูดโปรตีนมาให้ได้ความเข้มข้นของโปรตีนประมาณ 50 ไมโครกรัม นำระเหยแห้งด้วยเครื่องทำความร้อน (Heat box) จนปริมาตรโปรตีนเหลือประมาณ 5 ไมโครลิตร เติม 5X loading dye (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร นำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95-100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ก่อนจะโหลดลงบน SDS-PAGE gel โดยเจลที่พร้อมสำหรับการโหลดแยกโมเลกุลโปรตีนจะประกอบด้วยเจล 2 ชั้น ได้แก่ 5% stacking (เจลชั้นบน) และ 12.5% separating (เจลชั้นล่าง) (ภาคผนวก ค) ส่วนสภาวะที่เหมาะสมของเครื่องแยกโมเลกุลโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า เลือกใช้ 1X SDS-PAGE running buffer ซึ่งเตรียมจาก 10X SDS-PAGE running buffer (ภาคผนวก ค) มาใช้เป็นบัฟเฟอร์สำหรับแยกโมเลกุลโปรตีน เลือกใช้แรงดันกระแสไฟฟ้าขนาด 30 โวลต์ สำหรับพาโปรตีนเข้าสู่ชั้นเจล stacking และเมื่อโปรตีนผ่านเข้าสู่เจลชั้น separating จึงเปลี่ยนแรงดันกระแสไฟฟ้าเป็น 50 โวลต์ ทั้งนี้การแยกโมเลกุลโปรตีนจะเสร็จสมบูรณ์เมื่อโปรตีนตัวอย่างเคลื่อนลงมาเกือบถึงขอบเจลด้านล่าง จากนั้นจึงย้อมเจลด้วยสี Coomassie Brilliant Blue G-250 (ภาคผนวก ค) และตรึงสีย้อมให้ติดกับแถบโปรตีนด้วยสารละลายระหว่าง 10% Acetic acid และ

Methanol แล้วนำมาส่องภายใต้เครื่องถ่ายภาพและวิเคราะห์ภาพเจล (Calibrate imaging densitometer)

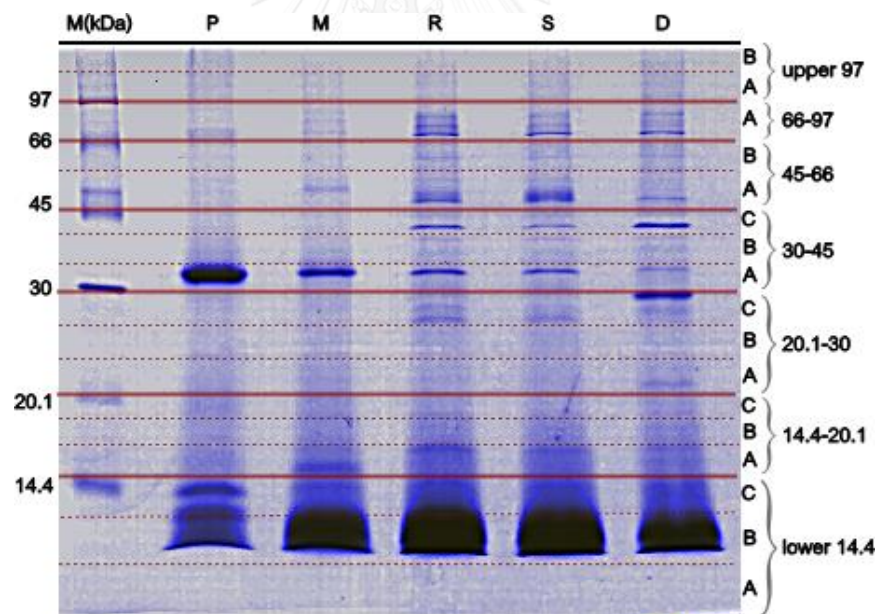
3.4.3 การระบุโปรตีนด้วยเครื่องแยกสารและวิเคราะห์มวลสาร (Liquid chromatography mass spectrometry/ mass spectrometry, LC-MS/MS)

3.4.3.1 การย่อยโปรตีนจากเจล SDS-PAGE

แผ่นเจล SDS-PAGE นำมาแบ่งออกเป็น 17 ช่วง โดยอ้างอิงกับโปรตีน marker แสดงดังตารางที่ 3.1 จากนั้นตัดชิ้นเจลแต่ละช่วงออกเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 1x1x1 มิลลิเมตร ใส่ลงในแต่ละหลุมของไมโครเพลท (หลุมละประมาณ 5 ชิ้นเจล) ล้างชิ้นเจลด้วยการเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม เขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที แล้วดูดน้ำทิ้งไป กำจัดสีย้อมออกจากชิ้นเจลด้วยการเติม 50 mM Ammonium bicarbonate ใน 50% Methanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม เขย่าที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งเจลใส ดูดสารทิ้งและล้างด้วยน้ำกลั่นอีกรอบ สลายพันธะ disulfide โดยการเติม 100% Acetonitrile ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม เขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที ดูดสารทิ้ง (ทำซ้ำอีกรอบ) ปล่อยให้ชิ้นเจลแห้งที่อุณหภูมิห้อง นาน 5-10 นาที แล้วเติม 10 mM Dithiothreitol ใน 10 mM Ammonium bicarbonate ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ปิดด้วยพลาสติกใส ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง ดูดสารละลายทิ้งไป เติม 100 mM Iodoacetamide ใน 10 mM Ammonium bicarbonate ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม ปิดด้วยพลาสติกใส ทิ้งไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง (เกิดปฏิกิริยา carbamidomethyl) ดูดสารละลายทิ้งไป เติม 100% Acetonitrile ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม เขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที แล้วดูดน้ำทิ้งไป (ทำซ้ำอีก 2 รอบ แต่ถ้าชิ้นเจลไม่หดตัวให้ทำซ้ำอีกรอบ) เติม 10ng Trypsin ใน 50% Acetonitrile ใน 10 mM Ammonium bicarbonate ปริมาตร 20 ไมโครลิตรต่อหลุม ปิดด้วยพลาสติกใส ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที และเติม 30% Acetonitrile ปริมาตร 30 ไมโครลิตรต่อหลุม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 3 ชั่วโมง หรือทิ้งไว้ข้ามคืน ดูดสารละลายเพปไทด์ลงในไมโครเพลทอันใหม่ สกัดชิ้นเจลซ้ำอีกรอบโดยการเติม 50% Acetonitrile ใน 0.1% Trifluoroacetic acid ปริมาตร 30 ไมโครลิตรต่อหลุม เขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที ดูดสารละลายเพปไทด์ใส่ลงในไมโครเพลทที่มีรหัสตัวอย่างตรงกัน (ทำซ้ำอีก 2 รอบ แต่ถ้าชิ้นเจลไม่หดตัวให้ทำซ้ำอีกรอบ ด้วย 70% Acetonitrile ใน 0.1% Trifluoroacetic acid ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม) ทำให้สารละลายเพปไทด์ที่อยู่ในไมโครเพลทแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และนำเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำวิเคราะห์ต่อด้วยเครื่อง LC-MS/MS



(ก) เนื้อผล



(ข) เนื้อในเมล็ด

ภาพที่ 3.1 โปรตีนจากตัวอย่างเนื้อผลและเนื้อในเมล็ดที่แยกได้ด้วย 12.5% SDS-PAGE gel

3.4.3.2 การวิเคราะห์โมเลกุลเปปไทด์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS

การเตรียมตัวอย่างสารละลายเปปไทด์สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS เริ่มจากการนำไมโครเพลทตัวอย่างที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จากข้อ 3.4.3.1 มาชะเอาเปปไทด์ออกด้วยการเติม 0.1% Trifluoroacetic acid ปริมาตร 10 ไมโครลิตรต่อหลุม (กรณีหัตถ์ตัวอย่างตรงกันหลายหลุมให้เติม 0.1% Trifluoroacetic acid ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในหลุมสุดท้ายและชะเรื่อยมาจนถึงหลุมแรก) ดูดสารละลายเปปไทด์ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ นำมาตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดสารละลายส่วนใสที่อยู่ด้านบนประมาณ 8 ไมโครลิตร ใส่ลงใน insert tube (ระวังการอย่าให้มีฟองอากาศ) ปรับ insert tube ให้ตรงก่อนปิดฝาหลอด และนำเข้าเครื่อง LC-MS/MS เพื่อทำการวิเคราะห์

สำหรับขั้นตอนการวิเคราะห์โมเลกุลเปปไทด์เลือกใช้เครื่อง LC-MS/MS รุ่น Ultimate 3000 คอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์เลือกใช้รุ่น Monolithic Nano Column (100 μ m i.d. x 5 cm) และ μ -precolumn เลือกใช้รุ่น Monolithic Trap Column (200 μ m i.d. x 5 cm) เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ระหว่าง A และ B เลือกใช้เป็นสารละลาย A ประกอบด้วย น้ำ (HPLC grade) และ 0.1% Trifluoroacetic acid สารละลาย B ประกอบด้วย น้ำ 50% (HPLC grade) และ 50% Acetonitrile (HPLC grade) และ 0.1% Trifluoroacetic acid กำหนดอัตราการไหลของสารผ่านคอลัมน์ไว้ที่ 20 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วนปริมาตรสารตัวอย่างที่ฉีดวิเคราะห์กำหนดไว้ที่ 1 ไมโครลิตรต่อตัวอย่าง และใช้สารละลาย BSA ความเข้มข้น 1 ไมโครโมล เป็น internal control ในการเปรียบเทียบ

3.4.4 การประมวลผลข้อมูลโมเลกุลเปปไทด์

จากการแบ่งเจล SDS-PAGE ของตัวอย่างเนื้อเยื่อทั้ง 2 ชนิด ออกเป็น 17 ช่วง ตามภาพที่ 3.1 ตัดและย่อยเจลจนได้ออกมาเป็นสารละลายกรดอะมิโน และเมื่อผ่านขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ข้อมูลที่ได้จะแสดงออกมาในรูปของโครมาโทแกรม หรือ MS/MS spectra ซึ่งข้อมูล MS/MS spectra ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างแต่ละช่วงนำมาประมวลผลผ่านโปรแกรมต่างๆ ตามลำดับ เช่น โปรแกรม CompassXport 1.3.10 (Bruker Daltonik, GmbH) และโปรแกรม DeCyder MS 2.0 Differential Analysis Software (GE Healthcare) ซึ่งตัวซอฟต์แวร์จะประกอบด้วยโปรแกรมหลักๆ คือ

- โปรแกรม DeCyder MS PepDetect จะทำหน้าที่วิเคราะห์ว่าเปปไทด์ที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ในเวลาเดียวกันน่าจะเป็นเปปไทด์ชนิดเดียวกัน

- โปรแกรม DeCyder MS PepMatch ทำหน้าที่วิเคราะห์ข้อมูลต่อจาก PepDetect โดยโปรแกรมดังกล่าว จะทำการวิเคราะห์การแสดงออกที่เพิ่มขึ้น (up-regulation) หรือลดลง (down-regulation) เปรียบเทียบปริมาณของเปปไทด์ของโพรตีนซีรัมอัลบูมิน

3.4.5 การระบุชนิดและหน้าที่ของโปรตีน

ในการระบุชนิดของโปรตีนจะอาศัยไฟล์ข้อมูลที่ผ่านการประมวลผลด้วยซอฟต์แวร์ DeCyder MS 2.0 Differential Analysis Software ซึ่งเป็นข้อมูลของเปปไทด์ที่มีการแสดงออกแตกต่างกันในตัวอย่างแต่ละระยะ มาสืบค้นต่อในเว็บไซด์ <http://www.Matrixscience.com> โดยเลือกที่ Mascot จะปรากฏแบบฟอร์มให้กำหนดค่าต่างๆ เช่น Database (S) หรือฐานข้อมูลสำหรับสืบค้นให้เลือกเป็น NCBI nr, Taxonomy เลือก Varidiplantae (Green plants), Fixed modifications เลือก Carbamidomethyl (C), Variable modifications เลือก Oxidation (M), Peptide charge เลือก 1+, 2+ and 3+ และ Instrument เลือก ESI-TRAP เป็นต้น และเมื่อผ่านการประมวลผลด้วย Mascot แล้ว จะได้ข้อมูลรายละเอียดต่างๆ เกี่ยวกับโปรตีนที่มีการแสดงออกทั้งหมด ระบุหน้าที่ของโปรตีนโดยการนำหมายเลข Accession No. มาสืบค้นกับฐานข้อมูลที่มีอยู่ใน Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) และ GoCat (<http://www.eagl.unige.ch/GoCat>)

3.5 ศึกษาการแยกและวิเคราะห์ปริมาณสารฟอรับอลเอสเทอร์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC)

3.5.1 การเตรียมตัวอย่างและการสกัดสารฟอรับอลเอสเทอร์ด้วยวิธี Soxhlet extraction

ตัวอย่างเนื้อผลและเนื้อในเมล็ดสบู่ดำทั้ง 5 ระยะ นำมาอบไล่ความชื้นที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง แล้วนำแต่ละตัวอย่างมาปั่นให้ละเอียด

สำหรับวิธีการสกัดสารฟอรับอลเอสเทอร์จากสบู่ดำ ได้ดัดแปลงมาจากวิธีการของ ปาริชาติ มั่นอัน (2552) โดยใช้อัตราส่วนตัวอย่างปั่นละเอียด 6 กรัม ต่อ Methanol (HPLC grade) ปริมาตร 125 มิลลิลิตร นำแต่ละตัวอย่างมาสกัดด้วยเครื่องสกัดสารซอกท์เลต (Soxhlet extraction) นาน 4 ชั่วโมง สารละลายที่ได้นำมาแยกตัวทำละลาย (Methanol) ออก ด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporator) โดยใช้อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความดันประมาณ 250-300 บาร์ จนได้สารละลายเหนียวข้น จากนั้นจึงใช้ Methanol (HPLC grade) ละลายและปรับปริมาตรให้ครบ 25 มิลลิลิตร คงสภาพสารโดยการนำตัวอย่างเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์

ด้วยเครื่อง HPLC ทั้งนี้การสกัดสารฟอร์บอลเอสเทอร์จากเนื้อผลและเนื้อในเมล็ดสับุดำแต่ละระยะจะ ทำทั้งหมด 2 ครั้ง แล้วนำมารวมกันก่อนจะนำมาวิเคราะห์

3.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณสารฟอร์บอลเอสเทอร์ด้วยเครื่อง HPLC

การเตรียมสารและการวิเคราะห์ปริมาณสารฟอร์บอลเอสเทอร์จากตัวอย่างสับุดำได้ ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Pradhan และคณะ (2012) ร่วมกับวิธีการของ ปาริชาติ มั่นอัน (2552) โดยการนำสารละลายตัวอย่างประมาณ 700 ไมโครลิตร มาผ่านการกรองด้วยตัวกรองชนิดไนลอน เพื่อกำจัดตะกอนที่ปนเปื้อน

สำหรับขั้นตอนการวิเคราะห์สารเลือกใช้เครื่อง HPLC รุ่น LC-20A ส่วนคอลัมน์ที่ใช้ ในการแยกสารเลือกเป็น รุ่น Inertsil ODS-3, Reverse-phase mode (4.6 μm i.d. x 250 cm) สภาวะคอลัมน์เลือกควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส ใช้ตัวตรวจวัด (detector) เป็น UV เลือกใช้ ความยาวคลื่นที่ 280 นาโนเมตร เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เลือกใช้เป็นสารผสมระหว่าง Acetonitrile (HPLC grade) ร่วมกับน้ำ (HPLC grade) ในอัตราส่วน 80 : 20 โดยกำหนดอัตราการ ไหลของสารผ่านคอลัมน์ไว้ที่ 20 ไมโครลิตร ทั้งนี้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารฟอร์บอลเอสเทอร์จาก แต่ละตัวอย่างจะทำทั้งหมด 3 ซ้ำ แล้วนำค่าพื้นที่ใต้โครมาโทแกรมที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและแทนค่าลงในสมการกราฟมาตรฐานของสารที่นำมาใช้ในการเปรียบเทียบเพื่อนำมาสู่การคำนวณหาปริมาณสาร ในแต่ละตัวอย่างต่อไป

สำหรับสารมาตรฐานที่เลือกนำมาใช้ในการเปรียบเทียบ (internal control) เลือกใช้เป็นสารฟอร์บอลเอสเทอร์ ชนิด Phorbol-12-myristate-13-acetate (TPA) จากบริษัท Sigma Chemicals (Sigma Aldrich, France) ละลายด้วย Methanol (HPLC grade) โดยกำหนด ความเข้มข้นของสารมาตรฐานตั้งแต่ 20-100 ส่วนในล้านส่วน (ppm) (ภาคผนวก ก) ทั้งนี้จะใช้ค่า พื้นที่ใต้โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง มาหาค่าเฉลี่ยและนำมาใช้ในการสร้าง สมการกราฟมาตรฐาน

3.6 หาความสัมพันธ์เพื่อนำไปสู่การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการชีวสังเคราะห์ สารกลุ่มไดเทอร์ปีนส์

ข้อมูลระดับการแสดงออกของโปรตีนทั้งหมดที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ และข้อมูลปริมาณสารฟอร์บอลเอสเทอร์จากตัวอย่างเนื้อผลและเนื้อในเมล็ดสับุดำทั้ง 5 ระยะ ที่ได้ จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC นำมาหาความสัมพันธ์โดยอ้างอิงกับสมมติฐานที่ตั้งไว้ว่า เลือกจาก ระดับการแสดงออกของโปรตีนที่มีแนวโน้มของความสัมพันธ์เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับสาร โดยในการ

คัดเลือกโปรตีนเป้าหมายจะให้ความสำคัญกับโปรตีนที่สามารถระบุชนิดและหน้าที่ได้เป็นอันดับแรก และการทำหน้าที่ของโปรตีนเกี่ยวข้องกับวิถีชีวสังเคราะห์เทอร์พีนอยด์ และเมื่อได้ข้อมูลที่ต้องการจึงเลือกนำมาใช้ในการทำนายยีนที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการสร้างสารในกลุ่มไดเทอร์พีนส์ (สารพอร์บอล เอสเทอร์) จากนั้นจึงเลือกนำมาตรวจสอบและติดตามการแสดงออกในระดับ mRNA ด้วยเทคนิค Real-time PCR

3.7 การตรวจสอบและติดตามการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการชีวสังเคราะห์สารกลุ่มไดเทอร์พีนส์ด้วยเทคนิค Real-time PCR

3.7.1 การเตรียมตัวอย่างและการสกัดอาร์เอ็นเอจากสบูดำ

นำตัวอย่างเนื้อผลและเนื้อในเมล็ดสบูดำทั้ง 5 ระยะ มาบดด้วยโกร่งร่วมกับการเติมไนโตรเจนเหลวจนตัวอย่างละเอียดกลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำมาสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธีการที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อนั้นๆ

สำหรับวิธีที่เลือกนำมาใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อในเมล็ด ได้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Boornasrisak และคณะ (2013) ร่วมกับวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอของสถาบันจีโนม ศูนย์พันธุกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) โดยใช้ตัวอย่างเนื้อในเมล็ดสบูดำบดละเอียด 100 มิลลิกรัม ต่อ Trizol reagent (Ambion, USA) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปั่นให้เข้ากัน นาน 5 นาที เติม Chloroform ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที ทำให้สารละลายแยกชั้นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ดูดของเหลวใสที่อยู่ชั้นบนสุด ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดใหม่ (ทำซ้ำ 2 รอบ ตั้งแต่ขั้นตอนการเติม Chloroform) ตกตะกอนอาร์เอ็นเอโดยการเติม Absolute ethanol ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เก็บตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทของเหลวทิ้งไป ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 75% Ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทของเหลวทิ้งไป ทำให้ตะกอนอาร์เอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้องแล้วจึงละลายตะกอนด้วย DEPC-treat water ปริมาตร 20 ไมโครลิตร อาร์เอ็นเอที่ได้นำมาวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมที่ช่วงความยาวคลื่น 260/280 (OD260/280)

หมายเหตุ กรณีอาร์เอ็นเอที่ได้จากการสกัดมีสิ่งเจือปน สามารถทำให้อาร์เอ็นเอบริสุทธิ์ขึ้นด้วยการเติม 8M Lithium chloride ในอัตรา 1 เท่าของอาร์เอ็นเอรวมกับ Absolute ethanol (เติม 8M Lithium chloride ลงในตัวอย่างอาร์เอ็นเอ วางไว้ที่อุณหภูมิห้องก่อนแล้วจึงเติม

Absolute ethanol ตาม) เติม Absolute ethanol ในอัตรา 2 เท่าของอาร์เอ็นเอ ที่งัวไข่มุกคินที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เก็บตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทของเหลวทิ้งไป ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 75% Ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทของเหลวทิ้งไปและทำให้ตะกอนอาร์เอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย DEPC-treat water ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำอาร์เอ็นเอมาวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม คงสภาพอาร์เอ็นเอโดยนำเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ cDNA

สำหรับวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อผล ได้ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Chaudhary และคณะ (2011) โดยใช้เนื้อผลสับดับละเอียด 100 มิลลิกรัม ต่อ Extraction buffer (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 425 ไมโครลิตร ร่วมกับ β -mercaptoethanol ปริมาตร 28 ไมโครลิตร และเม็ด bead เพื่อช่วยในการแตกตัวของเซลล์ นำมาปั่นนาน 5 นาที วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที นำเม็ด bead ออก ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดส่วนใสในหลอดใหม่ เติม PCI (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นนาน 1 นาที วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ดูดส่วนใสในหลอดใหม่ เติม 1M Glacial acetic acid ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ Absolute ethanol ปริมาตร 350 ไมโครลิตร นำมาบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เทของเหลวทิ้งไป เติม 75% Ethanol (Absolute ethanol ละลายด้วย DEPC-treat water) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทของเหลวทิ้งไป ทำให้ตะกอนอาร์เอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้องและละลายตะกอนด้วย DEPC-treat water ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำอาร์เอ็นเอมาวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม และนำมาตรวจสอบด้วยเจล 1% agarose

หมายเหตุ กรณีสกัดอาร์เอ็นเอที่ได้จากการสกัดมีสิ่งเจือปน สามารถทำให้อาร์เอ็นเอบริสุทธิ์ขึ้นด้วยการเติม Chloroform ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที ตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ดูดส่วนใสในหลอดใหม่ เติม P-buffer (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และ Absolute ethanol ปริมาตร 250 ไมโครลิตร นำมาบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เก็บตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เทของเหลวทิ้งไป ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 75% Ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

เทของเหลวทิ้งไป ทำให้ตะกอนอาร์เอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้องและละลายตะกอนด้วย DEPC-treat water ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำอาร์เอ็นเอมาวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม และตรวจสอบด้วยเจล 1% agarose คงสภาพอาร์เอ็นเอโดยนำเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ cDNA

3.7.2 การสังเคราะห์ cDNA

สำหรับขั้นตอนการสังเคราะห์ cDNA จากอาร์เอ็นเอต้นแบบ ในปฏิกิริยาจะประกอบด้วยอาร์เอ็นเอ ปริมาตร 9 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ Oligo dT ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ SuPrimeScript RT (2X) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร โดยเริ่มจากการผสมอาร์เอ็นเอกับไพรเมอร์ Oligo dT ให้เข้ากันก่อนนำเข้าสู่เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม แล้วจึงเติม SuPrimeScript RT (2X) ตามลงไป สำหรับสภาวะที่เหมาะสมของการทำงานของเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม แสดงดังตารางที่ 3.2 ในส่วนของ cDNA ที่ได้จากการสังเคราะห์จะคงสภาพโดยนำเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3.2 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสังเคราะห์ cDNA ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)
1	70	5
2	42	60
3	72	10
Stored	8	-

หมายเหตุ ขั้นตอนที่ 1 หลังนำปฏิกิริยาบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ให้นำออกมาแช่น้ำแข็งทันที นาน 1 นาที เติม SuPrimeScript RT (2X) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วนำเข้าสู่เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอีกครั้งจนสิ้นสุดปฏิกิริยา

3.7.3 การออกแบบไพรเมอร์สำหรับนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมขึ้นยืนเป้าหมาย

สำหรับการออกแบบไพรเมอร์เพื่อนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม และขั้นตอนการตรวจสอบการแสดงออกของยีนเป้าหมายด้วยเทคนิค Real-time PCR จะใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สร้างโปรตีนเป้าหมายแต่ละชนิดจากพืชที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่เลือกไว้นำมาทำการเปรียบเทียบด้วยโปรแกรม clustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) และออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะกับยีนเป้าหมายด้วยโปรแกรม Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) ในส่วนของยีน housekeeping ซึ่งเลือกนำมาใช้เป็น internal control ในการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนเป้าหมาย ได้เลือกใช้ยีน *ubiquitin (UBQ)* โดยอ้างอิงจากไพรเมอร์ที่ออกแบบและใช้ในงานวิจัยของ ฐิติพร และคณะ (2552) ทั้งนี้ในการออกแบบไพรเมอร์ให้จำเพาะกับยีนเป้าหมาย ต้องการให้ไพรเมอร์จับกับชิ้นส่วนของยีนและสังเคราะห์ยีนเป้าหมายได้ขนาด PCR product ไม่เกิน 210 คู่เบส และไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ได้สั่งซื้อจากบริษัท BioDesign (จ. ปทุมธานี)

3.7.4 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมชิ้นส่วนยีนเป้าหมาย

cDNA ที่ได้จากการสังเคราะห์จากข้อ 3.7.2 นำมาใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมชิ้นส่วนยีน *UBQ* โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย cDNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ยีน *UBQ* (forward และ reward) อย่างละ 1 ไมโครลิตร น้ำสำหรับงานพีซีอาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ 2X PCR Master Mix ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ทั้งนี้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมยีนที่สร้างโปรตีนเป้าหมายอื่นที่สนใจก็ใช้วิธีการเดียวกันนี้

สำหรับสภาวะที่เหมาะสมของการตั้งค่าการทำงานของเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม แสดงดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มการปริมาณสารพันธุกรรม ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

ขั้นตอน	จำนวนรอบ	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)
Denaturation	1	94	5
Annealing	30	94	00.30
		55-60*	00.30
		72	00.30
Extension	1	72	10
Stored	-	4	-

หมายเหตุ ขั้นตอน Annealing อุณหภูมิ* สามารถเปลี่ยนแปลงได้ ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของไพรเมอร์ที่ออกแบบ

3.7.5 การตรวจสอบชิ้นส่วนยีนเป้าหมาย

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *UBQ* (PCR product) ที่ได้จากขั้นตอนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม จากข้อ 3.7.4 นำมาตรวจสอบการแสดงออกด้วย 2% agarose (ภาคผนวก ค) โดยใช้ PCR product ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมกับ 6X loading dye ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร ก่อนไหลลงบนเจล ทั้งนี้ได้เลือกใช้ GeneRuler™ Low Range DNA Ladder ปริมาตร 2 ไมโครลิตร สำหรับไหลเทียบขนาดโมเลกุลดีเอ็นเอ

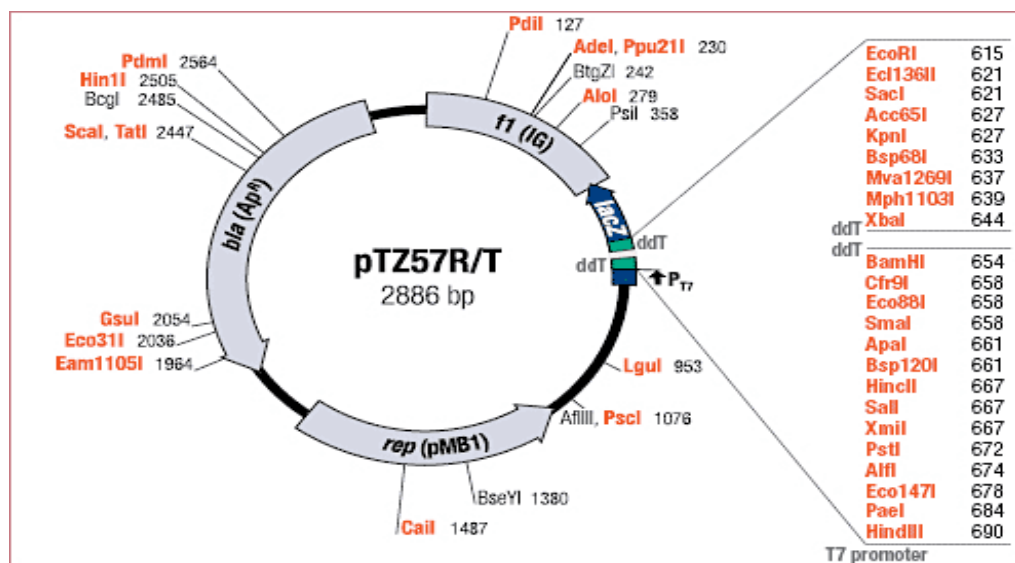
สำหรับสภาวะที่เหมาะสมในการแยกโมเลกุลดีเอ็นเอด้วยเครื่องแยกโมเลกุลดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า ได้เลือกใช้แรงดันกระแสไฟฟ้าขนาด 100 โวลต์ และ 0.5% TBE buffer (ภาคผนวก ค) มาใช้เป็นบัฟเฟอร์ในการแยก ทั้งนี้ในการแยกโมเลกุลดีเอ็นเอจะใช้เวลาประมาณ 10-15 นาที จากนั้นจึงย้อมเจลด้วย Ethidium bromide (10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) นาน 15 นาที นำมาส่องภายใต้เครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล (Gel Documentation)

3.7.6 การโคลนยีนและการคัดเลือก recombinant plasmid

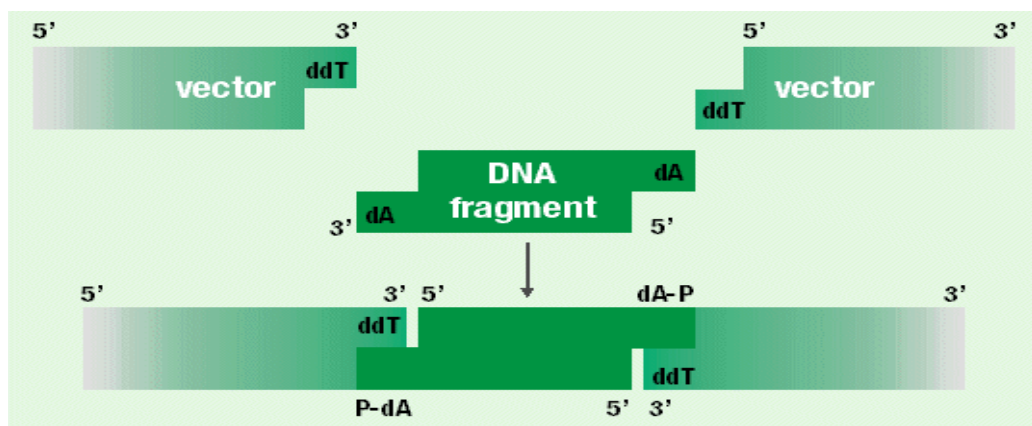
PCR product ของยีน *UBQ* ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม จากข้อ 3.7.4 นำมาเชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pTZ57R/T (ภาพที่ 3.2) ด้วยชุด InsTA clone™ PCR cloning kit ตามคู่มือที่แนบมา และเพื่อเป็นการเพิ่มโอกาสในการโคลนยีนเป้าหมายเข้าสู่เวกเตอร์ได้มากขึ้น จึงได้มีการแบ่งองค์ประกอบของสารต่างๆ ในปฏิกิริยาการเชื่อมดีเอ็นเอเข้าสู่เวกเตอร์ ออกเป็น 2 แบบ แสดงดังตารางที่ 3.4 ซึ่งหลังการการรวมปฏิกิริยาเข้าด้วยกันแล้ว จะวางปฏิกิริยาทั้ง 2 แบบ ไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2-3 ชั่วโมง เพื่อให้ PCR product ของยีน *UBQ* เชื่อมกับเวกเตอร์ pTZ57R/T จากนั้นจึงนำ pTZ57R/T plasmid vector ที่ได้ แทรกเข้าสู่ *E. coli* DH5α competent cell (ภาคผนวก ค) ด้วยวิธีการ heat shock ทั้งนี้ในส่วนของการเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนเป้าหมาย อื่นที่สนใจ ก็ใช้วิธีการเดียวกันนี้

สำหรับวิธีการ heat shock เพื่อแทรก pTZ57R/T plasmid vector เข้าสู่ *E. coli* DH5α competent cell ทำได้โดยใช้ pTZ57R/T plasmid vector ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ที่มีปริมาตร *E. coli* DH5α competent cell อยู่ 50 ไมโครลิตร นำมาแช่ในน้ำแข็งทันทีและตั้งทิ้งไว้เวลานาน 30 นาที นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที นำมาแช่บนน้ำแข็งทันที อีก 2 นาที เติมหาอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Luria-

Bertani (LB) (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 450 ไมโครลิตร นำมาบ่มพร้อมเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เก็บเซลล์ *E. coli* DH5 α recombinant plasmid ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ละลายเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว LB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำเซลล์มาเลี้ยงเพื่อคัดเลือกโคลน *E. coli* DH5 α recombinant plasmid โดยการเกลี่ยให้เซลล์กระจายบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง LB ที่มีส่วนประกอบของ Ampicillin (Ampicillin 100 ไมโครกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร) นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืนหรือประมาณ 16-18 ชั่วโมง



ภาพที่ 3.2 แผนที่เอ็นไซม์ตัดจำเพาะของเวกเตอร์ pTZ57R/T (Fermentas)



ภาพที่ 3.3 การแทรก PCR product เข้าสู่เวกเตอร์ pTZ57R/T (Fermentas)

ตารางที่ 3.4 องค์ประกอบของสารสำหรับปฏิกิริยาการเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนเป้าหมายเข้าสู่เวกเตอร์

องค์ประกอบของสาร	ปริมาตรสาร (μl)	
	ปฏิกิริยาที่ 1	ปฏิกิริยาที่ 2
pTZ57R/T vector	1	1
5X ligation buffer	2	2
DI water	5.7	3.7
ดีเอ็นเอของยีนเป้าหมาย	1	3
T4 DNA ligase	0.3	0.3
ปริมาตรรวม	10	10

3.7.7 การตรวจสอบผลการโคลนยีน

เลือกโคโลนี *E. coli* DH5 α recombinant plasmid ที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง LB ที่มีส่วนประกอบของ Ampicillin มาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (แต่ละปฏิกิริยาการเชื่อมชิ้นส่วนดีเอ็นเอ จะมีการตรวจสอบซ้ำ 3-5 ครั้ง จากการคัดเลือกโคโลนี มา 3-5 โคโลนี) เพื่อตรวจสอบ recombinant plasmid

สำหรับองค์ประกอบของปฏิกิริยาการทำโคลนพีซีอาร์ ประกอบด้วย 2X PCR Master Mix ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ยีน *UBQ* (forward และ reward) อย่างละ 1 ไมโครลิตร น้ำสำหรับงานพีซีอาร์ ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และหนึ่งโคโลนีของ *E. coli* DH5 α recombinant clones ที่ขึ้นบนจานเพาะเชื้อ ผสมให้เข้ากันแล้วนำเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม โดยอ้างอิงการตั้งค่าการทำงานของเครื่องจากตารางที่ 3.3 และเมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาจึงนำ PCR product มาตรวจสอบด้วย 2% agarose เช่นเดียวกันกับการตรวจสอบ PCR product ของยีน *UBQ* ที่ได้ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ทั้งนี้ในการตรวจสอบผลการโคลนยีนเป้าหมายอื่นที่สนใจก็ใช้หลักการเดียวกันนี้

หมายเหตุ ก่อนนำตัวอย่างเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม เซลล์บางส่วนของ *E. coli* DH5 α recombinant plasmid ที่ละลายอยู่ในองค์ประกอบของปฏิกิริยาการทำโคลนพีซีอาร์ มาเลี้ยงต่อบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง LB ที่มีส่วนประกอบของ Ampicillin และนำบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืนหรือประมาณ 16-18 ชั่วโมง เพื่อเก็บไว้ใช้ในขั้นตอนการเลี้ยงเซลล์เพื่อสกัดแยกเฉพาะ recombinant plasmid

3.7.8 การสกัดแยก recombinant plasmid

ผลการตรวจสอบโคลนนิ่งพีซีอาร์ จากข้อ 3.7.7 ด้วยเจล 2% agarose ข้อมูลที่ได้จะนำมาใช้ในการคัดเลือกโคลนนิ่ง *E. coli* DH5 α recombinant plasmid ที่เราได้แยกเลี้ยงไว้ เพื่อนำมาเลี้ยงต่อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว LB (ไม่มี Ampicillin) นำบ่มพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืนหรือประมาณ 16-18 ชั่วโมง นำมาสกัดแยกเฉพาะดีเอ็นเอออกจากพลาสมิด ด้วยชุดสกัดของ QIA prep[®] Spin Miniprep Kit ตามคู่มือที่แนบมา โดยการตกตะกอนเซลล์จากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ละลายตะกอนที่เก็บได้ด้วย Buffer P1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เติม Buffer P2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันวางทิ้งไว้สักพักสารละลายในหลอดจะใสขึ้น (ไม่เกิน 5 นาที) เติม Buffer N3 ปริมาตร 350 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดส่วนใสใส่ลงใน spin column ที่วางบนหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทิ้งของเหลวใสที่อยู่ในหลอดด้านล่างไป วาง spin column กลับไว้ที่เดิม เติม Buffer PB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทิ้งของเหลวใสที่อยู่ในหลอดด้านล่างไป วาง spin column กลับไว้ที่เดิม เติม Buffer PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทิ้งของเหลวใสที่อยู่ในหลอดด้านล่างไป วาง spin column กลับไว้ที่เดิม ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ย้าย spin column ไปวางบนหลอดไมโครเซนตริฟิวก์อันใหม่ เติม Buffer EB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บดีเอ็นเอที่อยู่ในหลอดด้านล่างมาวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม เตรียมดีเอ็นเอของยีน *UBQ* ให้มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ก่อนจะส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ทั้งนี้ในการสกัดดีเอ็นเอออกจากพลาสมิดยีนเป้าหมายอื่นที่สนใจก็ใช้หลักการเดียวกันนี้

3.7.9 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Real-time PCR

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน *UBQ* และยีนเป้าหมายอื่นๆ ที่ได้รับการส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ นำมาตรวจสอบความเหมือนเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่มีอยู่ในฐานข้อมูล Jatropha Genome Database จากนั้นจึงนำดีเอ็นเอของยีน *UBQ* ที่ทราบค่าความเข้มข้นแล้วมาคำนวณหาจำนวน DNA copy number (ภาคผนวก ค) เพื่อเตรียมดีเอ็นเอสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่องขยายจำนวนสารพันธุกรรมแบบเวลาจริง (Real-time PCR) (ภาคผนวก ก) ซึ่งในการเตรียมองค์ประกอบของสารในปฏิกิริยาก่อนการวิเคราะห์ ในหนึ่งหลุมของไมโครเพลทจะประกอบด้วย ดีเอ็นเอของยีน *UBQ* ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ยีน *UBQ* (forward

และ reward) อย่างละ 0.4 ไมโครลิตร น้ำสำหรับงานพีซีอาร์ ปริมาตร 3.2 ไมโครลิตร และ SYBR Green ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ทั้งนี้ในส่วนของสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตั้งค่าการทำงานของเครื่อง Real-time PCR แสดงดังตารางที่ 3.5

สำหรับค่า Cycle threshold (Ct) ที่ได้จากการวิเคราะห์ DNA copy number ยีน *UBQ* จากแต่ละตัวอย่าง จำนวน 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง จะนำมาใช้ในการสร้างสมการกราฟมาตรฐาน ลอการิทึม เพื่อนำมาใช้ในการคำนวณค่าการแสดงออกของยีนเป้าหมายต่อไป ทั้งนี้ในการสร้างสมการกราฟมาตรฐานลอการิทึมของยีนเป้าหมายอื่นๆ ก็ใช้หลักการเดียวกันนี้

ตารางที่ 3.5 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตั้งค่าการทำงานของเครื่อง Real-time PCR

ขั้นตอน	กระบวนการ	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
1	Incubate	95	00:02:30	
2	Incubate	95	00:00:30	
3*	Incubate	60	00:00:30	
4	Incubate	72	00:00:30	
5	Scan			
6	Goto	Step 2		40
7	Melting 60°C to 95°C, every 1.0°C		00:00:01	
8	Incubate	25	00:01:00	
9	Store at 8°C			
10	End			

หมายเหตุ ขั้นตอนที่ 3* การตั้งค่าอุณหภูมิ ขึ้นอยู่กับโปรแกรมที่ออกแบบ

สำหรับการเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอจากเนื้อผลและเนื้อในสับุดำทั้ง 5 ระยะ เพื่อนำมาวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *UBQ* เริ่มจากการนำ cDNA ที่ได้จากการสังเคราะห์ ในข้อ 3.7.2 มาวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม เมื่อทราบค่าความเข้มข้นแล้วจึงเตรียมดีเอ็นเอเริ่มต้นจากแต่ละตัวอย่างให้เท่ากัน คือ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ส่วนการเตรียมองค์ประกอบของสารภายในปฏิกิริยาก่อนนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Real-time PCR ก็ใช้วิธีการ

เดียวกันกับการเตรียมปฏิกิริยาในการสร้างสมการกราฟมาตรฐานลอกการิทึมของ DNA copy number ยีน *UBQ* และยีนเป้าหมายอื่นๆ

สำหรับการคำนวณหาค่าการแสดงออกของยีน *UBQ* และยีนเป้าหมายอื่นๆ จากตัวอย่างผลสลับค่าทั้ง 5 ระยะ เราจะใช้ค่า cycle threshold (Ct) ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเครื่อง Real-time PCR มาแทนค่าในสมการกราฟมาตรฐานลอกการิทึมของยีนแต่ละชนิด จากนั้นจึงคำนวณหาค่าการแสดงออกของยีนเป้าหมายเทียบกับยีน *UBQ* โดยใช้ค่าการแสดงออกของยีนเป้าหมายที่ได้จากการแทนค่าในสมการลอกการิทึมมาหารด้วยค่าที่ได้จากการแทนค่าในสมการลอกการิทึมของยีน *UBQ* จากนั้นจึงนำค่าการแสดงออกของยีนจำนวน 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง มาหาค่าเฉลี่ย (mean±SD) ก็จะได้ค่าการแสดงออกของยีนเป้าหมายในตัวอย่างนั้นๆ ทั้งนี้การเตรียมปฏิกิริยาเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีนและคำนวณหาค่าการแสดงออกของยีนเป้าหมายอื่นๆ ที่สนใจก็ใช้หลักการเดียวกันนี้

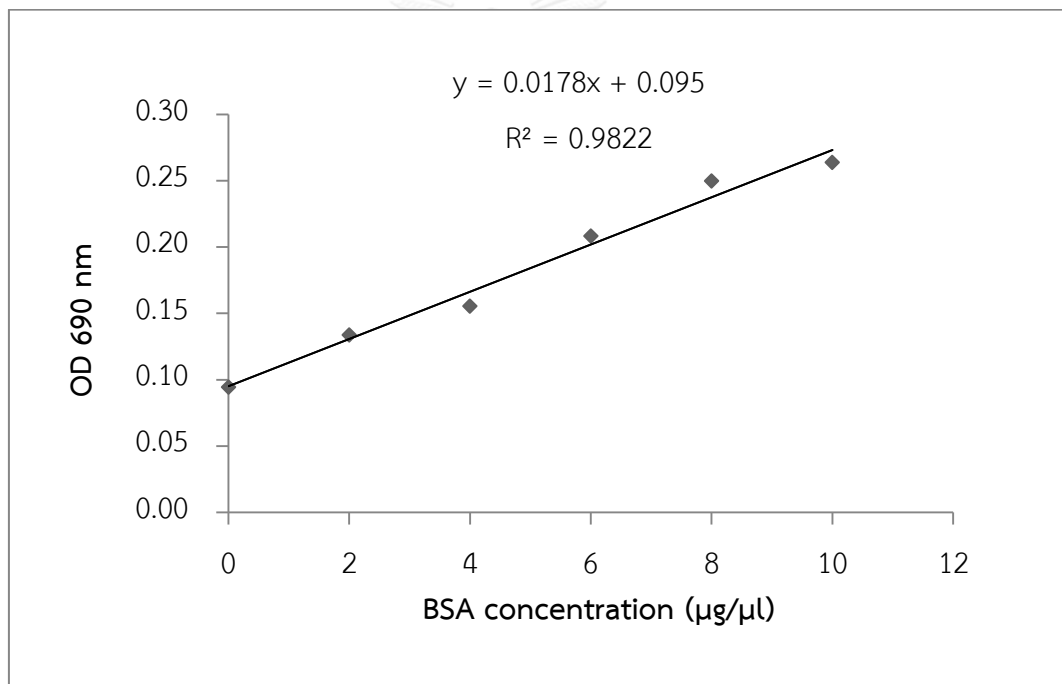


บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ระดับการแสดงออกของโปรตีนจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์

ตัวอย่างเนื้อผลและเนื้อในเมล็ดทั้ง 5 ระยะ นำมาสกัดโปรตีนและวัดค่าความเข้มข้นของโปรตีน ด้วยวิธีของ Lowry โดยการนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 690 นาโนเมตร (OD690) และค่าที่ได้จากการวัด 3 ครั้งต่อตัวอย่าง นำมาหาค่าเฉลี่ยและแทนค่าในสมการกราฟมาตรฐานของสารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมิน ซึ่งมีค่า R-squared มากกว่า 0.98 แสดงดังภาพที่ 4.1 พบว่าแต่ละตัวอย่างมีค่าความเข้มข้นของโปรตีน แสดงดังตารางที่ 4.1



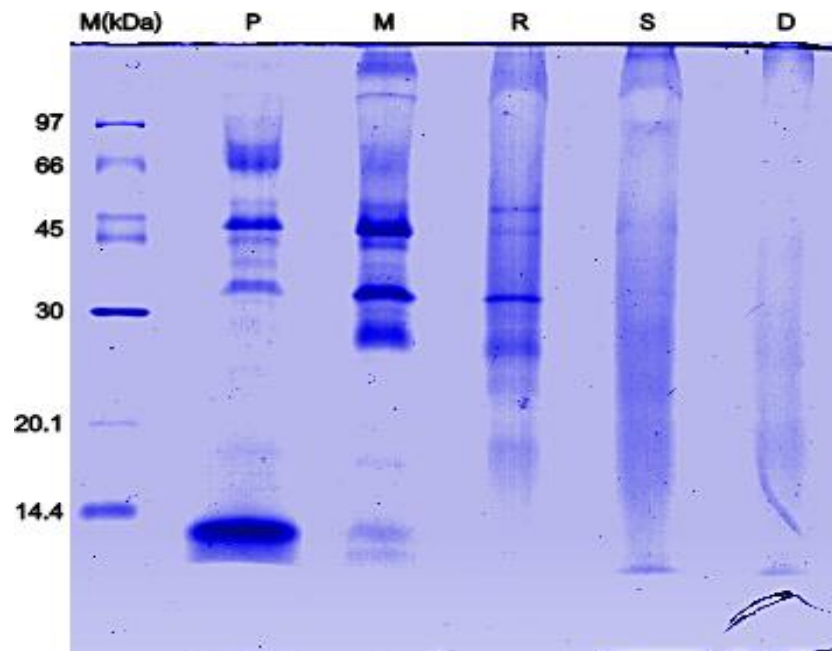
ภาพที่ 4.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมิน

ตารางที่ 4.1 ความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้จากตัวอย่างเนื้อเยื่อสับดูดำทั้ง 2 ชนิด จากการวัด 3 ครั้งต่อตัวอย่างแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย (mean±SD)

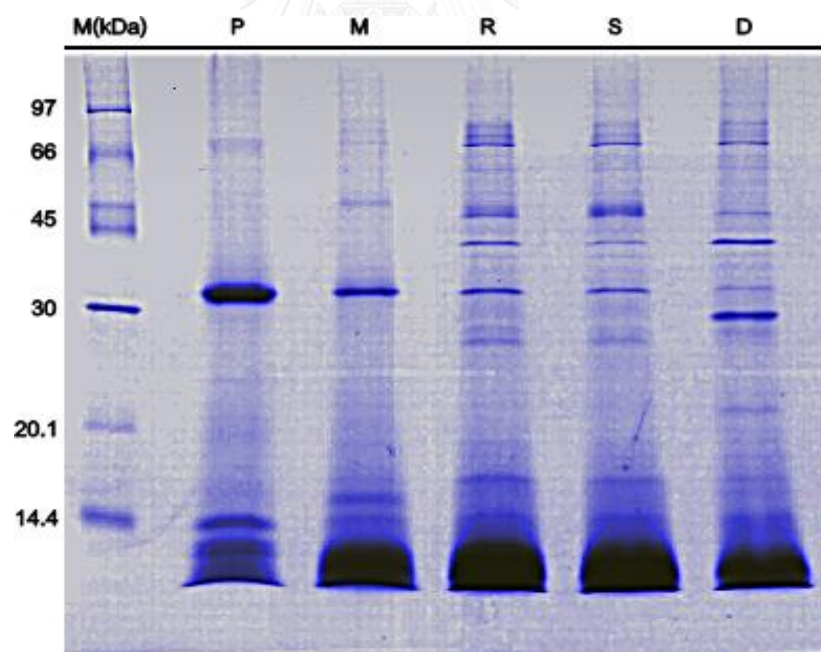
ชนิดของเนื้อเยื่อ	ระยะพัฒนาการของผล	ความเข้มข้น (mg/g FW)
เนื้อผล	Premature fruits (P)	9.64±0.007
	Mature green fruits (M)	14.23±0.007
	Mature ripe fruits (yellow) (R)	66.29±0.006
	Senescent fruit (black) (S)	33.71±0.003
	Dried fruits (D)	110.39±0.006
เนื้อในเมล็ด	Premature fruits (P)	11.89±0.005
	Mature green fruits (M)	51.12±0.023
	Mature ripe fruits (yellow) (R)	91.01±0.006
	Senescent fruit (black) (S)	73.60±0.005
	Dried fruits (D)	112.36±0.014

ผลจากการวิเคราะห์แยกโมเลกุลโปรตีนของตัวอย่างเนื้อผลและเนื้อในเมล็ดระยะต่างๆ ด้วย 12.5% SDS-PAGE gel และย้อมด้วยสี Coomassie Brilliant Blue G-250 โดยแยกออกเป็นเจลเนื้อผลและเนื้อในเมล็ด จะสังเกตเห็นว่าแถบโมเลกุลโปรตีนที่แยกได้และปรากฏให้เห็นในตัวอย่างเนื้อเยื่อแต่ละชนิดแต่ละระยะจะมีลักษณะแตกต่างกันออกไป ทั้งนี้จากการแบ่งช่วงมวลโมเลกุลโปรตีนโดยอ้างอิงกับโปรตีน marker พบว่าแถบโมเลกุลโปรตีนที่ปรากฏบน SDS-PAGE gel ของตัวอย่างเจลเนื้อเยื่อทั้ง 2 ชนิด จะมีความหนาแน่นของมวลโมเลกุลอยู่ระหว่าง 30-66 kDa

ผลจากการเปรียบเทียบแถบโมเลกุลโปรตีนที่ปรากฏบนเจลเนื้อเยื่อชนิดเดียวกัน จะสังเกตเห็นว่าแถบโมเลกุลโปรตีนที่แยกได้จะมาก-น้อย แตกต่างกันไปเมื่อระยะพัฒนาการของผลเปลี่ยนแปลงไป ขณะเดียวกันจากการเทียบความหนาแน่นของแถบโมเลกุลโปรตีนบน SDS-PAGE gel ระหว่างเนื้อเยื่อทั้ง 2 ชนิด จะสังเกตเห็นว่าเจลตัวอย่างเนื้อผลแต่ละระยะแถบโปรตีนที่ปรากฏให้เห็นค่อนข้างบางเบาหรือมองไม่เห็นเลยเมื่อเทียบกับเจลตัวอย่างเนื้อในเมล็ด แสดงดังภาพที่ 4.2



(ก) เนื้อผล



(ข) เนื้อในเมล็ด

ภาพที่ 4.2 การแสดงออกของโมเลกุลโปรตีนที่แยกได้ด้วยเจล 12% SDS-PAGE

ผลจากการวิเคราะห์โมเลกุลเปปไทด์จากตัวอย่างด้วยเครื่อง LC-MS/MS ซึ่งข้อมูลโมเลกุลเปปไทด์ทั้งหมดที่ได้จากการวิเคราะห์นำมาแปลผล ระบุชนิด และหน้าที่ด้วยโปรแกรมต่างๆ ที่เกี่ยวข้องจนได้ออกมาเป็นข้อมูลโปรตีนทั้งหมด พบว่าจากตัวอย่างเนื้อผลและเนื้อในเมล็ดมีการแสดงออกของโปรตีนทั้งหมดรวม 2941 ชนิด โดยพบโปรตีนที่มีการแสดงออกในทั้ง 2 เนื้อเยื่อ และทุกระยะพัฒนาการของผล 1316 ชนิด แสดงดังตารางที่ 4.2 นอกนั้นเป็นโปรตีนที่พบการแสดงออกในบางเนื้อเยื่อหรือบางระยะเท่านั้น

จากผลการแสดงออกของโปรตีน 1316 ชนิด นำมาระบุหน้าที่โปรตีนอ้างอิงฐานข้อมูลโปรตีนใน Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) และ GoCat (<http://www.eagl.unige.ch/GoCat>) แล้วนำมาแบ่งกลุ่มตามหน้าที่ (แสดงดังภาพที่ 4.3) จะสามารถแบ่งกลุ่มโปรตีนออกได้เป็น 7 กลุ่ม (ไม่รวมกลุ่ม unknown proteins) ได้แก่

1) โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการถอดรหัสและการแปลรหัส ยกตัวอย่างเช่น 60S ribosomal protein L18a-3, Ribosome recycling factor (ISS), Ribosomal protein L5, Ribosomal protein S3, Small ribosomal protein 4, Transcription factor bHLH25-like, Putative bZIP family transcription factor (ISS), Putative CCR4-associated factor 1-1, Putative MYB transcription factor family protein, RNA polymerase II second largest subunit และ WRKY transcription factor เป็นต้น (คิดเป็นร้อยละ 5.32)

2) โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์และวัฏจักรของเซลล์ ยกตัวอย่างเช่น Cyclin-dependent kinase inhibitor 3-like, Anaphase promoting complex, subunit 10 (IC) และ Transcription factor R2R3-MYB เป็นต้น (คิดเป็นร้อยละ 0.60)

3) โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมัน ยกตัวอย่างเช่น 3-ketoacyl-CoA synthase, Fatty acid elongase 3-ketoacyl-CoA synthase, Acetyl-CoA carboxylase beta subunit และ Acetyl-CoA carboxylase beta subunit เป็นต้น (คิดเป็นร้อยละ 0.50)

4) โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์แสง ยกตัวอย่างเช่น Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit, Photosystem I assembly protein Ycf3, PSI reaction center subunit และ Ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase เป็นต้น (คิดเป็นร้อยละ 0.30)

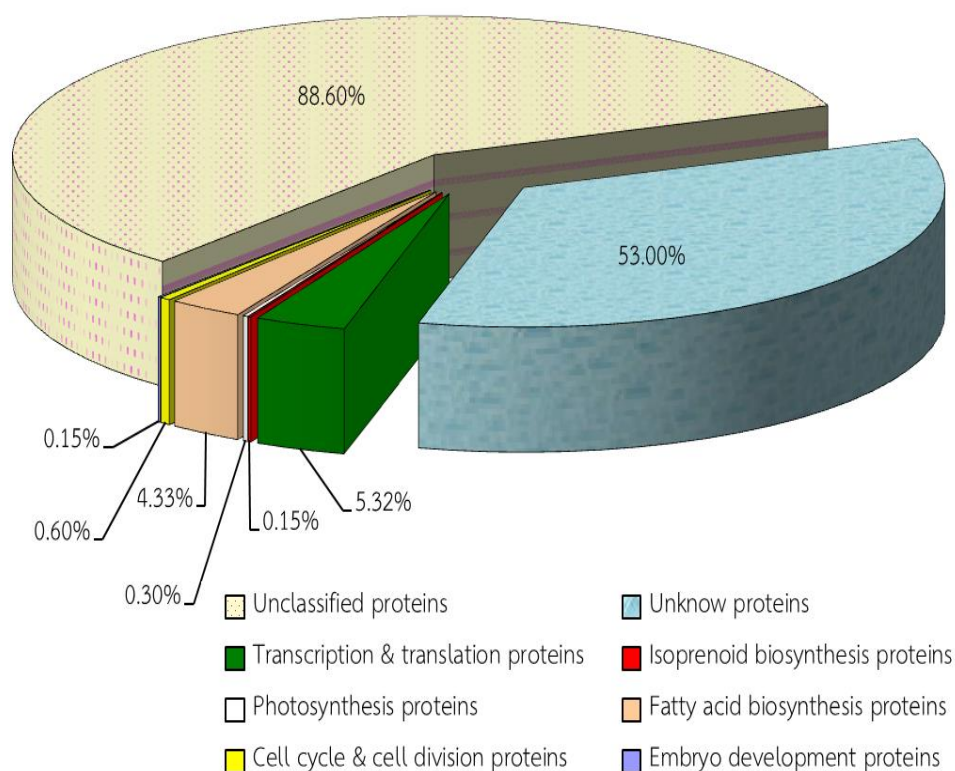
5) โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับพัฒนาการของเอ็มบริโอ ยกตัวอย่างเช่น Late embryogenesis abundant protein เป็นต้น (คิดเป็นร้อยละ 0.15)

6) โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีชีวสังเคราะห์ไอโซพรีนอยด์ ยกตัวอย่างเช่น Diphosphomevalonate decarboxylase และ Geranyl diphosphate synthase (คิดเป็นร้อยละ 0.15)

7) โปรตีนที่ไม่ได้จำแนกกลุ่ม ยกตัวอย่างเช่น โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับพัฒนาการของดอก เช่น flowering locus T โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการไกลโคลิซิส เช่น Fructose-1, 6-biphosphate aldolase โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณ เช่น RAS signaling inhibitor ST5 (ISS) โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายกรดอะมิโน เช่น 3-dehydroquinate dehydratase 01 เป็นต้น (คิดเป็นร้อยละ 88.80)

จากกลุ่มโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีชีวสังเคราะห์ไอโซพรีนอยด์ จะสังเกตเห็นว่าระดับการแสดงออกของโปรตีน Diphosphomevalonate decarboxylase และ Geranyl diphosphate synthase จะขึ้น-ลง แตกต่างกันไปในตัวอย่างเนื้อเยื่อแต่ละระยะ จากการเทียบระดับการแสดงออกของโปรตีน Diphosphomevalonate decarboxylase ในตัวอย่างเนื้อผล พบว่าระดับการแสดงออกของโปรตีนจะสูงสุดในระยะ Premature fruits (23.0) จากนั้นค่าการแสดงออกจะลดลงในระยะ Mature green fruits, Mature ripe fruits (yellow) และลดลงต่ำสุดในระยะ Senescent fruit (black) ตามลำดับ จากนั้นระดับการแสดงออกของโปรตีนจะเพิ่มขึ้นมาอีกครั้งในระยะ Dried fruits ส่วนในตัวอย่างเนื้อในเมล็ด ระดับการแสดงออกของโปรตีนจะค่อยๆ เพิ่มตั้งแต่ระยะ Premature fruits และ Mature green fruits และเพิ่มขึ้นสูงสุดในระยะ Mature ripe fruits (yellow) (19.8) จากนั้นระดับการแสดงออกของโปรตีนจะลดลงในระยะ Senescent fruit (black) และ Dried fruits ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 4.4 (ก)

จากการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของโปรตีน Geranyl diphosphate synthase ในตัวอย่างเนื้อผล พบว่าระดับการแสดงออกของโปรตีนจะต่ำสุดในระยะ Premature fruits จากนั้นจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นในระยะ Mature green fruits และเพิ่มสูงสุดในระยะ Mature ripe fruits (yellow) (19.5) ทั้งนี้ค่าการแสดงออกจะลดลงอีกครั้งในระยะ Senescent fruit (black) และเพิ่มขึ้นมาอีกครั้งในระยะ Dried fruits ส่วนในตัวอย่างเนื้อในเมล็ดระดับการแสดงออกของโปรตีนจะค่อยๆ ลดลงในระยะ Premature fruits และ Mature green fruits ตามลำดับ และจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นมาอีกครั้งในระยะ Mature ripe fruits (yellow) และเพิ่มสูงสุดในระยะ Senescent fruit (black) (21.4) ก่อนจะลดลงอีกครั้งในระยะ Dried fruits แสดงดังภาพที่ 4.4 (ข)



ภาพที่ 4.3 การแบ่งกลุ่มตามหน้าที่ของโปรตีน 1316 ชนิด

ตารางที่ 4.2 โปรตีนบางส่วนจากทั้งหมด 1316 ชนิด ที่พบการแสดงออกในเนื้อผลและเนื้อในเมล็ด สับดูดำ ทุกๆ ระยะพัฒนาการของผล

หมายเลข Accession No.	รายชื่อโปรตีน	โมเลกุล เพปไทด์	อ้างอิงสิ่งมีชีวิต
gil47825026	Protein SUR2	ILGTY	<i>Solanum demissum</i>
gil326533644	3-ketoacyl-CoA synthase	GAAFA	<i>Hordeum vulgare subsp. Vulguarvo</i>
gil323149198	Acetyl-CoA carboxylase beta sub unit	IYGSSDR	<i>Coccomyxa subellipsoidea C-169</i>
gil20799725	Adenosine monophosphate binding protein 8 AMPBP8	LPASDQAQLK	<i>Arabidopsis thaliana</i>
gil49355348	Fatty acid elongase 3- keyoacyl-CoA synthase	LTAEMAFK	<i>Brassica napus</i>
gil308808844	Anaphase-promoting complex,	VIEAHARR	<i>Ostreococcus tauri</i>

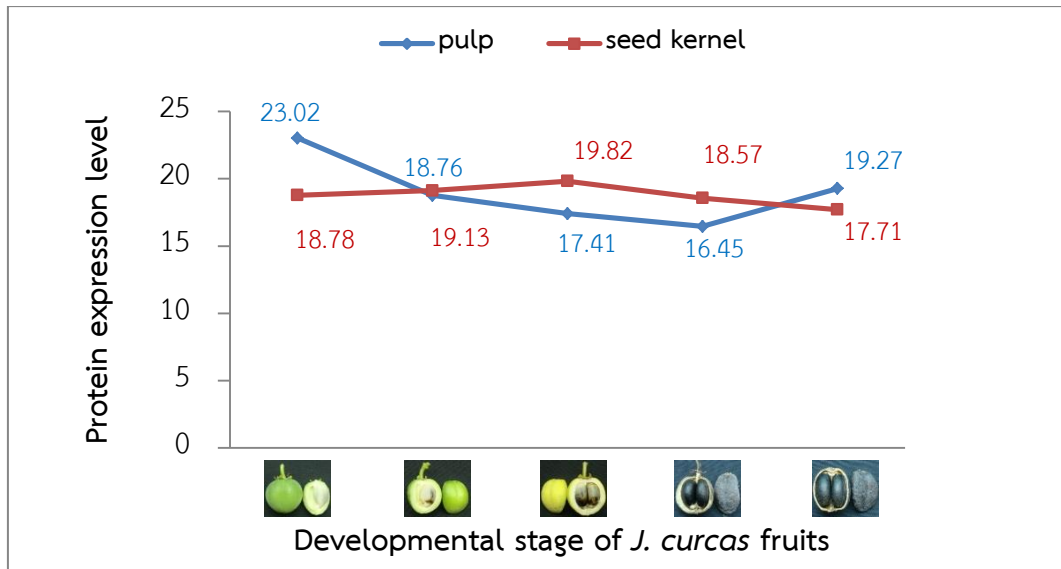
หมายเลข Accession No.	รายชื่อโปรตีน	โมเลกุล เปปไทด์	อ้างอิงสิ่งมีชีวิต
	subunit 10(IC)		
gil255566243	Cell division cycle	NAAVYR	<i>Ricinus communis</i>
gil359479884	Cyclin-dependent kinase inhibitor 3- like	MGKYMK	<i>Vitis vinifera</i>
gil294679643	Transcription factor R2R3-MYB	CSIKTK	<i>Lilium hybrid division I</i>
gil1552249	Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase	AXDTL	<i>Asclepias curassavica</i>
gil156618827	Photosystem I assembly protein Ycf3	ITGRFD	<i>Cuscuta reflexa</i>
gil157678732	PSI reaction center subunit II	QGVGVNYR	<i>Citrus sinensis</i>
gil353703788	Late embryogenesis abundant protein	SHEQSYK	<i>Solanum lycopersicum</i>
gil15231888	60S ribosomal protein L18a-3	FPLVFR	<i>Arabidopsis thaliana</i>
gil308806109	Ribosome recycling fator (ISS)	RAAAAADR	<i>Ricinus communis</i>
gil108773103	Ribosomal protein L5	KSIAGFK	<i>Acutodesmus obliquus</i>
gil383930408	Rps18 gene product (chloroplast)	MAAPNSSK	<i>Dunaliella salina</i>
gil46810992	Small ribosome protein 4	XMSQYR	<i>Austrofossombronia peruviana</i>
gil460373145	Scarecrow-like protein 15-like	KANAPILR	<i>Solanum lycopersicum</i>
gil359475553	Transcription factor bHLH25- like	ASQGAK	<i>Vitis vinifera</i>
gil15219825	Protein agamous-like 56	EAVDAVSR	<i>Arabidopsis thaliana</i>
gil84570631	Pseudo-response regulator 37 homologue	SGDYESR	<i>Lemna gibba</i>
gil308801739	Putative bZIP family transcription faction (ISS)	TTPEMK	<i>Ostreococcus tauri</i>
gil290465691	SEP1	LTWEAGGAK	<i>Nelumbo nucifera</i>
gil293336377	Putative cyclin-T1 family protein	SDAGMDR	<i>Zea mays</i>
gil308080696	Putative homeobox DNA- binding and leucine zipper domain family protein	GMAPMLR	<i>Zea mays</i>

หมายเลข Accession No.	รายชื่อโปรตีน	โมเลกุล เพปไทด์	อ้างอิงสิ่งมีชีวิต
gil224119168	Putative MYB transcription factor family protein	KAAFHK	<i>Populus trichocarpa</i>
gil168053884	SNF2 family DNA-dependent ATPase	KAVNEYR	<i>Physcomitrella patena</i> <i>subsp. Patens</i>
gil18403012	TBP-associated factor 15	GGRGGGYK	<i>Arabidopsis thaliana</i>
gil255547251	Transcription factor	AGCYLK	<i>Ricinus communis</i>
gil255563336	Transcription factor	LEKNPN	<i>Ricinus communis</i>
gil307135912	WRKY transcription factian	NRSSSSSR	<i>Cucumis melo subsp.</i> <i>Melo</i>
gil10177788	4-coumarate-CoA ligase-like 8	TPSGK	<i>Arabidopsis thaliana</i>
gil160334572	Alcohol dehydrogenase	KGQSVAF	<i>Capsella rubella</i>
gil294281	Alpha-glucan phosphorylase type H isozyme, partial	SNDVSA	<i>Solanum tuberosum</i>
gil262181541	3-dehydroquinate dehydratase 01	MESGGMSK	<i>Vitis vinifera</i>
gil293331365	Putative AMP-dependent synthase and ligase superfamily protein	MVTGSMK	<i>Zea mays</i>
gil302775037	ATP-binding cassette transporter	GQASFTTR	<i>Selaginella moellendorffii</i>
gil49182424	ATP synthesis beta chain	MPSAV	<i>Isotachis lyallii</i>
gil4127323	NADH dehydrogenase subunit F	ELGGLIHFXD	<i>Lindsayomyrtus racemoides</i>
gil255576820	Auxin-induced protein 5NG4	VTPGEP	<i>Ricinus communis</i>
gil18395002	Putative calcium-binding protein CML44	NMILHV	<i>Arabidopsis thaliana</i>
gil41818408	Class III acidic chitinase	SHVCPARR	<i>Musa acumimata</i>
gil255545514	Biotin protein ligase	EASFDR	<i>Ricinus communis</i>
gil15240915	Duplicated SANT DNA-binding domain-containing protein	SSSTMYR	<i>Arabidopsis thaliana</i>
gil159485314	Plastid ribosomal protein L3	KAGVPPMR	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
gil224090831	Copper transporter	KSGGS	<i>Populus trichocarpa</i>

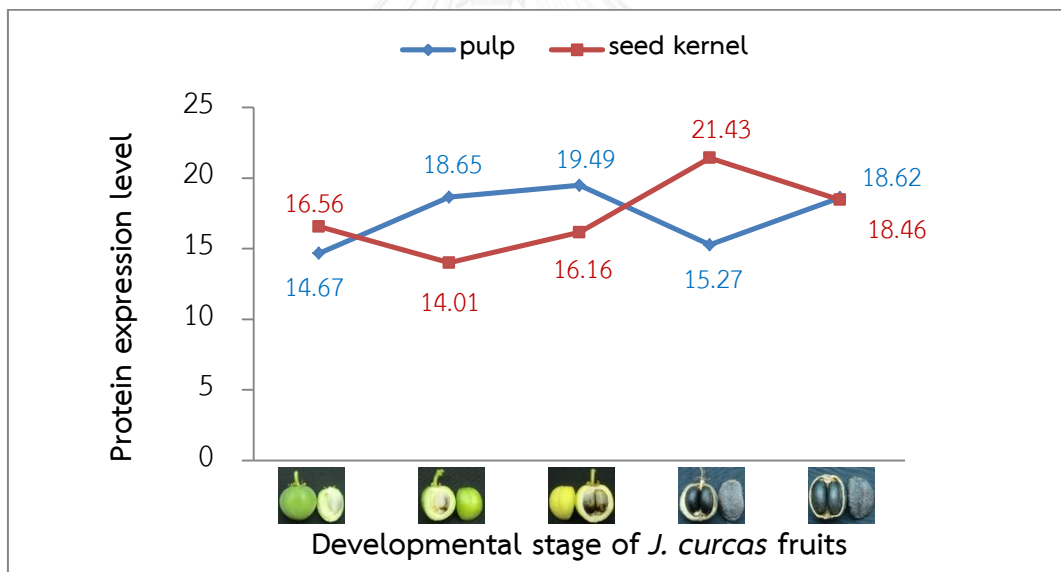
หมายเลข Accession No.	รายชื่อโปรตีน	โมเลกุล เพปไทด์	อ้างอิงสิ่งมีชีวิต
gil599625	Aconitase	GFAVPK	<i>Arabidopsis thaliana</i>
gil15234824	Cysteine-rich receptor-like protein kinase 26	ASVIGR	<i>Arabidopsis thaliana</i>
gil195612782	Cytokinin-N- glucosyltransferase 1	GIVLGVDK	<i>Zea mays</i>
gil21744985	Putative disease resistance gene analog NBS-LRR	VGKTTLAK	<i>Malus domestica</i>
gil160858107	Lectin precursor	IASW	<i>Diochea guianensis</i>
gil308804427	ATP-dependent DNA helicase (ISS), partial	GPIANDTTK	<i>Ostreococcus tauri</i>
gil83764373	Cryptochrome	TSSLSA	<i>Marchantia paleacea</i> sub sp. <i>Diptera</i>
gil255070017	DNA topoisomerase I	NRPAHK	<i>Micromonas sp. RCC299</i>
gil224112279	Uracil-DNA glycosylase	SKLIDQTK	<i>Populus trichocarpa</i>
gil225464430	TMV resistance protein N-like	IIIPMK	<i>Vitis vinifera</i>
gil526117932	Ripening-related bZIP protein like	EYGGGAK	<i>Vitis vinifera</i>
gil114229341	Ethylene control element variant	EVDHLAK	<i>Malus domestica</i>
gil168831408	S40-RNase	ILLAH	<i>Malus domestica</i>
gil164457875	Flowering locus T	DPLIVGR	<i>Citrus unshiu</i>
gil262088703	WRKY transcription factor 12	AVXEPR	<i>Bactris major</i>
gil255089076	Glycosyltransferase family 5 protein	LIEAKYSW	<i>Micromonas sp. RCC299</i>
gil15238151	6-phosphogluconate dehydrogenase	ILDKTGMK	<i>Arabidopsis thaliana</i>
gil116582779	Cytosolic glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	VKAASH	<i>Mesostigma viride</i>
gil226508418	Glutamate	WMNAVNKK	<i>Zea mays</i>
gil1360700	Glutamine synthase	GG SIR	<i>Zea mays</i>
gil15240349	5-oxoprolinase	SVANR	<i>Arabidopsis thaliana</i>
gil283135864	Tau class glutathione transferase GSTU31	SLGFD	<i>Populus trichocarpa</i>

หมายเลข Accession No.	รายชื่อโปรตีน	โมเลกุล เพปไทด์	อ้างอิงสิ่งมีชีวิต
gil351724373	Serine hydroxymethyltransferase 4	LIESGYK	<i>Glycine max</i>
gil1847893	Putative receptor-like protein kinase RLPK4	NIGGISYK	<i>Glycine max</i>
gil168569564	Glucose-1-phosphate adenyltransferase	AVSAGR	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
gil22330923	Protein short-root interacting embryonic lethal	AVVFTLR	<i>Arabidopsis thaliana</i>
gil14334824	Putative protein transport factor	MVAPR	<i>Arabidopsis thaliana</i>
gil303277771	ATP-binding cassette superfamily	CIVSSASGR	<i>Micromonas pusilla CCMP1545</i>
gil170026503	Rieske iron-sulfur protein of cytochrome B6/F complex	GPAPL	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
gil15228118	Putative leucine-rich repeat receptor-like serine/threonine- protein kinase	DGNNGAKK	<i>Arabidopsis thaliana</i>
gil15054388	Family II lipase EXL4	ILPAYR	<i>Arabidopsis thaliana</i>
gil15219742	Calcium-dependent lipid- binding domain-containing protein	TSNNEYR	<i>Arabidopsis thaliana</i>
gil255573576	Ubiquinone/menaquinone biosynthesis methyltransferase	GFGEDK	<i>Ricinus communis</i>
gil45535493	Acetolactate synthase isozyme2	AENLPVK	<i>Bidens pilosa</i>
gil91805911	Polyadenylate-binding protein	KGMNLYVK	<i>Arabidopsis thaliana</i>
gil296040749	NADH dehydrogenase subunit 6	RNAIDF	<i>Silene latifolia</i>
gil224122102	SAUR family protein	ILKMI	<i>Populus trichocarpa</i>
gil162463950	Histone H1	KPKAAAKPK	<i>Zea mays</i>
gil297820182	SAC3/GANP family protein	FHVISHK	<i>Arabidopsis lyrata sub sp. Lyrata</i>
gil57283666	Delta 1-pyrroline-5-	GPVGV	<i>Glycine max</i>

หมายเลข Accession No.	รายชื่อโปรตีน	โมเลกุล เพปไทด์	อ้างอิงสิ่งมีชีวิต
	carboxylate synthase		
gil15225576	Serin/threonine-protein phosphatase PP1 isozyme 4	FMMSTKI	<i>Arabidopsis thaliana</i>
gil3286691	Auxinlin-like protein	SAASQAK	<i>Arabidopsis thaliana</i>
gil255071349	Peptidyl-propyl cis-trans isomerase	APVAFRGK	<i>Micromonas sp. RCC299</i>
gil15232447	Putative beta-1,3- galactosyltransferase 13	SAGRR	<i>Arabidopsis thaliana</i>
gil21617942	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim9	HTMRVGMR	<i>Arabidopsis thaliana</i>
gil302815251	Ubiquitin-protein ligase, UPL1	GGKGHK	<i>Selaginella moellendorffii</i>
gil289188	5'-phosphoribosyl-5- aminoimidazole synthase	DGYGG	<i>Arabidopsis thaliana</i>
gil308810819	RAS signaling inhibitor ST5 (ISS)	SELAASKK	<i>Ostreococcus tauri</i>
gil71834072	Steroid 23-alpha-hydroxylase	AMTDVKIK	<i>Zinnia elegans</i>
gil307135863	Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase	GKESTAPK	<i>Cucumis melo subsp. Melo</i>
gil14534595	MES family transporter: glycerol-3-phosphate	VVRPMSK	<i>Ostreococcus lucimarinus CCE9901</i>
gil15227480	Putative E3 ubiquitin-protein ligase SINAT1	APGGSALK	<i>Arabidopsis thaliana</i>
gil226504358	Diphosphomevalonate decarboxylase	LGAGPK	<i>Zea mays</i>
gil159465717	Geranyl diphosphate synthase	AAADMIR	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>

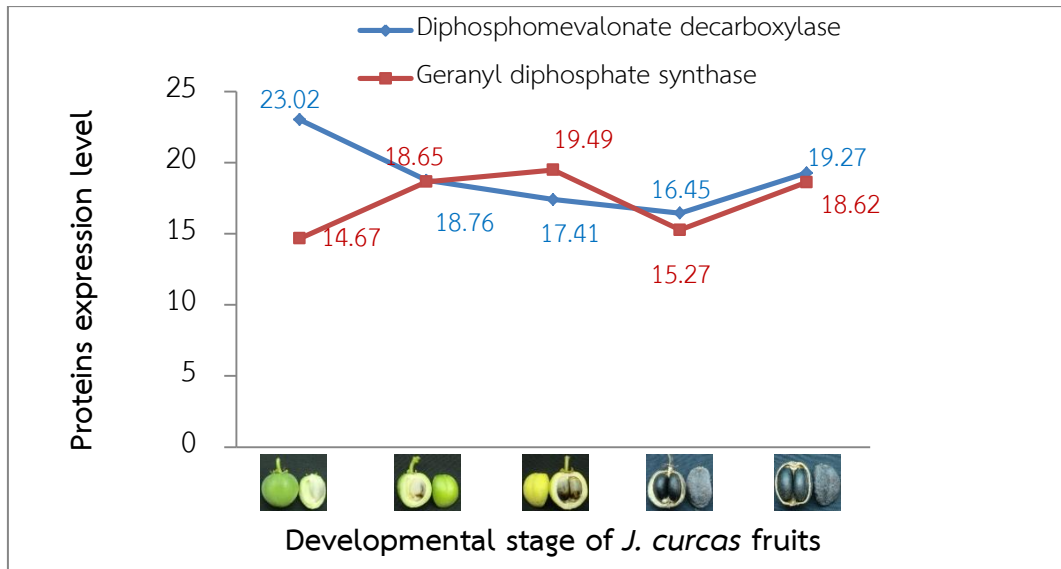


(ก) Diphosphomevalonate decarboxylase

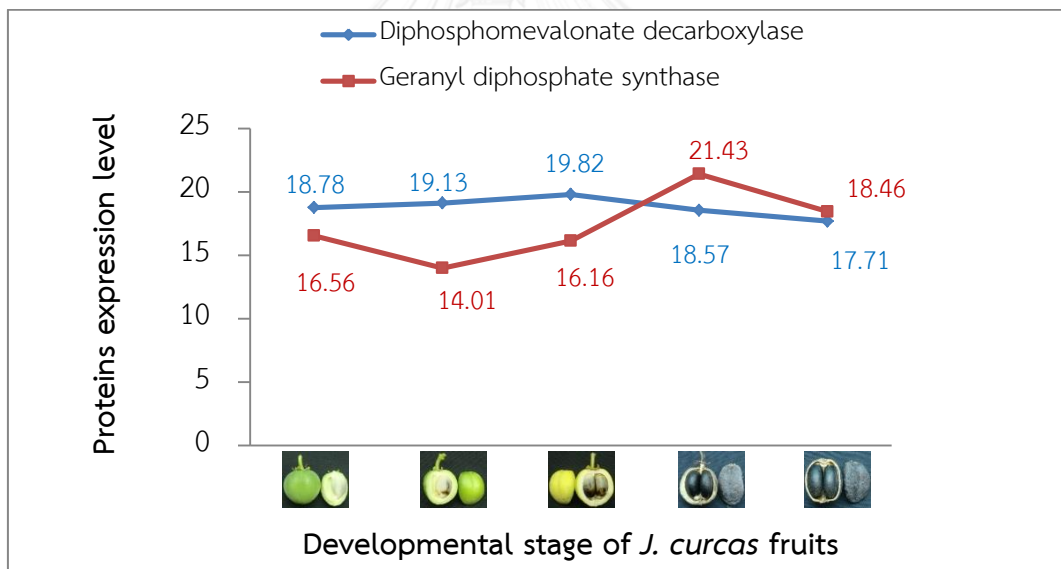


(ข) Geranyl diphosphate synthase

ภาพที่ 4.4 กราฟเทียบระดับการแสดงออกของโปรตีนชนิดเดียวกันในเนื้อเยื่อต่างชนิด



(ก) เนื้อผล



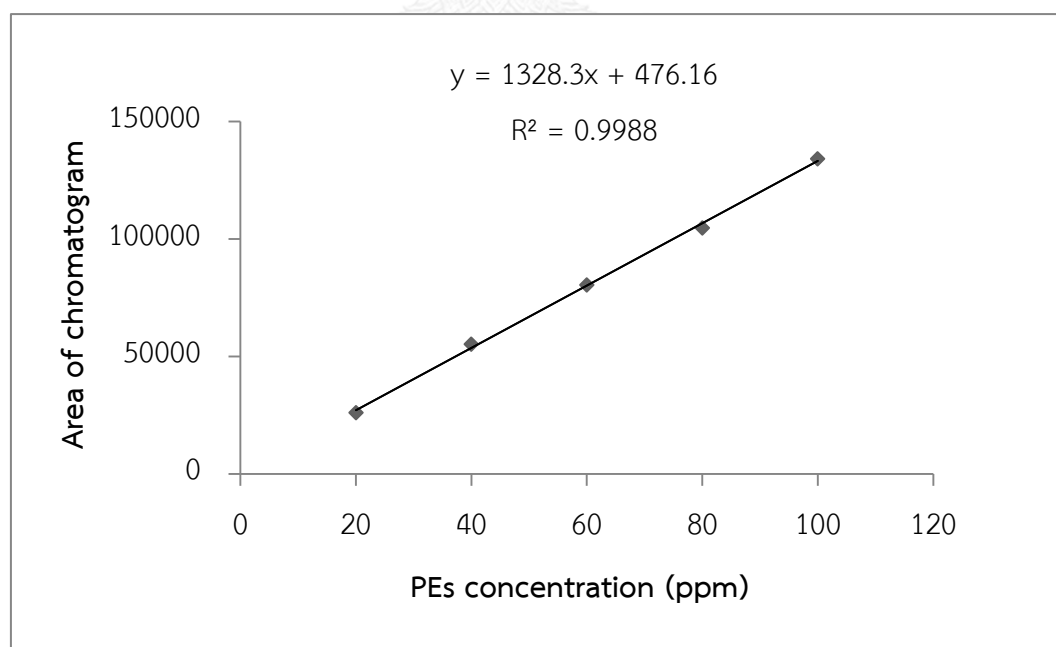
(ข) เนื้อในเมล็ด

ภาพที่ 4.5 กราฟเทียบระดับการแสดงออกของโปรตีนทั้ง 2 ชนิด ในตัวอย่างเนื้อเยื่อชนิดเดียวกัน

4.2 การแยกและวิเคราะห์ปริมาณสารฟอร์บอลเอสเทอร์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง (HPLC)

สารมาตรฐานที่เลือกนำมาใช้ในการสร้างสมการกราฟมาตรฐานสำหรับการคำนวณปริมาณสารฟอร์บอลเอสเทอร์จากตัวอย่างเนื้อผลและเนื้อในเมล็ดสับุดำทั้ง 5 ระยะ เลือกใช้เป็นสารฟอร์บอลเอสเทอร์ชนิด TPA ละลายด้วย Methanol (HPLC grade) ก่อนนำมาฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ซึ่งจากข้อมูลการวิเคราะห์พบว่าโครมาโทแกรมของสารมาตรฐานจะปรากฏอยู่ในช่วง Retention time ที่ 39-40 นาที (ภาคผนวก ข) ขณะที่ในการวิเคราะห์หาปริมาณสารฟอร์บอลเอสเทอร์จากตัวอย่างเนื้อเยื่อสับุดำทั้ง 2 ชนิด พบว่าโครมาโทแกรมที่ปรากฏเป็นกลุ่มของสารฟอร์บอลเอสเทอร์ชนิด DHPB และไม่พบโครมาโทแกรมของสารฟอร์บอลเอสเทอร์ชนิด TPA แต่อย่างใด ซึ่งจากกลุ่มโครมาโทแกรมที่ปรากฏพบว่ามีอยู่ด้วยกันประมาณ 5-6 โครงสร้าง โดยกลุ่มโครมาโทแกรมจะปรากฏในช่วง Retention time ที่ 17-27 นาที (ภาคผนวก ข)

สำหรับการคำนวณหาปริมาณสารฟอร์บอลเอสเทอร์จากแต่ละตัวอย่างซึ่งได้จากการนำพื้นที่ใต้โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์มาแทนค่าในสมการกราฟมาตรฐานสารละลายฟอร์บอลเอสเทอร์ ชนิด TPA ซึ่งมีค่า R-squared มากกว่า 0.99 แสดงดังภาพที่ 4.6 พบว่าแต่ละตัวอย่างมีความเข้มข้นของสารฟอร์บอลเอสเทอร์ชนิด DHPB แสดงดังตารางที่ 4.3



ภาพที่ 4.6 กราฟมาตรฐานของสารละลายฟอร์บอลเอสเทอร์ ชนิด TPA

ตารางที่ 4.3 ปริมาณสารพอร์บอลเอสเทอร์ชนิด DHPB ที่แยกได้จากตัวอย่างเนื้อเยื่อสับบุ้ด้าทั้ง 2 ชนิด จากการวัด 3 ครั้งต่อตัวอย่างแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย (mean±SD)

ชนิดของเนื้อเยื่อ	ระยะพัฒนาการของผล	ความเข้มข้น (mg/g DW)
เนื้อผล	Premature fruits (P)	1.79±0.038
	Mature green fruits (M)	0.96±0.066
	Mature ripe fruits (yellow) (R)	0.40±0.105
	Senescent fruit (black) (S)	0.61±0.008
	Dried fruits (D)	0.13±0.018
เนื้อในเมล็ด	Premature fruits (P)	5.30±1.658
	Mature green fruits (M)	3.49±0.473
	Mature ripe fruits (yellow) (R)	2.36±0.729
	Senescent fruit (black) (S)	2.87±0.024
	Dried fruits (D)	3.51±0.030

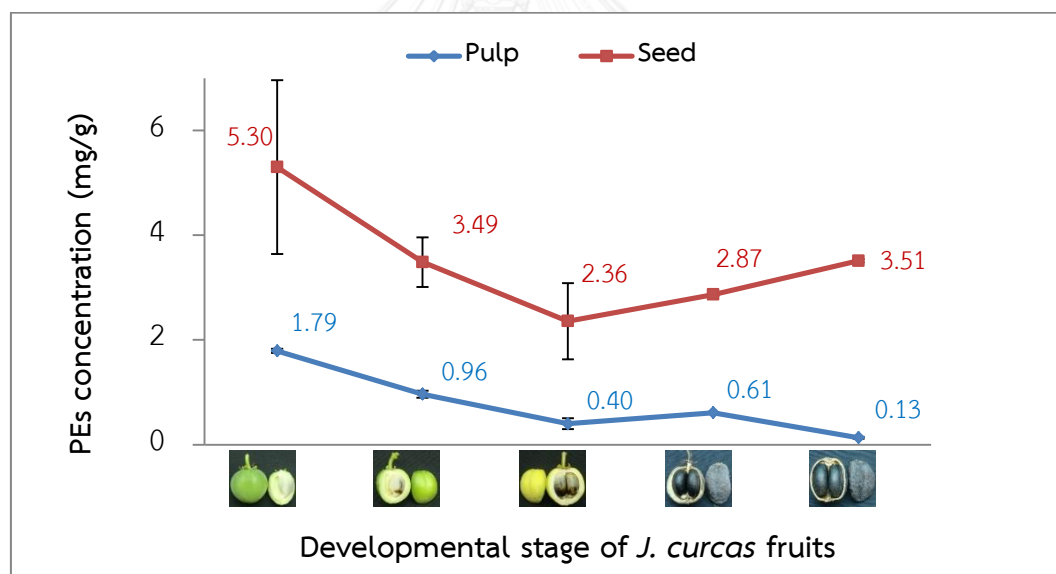
สำหรับปริมาณสารพอร์บอลเอสเทอร์ชนิด DHPB ที่แยกได้จากตัวอย่างเนื้อเยื่อสับบุ้ด้าทั้ง 2 ชนิด จะสังเกตเห็นว่าในเนื้อผลระยะ Premature fruits มีการสะสมสารพอร์บอลเอสเทอร์ไว้มากที่สุดถึง 1.79 มิลลิกรัมต่อกรัม จากนั้นปริมาณสารจะค่อยๆ ลดลงเรื่อยๆ ในระยะ Mature green fruits และ Mature ripe fruits (yellow) ตามลำดับ และเมื่อเข้าสู่ระยะ Senescent fruit (black) จะเพิ่มขึ้นอีกครั้งก่อนจะลดลงต่ำสุดในระยะ Dried fruits (0.13 มิลลิกรัมต่อกรัม) ส่วนในเนื้อในเมล็ดแต่ละระยะพบว่าในระยะ Premature fruits มีการสะสมสารพอร์บอลเอสเทอร์ไว้มากที่สุดถึง 5.30 มิลลิกรัมต่อกรัม จากนั้นปริมาณสารจะค่อยๆ ลดลง ในระยะ Mature green fruits และ Mature ripe fruits (yellow) โดยในระยะ Mature ripe fruits (yellow) นั้นจะมีการสะสมสารพอร์บอลเอสเทอร์ไว้น้อยที่สุดเพียง 2.36 มิลลิกรัมต่อกรัม จากนั้นปริมาณสารจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นอีกครั้งในระยะ Senescent fruit (black) (S) และ Dried fruits (D) ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 4.7

4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนและปริมาณสารเพื่อนำไปสู่การศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการชีวสังเคราะห์สารในกลุ่มไดเทอร์พินส์

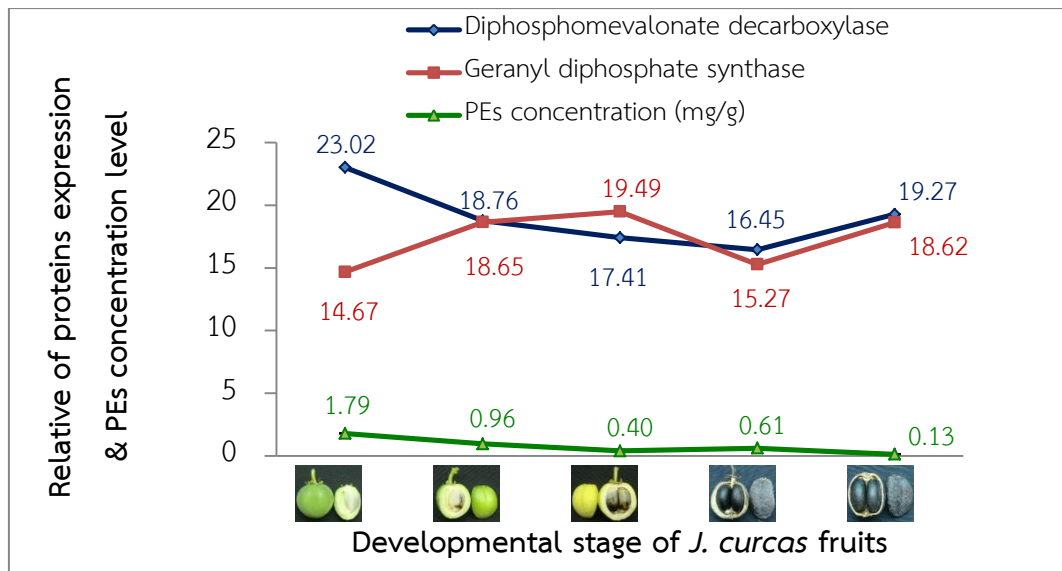
ข้อมูลปริมาณสารพอร์บอลเอสเทอร์ชนิด DHPB จากเนื้อผลและเนื้อในเมล็ดสับบุ้ด้าทั้ง 5 ระยะที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC และข้อมูลระดับการแสดงออกของโปรตีนทั้งหมดจาก

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ นำมาหาความสัมพันธ์โดยอ้างอิงกับสมมติฐานที่ตั้งไว้และการทำหน้าที่ของโปรตีนเกี่ยวข้องกับวิถีชีวสังเคราะห์เทอร์พีนอยด์เป็นหลัก ซึ่งจากข้อมูลพบว่ามีโปรตีนอยู่ 2 ชนิด ที่สามารถระบุชนิดและหน้าที่ได้ว่าเกี่ยวข้องกับวิถีชีวสังเคราะห์เทอร์พีนอยด์ ได้แก่ Diphosphomevalonate decarboxylase และ Geranyl diphosphate synthase

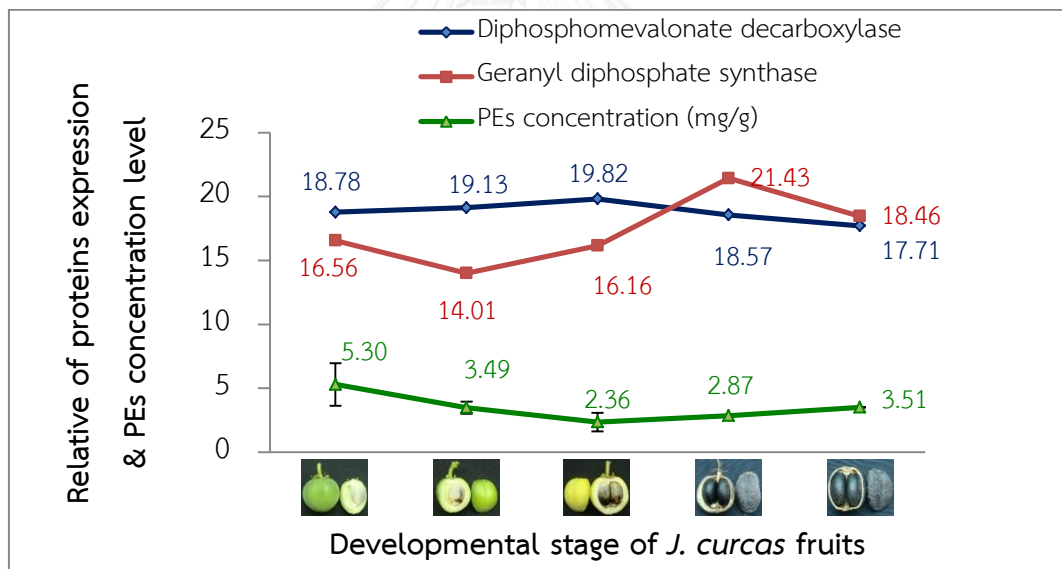
ผลจากการเทียบข้อมูลระดับการแสดงออกโปรตีนทั้ง 2 ชนิด กับปริมาณสารพอร์บอลเอสเทอร์ในเนื้อผล จะสังเกตเห็นว่าความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของโปรตีน Diphosphomevalonate decarboxylase และปริมาณสารพอร์บอลเอสเทอร์มีแนวโน้มเป็นไปในทิศทางเดียวกัน แสดงดังภาพที่ 4.8 (ก) ขณะที่ในเนื้อในเมล็ดความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของโปรตีน Diphosphomevalonate decarboxylase, Geranyl diphosphate synthase และปริมาณสารพอร์บอลเอสเทอร์มีแนวโน้มไม่ได้เป็นไปในทิศทางเดียวกันเลย แสดงดังภาพที่ 4.8 (ข) ซึ่งจากข้อมูลที่ได้จึงนำมาสู่การยืนยันผลการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจโดยการตรวจสอบและติดตามการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีนที่สร้างโปรตีนที่สนใจด้วยเทคนิค Real-time PCR



ภาพที่ 4.7 กราฟเทียบปริมาณสารพอร์บอลเอสเทอร์ชนิด DHPB ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อสับุดำ



(ก) เนื้อผล



(ข) เนื้อในเมล็ด

ภาพที่ 4.8 กราฟเทียบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของโปรตีนและปริมาณสารฟอร์บอลเอสเทอร์ชนิด DHPB ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อสับุดำ

4.4 ตรวจสอบและติดตามการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการชีวสังเคราะห์สารกลุ่มไคเทอร์พินส์ ด้วยเทคนิค Real-time PCR

4.4.1 ผลการสกัดอาร์เอ็นเอ

ตัวอย่างเนื้อผลและเนื้อในเมล็ดสับดูดำทั้ง 5 ระยะ นำมาสกัดอาร์เอ็นเอ และวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (Nanodrop spectrophotometry) ซึ่งจากการสังเกตจะเห็นว่าอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างเนื้อผลจะมีปริมาณต่ำ ขณะที่ภาพรวมอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างเนื้อในเมล็ดจะมีปริมาณความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่ค่อนข้างสูง ในส่วนของความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอ พบว่าอาร์เอ็นเอจากแต่ละตัวอย่างยังคงมีการปนเปื้อนอยู่สูงทั้งนี้อาร์เอ็นเอบริสุทธิ์ ค่า $OD_{260/280}$ จะต้องอยู่ระหว่าง 1.8-2.0

ผลจากการสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อเยื่อทั้ง 2 ชนิด ด้วย Trizol reagent พบว่าอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากเนื้อในเมล็ดแต่ละระยะจะมีปริมาณความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอค่อนข้างสูง แสดงดังตารางที่ 4.4 ในส่วนของอาร์เอ็นเอเมื่อนำมาผ่านขั้นตอนการทำให้อาร์เอ็นเอบริสุทธิ์และนำมาใช้ในการสังเคราะห์ cDNA พบว่า cDNA สามารถนำมาใช้เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ ขณะที่อาร์เอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อผลที่ได้จากการสกัดด้วย Trizol reagent กลับพบว่ามีความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอต่ำมาก (ไม่ได้แสดงข้อมูล) และอาร์เอ็นเอเมื่อนำมาผ่านขั้นตอนการทำให้อาร์เอ็นเอบริสุทธิ์และนำมาใช้ในการสังเคราะห์ cDNA พบว่า cDNA ไม่สามารถนำมาใช้เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงลองเปลี่ยนวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อผลมาเป็นการสกัดด้วย Extraction buffer ร่วมกับ β -mercaptoethanol ซึ่งจากการสังเกตพบว่าความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่ได้จากการสกัดตัวอย่างแต่ละระยะก็ยังคงต่ำอยู่มาก แสดงดังตารางที่ 4.4 และอาร์เอ็นเอเมื่อนำมาผ่านขั้นตอนการทำให้อาร์เอ็นเอบริสุทธิ์และนำมาใช้ในการสังเคราะห์ cDNA พบว่า cDNA ก็ยังคงไม่สามารถนำมาใช้เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้เช่นกัน

ผลจากการเทียบวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อผล ระหว่างการใช้ Trizol reagent และ Extraction buffer ร่วมกับ β -mercaptoethanol พบว่าวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอด้วย Extraction buffer ร่วมกับ β -mercaptoethanol สามารถสกัดออกจากตัวอย่างได้ค่อนข้างดี และได้ปริมาณอาร์เอ็นเอที่สูงกว่า ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างเนื้อผล ด้วยชุดสกัดอาร์เอ็นเอของ Axygen (Biosciences) ที่พบว่าคอลัมน์สามารถแยกสกัดออกจากตัวอย่างได้ดี แต่อาร์เอ็นเอเมื่อนำมาใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ cDNA พบว่า cDNA ก็ยังคงไม่สามารถนำมาใช้เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้เช่นกัน

ตารางที่ 4.4 ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างเนื้อผลและเนื้อในเมล็ดสับุดำ

ชนิดของเนื้อเยื่อ	ระยะพัฒนาการของผล	ความเข้มข้น		
		(ng/100 mg FW)	OD _{260/280}	OD _{260/230}
เนื้อผล	Premature fruits (P)	52.10	1.90	0.37
	Mature green fruits (M)	192.10	2.10	1.12
	Mature ripe fruits (yellow) (R)	76.20	1.21	0.57
	Senescent fruit (black) (S)	191.5	1.51	0.62
	Dried fruits (D)	42.98	0.71	0.38
เนื้อในเมล็ด	Premature fruits (P)	1825.74	1.87	0.91
	Mature green fruits (M)	1915.10	1.62	1.02
	Mature ripe fruits (yellow) (R)	2128.69	1.57	0.96
	Senescent fruit (black) (S)	1571.61	1.46	0.76
	Dried fruits (D)	1942.45	1.51	0.94

หมายเหตุ อาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างเนื้อเยื่อสับุดำทั้ง 2 ชนิด ยังไม่ผ่านขั้นตอนการทำอาร์เอ็นเอให้บริสุทธิ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4.2 ไพรมเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

สำหรับไพรมเมอร์ที่ใช้ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมชิ้นส่วนยีนเป้าหมาย และใช้ในการตรวจสอบและติดตามการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Real-time PCR ได้แก่ *UBQ* ซึ่งเป็นยีนที่เลือกนำมาใช้เป็น internal control ยีน *J. curcas geranylgeranyl diphosphate synthase (Jc-GGPPS)* และยีน *J. curcas casbene synthase homolog (JcCHS)* ซึ่งเป็นยีนที่เคยมีรายงานว่าสร้างสารในกลุ่มไดเทอร์พีนส์ (สารพอร์บอลเอสเทอร์) นั้น ได้เลือกใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่สร้างโปรตีนเป้าหมายจากพืชที่หาได้จากฐานข้อมูล GenBank มาทำการเปรียบเทียบและออกแบบไพรมเมอร์ แสดงดังภาพที่ 4.9-4.11 ในส่วนของการออกแบบไพรมเมอร์สำหรับตรวจสอบยีนที่สร้างเอนไซม์ Geranyl diphosphate synthase (GGPPS) ซึ่งเป็นเอนไซม์ตั้งต้นในการสร้าง Geranylgeranyl diphosphate (GGPP) นั้น ได้เลือกใช้โมเลกุลเพปไทด์ที่ได้มาจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ มาสืบค้นกับฐานข้อมูล Jatropha Genome Database

(<http://www.kazusa.or.jp/jatropha/>) และเมื่อได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ จึงนำมาออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุมตำแหน่งโมเลกุลเปปไทด์ที่นำไปสืบค้น แสดงภาพที่ 4.12 ไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบ แสดงดังตารางที่ 4.5

Prunus. avium	GAAGCGTAAGAAGAAGACCTACACCAAGCCAAAGAAGATCAAGCACAGAAGAAGAAGGT	327
Ziziphus. jujuba	GAAGAGGAAGAAGAAGACCTACACCAAGCCAAAGAAGATCAAGCACAGAAGAAGAAGGT	293
Jatropha. curcas	GAAGAGAAAGAAGAAGACTTACACCAAGCCAAAGAAGATCAAGCACAGAAGAAGAAGGT	293
	**** * *****	
Prunus. avium	TAAGCTCGCGGTGCTCCAGTTCTACAAGGGTGATGATTCTGGAAAGGTCAGAGGCTGAG	387
Ziziphus. jujuba	CAAGCTCGCCGTCCTCCAGTTCTACAAGGGTGATGATTCTGGCAAAGTTGAGAGGCTGAG	353
Jatropha. curcas	CAAACCTGCCGTGCTT CAGTTCTACAAGAGCGATGACTCCGGAAAGGTGCAGAGGCTGAG	353
	***** * *****	
Prunus. avium	GAAAGAGTGCCCTAATGCTGAGTCCGGAGCCGGGACTTTCATGGCGAACCACTTCGACAG	447
Ziziphus. jujuba	GAAGGAGTGCCCTAACGCCGAGTGTGGTGGCGGGACTTTCATGGCAAACCACTTTGACCG	413
Jatropha. curcas	GAAGGAGTGCCCAATGCTGAGTGTGGAGCTGGAACCTTCATGGCCAACATTTTGATAG	413
	***** ** *****	

ภาพที่ 4.9 ตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *UBQ* ที่เลือกนำมาออกแบบไพรเมอร์ (ฐิติพร บุรณะศรีศักดิ์, 2552)

<i>Jatropha</i>	AATGATGTAATGTCTCATGAGACTGAGCAAGATAGAGGACATGTAGCGTCTTG CATCGAT	1612
<i>Euphorbia</i>	AATGACCTTACTTCTCACAAAGACTGAGCAAGCAAGAGGACACGTGGCATCTTG CATTGAC	1545
	***** * * *****	
<i>Jatropha</i>	TGCTACATGAAGCA AATATGGTGTTTCAAAGAGGAGGCAGTTGAAGAGATCCAGAAAAATG	1672
<i>Euphorbia</i>	TGTTACATGAAACA ACATGGATTAAAGCAAAGAAGAAGCAGTGAAAGTTCTTGAAAAAATG	1605
	** ***** * * *****	
<i>Jatropha</i>	GCTACAAATGAATGGAAGAAATTAATGAGCAACTCATCGTGCGGTCCACAGAAGTTGTG	1732
<i>Euphorbia</i>	GCAAGAGACTGTTGGAAAGAAATGAATGAAGAAGTGATGA---GACCAAAATCAATTTT-	1660
	** * * * ***** * * ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
<i>Jatropha</i>	CCAGTGAATCTTTTAAATGCGAATCGTTAATCTTGTCCGCCTAACAGATGTGAGTTA CAAG	1792
<i>Euphorbia</i>	-CAGTGGATGTTTAAATGAGAATTGTAAATCTTGTTCGTCTAACAGATGTGAGCTA CAAA	1719
	***** ** ***** * * ***** * * *****	
<i>Jatropha</i>	TATGGAGATGGATACAG GACTCTTCACAACTGAAAGAATATGTGAAAGGATTGTTTCATT	1852
<i>Euphorbia</i>	TATGGAGATGGATACAC TATTCTCAGCAACTCAAAGACTTTGTTAAAGGCTCGTTTGTT	1779
	***** ***** *	

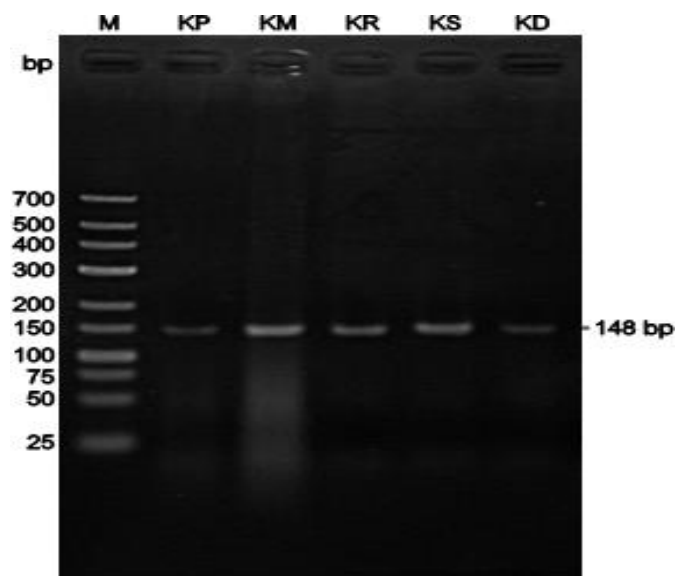
ภาพที่ 4.10 ตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CS* ที่เลือกนำมาออกแบบไพรเมอร์

ตารางที่ 4.5 โพรเมอร์สำหรับใช้ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมชิ้นยีนเป้าหมาย ที่ออกแบบโดยใช้โปรแกรม Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)

ยีน	ขนาดของ PCR product (bp)	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5'-3') ของโพรเมอร์	%GC	อุณหภูมิ (°C)
UBQ	148	F' CAC CAA GCC AAA GAA GAT	58	48
		CAA GCA C		
		R' GGT TGG CCA TGA AAG TTC CAG	57	55
		C		
CS	187	F' GCG ATG AGA TAC TCT CTT CTC	50	58
		G		
		R' CCC GTC GAA GAT CAT CAT TGT	48	58
GGPPS	205	F' CAT CGA TTG CTA CAT GAA GCA	43	57
		R' CGT GTA TCC ATC TCC ATA CTT		
		G	45	56
GPPS	191	F' GGC GTA TGA AGA TGC CTG AA	50	58
		R' CAA GTG AAG TCC ATG GCG A	55	59

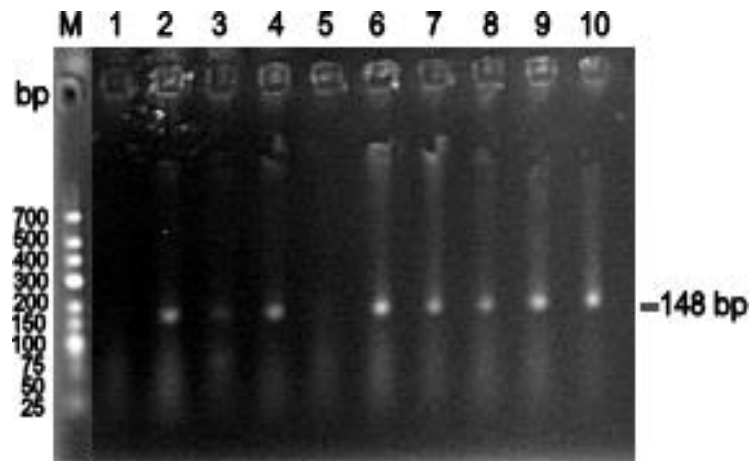
4.4.3 การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมและการโคลนยีนเป้าหมายสำหรับนำมาใช้ในการคัดเลือก recombinant plasmid

สำหรับการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมชิ้นส่วนของยีนที่สร้างเอนไซม์ UBQ, CS, GGPPS และ GPPS นั้น ในขั้นตอนการทำให้ชิ้นส่วนของโพรเมอร์ยึดติดกับดีเอ็นเอสายเดี่ยว (Primer annealing) จะใช้อุณหภูมิแตกต่างกันไป ซึ่งอุณหภูมิที่ได้จากการออกแบบด้วยโปรแกรม Primer-BLAST (ตารางที่ 4.5) พบว่ายังมีความคลาดเคลื่อนอยู่ ดังนั้นจึงทดลองหาอุณหภูมิที่เหมาะสมกับยีนแต่ละชนิดโดยได้ลองใช้อุณหภูมิหลายๆ แบบ ได้แก่ 55, 58, 60 และ 62 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และจากการสังเกตการแสดงผลของยีนเป้าหมายด้วยเจล 2% agarose พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับขั้นตอน annealing ของยีน CS คือ 55 องศาเซลเซียส ขณะที่ยีน UBQ, GGPPS และ GPPS อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด คือ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งผลการแสดงผลของยีน UBQ จากการตรวจสอบด้วยเจล 2% agarose แสดงดังภาพที่ 4.13

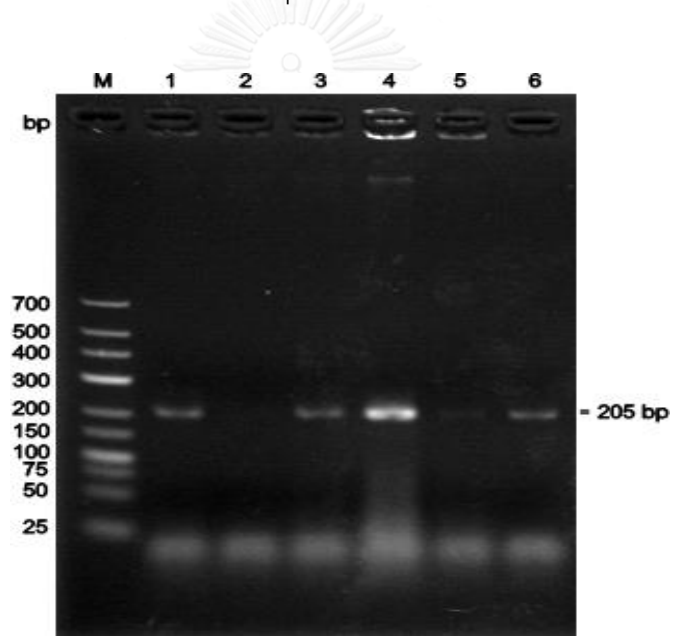


ภาพที่ 4.13 การแสดงออกของยีน *UBQ* จากตัวอย่างเนื้อในเมล็ด จากการตรวจสอบด้วย 2% agarose gel (KP = seed kernel premature fruits, KM = seed kernel mature fruits, KR = seed kernel mature ripe fruits (yellow), KS = seed kernel senescent fruit (black) และ KD = seed kernel dried fruits

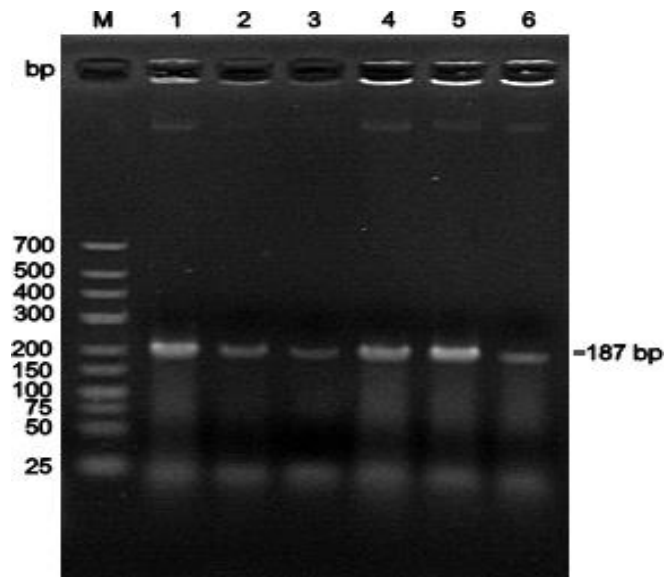
สำหรับผลจากการโคลนยีน *UBQ*, *CS*, *GGPPS* และ *GPPS* จะสังเกตเห็นว่าจากการคัดเลือกโคโลนี *E.coli* DH5 α recombinant plasmid ที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำโคโลนีพีซีอาร์ และตรวจสอบการแสดงออก PCR product ของยีนเป้าหมายทั้ง 4 ชนิด ด้วยเจล 2% agarose นั้นพบว่าโคโลนีที่เลือกมาใช้มีชิ้นส่วนของยีนเป้าหมายแทรกอยู่ แสดงดังภาพที่ 4.14



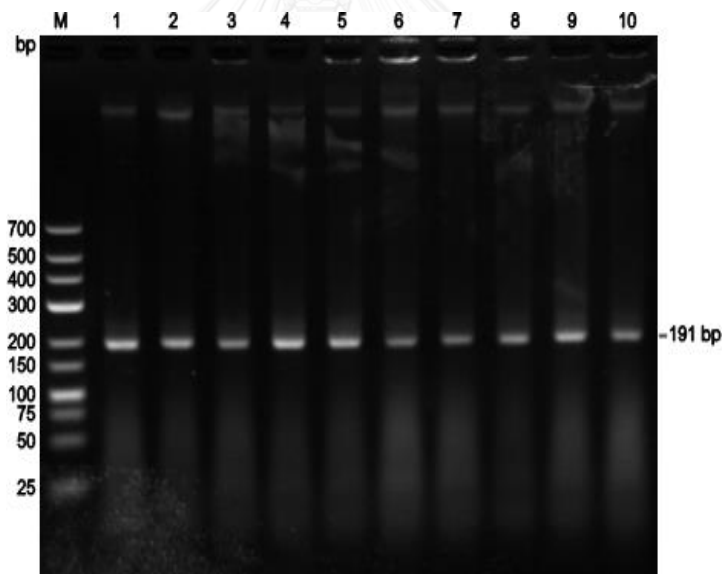
(ก) PCR product ยีน *UBQ*



(ข) PCR product ยีน *CS*



(ค) PCR product ยีน *GGPPS*



(ง) PCR product ยีน *GPPS*

ภาพที่ 4.14 PCR product จากการทำโคลนนิ่งพีซีอาร์ ที่มีชิ้นส่วนของยีนเป้าหมายแทรกอยู่
(ตรวจสอบการแสดงออกด้วยเจล 2% agarose)

ผลจากการตรวจสอบการแสดงออก PCR product ของยีน *UBQ*, *CS*, *GGPPS*
และ *GPPS* ด้วยเจล 2% agarose จะนำมาใช้ในการเลือก *E.coli* DH5 α recombinant plasmid

สำหรับนำมาเลี้ยงและสกัดแยกเฉพาะดีเอ็นเอออกจากพลาสมิด ก่อนส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งจากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีนเป้าหมายทั้ง 4 ชนิด และเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่มีอยู่ในฐานข้อมูล Jatropha Genome Database พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเป้าหมายทั้ง 4 ชนิด ที่ได้จากการโคลน มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่มีอยู่ในฐานข้อมูล แสดงดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นยีนเป้าหมาย 4 ชนิด เทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่มีอยู่ในฐานข้อมูล Jatropha Genome Database

ชนิดของยีน	หมายเลข Accession No.	อ้างอิงสิ่งมีชีวิต	% ความเหมือน
UBQ	Jcr 4S08473	<i>J. curcas</i>	100
CS	Jcr 4S03951	<i>J. curcas</i>	100
GGPPS	Jcr 4S01081	<i>J. curcas</i>	100
GPPS	Jcr 4S01716	<i>J. curcas</i>	100

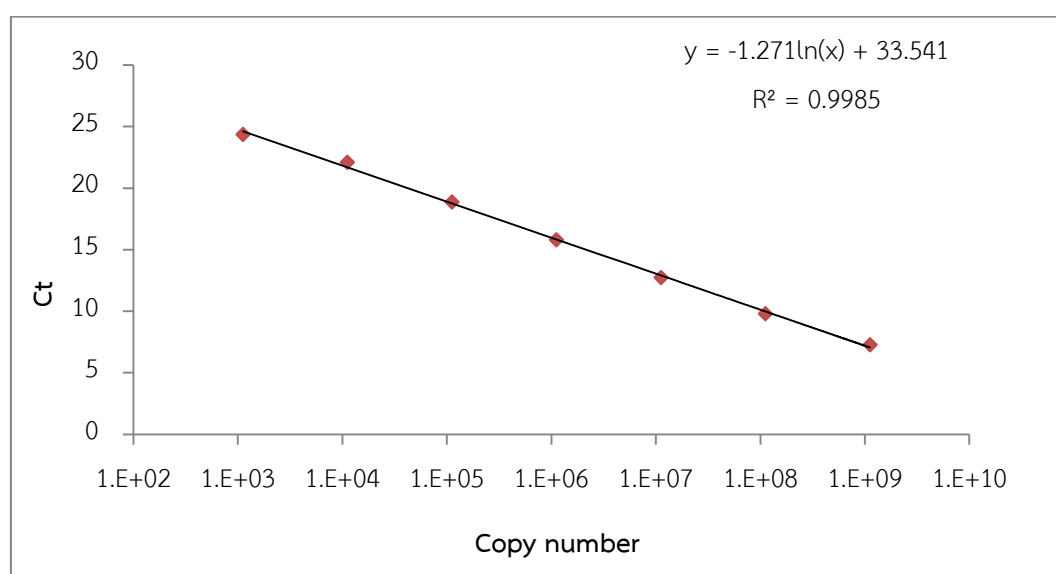
4.4.4 การแสดงออกของยีนเป้าหมายจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Real-time PCR

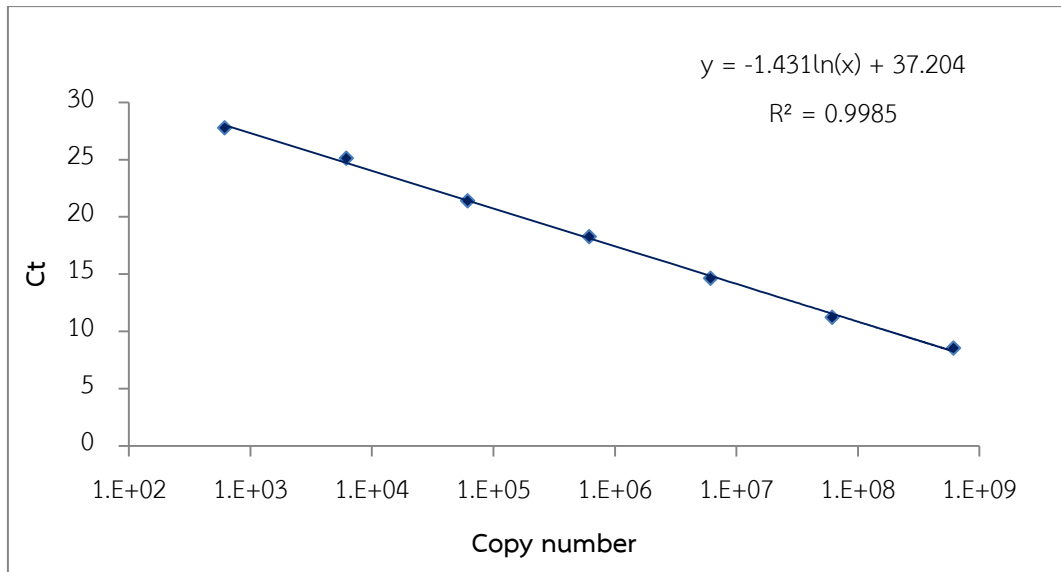
ดีเอ็นเอของยีน *UBQ*, *CS*, *GGPPS* และ *GPPS* ที่สกัดแยกออกจากพลาสมิดและทราบค่าความเข้มข้นแล้ว นำมาคำนวณหาจำนวน DNA copy number (ภาคผนวก ค) เพื่อเตรียมดีเอ็นเอสำหรับการวิเคราะห์การแสดงออกด้วยเครื่อง Real-time PCR โดยข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง นำมาหาค่าเฉลี่ยและนำมาใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานลอการิทึมของยีนแต่ละชนิด จะสังเกตว่าค่า R-squared มากกว่า 0.99 แสดงดังภาพที่ 4.15 (ก-ง)

สำหรับผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *UBQ*, *CS*, *GGPPS* และ *GPPS* จากตัวอย่างเนื้อในเมล็ดสับดำทั้ง 5 ระยะ ที่ได้จากการนำค่า Ct ของยีนแต่ละชนิดจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Real-time PCR มาแทนค่าในสมการกราฟมาตรฐานลอการิทึม และนำมาคำนวณค่าการแสดงออกเทียบกับการแสดงออกของยีน *UBQ* ที่เลือกนำมาใช้เป็น internal control พบว่าการแสดงออกของยีน *GPPS* ในเนื้อในเมล็ด จะแสดงออกต่ำสุดในระยะ Premature fruits (0.41) จากนั้นจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นเมื่อระยะพัฒนาการของผลเปลี่ยนไป และเพิ่มขึ้นมาสูงสุดในระยะ Dried fruits (0.67) แสดงดังภาพที่ 4.16 (ก) และจากการเปรียบเทียบระหว่างการแสดงออกของยีน *GPPS* และโปรตีน *GPPS* จากตัวอย่างเนื้อในเมล็ดแต่ละระยะ จะสังเกตเห็นว่าแนวโน้มของความสัมพันธ์ไม่ได้เป็นไปในทิศทางเดียวกันแต่อย่างใด แสดงดังภาพที่ 4.17 ขณะที่ยีน *CS* พบว่ามีการแสดงออก

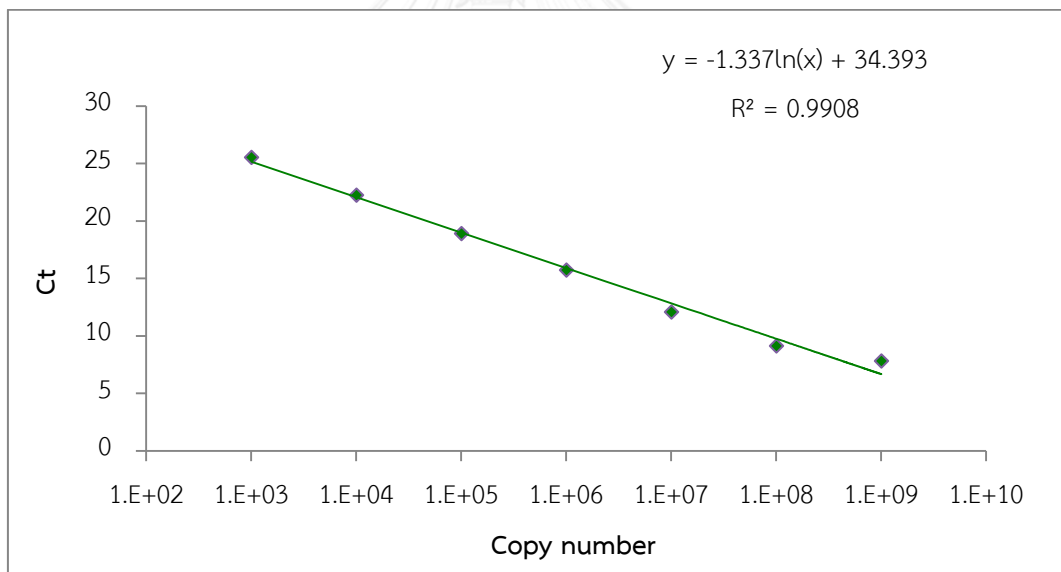
ต่ำสุดในระยะ Premature fruits (4.57) และเพิ่มขึ้นมาสูงสุดในระยะ Mature green fruits (7.11) ส่วนยีน *GGPPS* พบว่ามีการแสดงออกต่ำสุดในระยะ Premature fruits (0.59) จากนั้นจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นเมื่อระยะพัฒนาการของผลเปลี่ยนไป และเพิ่มขึ้นมาสูงสุดในระยะ Dried fruits (1.02) แสดงดังภาพที่ 4.16 (ข และ ค)

ผลจากการเปรียบเทียบข้อมูลการแสดงออกของยีนทั้ง 3 ชนิด ในตัวอย่างเนื้อในเมล็ดสับุดำแต่ละระยะจะสังเกตเห็นว่าแนวโน้มการแสดงออกของยีน *CS* จะสูงกว่ายีน *GGPPS* และ *GPPS* ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 4.18

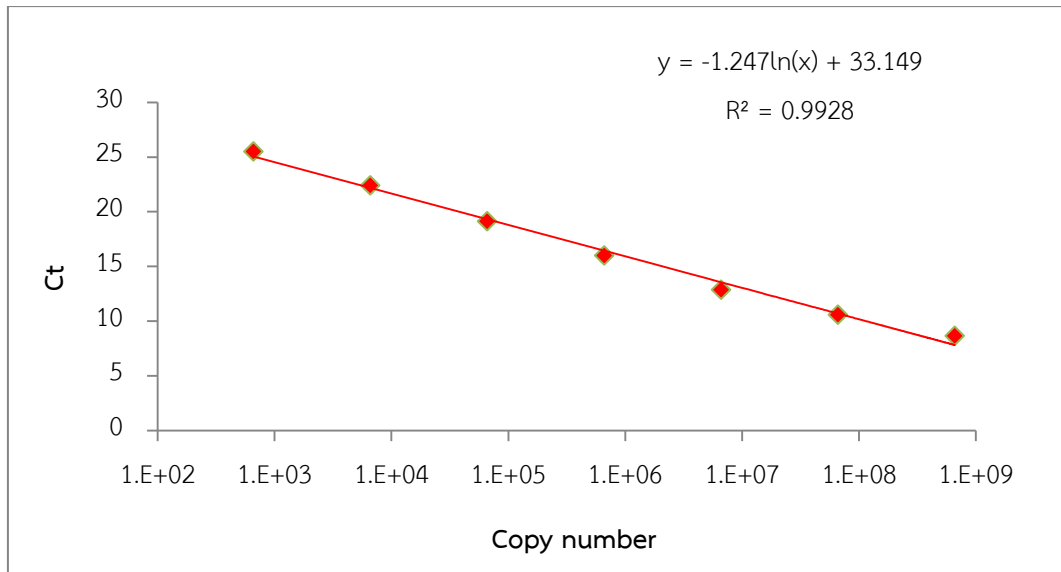




(ข) ยีน CS

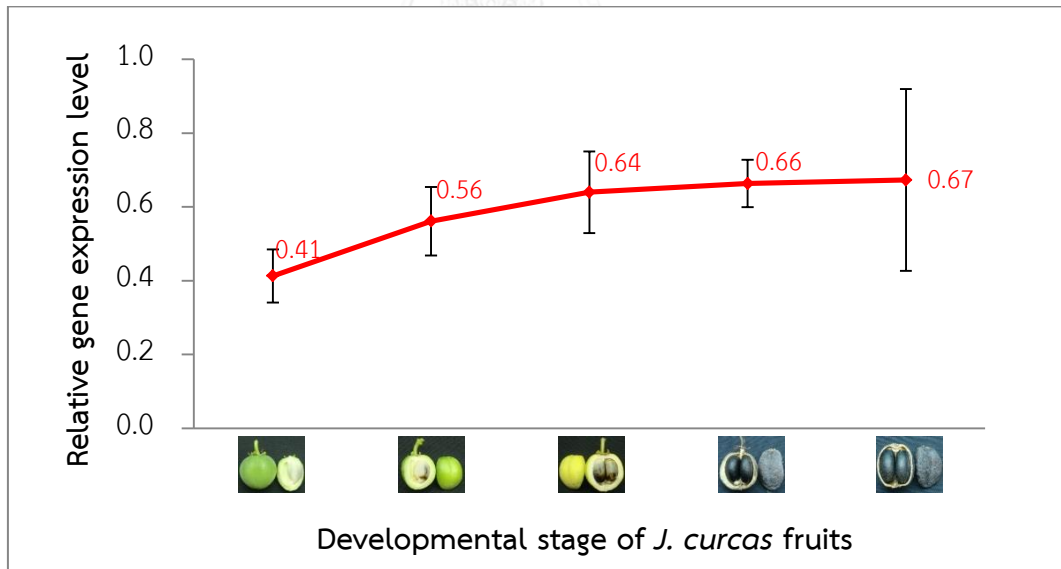


(ค) ยีน GGPPS

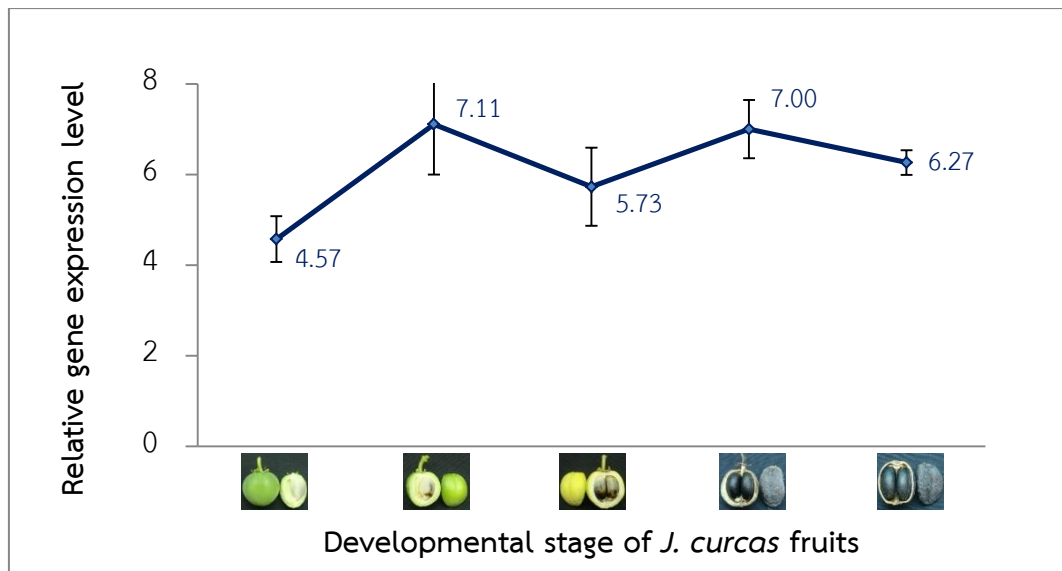


(ง) ยีน GPPS

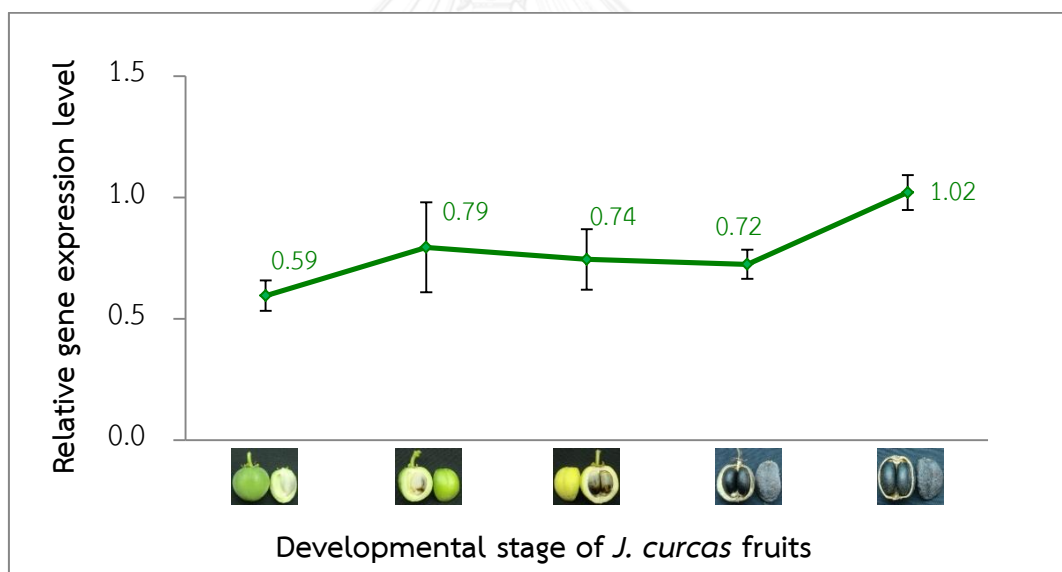
ภาพที่ 4.15 กราฟมาตรฐานลอการิทึมของยีนทั้ง 4 ชนิด



(ก) ยีน GPPS

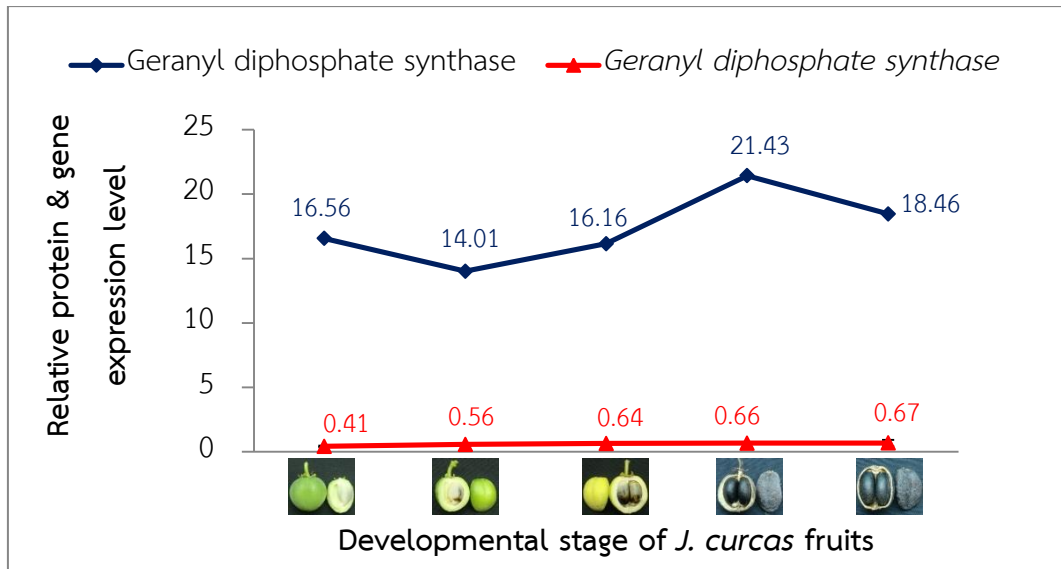


(ข) ยีน CS

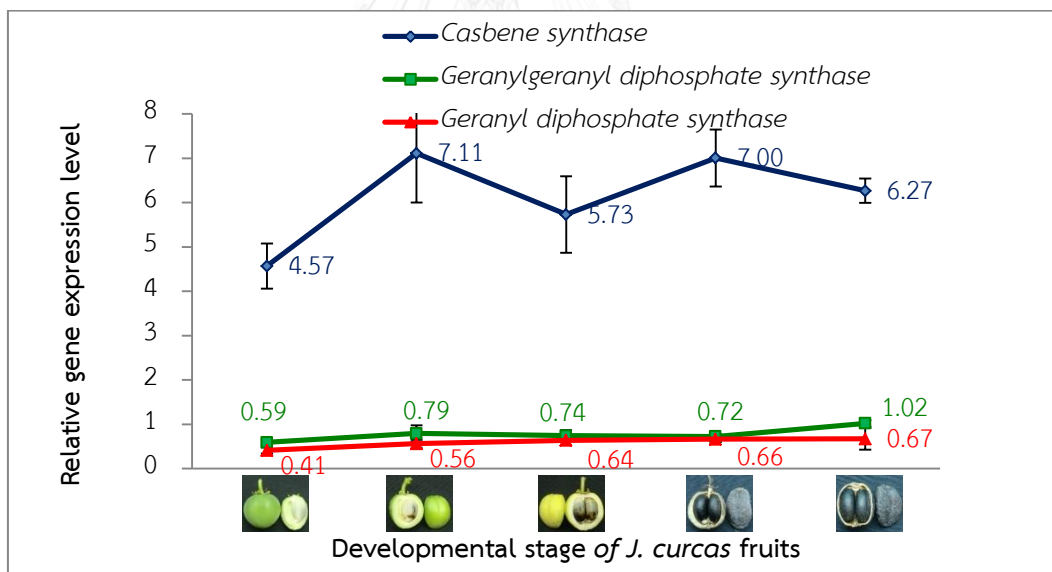


(ค) ยีน GGPPS

ภาพที่ 4.16 ระดับการแสดงออกของยีนทั้ง 3 ชนิด จากตัวอย่างเนื้อในเมล็ดสับุดำ



ภาพที่ 4.17 กราฟเทียบการแสดงออกของยีน GPPS และโปรตีน GPPS ในตัวอย่างเนื้อในเมล็ด
สบู่ดำ



ภาพที่ 4.18 กราฟเทียบระดับการแสดงออกของยีนทั้ง 3 ชนิด จากตัวอย่างเนื้อในเมล็ดสบู่ดำ

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 ระดับการแสดงออกของโปรตีนจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์

ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนจากเนื้อผลและเนื้อในเมล็ดสับุดำระยะต่างๆ จากการตรวจสอบเบื้องต้นด้วย SDS-PAGE gel จะสังเกตเห็นว่าเจลเนื้อในเมล็ดแต่ละระยะจะมีความหนาแน่นของแถบโมเลกุลโปรตีนอยู่สูงกว่าเจลเนื้อผลทั้งที่ใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นก่อนโหลดเท่ากัน ซึ่งจากข้อมูลมีความเป็นไปได้ว่าสีของตัวอย่างอาจเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีผลรบกวนการแสดงออกของโปรตีน โดยเฉพาะในเจลเนื้อผล ส่วนผลจากการวิเคราะห์มวลโมเลกุลโปรตีนด้วยเครื่องแยกและวิเคราะห์มวลสาร (LC-MS/MS) พบการแสดงออกของโปรตีนรวมทั้งสิ้น 2941 ชนิด โดยแบ่งออกเป็นโปรตีนที่พบการแสดงออกเฉพาะเนื้อผล 13 ชนิด โปรตีนที่พบการแสดงออกเฉพาะเนื้อในเมล็ด 3 ชนิด โปรตีนที่พบการแสดงออกในเนื้อผลและเนื้อในเมล็ดสับุดำทุกระยะ 1316 ชนิด และอีก 1609 ชนิด เป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกในบางเนื้อเยื่อหรือบางระยะเท่านั้น ซึ่งผลจากการระบุหน้าที่ของโปรตีนอ้างอิงจากฐานข้อมูล Uniprot และ GoCat พบว่าจากโปรตีน 1316 ชนิด ที่มีการแสดงออกในเนื้อผลและเนื้อในเมล็ดสับุดำทุกระยะ สามารถจัดแบ่งกลุ่มโปรตีนออกได้เป็น 8 กลุ่มหลักๆ สอดคล้องกับภาพที่ 4.3 ทั้งนี้จากกลุ่มโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีชีวสังเคราะห์เทอร์ปีนอยด์ พบการแสดงออกของโปรตีนที่มีหน้าที่เกี่ยวข้อง คือ Diphosphomevalonate decarboxylase และ Geranyl diphosphate synthase

5.2 ปริมาณสารฟอรับอลเอสเทอร์จากตัวอย่างเนื้อเยื่อสับุดำ

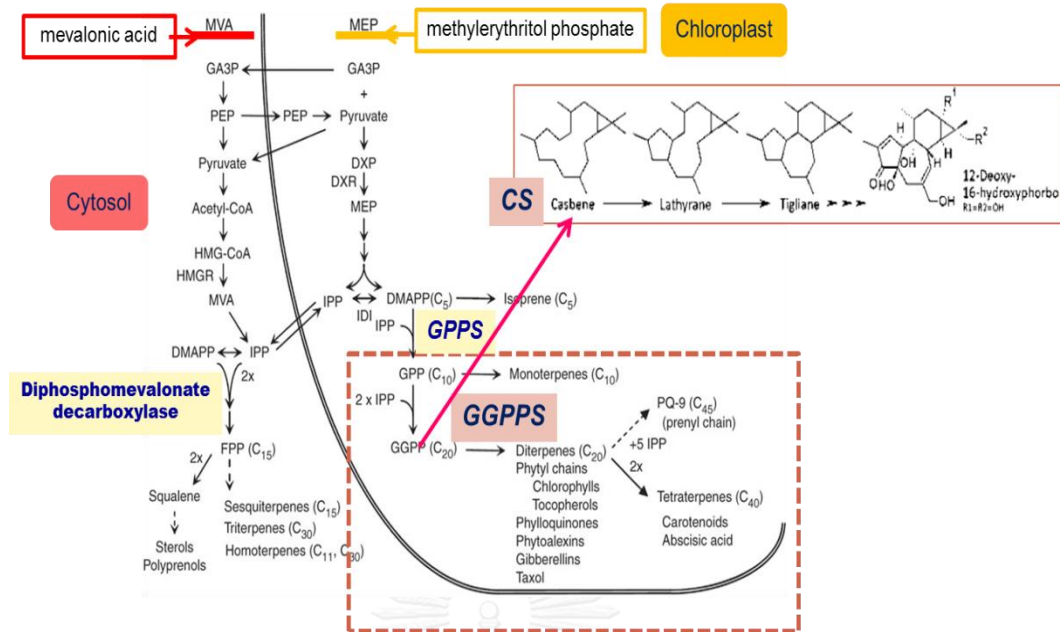
ผลการวิเคราะห์สารฟอรับอลเอสเทอร์จากเนื้อผลและเนื้อในเมล็ดสับุดำแต่ละระยะ สำหรับการวิจัยในครั้งนี้เราพบเฉพาะสารฟอรับอลเอสเทอร์ชนิด DHPB เท่านั้น สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ นุจรี จันทรย์แย้ม และคณะ (2552) ที่พบว่าสารฟอรับอลเอสเทอร์ที่พบในเนื้อผล ใบ และเนื้อในเมล็ดสับุดำสายพันธุ์เม็กซีโกเป็นสารฟอรับอลเอสเทอร์ชนิด DHPB

ผลจากการวิเคราะห์สารฟอรับอลเอสเทอร์พบว่าเนื้อในเมล็ดระยะ Premature fruits จะมีการสะสมสารไว้มากสุดถึง 5.30 มิลลิกรัมต่อกรัม ขณะที่ระยะ Mature ripe fruits (yellow) จะมีการสะสมสารไว้น้อยที่สุดเพียง 2.36 มิลลิกรัมต่อกรัม ส่วนเนื้อในผลระยะ Premature fruits จะมีการสะสมสารไว้มากสุดถึง 1.79 มิลลิกรัมต่อกรัม ขณะที่ระยะ Dried fruits มีการสะสมสารไว้น้อยที่สุดเพียง 0.13 มิลลิกรัมต่อกรัม ซึ่งจากข้อมูลการสะสมสารมีความเป็นไปได้ที่ในระยะ Premature fruits จะมีการสะสมสารไว้มากเพื่อป้องกันตัวเองจากแมลงและสิ่งแวดล้อม และเมื่อเวลาผ่านไปสาร

บางส่วนอาจถูกนำไปใช้ในกิจกรรมต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับพัฒนาการของผล ทั้งนี้จากการสังเกตเนื้อในเมล็ดระยะ Dried fruits ได้มีการสะสมสารเพิ่มขึ้นมาอีกครั้งซึ่งอาจมีวัตถุประสงค์เพื่อเตรียมป้องกันตัวเองจากแมลงและสิ่งแวดล้อมในช่วงที่เมล็ดงอก ขณะที่ตัวอย่างเนื้อผลระยะ Dried fruits ปริมาณสารลดลงต่ำสุดซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเมื่อโครงสร้างเนื้อผลเสื่อมสภาพสารก็อาจเสื่อมสภาพไปหรือไม่ก็อาจถูกเคลื่อนย้ายไปยังเนื้อเยื่ออื่น

5.3 โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการชีวสังเคราะห์สารในกลุ่มไดเทอร์พีนส์

ผลจากการเทียบการแสดงออกของโปรตีน Diphosphomevalonate decarboxylase และ Geranyl diphosphate synthase กับปริมาณสารฟอรบออลเอสเทอร์ จากตัวอย่างเนื้อผลและเนื้อในเมล็ดสับุดาระยะต่างๆ พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของโปรตีนและปริมาณสารไม่ได้มีแนวโน้มเป็นไปในทิศทางเดียวกันแต่อย่างใด จึงนำมาสู่การยืนยันผลการแสดงออกของโปรตีนด้วยการวิเคราะห์การแสดงออกในระดับ mRNA ของยีนที่เกี่ยวข้อง ซึ่งการวิจัยในครั้งนี้ได้ให้ความสำคัญกับโปรตีน Geranyl diphosphate synthase ด้วยเหตุผลที่ว่าในวิถีชีวสังเคราะห์เทอร์พีนอยด์ Geranyl diphosphate synthase เป็นเอนไซม์ตั้งต้นในการสร้าง Geranylgeranyl diphosphate และที่สำคัญคือยังไม่มีรายงานการศึกษาในดังกล่าวในสับุดำ นอกจากนี้ยังได้เลือกศึกษาการแสดงออกของยีน GGPPS และ CS ด้วยเหตุผลที่ว่ายีนทั้ง 2 ชนิด มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับการสร้างสารในกลุ่มไดเทอร์พีนส์ (สารฟอรบออลเอสเทอร์) ซึ่งคาดว่าความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนและยีนในวิถีชีวสังเคราะห์เทอร์พีนอยด์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารฟอรบออลเอสเทอร์ในผลสับุดำ น่าจะเป็นไปตามภาพที่ 5.1



ภาพที่ 5.1 ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนและยีนในวิถีชีวสังเคราะห์เทอร์ปีนอยด์ที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการสร้างสารพอร์บอลเอสเทอร์ในผลสับุดำ

5.4 การตรวจสอบและติดตามการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการชีวสังเคราะห์สารในกลุ่มไดเทอร์ปีนส์

ผลการสกัดอาร์เอ็นเอจากเนื้อผลและเนื้อในเมล็ดสับุดำแต่ละระยะ ด้วย Trizol reagent และนำมาวัดความเข้มข้นด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม พบว่าเนื้อในเมล็ดแต่ละระยะมีความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอค่อนข้างสูงจนต้องนำมาเจือจางลงครึ่งหนึ่งก่อนจะนำมาใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ cDNA ในทางกลับกันผลการสกัดอาร์เอ็นเอจากเนื้อผลแต่ละระยะด้วย Trizol reagent พบว่าในระยะ Premature fruits, Mature green fruits และ Mature ripe fruits (yellow) มีความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอต่ำมาก ส่วนในระยะ Senescent fruit (black) และ Dried fruits พบว่าปัญหาสืจากตัวอย่างทำให้ไม่สามารถวัดความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอได้ ดังนั้นจึงได้ลองเปลี่ยนวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอจากเนื้อผลมาเป็นการสกัดโดยใช้ Extraction buffer ร่วมกับ β -mercaptoethanol ซึ่งพบว่าในระยะ Senescent fruit (black) และ Dried fruits สีของตัวอย่างจางลงพอสมควร ขณะที่ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอจากการวัดด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมพบว่าสูงกว่าการสกัดด้วย Trizol reagent และจากการนำอาร์เอ็นเอมาใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ cDNA และนำมาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมชิ้นส่วนยีน *UBQ* แล้วตรวจสอบด้วย 2%

agarose gel และเครื่อง Real-time PCR กลับไม่พบการแสดงออกของยีนดังกล่าวแต่อย่างใด ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าคุณภาพและความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอมีผลต่อการสังเคราะห์ cDNA ต้นแบบ

สำหรับการวิจัยในครั้งนี้เราสามารถระบุยีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีชีวสังเคราะห์เทอร์ปีนอยด์จากตัวอย่างเนื้อในเมล็ดสับุด้าได้คือ *GPPS* และจากข้อมูลการแสดงออกของโปรตีน *GPPS* เทียบกับการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน *GPPS* ในตัวอย่างแต่ละระยะ พบว่าแนวโน้มของความสัมพันธ์ไม่ได้เป็นไปในทิศทางเดียวกัน ซึ่งรวมถึงความสัมพันธ์ระหว่าง *GPPS*, *GPPS* และสารฟอร์บอลเอสเทอร์ด้วย ขณะที่การแสดงออกของโปรตีน Diphosphomevalonate decarboxylase และสารฟอร์บอลเอสเทอร์ในตัวอย่างเนื้อในเมล็ดแต่ละระยะเองก็มีแนวโน้มของความสัมพันธ์ไม่ได้เป็นไปในทิศทางเดียวกันเช่นกัน จึงอาจเป็นไปได้ว่าโปรตีน Diphosphomevalonate decarboxylase และ *GPPS* ไม่ได้เกี่ยวข้องกับกับการสะสมสารฟอร์บอลเอสเทอร์ในผลสับุด้า และอาจเป็นไปได้ว่ามีโปรตีนหรือยีนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องและยังรอการศึกษาวิจัยในอนาคต



รายการอ้างอิง

- จิตติพร บุรณะศรีศักดิ์. 2552. การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันอิสระในเนื้อเมล็ดสบู่ดำ *Jatropha curcas L.* โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์. (วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต), จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นุจรี จันทรเยี่ยม, วิฑูรย์ ใจฝ่อง และ พรศิริ หลีวานิช. (2552). การศึกษาปริมาณสารฟอรับอลเอสเทอร์ในใบ เนื้อผล และเมล็ด ของสบู่ดำพันธุ์มีพิษน้อยจากประเทศเม็กซิโก. Paper presented at the การประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 6, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม.
- ปาริชาติ มั่นอัน. 2552. การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารฟอรับอลเอสเทอร์ในระหว่างการย่อยสลายของส่วนต่างๆ จากสบู่ดำ. (วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต), มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- รักษ์ พุกษชาติ. (2552). การปลูกและการพัฒนาสบู่ดำเพื่อทดแทนน้ำมันดีเซล. สำนักพิมพ์เน็อน บ็อค มีเดีย
- สุดารัตน์ หอมหวล. 2007. พืชอันตราย Dangerous Plants. *Thai Pharmaceutical and Health Science Journal*. 2: 159-165.
- Ahmed, W. A., and Salimon, J. 2009. Phorbol ester as toxic constituents of tropical *Jatropha curcas* seed oil. *European Journal of Scientific Research*. 31(3): 429-436.
- Akbar, E., Yaakob, Z., Kamarudin, S. K., Ismail, M., and Salimon, J. 2009. Characteristic and composition of *Jatropha curcas* oil seed from Malaysia and its potential as biodiesel feedstock feedstock. *European Journal of Scientific Research*. 29(3): 396-403.
- Baldini, M., Raranciuc, S., and Vischi, M. . (2012). *Toxicity of Jatropha curcas L. as a biofuel crop and options for management*. [online]. Available from: <http://www.cabi.org/cabreviews>. [2014, August 16]
- Boornasrisak, T., Phaonakrop, N., Jaresitthikunchai, J., Virunanon, C., Roytrakul, S., and Chulalaksananukul, W. 2013. Proteomic evaluation of free fatty acid

- biosynthesis in *Jatropha curcas* L.(physic nut) kernel development. *African Journal of Biotechnology*. 12(21): 3132-3142.
- Burke, C., and Croteau, R. 2002. Geranyl diphosphate synthase from *Abies grandis*: cDNA isolation, functional expression, and characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 405(1): 130-136.
- Caballero, N., Rodriguez-Vega, A., Dias-Lopes, G., Valenzuela, J. G., Ribeiro, J., Carvalho, P. C., Valente, R. H., Brazil, R. P., and Cuervo, P. 2014. Expression of the mevalonate pathway enzymes in the *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) sex pheromone gland demonstrated by an integrated proteomic approach. *Journal of Proteomics*. 96: 117-132.
- Chaudhary, S., Shah, P., Vyas, M., Kumar, V., Srivastava, N., Katudia, K., Vaidya, K., and Chikara, S. 2011. Establishment of the protocol for high quality RNA isolation from *Jatropha curcas*. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences*. 2(4): 715-720.
- Devappa, R. K., Makkar, H., and Becker, K. 2010. Optimization of conditions for the extraction of phorbol esters from *Jatropha* oil. *Biomass and Bioenergy*. 34(8): 1125-1133.
- Devappa, R. K., Makkar, H. P., and Becker, K. 2011. *Jatropha* diterpenes: a review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 88(3): 301-322.
- Emil, A., Yaakob, Z., Kumar, M. S., Jahim, J., and Salimon, J. 2010. Comparative evaluation of physicochemical properties of *Jatropha* seed oil from Malaysia, Indonesia and Thailand. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 87(6): 689-695.
- Freeman, B., and Beattie, G. 2008. An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. *The Plant Health Instructor*.
- Goel, G., Makkar, H. P., Francis, G., and Becker, K. 2007. Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. *International Journal of Toxicology*. 26(4): 279-288.

- Haas, W., and Mittelbach, M. 2000. Detoxification experiments with the seed oil from *Jatropha curcas* L. *Industrial Crops and Products*. 12(2): 111-118.
- Haas, W., Sterk, H., and Mittelbach, M. 2002. Novel 12-Deoxy-16-hydroxyphorbol Diesters Isolated from the Seed Oil of *Jatropha curcas*. *Journal of Natural Products*. 65(10): 1434-1440.
- He, W. 2011. *Biochemical and genetic analyses of Jatropha curcas L. seed composition*. (PhD' S Thesis), University of York.
- Jain, M., Nijhawan, A., Tyagi, A. K., and Khurana, J. P. 2006. Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 345(2): 646-651.
- Kirby, J., Nishimoto, M., Park, J. G., Withers, S. T., Nowroozi, F., Behrendt, D., Rutledge, E. J. G., Fortman, J. L., Johnson, H. E., and Anderson, J. V. 2010. Cloning of casbene and neocembrene synthases from Euphorbiaceae plants and expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry*. 71(13): 1466-1473.
- Kumar, A., and Sharma, S. 2008. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review. *Industrial Crops and Products*. 28(1): 1-10.
- Lin, J., Jin, Y., Zho, M., Zhou, X., and Wang, J. 2009. Molecular cloning, characterization and functional analysis of a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene from *Jatropha curcas*. *African Journal of Biotechnology*. 8(15).
- Lin, J., Jin, Y., Zhou, X., and Wang, J. 2010. Molecular cloning and functional analysis of the gene encoding geranylgeranyl diphosphate synthase from *Jatropha curcas*. *African Journal of Biotechnology*. 9(23): 3342-3351.
- Liu, H., Liu, Y. J., Yang, M. F., and Shen, S. H. 2009. A comparative analysis of embryo and endosperm proteome from seeds of *Jatropha curcas*. *Journal of Integrative Plant Biology*. 51(9): 850-857.

- Løvdaal, T., and Lillo, C. 2009. Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress. *Analytical Biochemistry*. 387(2): 238-242.
- Meng, Y., Li, N., Tian, J., Gao, J., and Zhang, C. 2013. Identification and validation of reference genes for gene expression studies in postharvest rose flower (*Rosa hybrida*). *Scientia Horticulturae*. 158: 16-21.
- Miziorko, H. M. 2011. Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 505(2): 131-143.
- Nakano, Y., Ohtani, M., Polsri, W., Usami, T., Sambongi, K., and Demura, T. 2012. Characterization of the casbene synthase homolog from *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.). *Plant Biotechnology*. 29(2): 185-189.
- Nieto, B., Forés, O., Arró, M., and Ferrer, A. 2009. Arabidopsis 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase is regulated at the post-translational level in response to alterations of the sphingolipid and the sterol biosynthetic pathways. *Phytochemistry*. 70(1): 53-59.
- Nithiyanantham, S., Siddhuraju, P., and Francis, G. 2012. Potential of *Jatropha curcas* as a biofuel, animal feed and health products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 89(6): 961-972.
- Nokkaew, R. 2008. *Elimination of Phorbol Esters in Seed Oil and Press Cake of Jatropha Curcas L.* . (Master's Thesis), Kasetsart University.
- Pradhan, S., Naik, S., Khan, M., and Sahoo, P. 2012. Experimental assessment of toxic phytochemicals in *Jatropha curcas*: oil, cake, bio-diesel and glycerol. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 92(3): 511-519.
- Qiang, C., Li, C., Qi, R., Zhou, B., Qin, Y., and Du, Y. 2013. Cloning and bioinformatics analysis of an ubiquitin gene of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *African Journal of Biotechnology*. 10(60): 12852-12858.

- Sabandar, C. W., Ahmat, N., Jaafar, F. M., and Sahidin, I. 2013. Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (Euphorbiaceae): A review. *Phytochemistry*. 85: 7-29.
- Sandjo, L. P., and Kuete, V. 2013. Diterpenoids from the Medicinal Plants of Africa. *Medicinal Plant Research in Africa*: 105-133.
- Siang, T. C., Soong, S. T., and Yien, A. T. S. 2014. Plant regeneration studies of *Jatropha curcas* using induced embryogenic callus from cotyledon explants. *African Journal of Biotechnology*. 11(31).
- Vanderschuren, H., Lentz, E., Zainuddin, I., and Gruissem, W. 2013. Proteomics of model and crop plant species: Status, current limitations and strategic advances for crop improvement. *Journal of Proteomics*. 93: 5-19.
- Vickers, C. E., Gershenzon, J., Lerda, M. T., and Loreto, F. 2009. A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. *Nature Chemical Biology*. 5(5): 283-291.
- Xia, W., Mason, A. S., Xiao, Y., Liu, Z., Yang, Y., Lei, X., Wu, X., Ma, Z., and Peng, M. 2014. Analysis of multiple transcriptomes of the African oil palm (*Elaeis guineensis*) to identify reference genes for RT-qPCR. *Journal of Biotechnology*. 184: 63-73.
- Xu, R., Wang, R., and Liu, A. 2011. Expression profiles of genes involved in fatty acid and triacylglycerol synthesis in developing seeds of *Jatropha* (*Jatropha curcas* L.). *Biomass and Bioenergy*. 35(5): 1683-1692.
- Yang, H., Liu, J., Huang, H., Guo, T., Deng, L., and Hua, W. . 2014. Selection and evaluation of novel reference genes for quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) based on genome and transcriptome data in *Brassica napus* L. . *Gene*. 538: 113–122.
- Yang, M. F., Liu, Y. J., Liu, Y., Chen, H., Chen, F., and Shen, S. H. 2009. Proteomic analysis of oil mobilization in seed germination and postgermination development of *Jatropha curcas*. *Journal of Proteome Research*. 8(3): 1441-1451.

- Yunping, B., Ngoc Ha, B. T., Eunice, Y., Loong Chueng, L., and Yan, H. 2012. Light induced degradation of phorbol esters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 84: 268-273.
- Zheng, W. J., and Sun, L. 2011. Evaluation of housekeeping genes as references for quantitative real time RT-PCR analysis of gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Fish & Shellfish Immunology*. 30(2): 638-645.
- Zhu, L. J., and Altmann, S. W. 2005. mRNA and 18S-RNA coapplication–reverse transcription for quantitative gene expression analysis. *Analytical Biochemistry*. 345(1): 102-109.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

การสร้างกราฟมาตรฐาน

1. การสร้างกราฟมาตรฐาน (Standard curve) ของสารละลายโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน สำหรับนำมาใช้ในการคำนวณความเข้มข้นของโปรตีน

1.1 เตรียมสารละลายโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน โดยการชั่งโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน 2 มิลลิกรัม นำมาละลายด้วย 0.15% (w/v) SDS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

1.2 ดูดสารละลายโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน จากข้อ 1.1 และน้ำกลั่น ลงในไมโครเพลทแต่ละหลุม ตามตารางที่ ก-1

1.3 เติม Reagent A ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลทแต่ละหลุม ตั้งที่ไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที

1.4 เติม Reagent B ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในไมโครเพลทแต่ละหลุม ตั้งที่ไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที

1.5 นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 690 นาโนเมตร (OD690)

1.6 ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวัด OD690 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง นำมาสร้างสมการกราฟมาตรฐานระหว่าง ค่าที่ได้จากการวัด OD690 และปริมาณความเข้มข้นของสารละลายโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน

ตารางที่ ก-1 ปริมาณสารที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน ความเข้มข้น 0-50 ไมโครกรัม

ความเข้มข้นของสารละลายโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (μg)	สารละลายโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (μl)	น้ำกลั่น (μl)
0	0	5
10	1	4
20	2	3
30	3	2
40	4	1
50	5	0

การเตรียม Reagent A ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

CuSO ₄ -tartrate solution	5 มิลลิลิตร
20% Na ₂ CO ₃	5 มิลลิลิตร
0.8 N NaOH	10 มิลลิลิตร
5% SDS	20 มิลลิลิตร

การเตรียม CuSO₄-tartrate solution ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.04 กรัม
Tartaric acid	0.08 กรัม
น้ำกลั่นสำหรับละลายและปรับปริมาตรให้ครบ 20 มิลลิลิตร	

การเตรียม Reagent B ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Folin-Ciocalteu phenol	1 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	5 มิลลิลิตร

2. การสร้างกราฟมาตรฐาน (Standard curve) ของสารละลายฟอรับอลเอสเทอร์ สำหรับนำมาใช้ในการคำนวณปริมาณสารฟอรับอลเอสเทอร์

2.1 สารฟอรับอลเอสเทอร์ที่เลือกนำมาใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐาน เลือกใช้เป็นสารชนิด Phorbol-12-myristate-13-acetate (TPA) ความบริสุทธิ์ 99%

2.2 เตรียมความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเริ่มต้นเป็น 5000 ppm (ละลายสารมาตรฐานด้วย Methanol (HPLC grade)) และเตรียมความเข้มข้นของสารมาตรฐาน ตามตารางที่ ก-2

2.3 กรองสารละลายมาตรฐาน จากข้อ 2.2 ด้วย Syringe filter ชนิดไนลอน (Dia. 13 mm, pore size 0.45 µl) ก่อนนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

2.5 ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง นำมาสร้างสมการกราฟมาตรฐาน ระหว่าง พื้นที่ใต้โครมาโทแกรม และปริมาณความเข้มข้นของสารละลายฟอรับอลเอสเทอร์

ตารางที่ ก-2 ปริมาณสารที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายฟอร์บอลเอสเทอร์ ชนิด TPA ความเข้มข้น 20-100 ppm

ความเข้มข้นของสารละลาย ฟอร์บอลเอสเทอร์ (ppm)	สารละลายฟอร์บอลเอสเทอร์ความ เข้มข้น 5000 ppm (μ l)	Methanol (HPLC grade) (μ l)
20	4	996
40	8	992
60	12	988
80	18	984
100	16	980

การเตรียม สารละลายฟอร์บอลเอสเทอร์ความเข้มข้น 5000 ppm ประกอบด้วย

ฟอร์บอลเอสเทอร์ ชนิด TPA 1 มิลลิกรัม

Methanol (HPLC grade) 200 ไมโครลิตร

3. การสร้างกราฟมาตรฐานลอการิทึมของยีน UBQ (internal control) สำหรับนำมาใช้ในการคำนวณการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Real-time PCR

3.1 ดีเอ็นเอของชิ้นส่วนยีน UBQ ที่สกัดแยกออกจากพลาสมิด นำมาวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ ด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรมที่ OD260/280 นาโนเมตร

3.2 ค่าที่ได้จากการวัด จากข้อ 3.1 นำมาคำนวณหาจำนวน DNA copy number เพื่อนำมาใช้ในการเตรียมดีเอ็นเอสำหรับวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Real-time PCR แสดงดังตารางที่ ก-3

ตารางที่ ก-3 การเตรียมดีเอ็นเอของชิ้นส่วนยีน *UBQ* สำหรับวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Real-time PCR

จำนวน DNA copy number	ปริมาตรดีเอ็นเอ (μl)	น้ำสำหรับงานพีซีอาร์ (μl)
1.12×10^{10}	1 μl จาก 1.12×10^{11}	9
1.12×10^9	1 μl จาก 1.12×10^{10}	9
1.12×10^8	1 μl จาก 1.12×10^9	9
1.12×10^7	1 μl จาก 1.12×10^8	9
1.12×10^6	1 μl จาก 1.12×10^7	9
1.12×10^5	1 μl จาก 1.12×10^6	9
1.12×10^4	1 μl จาก 1.12×10^5	9
1.12×10^3	1 μl จาก 1.12×10^4	9
1.12×10^2	1 μl จาก 1.12×10^3	9
1.12×10^1	1 μl จาก 1.12×10^2	9

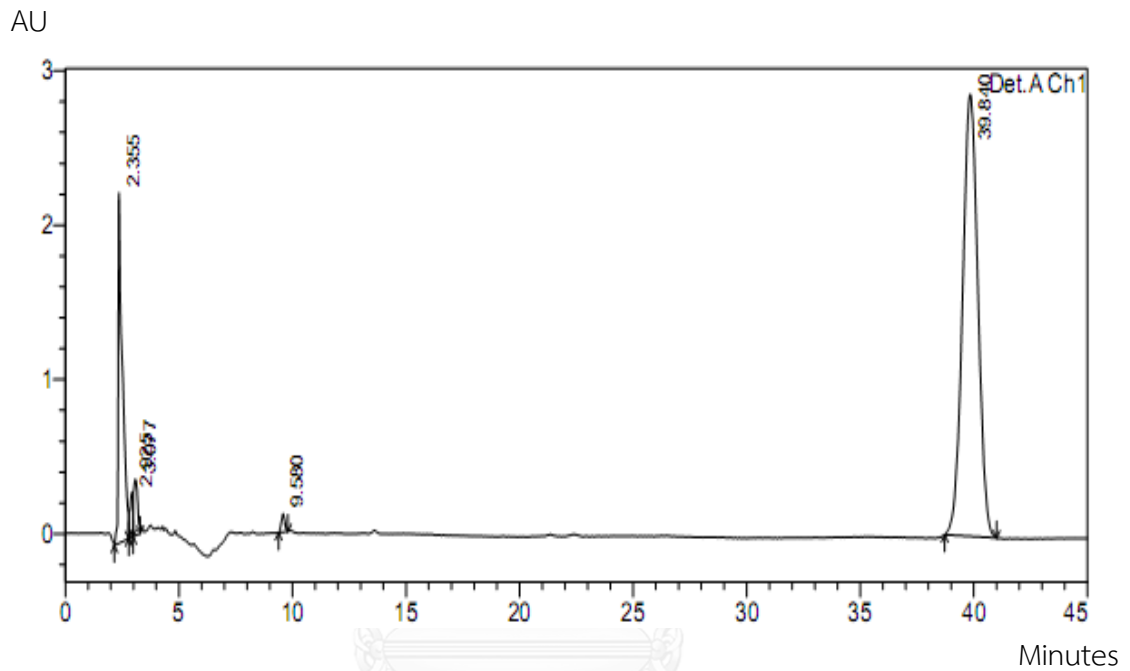
3.3 ดีเอ็นเอของชิ้นส่วนยีน *UBQ* ที่เตรียมไว้ตามตารางที่ ก-3 นำมาวิเคราะห์การแสดงผลออกด้วยเครื่อง Real-time PCR

3.4 ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวิเคราะห์การแสดงผลออกของยีน 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง จากข้อ 3.3 นำมาสร้างสมการกราฟมาตรฐานลอการิทึม ระหว่างค่า cycle threshold (Ct) และจำนวน DNA copy number ของชิ้นส่วนยีน *UBQ*

ภาคผนวก ข

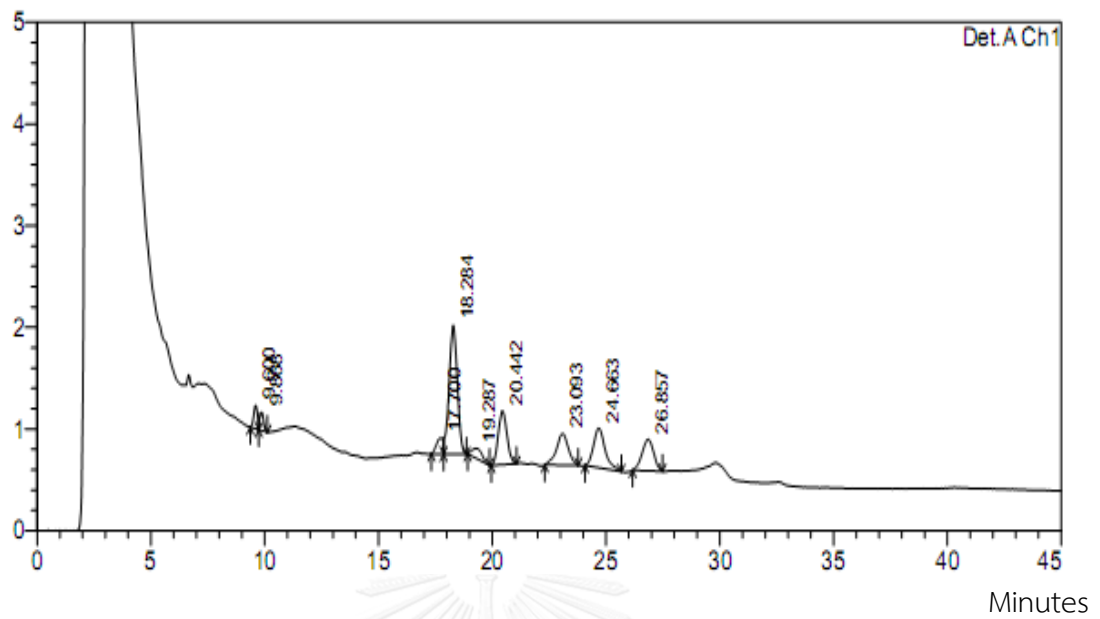
ข้อมูล

1. โครมาโทแกรมของสารพอร์บอลเอสเทอร์ (PEs)



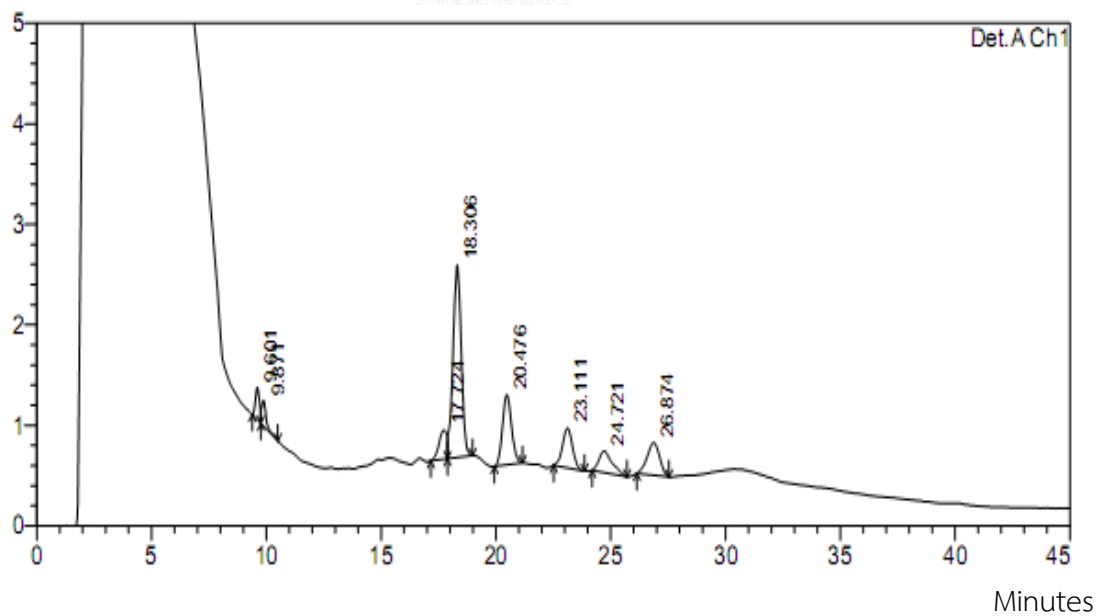
ภาพที่ ข-1 โครมาโทแกรมของสาร PEs ชนิด TPA ความเข้มข้น 100 ppm

AU



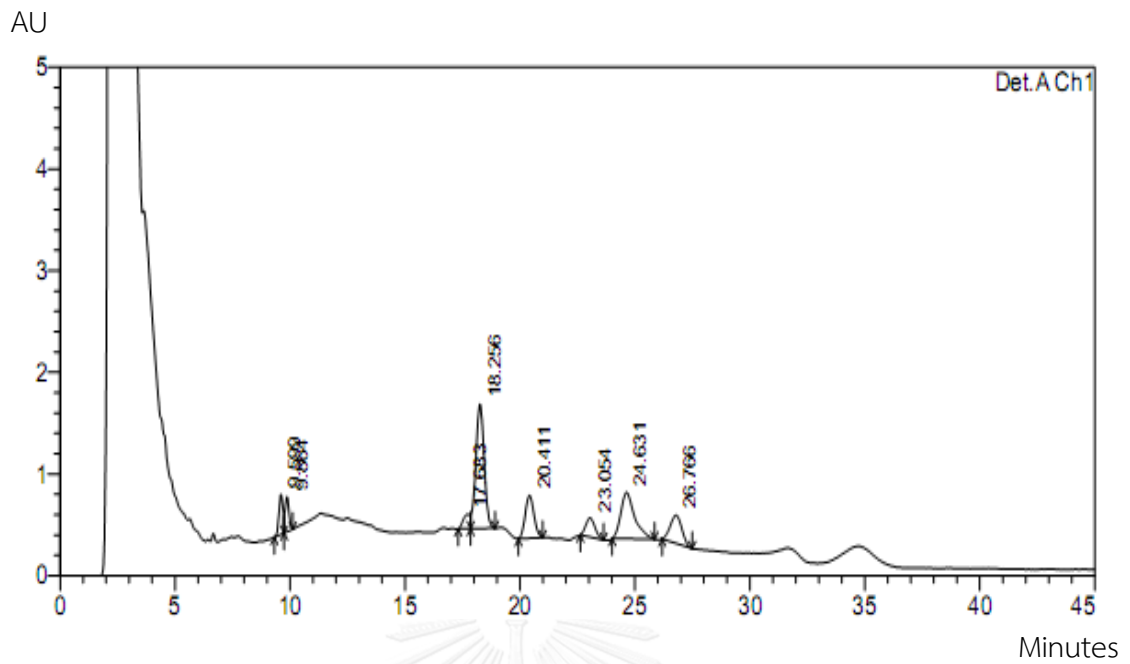
(ก) เนื้อผล

AU

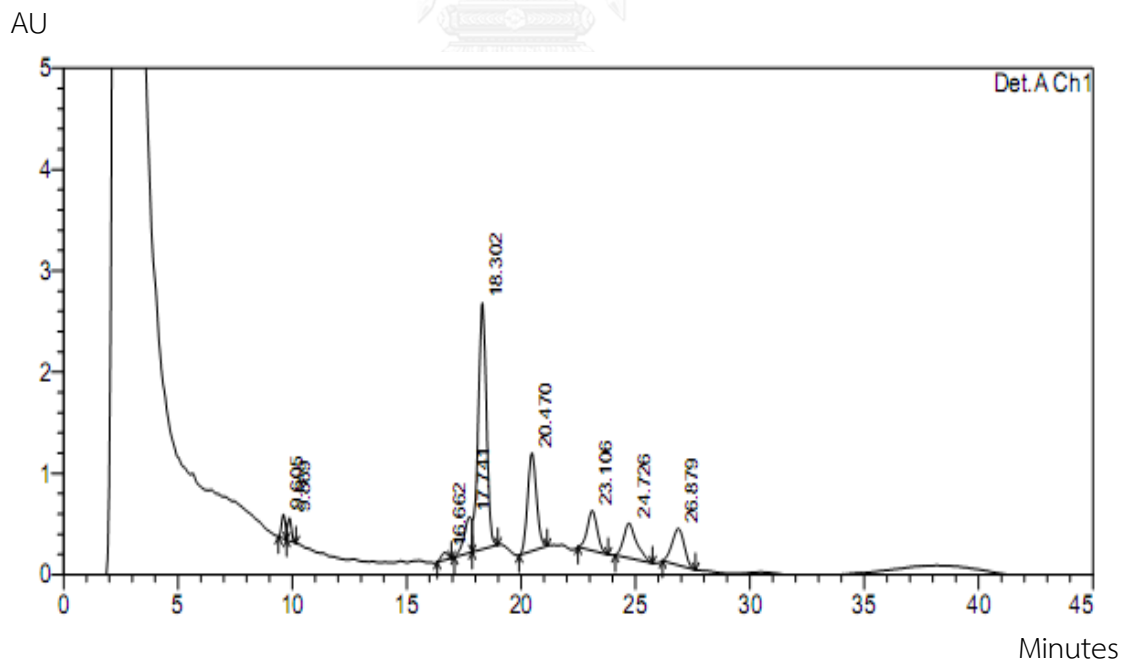


(ข) เนื้อในเมล็ด

ภาพที่ ข-2 โครมาโทแกรมของสาร PEs ชนิด DHPB ระยะ premature fruits

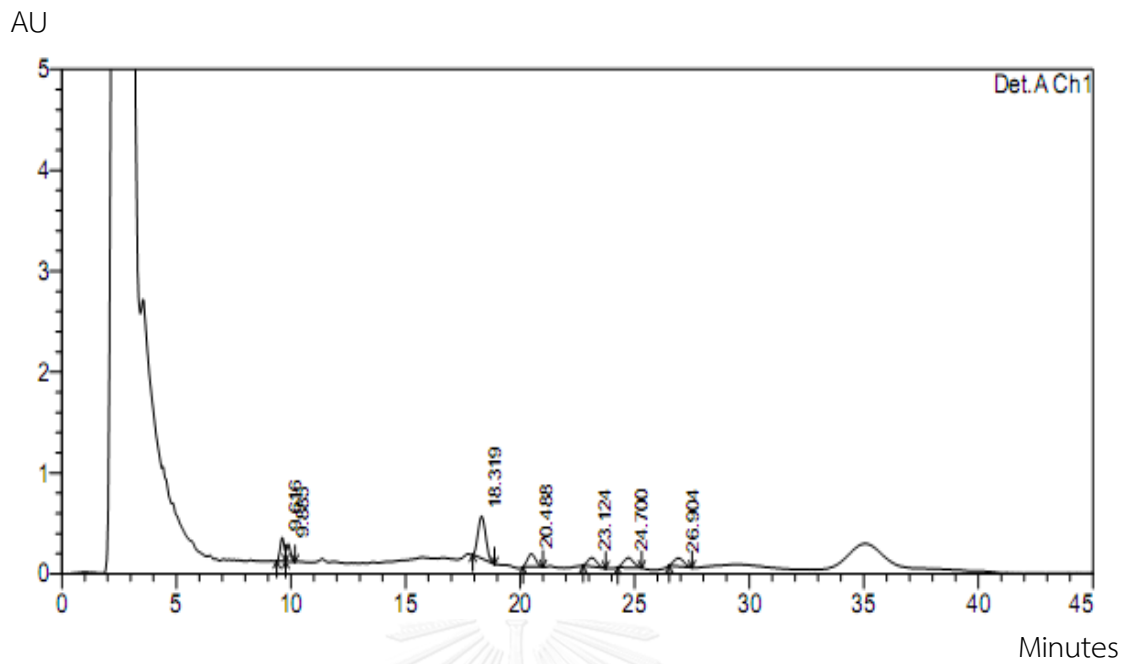


(ก) เนื้อผล

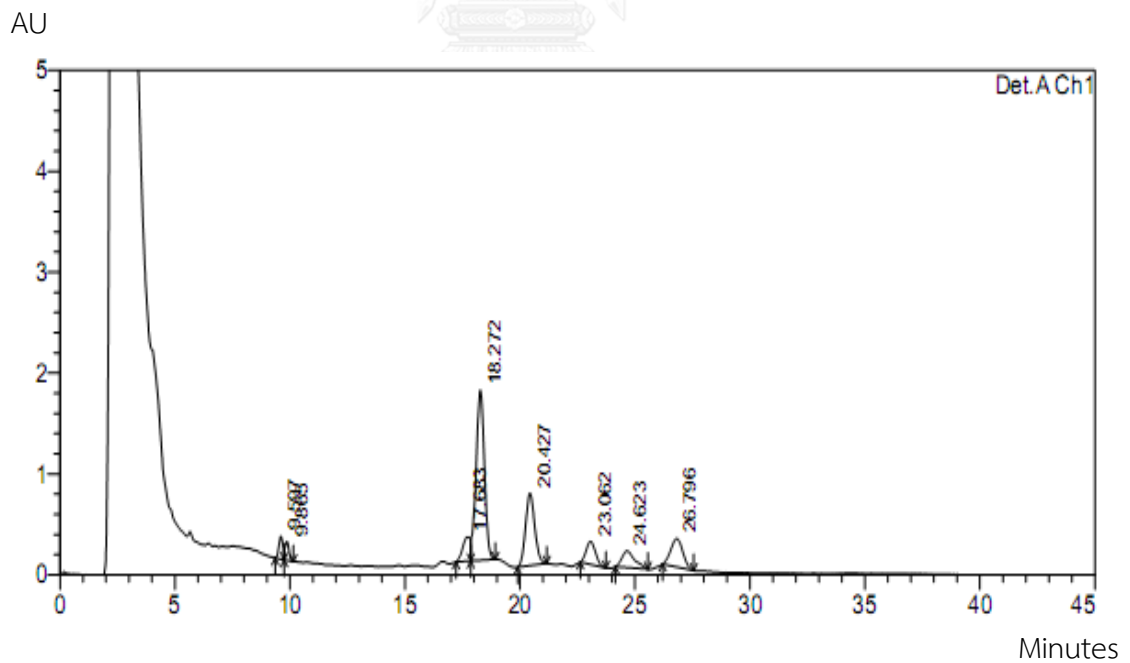


(ข) เนื้อในเมล็ด

ภาพที่ ข-3 โครมาโทแกรมของสาร PEs ชนิด DHPB ระยะ mature green fruits



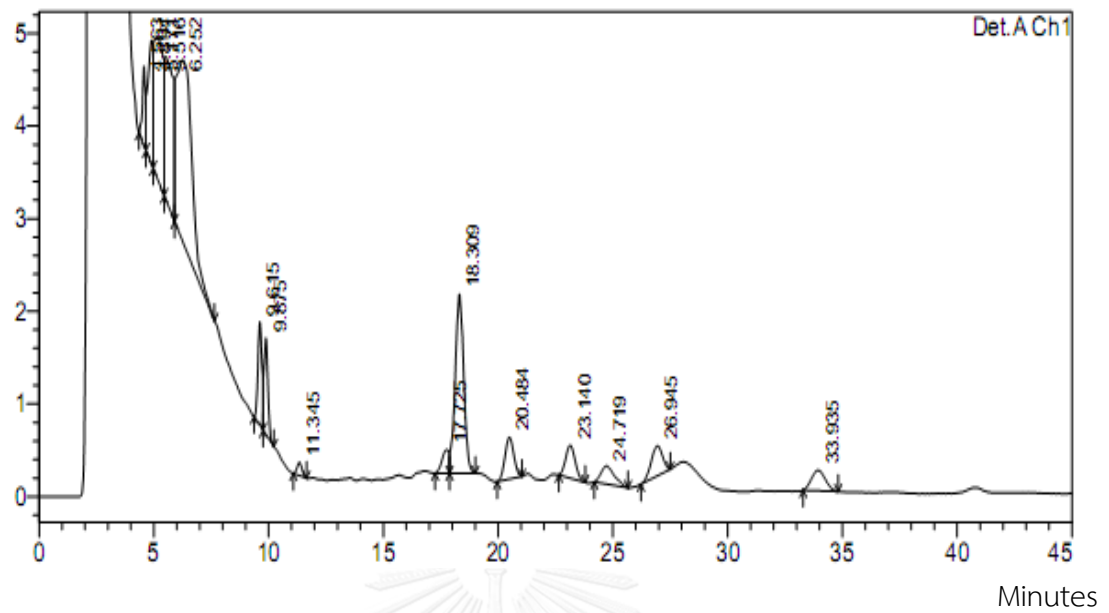
(ก) เนื้อผล



(ข) เนื้อในเมล็ด

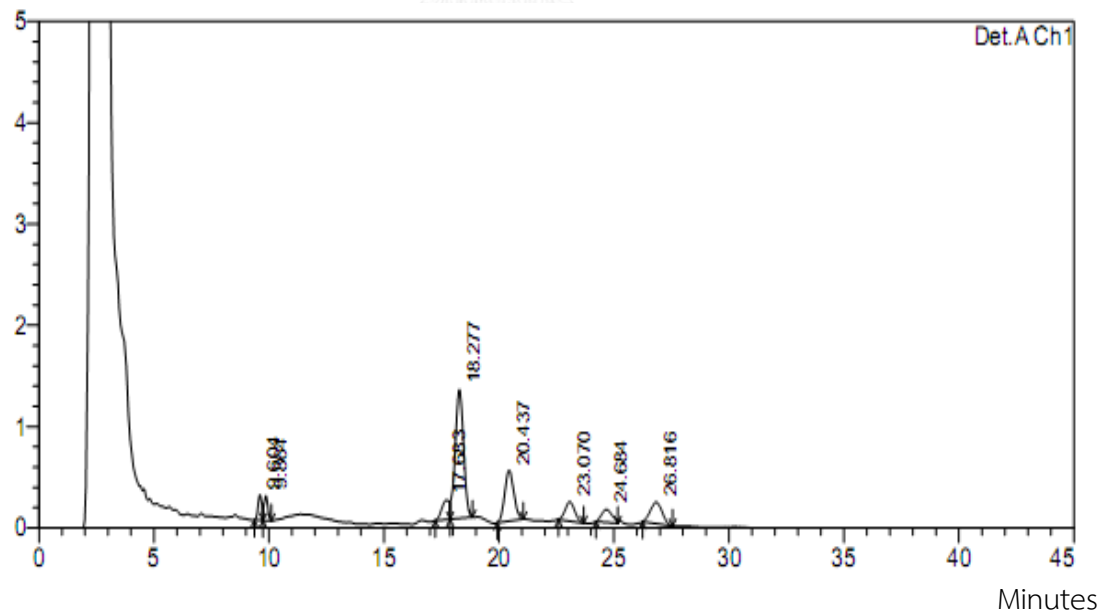
ภาพที่ ข-4 โครมาโทแกรมของสาร PEs ชนิด DHPB ระยะ mature ripe fruits (yellow)

AU



(ก) เนื้อผล

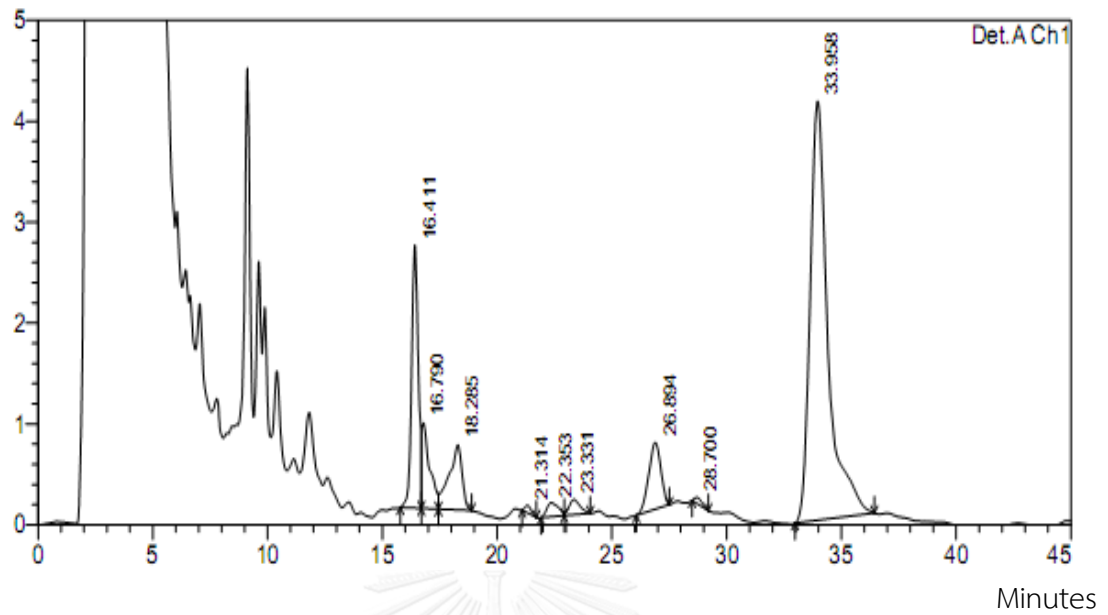
AU



(ข) เนื้อในเมล็ด

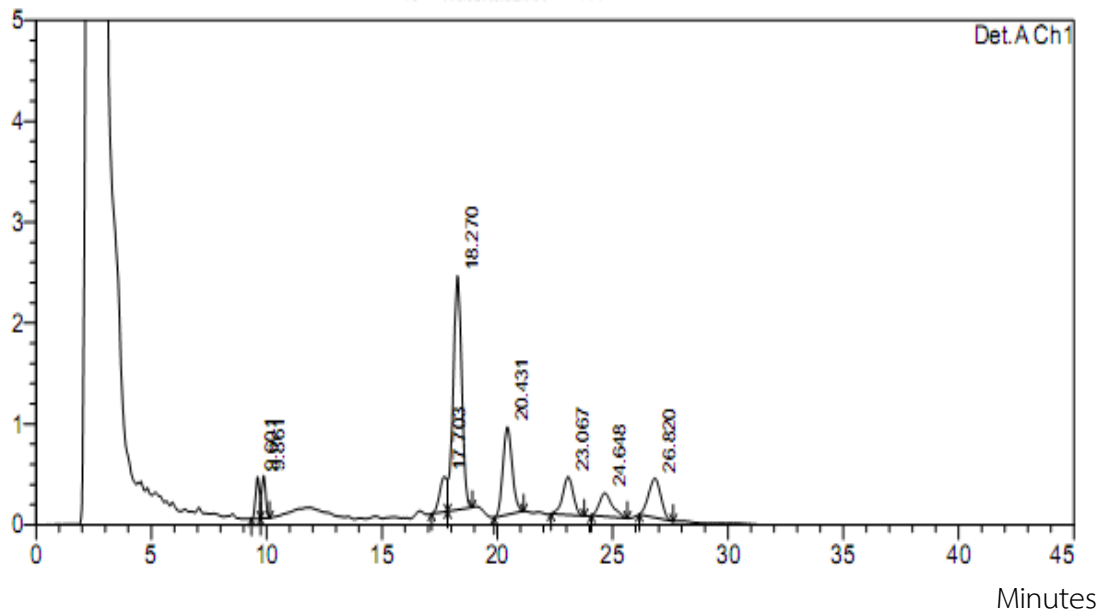
ภาพที่ ข-5 โครมาโทแกรมของสาร PEs ชนิด DHPB ระยะ senescent fruits (black)

AU



(ก) เนื้อผล

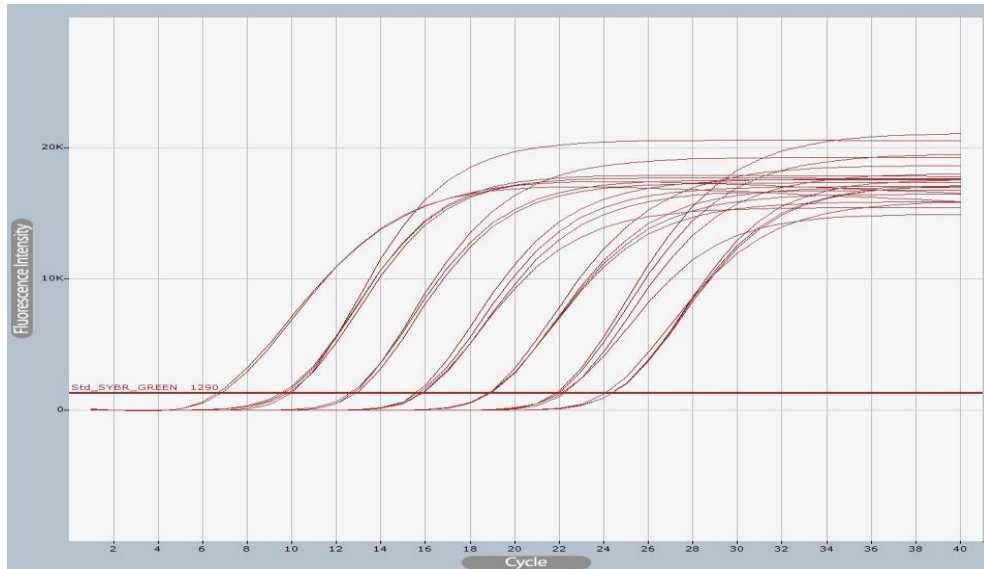
AU



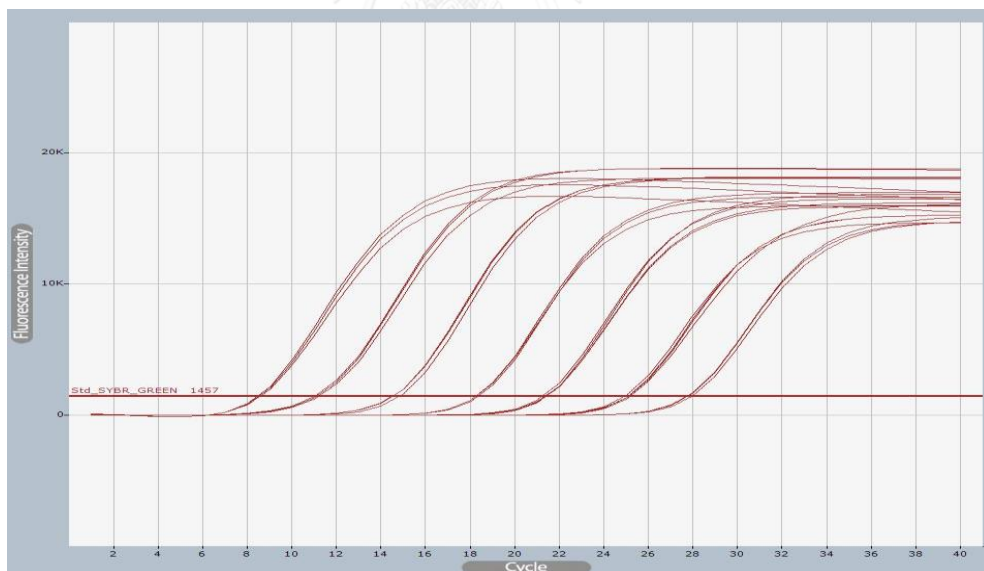
(ข) เนื้อในเมล็ด

ภาพที่ ข-6 โครมาโทแกรมของสาร PEs ชนิด DHPB ระยะเวลา dried fruits (black)

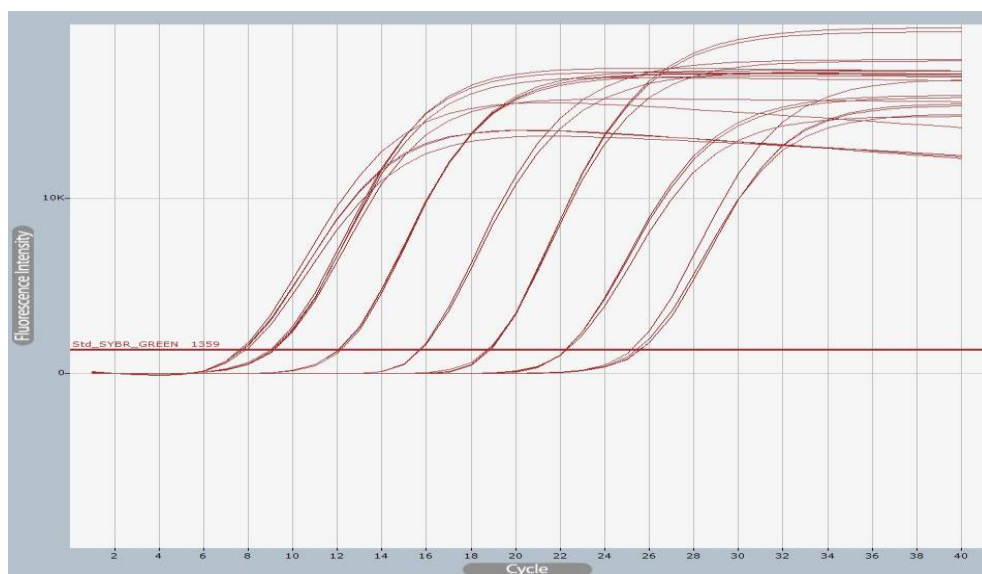
2. การวัดสัญญาณ fluorescence จาก standard ของยีนมาตรฐาน ด้วย real-time PCR



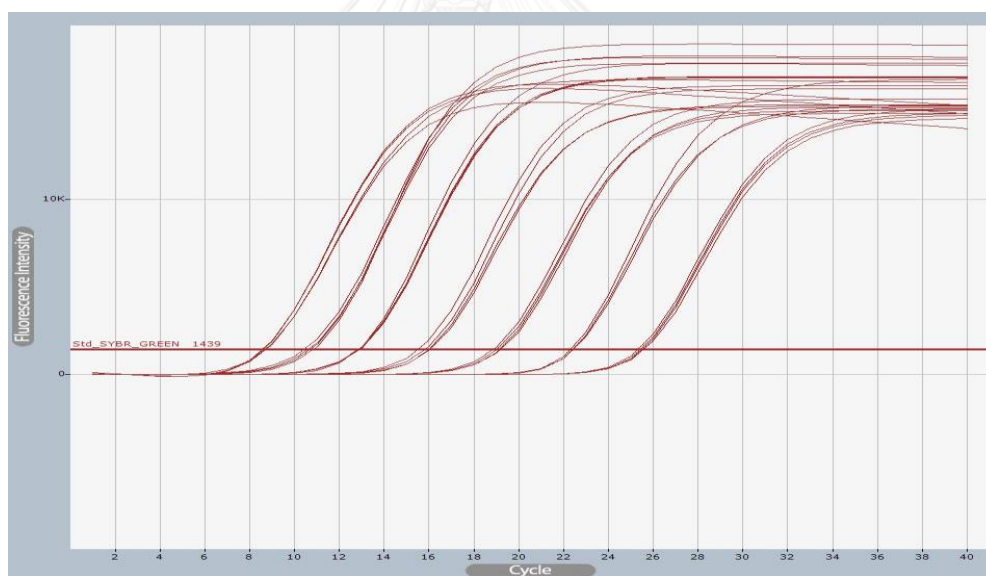
ภาพที่ ข-7 ยีน UBQ



ภาพที่ ข-8 ยีน CS

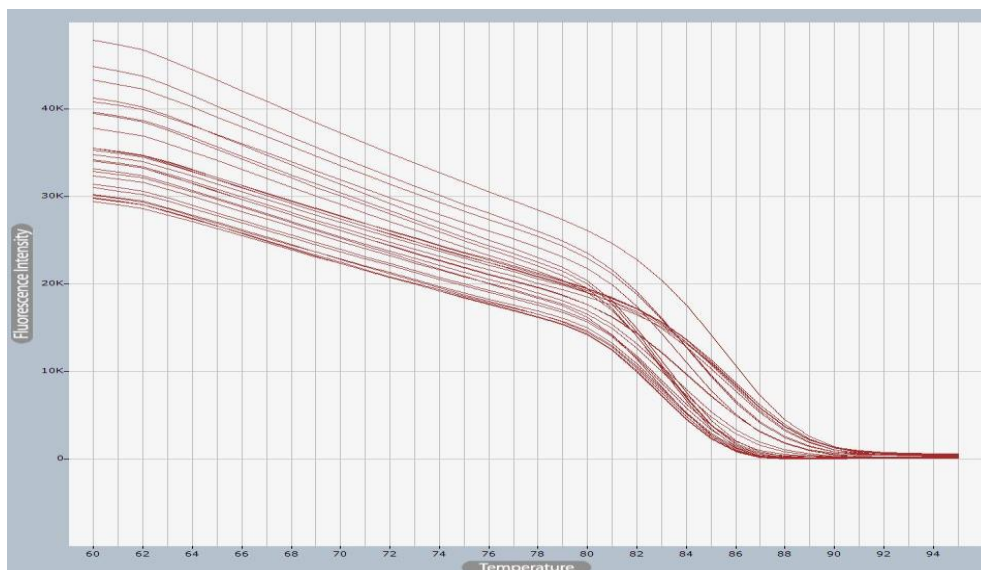


ภาพที่ ข-9 ยีน GGPPS

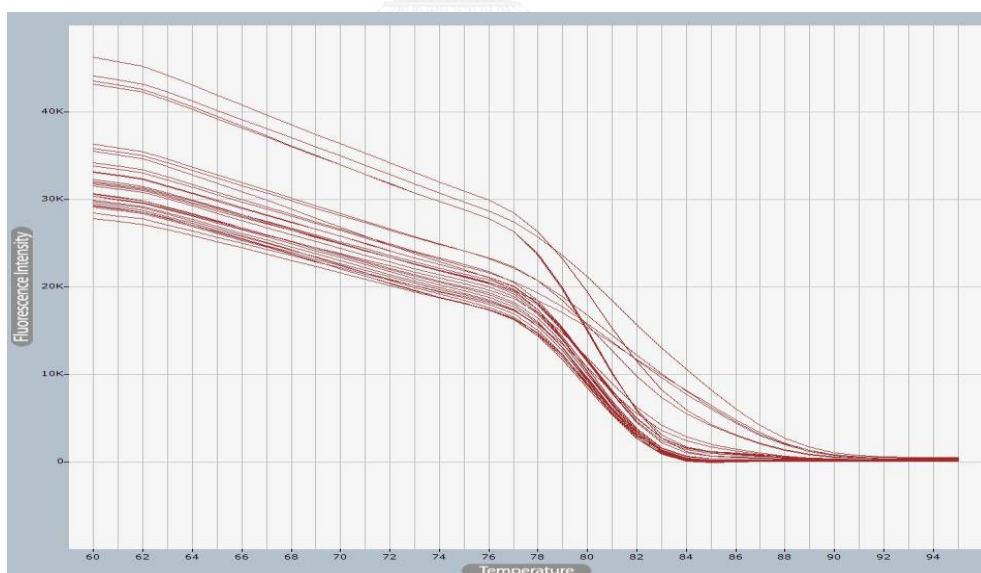


ภาพที่ ข-10 ยีน GPPS

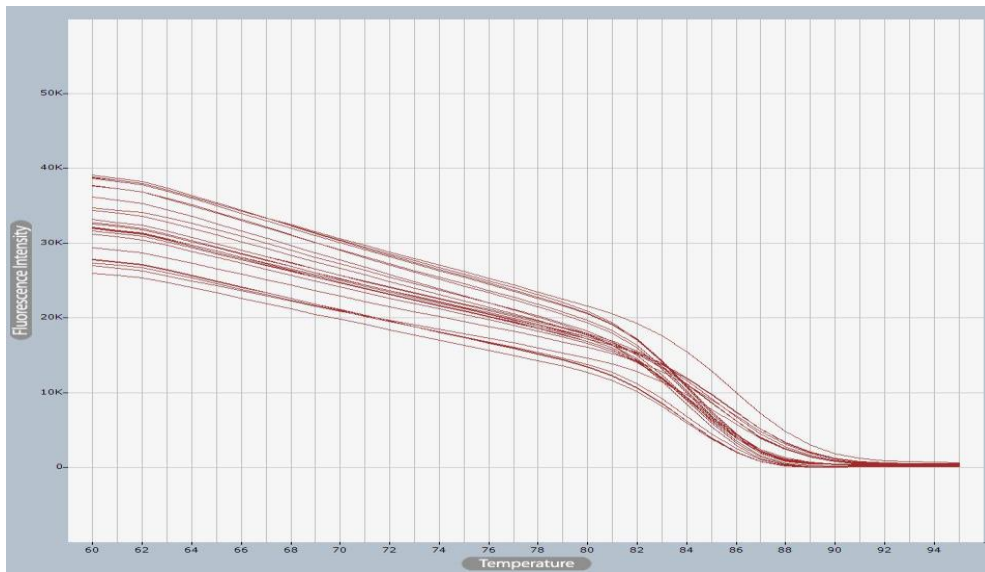
3. การวัดสัญญาณ fluorescence melting curve ของ PCR product ของยีนมาตรฐาน ด้วย real-time PCR



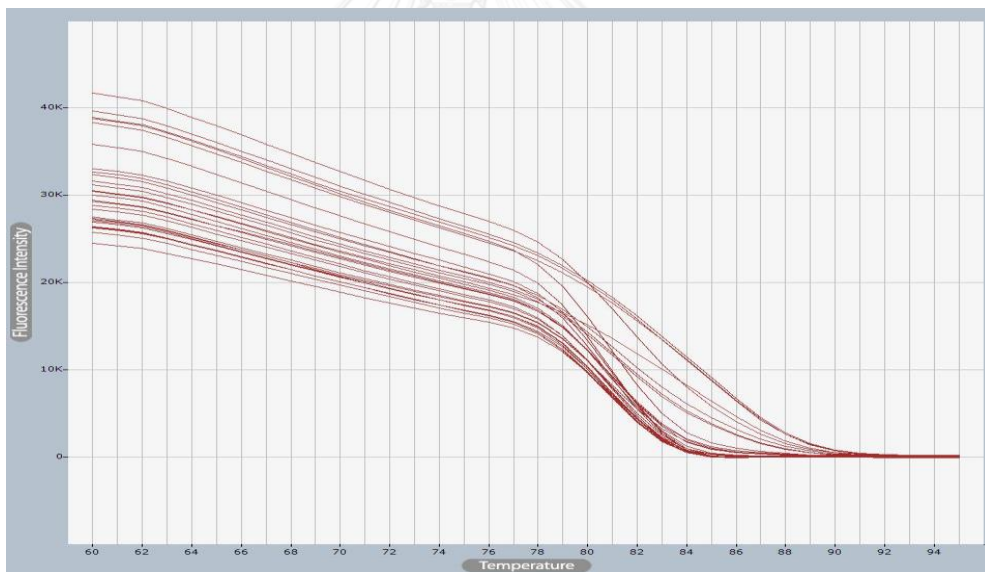
ภาพที่ ข-11 ยีน UBO



ภาพที่ ข-12 ยีน CS



ภาพที่ ข-13 ยีน GGPPS



ภาพที่ ข-14 ยีน GPPS

ภาคผนวก ค

วิธีการเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารสำหรับขั้นตอนการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนด้วยเทคนิคโพรตีโอมิกส์

1.1 การเตรียม 5X loading buffer ปริมาตร 25 ไมโครลิตร

Tris-HCl, pH 6.8 (3M)	3.25 กรัม
Dithiothreitol (DTT)	1.925 กรัม
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	2.50 กรัม
Glycerol	12.50 มิลลิลิตร
1% Bromophenol blue	500 ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	8.75 มิลลิลิตร

1.2 การเตรียมสีย้อม Coomassie Brilliant Blue G-250 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

Ammonium sulfate	50 กรัม
85% Orthophosphoric acid	6 มิลลิลิตร
Brilliant Blue G-250/CI 42655	0.5 กรัม
Methanol สำหรับละลายและปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร	

หมายเหตุ การใช้สี Coomassie Brilliant Blue G-250 จะต้องนำสีที่เตรียมไว้มาผสมกับ Methanol ในอัตราส่วน 4 ต่อ 1 ก่อนนำมาใช้

1.3 การเตรียม Stock 10X SDS-PAGE running buffer ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

Tris-HCl, pH 8.5	30.3 กรัม
Glycine	14.4 กรัม
SDS	10 กรัม
น้ำกลั่นสำหรับละลายและปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร	

1.4 การเตรียม 1X SDS-PAGE running buffer ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จาก Stock 10X SDS-PAGE running buffer

Stock 10X SDS-PAGE running buffer	100 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	900 มิลลิลิตร

1.5 การเตรียมเจล SDS-PAGE ขนาด 90x80x1 มิลลิเมตร ประกอบด้วยเจล

5% Stacking

40% Acrylamide	0.38 มิลลิลิตร
0.5M Tris-HCl, pH 6.8	0.742 มิลลิลิตร
10% SDS	30 ไมโครลิตร
10% Ammonium persulfate	23 ไมโครลิตร
TEMED	1.7 ไมโครลิตร
DI water	1.823 มิลลิลิตร

เจล 12.5% Stacking

40% Acrylamide	3.125 มิลลิลิตร
1.5M Tris-HCl, pH 8.8	2.5 มิลลิลิตร
10% SDS	125 ไมโครลิตร
10% Ammonium persulfate	50 ไมโครลิตร
TEMED	3.3 ไมโครลิตร
DI water	4.197 มิลลิลิตร

1.6 การเตรียมสารเคมีสำหรับขั้นตอนการย่อยเจล SDS-PAGE

1.6.1 20 mM Ammonium bicarbonate (MW 79.06) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

Ammonium bicarbonate 79.06 มิลลิกรัม

น้ำกลั่นสำหรับละลายและปรับปริมาตรให้ครบ 50 มิลลิลิตร

1.6.2 10 mM Ammonium bicarbonate ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

20 mM Ammonium bicarbonate 25 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร

1.6.3 10 mM Dithiothreitol ใน 10mM Ammonium bicarbonate ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

Dithiothreitol (MW 154.25) 7.7125 มิลลิกรัม

10 mM Ammonium bicarbonate สำหรับละลายและปรับปริมาตรให้ครบ 5 มิลลิลิตร

1.6.4 100 mM Iodoacetamide ใน 10m Ammonium bicarbonate ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

Iodoacetamide (MW 184)	92 มิลลิกรัม
10 mM Ammonium bicarbonate สำหรับละลายและปรับปริมาตรให้ครบ 5 มิลลิลิตร	

1.6.5 50% Acetonitrile ใน 10m Ammonium bicarbonate

100% Acetonitrile	1 ส่วน
20 mM Ammonium bicarbonate	1 ส่วน

1.6.6 10ng Trypsin ใน 50% Acetonitrile ใน 10 mM Ammonium bicarbonate

50% Acetonitrile ใน 10m Ammonium bicarbonate	2 มิลลิลิตร
Trypsin	20 ไมโครกรัม

1.6.7 30% Acetonitrile ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

100% Acetonitrile	1.5 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	3.5 มิลลิลิตร

1.6.8 0.1% Trifluoroacetic acid ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

FA conc. (Trifluoroacetic acid)	50 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	49.95 มิลลิลิตร

1.6.9 50% Acetonitrile ใน 0.1% Trifluoroacetic acid ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

100% Acetonitrile	5 มิลลิลิตร
0.1% Trifluoroacetic acid	5 มิลลิลิตร

2. การเตรียมสารสำหรับขั้นตอนการศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค Real-time PCR

2.1 การเตรียม 2% agarose ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Agarose	2 กรัม
0.5X TBE buffer สำหรับละลายและปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร	

2.2 การเตรียม stock 10X TBE buffer ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

Tris base	108 กรัม
Boric acid	55 กรัม
EDTA	7.5 กรัม

น้ำกลั่นสำหรับละลายและปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร

2.3 การเตรียม 5X TBE buffer ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จาก stock 10X TBE buffer ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

10X TBE buffer	50 มิลลิลิตร
น้ำกลั่นสำหรับละลายและปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร	

2.4 การเตรียม P-buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

Sodium citrate (0.8M)	23.52 กรัม
DEPC-treat water สำหรับละลายและปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร	

2.5 การเตรียม Extraction buffer ปริมาตร 300 มิลลิลิตร

NaCl (0.25M)	4.4 กรัม
Tris-HCl, pH 8.0 (0.05M)	2.4 กรัม
EDTA (20 mM)	1.8 กรัม
SDS (1% w/v)	3 กรัม
PVP (4% w/v)	12 กรัม
DEPC-treat water สำหรับละลายและปรับปริมาตรให้ครบ 300 มิลลิลิตร	

2.6 การเตรียม P: C: I ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

Phenol	25 มิลลิลิตร
Chloroform	24 มิลลิลิตร
Isoamyl alcohol	1 มิลลิลิตร

2.7 การเตรียม TE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

10 mM Tris-HCl, pH 7.5	20 มิลลิลิตร
1 mM EDTA, pH 8.0	4 มิลลิลิตร
น้ำกลั่นสำหรับปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร	

2.8 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB)

2.8.1 Luria-Bertani ชนิดเหลว ปริมาตร 1 ลิตร

Tryptone	10 กรัม
NaCl	5 กรัม
Yeast extracts	5 กรัม
น้ำกลั่นสำหรับปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร	

2.8.2 Luria-Bertani ชนิดแข็ง ปริมาตร 1 ลิตร

Tryptone	10 กรัม
NaCl	5 กรัม
Yeast extracts	5 กรัม
Agar	15 กรัม
น้ำกลั่นสำหรับปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร	

หมายเหตุ นิ่งฆ่าเชื้อก่อนนำมาใช้งาน และกรณีต้องเติม Ampicillin ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะใช้อัตราส่วน Ampicillin 100 ไมโครกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร

2.9 การเตรียมสารสำหรับการเตรียม E. coli DH5 α competent cell

2.9.1 0.1M Calcium chloride ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

Calcium chloride (CaCl ₂ ·2H ₂ O) (MW 147.02)	2.94 กรัม
น้ำกลั่นสำหรับปรับปริมาตรให้ครบ 200 มิลลิลิตร	

2.9.2 14% Glycerol ใน 0.1M Calcium chloride ปริมาตร 120 มิลลิลิตร

85% Glycerol	19.79 มิลลิลิตร
0.1M Calcium chloride สำหรับปรับปริมาตรให้ครบ 120 มิลลิลิตร	

2.10 การเตรียม E. coli DH5 α competent cell

- หนึ่งโคโลนีของ E. coli DH5 α ที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ชนิดแข็ง นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ที่มีปริมาตรอยู่ 3 มิลลิลิตร นำบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 4-6 ชั่วโมง

- นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD₆₀₀) ทั้งนี้จะเลี้ยงเซลล์จนได้ค่า OD₆₀₀ อยู่ระหว่าง 0.4-0.6

- เก็บเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที

- ละลายเซลล์ด้วย 0.1M Calcium chloride เย็น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำบ่มในน้ำแข็งนาน 5-10 นาที
- เก็บเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที
- ละลายเซลล์ 14% Glycerol ใน 0.1M Calcium chloride เย็น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร
- แบ่งเซลล์ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวก์แต่ละหลอด แล้วนำเก็บทันทีที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้งาน



ภาคผนวก ง

การคำนวณ

1. การคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของโปรตีน

ค่าจากการวัด OD690 นาโนเมตร ของตัวอย่างแต่ละชนิด จำนวน 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง นำมาหาค่าเฉลี่ยและนำมาใช้ในการคำนวณปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนรวม โดยการแทนค่าในสมการกราฟมาตรฐานของสารละลายโบไวน์ซีรัมอัลบูมิน

$$Y=0.0178X+0.095$$

เมื่อ Y = ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการวัด OD690 นาโนเมตร ของตัวอย่างแต่ละชนิด
 X = ค่าที่ต้องการทราบ (ความเข้มข้นของโปรตีนรวมจากแต่ละตัวอย่าง)

ทั้งนี้ปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนจากแต่ละตัวอย่าง จะคำนวณออกมาให้อยู่ในหน่วยมิลลิกรัมต่อไมโครลิตร

2. การคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของสารฟอรับอลเอสเทอร์ (PEs)

ค่าผลรวมพื้นที่ใต้โครมาโทแกรมของสาร PEs แต่ละโครงสร้าง ที่ได้จากการวิเคราะห์จากตัวอย่างแต่ละชนิด จำนวน 3 ซ้ำ นำมาหาค่าเฉลี่ยและนำมาใช้ในการคำนวณปริมาณความเข้มข้นของสาร PEs โดยการแทนค่าในสมการกราฟมาตรฐานของสารละลายสาร PEs ชนิด TPA

$$Y=1328.3X+476.16$$

เมื่อ Y = ค่าเฉลี่ยที่ผลรวมพื้นที่ใต้โครมาโทแกรมของสาร PEs แต่ละโครงสร้าง
 X = ค่าที่ต้องการทราบ (ปริมาณความเข้มข้นของสาร PEs จากตัวอย่างแต่ละชนิด)

ทั้งนี้ปริมาณความเข้มข้นของสาร PEs ชนิด DHPB (ทุกโครงสร้าง) จากตัวอย่างแต่ละชนิด จะคำนวณออกมาให้อยู่ในหน่วยมิลลิกรัมต่อปริมาณตัวอย่างก่อนการสกัดในหน่วยกรัม

ตัวอย่างการคำนวณหาปริมาณสาร PEs นิด DHPB ที่แยกได้จากตัวอย่างเนื้อผล ระยะเวลา Premature fruits

กำหนดให้: น้ำหนักตัวอย่างเนื้อผลก่อนการสกัด = 6.0589 กรัม (25 มิลลิลิตร)
 ค่าเฉลี่ยผลรวมพื้นที่ใต้โครมาโทแกรมของสาร PE = 577168.98 (25 มิลลิลิตร)

นำมาแทนค่าในสมการกราฟมาตรฐาน

$$Y=1328.3X+476.16$$

ดังนั้น: $X= 434.15$ มิลลิกรัมต่อส่วนในล้านส่วน

แสดงว่า: ใน 1000000 μl มีความเข้มข้นของสาร PEs (ค่า X) = 434.15 มิลลิกรัม
 ใน 6.0589 กรัม จะมีความเข้มข้นของสาร PEs = 10.85 มิลลิกรัม
 ดังนั้น: ใน 1 กรัม จะมีความเข้มข้นของสาร PEs = 1.79 มิลลิกรัม

3. การคำนวณหาจำนวน DNA copy number ของชิ้นยีนเป้าหมายที่สกัดแยกออกจากพลาสมิด
 สูตร

$$\text{DNA copy number} = \frac{6.02 \times 10^{23} (\text{copy/mol}) \times \text{ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (g/\mu l)}}{(\text{ขนาดเวกเตอร์} + \text{ขนาดชิ้นยีน}) (\text{bp}) \times 660 (\text{g/mol/bp})}$$

เมื่อ ขนาดเวกเตอร์ = เวกเตอร์ pTZ57R/T มีขนาด 2886 คู่เบส
 ขนาดชิ้นยีน = ชิ้นส่วนของยีนที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์

ตัวอย่างการคำนวณหาจำนวน DNA copy number ของชิ้นส่วนยีน UBO

กำหนดให้: ค่าความเข้มข้นดีเอ็นเอของชิ้นส่วนยีน UBO = 372.28 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร
 หรือ 372.28×10^{-9} กรัมต่อไมโครลิตร
 ขนาดเวกเตอร์ = 2886 คู่เบส
 ขนาดของชิ้นยีน UBO ที่แทรกอยู่ในเวกเตอร์ = 148 คู่เบส

ดังนั้น

$$\begin{aligned}\text{DNA copy number} &= \frac{6.02 \times 10^{23} (\text{copy/mol.}) \times 372.28 \times 10^{-9} (\text{g}/\mu\text{l})}{3034 (\text{bp}) \times 660 (\text{g/mol/bp})} \\ &= 2241.12 \times 10^{14} \\ &\quad 2.0 \times 10^6 \\ &= 1.12 \times 10^{11}\end{aligned}$$



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสุภา แก้วสุรวงษ์ เกิดวันที่ 16 พฤษภาคม พ.ศ. 2524 ที่จังหวัดชัยภูมิ สำเร็จ การศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ชีววิทยา จากคณะ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ในปีการศึกษา 2546 เข้าศึกษาระดับปริญญาโท วิทยา ศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์ ที่คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสำเร็จ การศึกษาในปีการศึกษา 2557 และได้เผยแพร่ผลงานวิจัยบางส่วนในการประชุมวิชาการในงาน การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 15 ณ วิทยาลัยการปกครองท้องถิ่น มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น วันที่ 28 มีนาคม พ.ศ. 2556 ในหัวข้อเรื่อง Proteome Analysis of Fruits Development in Physic nut (*Jatropha curcas* L.)

