ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณคาเทชินในยอดชากับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้อง

Relationship between Catechins Content in Young Tea Leaves and Expression of Genes Involved

ศิริพัชร์ กังแฮ

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง
2548

©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณคาเทชินในยอดชากับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้อง

Relationship between Catechins Content in Young Tea Leaves and Expression of Genes Involved

ศิริพัชร์ กังแฮ

วิทยานิพนธ์เสนอต่อมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวงเพื่อเป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

2548

©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณคาเทชินในยอดชากับ
การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้อง

ศิริพัชร์ กังแฮ

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
2548

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....ประธานกรรมการ
(ดร.ประภัสสร ดำรงกุล)

....กรรมการ
(ดร.ฐิตินันท์ สำราญวานิช)

....กรรมการ
(ดร.พนม วิญญายอง)

....กรรมการ
(ดร.พรรณรวี สร้อยสุวรรณ)

©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ ดร.ประภัสสร ดำรงกุล ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อาจารย์สยาม ภพลือชัย และ ดร.พนม วิญญายอง ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา แนะนำแนวทางที่เป็นประโยชน์ทุก ๆด้าน ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่งตลอดมา อีกทั้งยังตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆจนวิทยานิพนธ์สำเร็จสมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบพระคุณอาจารย์ ดร.ฐิตินันท์ สำราญวานิช จากมหาวิทยาลัยมหิดล และอาจารย์ ดร.พรรณรวี สร้อยสุวรรณ ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ และให้คำแนะนำตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณสถาบันชา ที่อนุเคราะห์สารเคมี และ บริษัทห้องปฏิบัติการกลางตรวจสอบผลิตภัณฑ์เกษตรและอาหารจำกัด ที่ให้ไปฝึกวิธีการวิเคราะห์ชาโดยเทคนิค HPLC โดย ดร.ธีรพงศ์ เทพกรณ์ ซึ่งเป็นคำแนะนำที่มีค่าอย่างยิ่งตลอดมา

ขอขอบพระคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการชีววิทยา เจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเคมีทุกคน ที่อำนวยความสะดวกด้านการใช้เครื่องมือและคำแนะนำที่เป็นมีค่ายิ่งและเป็นประโยชน์ในครั้งนี้

ท้ายที่สุดนี้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงคุณพ่อ คุณแม่ พี่ น้อง และบุคคลอันเป็นที่รักทุกท่านที่ให้โอกาสทางการศึกษาและคอยช่วยเหลือในทุก ๆด้านด้วยดีตลอดมา จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสิ้นสมบูรณ์

ศิริพัชร์ กังแฮ

ชื่อเรื่อง ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณคาเทชินในยอดชากับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้อง

ผู้เขียน นางสาวศิริพัชร์ กังแฮ

หลักสูตร วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ)

คณะกรรมการที่ปรึกษา

อาจารย์ ดร.ประภัสสร ดำรงกุล	ประธานกรรมการ
อาจารย์ ดร.พนม วิญญายอง	กรรมการ
อาจารย์สยาม ภพลือชัย	กรรมการ

บทคัดย่อ

Catechins เป็นสารกลุ่มโพลีฟีนอลที่พบมากในใบชา (*Camellia sinensis*) ซึ่งเป็นสารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยเฉพาะสาร Epigalocatechin gallate (EGCG), Epicatechin (EC), และ Gallocatechin (GC) จากการวิเคราะห์ปริมาณสารในกลุ่ม catechins ในยอดและใบที่ 4 ของชาอูหลง เบอร์ 17 ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบว่าปริมาณการสะสมของสารในกลุ่ม catechins จะสูงในยอดเมื่อเปรียบเทียบกับใบที่ 4 จากการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ catechins ด้วยเทคนิค Revese Transcriptase - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) พบว่าการแสดงออกของยีน phenylalanine ammonia-lyase1 (PAL1) และ dihydroflavonol reductase (F3H) ในยอดมากกว่าในใบที่ 4

คำสำคัญ : *Camellia sinensis*/ ชา/ การแสดงออกของยีน/ Catechins Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)/ High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Title Relationship between Catechins Content in Young Tea Leaves and Expression of Genes Involved

Author Miss Siripach Kanghae

Degree Master of Science (Biotechnology)

Supervisory Committee

Lecturer Dr. Prapassorn Damrongkool	Chairperson
Lecturer Dr. Panom Winyayong	Member
Lecturer Siam Popluechai	Member

ABSTRACT

Catechins are a group of polyphenols found in tea (*Camellia sinensis*) at high levels. They are benefitial compounds for health, especially, Epigalocatechin gallate (EGCG), Epicatechin (EC), and Gallocatechin (GC). From the study on the amounts of catechins in shoots and fourth leaves of Oolong No. 17 using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) it was found that catechins contents in shoots were higher than fourth leaves. From gene expression study using Revese Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) showed that genes involved in catechins synthesis were gene expressed of phenylalanine ammonia-lyase1 (PAL1) and dihydroflavonol reductase (F3H) in shoots were higher than in the fourth leaves.

Keyword : *Camellia sinensis*/ Tea/ Gene Expression/ Catechins/ Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)/ High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

สารบาญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญภาพ	ฌ
บทที่	
1 บทนำ	
1.1 หลักการและเหตุผล	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 อนุกรมวิธานของชา	4
2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของชา	4
2.3 การจำแนกพันธุ์ชา	7
2.4 ชนิดของชาแบ่งตามกระบวนการผลิต	9
2.5 องค์ประกอบทางเคมีของใบชา	9
2.6 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน	18
2.7 หลักการของเทคนิค RT-PCR	19
2.8 การเลือกชนิดและการออกแบบ primers	21
2.9 รูปแบบการทำ RT-PCR	22
3 วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี	
3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี สำหรับ HPLC	29
3.2 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี สำหรับการสกัด RNA	30

สารบาญ (ต่อ)

หน้า

3.3 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี สำหรับ RT-PCR 31
3.4 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี สำหรับ agarose gel electrophoresis 32
3.5 วิธีการศึกษา 33

4 ผลและอภิปรายผลการวิจัย
4.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่ม catechins ด้วยเทคนิค HPLC 38
4.2 ผลการวิเคราะห์ของการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR 40

5 สรุปและข้อเสนอแนะ
4.1 สรุป 44
4.2 ข้อเสนอแนะ 45

บรรณานุกรม 46

ภาคผนวก
ภาคผนวก ก ข้อมูล RT-PCR 48
ภาคผนวก ข ข้อมูล HPLC 50
ภาคผนวก ค ข้อมูล การเตรียมสารละลาย 83

ประวัติผู้วิจัย 86

สารบาญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของใบชาสด	10
2.2 ปริมาณสาร catechins ในส่วนต่าง ๆของชาอัสสัม	17
2.3 ความแตกต่างของปริมาณสารเคมีที่สำคัญในใบชาสดที่ต่างสายพันธุ์	17
2.4 ปัจจัยต่าง ๆที่ควรพิจารณาในการทำ RT-PCR	23
2.5 การเปรียบเทียบข้อได้เปรียบของ RT-PCR แบบตอนเดียวและสองขั้นตอน	24
3.1 การเจือจางสารละลาย stock solution ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	34
4.1 ผลคำนวณปริมาณสารในกลุ่ม catechins และ caffeine ในยอดและใบที่ 4	39

สารบาญภาพ

รูป	หน้า
2.1 ลักษณะใบชาจีน	5
2.2 ลักษณะดอกชาจีน	5
2.3 ลักษณะผลชาจีน	6
2.4 ลักษณะเมล็ดชาจีน	6
2.5 ลักษณะของชาจีน	7
2.6 ลักษณะของชาอัสสัม	8
2.7 ลักษณะของชาเขมร	8
2.8 โครงสร้างทางเคมีของ EGC	12
2.9 โครงสร้างทางเคมีของ EC	12
2.10 โครงสร้างทางเคมีของ C	13
2.11 โครงสร้างทางเคมีของ GC	13
2.12 โครงสร้างทางเคมีของ EGCG	14
2.13 โครงสร้างทางเคมีของ ECG	14
2.14 โครงสร้างทางเคมีของ GCG	15
2.15 โครงสร้างทางเคมีของ CG	15
2.16 Central dogma of Molecular Biology	19
2.17 กระบวนการสังเคราะห์ catechins	26
2.18 ปริมาณการวิเคราะห์ RT-PCR ของการแสดงออกยีนที่สังเคราะห์ catechins	28
3.1 การเก็บยอดและใบที่ 4 ของตัวอย่าง	33
4.1 การเปรียบเทียบปริมาณสารในยอดและใบที่ 4 ของชา	39
4.2 ผลการแสดงออกของยีนต่าง ๆ จาก primers ออกแบบขึ้นมาใหม่	42
4.3 ผลการแสดงออกของยีนต่าง ๆ จาก primers ออกแบบโดย Park และคณะ	43

บทที่ 1

บทนำ

1.1 หลักการและเหตุผล

ชา (*Camellia sinensis*) เป็นเครื่องดื่มสมุนไพรชนิดหนึ่งที่รู้จักกันมานานแล้ว โดยมีหลักฐานพบว่าประเทศจีนเป็นประเทศแรกของโลกที่มีการดื่มชา และหลังจากนั้นได้มีการติดต่อค้าขายกับชาวต่างชาติ จึงทำให้มีการเผยแพร่ไปยังหลายประเทศทั่วโลก โดยมีการปลูกและขยายพันธุ์ไปตามที่ต่าง ๆ ด้วยรสชาติและกลิ่นที่เป็นเอกลักษณ์ ทำให้เครื่องดื่มชาเป็นที่นิยมอย่างรวดเร็ว ซึ่งส่วนใหญ่ได้มีการค้นพบเครื่องดื่มชาจะเกี่ยวข้องกับวัฒนธรรม วิถีชีวิต ศิลปวัฒนธรรม เศรษฐกิจ และสุขภาพของผู้คนในยุคนั้น ๆจนถึงปัจจุบันนี้ เชื่อกันว่าการใช้ประโยชน์จากใบชานั้นมีมานานแล้วตั้งแต่ 5,000-6,000 ปีก่อน ซึ่งยุคนั้นจะใช้ชาเป็นพืชสมุนไพรในการรักษาโรคต่าง ๆ ต่อมาก็ได้มีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการใช้ประโยชน์จากใช้เป็นยา มาเป็นเครื่องดื่มจึงทำให้มีการดื่มชาได้แพร่หลายสูงสุดไปสู่คนทั่ว ๆไปในประเทศจีน เพราะทำให้ร่างกายสดชื่นกระชุ่มกระชวย ไม่ง่วง ไม่ซึมเซา และสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ นั่นก็หมายความว่าการที่ดื่มชาสม่ำเสมอจะทำให้ร่างกายแข็งแรง และป้องกันโรคได้ ประกอบกับชายังเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอย่างหนึ่งของจังหวัดเชียงราย ซึ่งมีพื้นที่แหล่งเพาะปลูกชาที่สำคัญอันดับหนึ่งของประเทศไทย ประมาณ 97,000 ไร่ ทำให้สามารถผลิตชาได้ปีละ 6,000 ตัน ทำรายได้ให้กับประเทศเฉลี่ยปีละ 100 ล้านบาทต่อปี นอกเหนือจากเชียงรายแล้วยังมีเชียงใหม่ ลำปางแม่ฮ่องสอน แพร่ ตาก ที่มีการปลูกชา (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์จังหวัดเชียงราย, 2547)ทำให้มีการเรียกขานกันว่าเป็นจังหวัดชาแห่งชาติ จึงทำให้ชาเชียงรายได้รับคัดเลือกให้เป็นสินค้า OTOP PRODUCT CHAMPION ที่ทำรายได้ให้แก่เกษตรกรที่ปลูก และยังเป็นชาที่มีคุณภาพ

การศึกษาค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับชาที่มีมาจนถึงปัจจุบัน ทำให้เครื่องดื่มชาได้รับกระแสความนิยมจากผู้คนเป็นอันดับหนึ่ง สาเหตุมาจากองค์ประกอบทางเคมีที่มีอยู่ในใบชา โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารประกอบกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenols) ที่เรียกว่าคาทิชิน (catechins) ที่สำคัญคือ Epigallocatechin gallate (EGCG) เป็นสารแอนตี้ออกซิแดนท์ (antioxidant) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าวิตามินอี ถึง 20 เท่า (Peterson and Dwyer, 1998) ดังนั้นจึงเชื่อกันว่าการดื่มชาเป็นประจำสามารถป้องกันโรคและความบกพร่องต่าง ๆที่เกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระ

(free radicals) ซึ่งรวมถึง โรคหัวใจ โรคมะเร็ง โรคไขมันอุดตันในเส้นเลือด โรคอัลไซเมอร์ (Duthie *et al*., 2000) โรคภูมิแพ้ (Katiyar and Mukhtar, 2001) อาการแทรกซ้อนในโรคเบาหวาน (Yang *et al*., 2001) และยังพบอีกว่าชายังมีฤทธิ์เป็นสารปฏิชีวนะ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหลายชนิด จึงทำให้สามารถบรรเทาอาการอักเสบและการติดเชื้อในช่องปากได้ (Graham, 1992) ซึ่งเห็นได้ว่าสาร catechins มีความสำคัญอย่างมากต่อคุณภาพชา แหล่งของสาร polyphenols เหล่านี้ จากการศึกษาวิจัยพบว่ามีมากในชาจีนและชาญี่ปุ่น ที่ผลิตเป็นแบบชาเขียว

จากการศึกษากระบวนการสังเคราะห์ catechins พบว่าในการสังเคราะห์ catechins นั้นส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ ซึ่งจะเป็นตัวเร่งในกระบวนการสังเคราะห์ catechins ได้แก่ glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) และ shikimate dehydrogenase (SDH) ซึ่งมีรายงานเกี่ยวกับการสะสมของสาร catechins พบว่าในใบอ่อนมีมากกว่าใบแก่ (Moriguchi *et al*., 2002; Yamamoto *et al*., 2002) จึงมีการศึกษาเกี่ยวกับยีนที่มีผลต่อการสร้าง catechins โดยศึกษาถึงความแตกต่างของการแสดงออกของยีนในใบอ่อนและใบแก่ โดยการทำ suppression subtractive hybridization (SSH) พบว่ายีนที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ catechins ได้แก่ phenylalanine ammonia-lyase 1 (PAL), chalcone synthase (CHS), flavanone 3-hydroxylase (F3H), dihydroflavonol 4-reductase (DFR), flavonoid synthase (FLS) และ leucoanthocyanidin reductase (LCR) (Park *et al*., 2004)

ชาเชียงรายนั้นยังมีการศึกษาวิจัยน้อยมากทั้งในด้านองค์ประกอบทางเคมีและด้านพันธุศาสตร์ของชา ในงานวิจัยนี้ถึงมีจุดมุ่งหมายที่จะทำการศึกษาวิจัยในการวิเคราะห์ปริมาณสาร catechins ในใบชา ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์ catechins โดยเทคนิค Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) เพื่อสามารถนำข้อมูลพื้นฐานครั้งนี้ไปใช้ในการพัฒนาและสนับสนุนส่งเสริมปรับปรุงชาเชียงรายให้มีคุณภาพยิ่งขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาปริมาณสารประกอบกลุ่ม catechins ในชาเชียงราย โดยเทคนิค HPLC
2. เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ catechins ในชาเชียงรายโดยเทคนิค RT-PCR

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จะใช้ตัวอย่างชาอูหลง เบอร์ 17 จากสถาบันชา มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง โดยการใช้ยอด (ใบอ่อน 3 ใบแรก) และใบที่ 4 มาศึกษาวิเคราะห์สารประกอบกลุ่ม catechins ได้แก่ Catechin (C), Epicatechin (EC), Epigallocatechin (EGC), Epigallocatechin gallate (EGCG), Catechin gallate (CG), Gallocatechin (GC), Gallocatechin gallate (GCG), Epicatechin gallate (ECG), และ Caffeine (CF) โดยเทคนิค HPLC และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ catechins โดยเทคนิค RT-PCR

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ข้อมูลปริมาณสารประกอบกลุ่ม catechins ในชาเชียงราย
2. ได้ข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ catechins ในชาเชียงราย
3. เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการคัดเลือกต้นชาและปรับปรุงคุณภาพชาต่อไป

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อนุกรมวิธานของชา

ชาเป็นพืชดอกชนิดหนึ่ง ซึ่งสามารถจัดหมวดหมู่ทางอนุกรมวิธานของชา ได้ดังนี้

ชื่อวิทยาศาสตร์ (Scientific name)	:	*Camellia sinensis*
ชื่อสามัญ (Common name)	:	Tea
วงศ์ (Genus)	:	*Camellia*
ตระกูล (Family)	:	Theaceae

2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของชา

2.2.1 ราก (roots)

ประกอบด้วยรากแก้ว รากฝอยสำหรับหาอาหาร และมีการสะสมคาร์โบไฮเดรตในรูปแป้ง รากยาวถึง 1.5-3.0 เมตร จะขึ้นอยู่กับชนิดต้นชาและสภาพดิน

2.2.2 ใบ (leaves)

ใบชาจะเป็นใบเดี่ยว มีการจัดเรียงตัวของใบแบบสลับ 1 ใบต่อ 1 ข้อ ใบขอบหยักแบบฟันเลื่อย ปลายใบแหลม แผ่นใบหนาเหนียว หน้าใบเป็นมันวาว ยาวประมาณ 7-30 เซนติเมตร ใต้ใบมีขนอ่อนปกคลุ่ม ปากใบพบมากบริเวณใต้ใบ กลุ่มชาจีนใบแคบขนาดเล็กและสีค่อนข้างคล้ำ ส่วนชาอัสสัมใบจะมีขนาดใหญ่ ดังรูปที่ 2.1

รูปที่ 2.1 ลักษณะใบชาจีน

2.2.3 ดอก (flowers)

ดอกชามีทั้งดอกเดี่ยวและดอกช่อ 2-4 ดอก ก้านดอกสั้น ดอกมีกลิ่นหอม เป็นดอกสมบูรณ์เพศ มีกลีบดอกสีขาวหรือขาวอมชมพู จำนวน 5-7 กลีบ ลักษณะโค้งเว้าแบบ obovate ดังรูปที่ 2.2

รูปที่ 2.2 ลักษณะดอกชาจีน

2.2.4 ผล (fruits)

มีลักษณะเป็นแคปซูล (capsule) เปลือกหนาสีน้ำตาลอมเขียว แบ่งเป็น 3 ช่อง เปลือกเมล็ดบางสีน้ำตาลอ่อน ดังรูปที่ 2.3 และ 2.4

รูปที่ 2.3 ลักษณะผลชาจีน

รูปที่ 2.4 ลักษณะเมล็ดชาจีน

2.3 การจำแนกพันธุ์ชา

กลุ่มพันธุ์ชาสามารถแบ่งจำแนกได้ 3 กลุ่มที่ปลูกกันทั่วโลกตามลักษณะทางพฤกษศาสตร์

2.3.1 **พันธุ์ชาจีน (China tea, *C. sinensis* var. *sinensis*)**

ชาสายพันธุ์ *sinensis* หรือเรียกว่า ชาจีน ดังรูปที่ 2.5 ลักษณะลำต้นเป็นพุ่มเตี้ย สูงประมาณ 2-3 เมตร ใบมีสีเขียวเข้มขนาดเล็ก ยาว 3.8-6.4 เซนติเมตร แคบ ใบหยักแบบฟันเลื่อย เส้นใบมองไม่ชัด ข้อถี่ ปล้องสั้น ทนทานต่ออุณหภูมิต่ำและสภาพแวดล้อมที่ผันแปรได้ดี ชาพันธุ์นี้ปลูกมากในประเทศจีน ปัจจุบันได้มีการทดลองนำชาจีนพันธุ์ใหม่ๆเข้ามาปลูก ส่วนใหญ่นำต้นกล้ามาจากประเทศไต้หวัน สายพันธุ์ที่นิยมปลูกจะแตกต่างกันไปในแต่ละท้องที่อย่างจังหวัดเชียงรายที่ปลูกกันมี อูหลงก้านอ่อน อูหลงเบอร์ 12 ชิงชิงอูหลง สี่ฤดูถิกวนอิม ชากลุ่มนี้ต้องการการดูแลในขณะที่ปลูกอย่างดีและใกล้ชิด ทำให้เมื่อนำมาผลิตเป็นชาเพื่อชงดื่มมีราคาค่อนข้างแพง

รูปที่ 2.5 ลักษณะของชาจีน

2.3.2 พันธุ์ชาอัสสัม (Assam tea, *C. sinensis* var. *assamica*)

ชาสายพันธุ์ *assamica* หรือเรียกว่าชาอัสสัม หรือ ชาพื้นเมือง หรือ ชาป่า ดังรูปที่ 2.6 มีถิ่นกำเนิดมาจากทางตอนล่างของทวีปเอเชียแถวๆประเทศอินเดีย (Bokuchava and Skobeleva, 1980) ชาที่ขึ้นกระจัดกระจายตามธรรมชาติทางตอนบนของประเทศไทย จัดเป็นชาอัสสัม (สัณฑ์, 2535) และลักษณะเป็นไม้ยืนต้นลำต้นเดี่ยว ทรงต้นค่อนข้างใหญ่ สูงประมาณ 6-8 เมตร ใบใหญ่ ดอกออกเป็นช่อๆละ 2-4 ดอก เจริญเติบโตเร็ว ทนแล้ง

รูปที่ 2.6 ลักษณะของชาอัสสัม

***2.3.3* พันธุ์ชาเขมร (Indo-China, Cambodia tea, *C. sinensis* var. *indo – china*)**

ชาเขมร มีลักษณะลำต้นเดี่ยว สูง 5 เมตร ใบยาว 7.6 เซนติเมตร แข็งเป็นมัน ขอบใบหยักเป็นฟันเลื่อย แผ่นใบม้วนงอเป็นรูปตัววี (V-shape) ก้านใบออกสีแดง ฤดูแล้งใบจะมีสีแดงเรื่อ ๆ ดังรูปที่ 2.7 ยอดอ่อนรสจะฝาดเนื่องจากมีแทนนินสูง และยังทนแล้งได้ดี

รูปที่ 2.7 ลักษณะของชาเขมร

2.4 ชนิดของชาแบ่งตามกระบวนการผลิต

2.4.1 ชาเขียว (Green tea) หรือ non-fermented tea

เป็นชาที่ไม่ผ่านกระบวนการหมักเกิดขึ้นเลยโดยมีการยับยั้งปฏิกิริยาเคมีต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นได้กับสาร polyphenols ในใบชา โดยการอาศัยความร้อนสูง ๆ ไปทำลายเอนไซม์ให้เสียสภาพ จึงทำให้ปริมาณ catechins มีอยู่สูงเมื่อเทียบกับชาชนิดอื่น มีรสอ่อน น้ำชาที่ได้มีสีเขียวถึงเหลืองอ่อน รสชาติดีมาก พันธุ์ชาที่นิยมมาผลิต ได้แก่ ชาพันธุ์อัสสัม อูหลงเบอร์ 12 เป็นต้น

2.4.2 ชาอูหลง (Oolong tea) หรือ semi – fermentation tea

เป็นชาที่ผ่านกระบวนการหมักในระยะเวลาอันสั้น กล่าวคือ ในขั้นตอนการผลิต จะมีการปล่อยให้เกิดการหมักในบางส่วนการผลิตค่อนข้างละเอียดและเชี่ยวชาญ รวมทั้งต้องการเทคโนโลยีการผลิตที่ค่อนข้างซับซ้อน จึงมีคุณสมบัติอยู่ระหว่างชาดำและชาเขียว แต่กลิ่นของชาชนิดนี้จะมีกลิ่นหอมละมุน รสชาติดี

2.4.3 ชาฝรั่งหรือชาดำ (Black tea) หรือ fully-fermentation tea

เป็นชาที่มีการปล่อยให้เกิดการหมักอย่างสมบูรณ์เต็มที่ สาร polyphenols ในใบชาสดจะเปลี่ยนไปเป็นผลิตผล ได้แก่สารพวก Theraflavins และThearubigins คนจีนมักเรียกว่า ชาแดงหรือหงฉ่า เพราะสีของน้ำชาจะออกสีแดงคล้ายสีทองแดงและมีกลิ่นหอม

2.5 องค์ประกอบทางเคมีของใบชา

จากการนำใบชามาใช้ประโยชน์มาทำเป็นเครื่องดื่ม ทำให้มีการศึกษาวิจัยองค์ประกอบทางเคมีของใบชากันมากมายหลายพันธุ์ชา สามารถสรุปองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของใบชาได้ดังตารางที่ 2.1 ซึ่งในใบชาจะประกอบด้วยสารประกอบอินทรีย์และสารประกอบอนินทรีย์ ที่สามารถละลายน้ำได้ดีและละลายได้เล็กน้อย สารอนินทรีย์ที่พบจะอยู่ในรูปเกลือหรือพวกแร่ธาตุ เช่นโพแทสเซียมที่พบมากที่สุด ส่วนสารประกอบอินทรีย์ ได้แก่ สารกลุ่มโพลีฟีนอล คาเฟอีน สารให้กลิ่น กรดอะมิโนและสารประกอบไนโตรเจน คาเฟอีนพบในใบชาประมาณ 3-4% ของน้ำหนักแห้ง เป็นสารอินทรีย์ที่ช่วยกระตุ้นประสาทและทำให้รสชาติของชาดีขึ้น ส่วนกรดอะมิโนและสารประกอบไนโตรเจนใบชาประกอบด้วย กรดอะมิโน เอไมด์ กรดนิวคลีอิค และโปรตีน ซึ่งมีประมาณร้อยละ 4.5-6.0 และมีกรดอะมิโน คือ theanine และ glutamic acid อยู่กว่าครึ่งของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในชา ส่วนโปรตีน ได้แก่ เอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดส

ตารางที่ 2.1 **องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของใบชาสด**

Components	**% Dry weight**
Soluble in water	
Flavonols	
(-) - EGCG	9-14
(-) - EGC	4-7
(-) - ECG	2-4
(-) - EC	1-3
(+) - GC	1-2
(+) - C	0.5-1
minor catechin	0.4-1
Flavonol glucosides	3-4
Proanthocyanidins	2-3
Caffeine	3-4
Amino acids	2-4
Carbohydrates	3-5
Organic acid	0.5-2
Saponins	0.04-0.07
Pigments	0.5-0.8
Vitamins	0.6-1.0
Suluble minerals	2-4
Insoluble or Slightly Soluble in water	
Cellulose	6-8
Lignin	4-6
Polysaccharides	4-10
Lipids	2-4
Insoluble pigments	0.5
Insoluble minerals	1.5-3.0
Volatiles	0.01-0.02

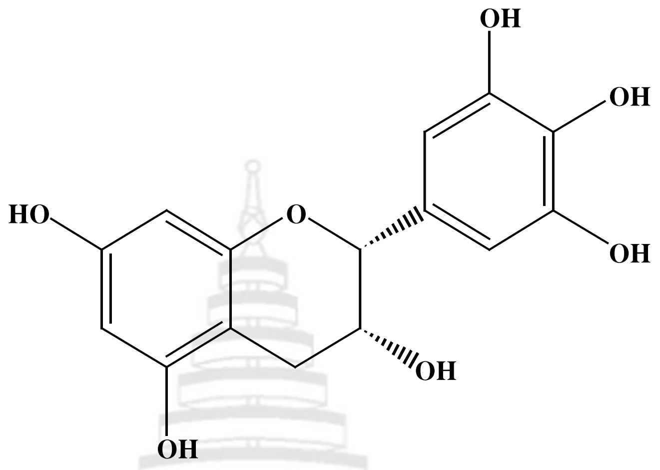
ที่มา : Chen *et al.*, 2002

(polyphenol oxidase) จะเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้สาร polyphenols กลายเป็นสารพวก Quinone ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ต่อกลายเป็นสารที่มีสีเข้ม (Baruah, 2003) เรียกปฏิกิริยานี่ว่ากระบวนการเกิด browning ของพืช (Lee *et al*., 2002) และนอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ที่สำคัญ คือ เอนไซม์ Catechol oxidase ทำหน้าที่ในการออกซิไดซ์ catechins โดยระดับความสูง ต่ำ ของเอนไซม์สามารถบอกให้ทราบถึงคุณภาพของการหมักใบชา และสารให้กลิ่น (Volatile compounds) กลิ่นหอมที่เกิดจากชาจะแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับกระบวนการผลิตพันธุ์ของชา สภาพอากาศ และภูมิประเทศที่ปลูก

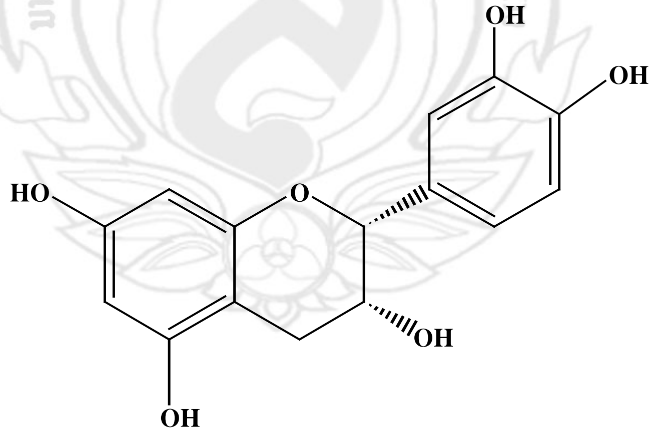
สารที่สำคัญที่สุดในชา คือ สารประกอบ polyphenols ซึ่งส่วนใหญ่ร้อยละ 90 เป็นสารกลุ่ม flavonoids เรียกว่า flavonols ซึ่งมีสูตรโครงสร้าง C6-C3-C6 (Lakenbrink *et al*., 2000) ในใบชาสดนั้นจะมีสารเคมีกลุ่ม polyphenols อยู่ประมาณ 20-35% ต่อน้ำหนักใบสดและยังจัดอยู่ในกลุ่มสารประกอบ phenols เป็น secondary phytochemicals ที่พบได้ในส่วนต่าง ๆของพืช เช่น เมล็ด ใบ เปลือก และ ดอก ของพืชหลายชนิด สารกลุ่มนี้มีโมเลกุลขนาดเล็กและมีวง flavan เป็นโครงสร้างหลักของโมเลกุล กลุ่ม flavonoids และ tannins มีผลต่อสุขภาพในแง่ที่มีฤทธิ์เป็นสาร antioxidants และมีคุณสมบัติจับกับไอออนโลหะได้ (Cheng and Breen, 2000; Soczynska-Kordala *et al*., 2001) ซึ่งอาจเรียกสารพวก flavonols ในใบชานี้ว่าเป็นสารพวก catechins โดยพบในส่วนต่าง ๆอันได้แก่ ยอด ก้าน ใบ ลำต้น ราก และเมล็ด ซึ่งมีส่วนประกอบของปริมาณสารที่แตกต่างกัน

Catechins เป็นสาร secondary metabolite ที่พบมากในชา ซึ่งเป็นสารประกอบที่เกิดจากวงแหวนเบนซีนและหมู่ไฮรอกซิล มีสูตรโครงสร้างปฐมภูมิเป็น flavonols และอาจมีหมู่สารอื่น เช่น galloyl group มาต่อตรงอะตอมคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 หรือ 3 ของวง flavan สารในกลุ่ม catechins ในใบชาสามารถแบ่ง catechins ออกได้เป็น catechin และ catechin gallate ดังต่อไปนี้ (Forrest and Bendall, 1969; Hilton *et al*., 1973; Hara *et al*., 1995)

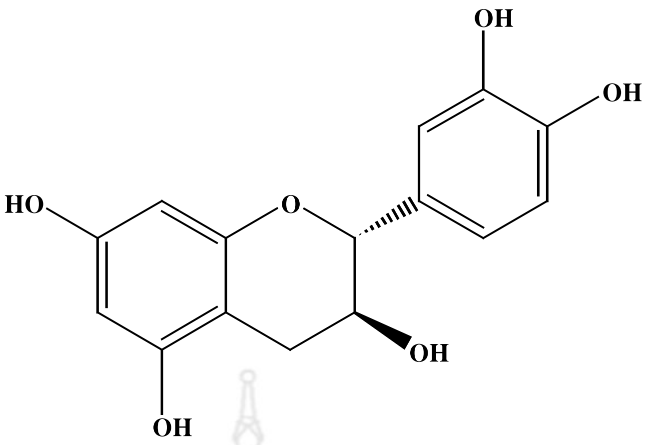
1. Catechin ประกอบด้วย EGC, EC, C, GC ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมี ดังรูปที่ 2.8-2.11



(-) - Epigallocatechin (EGC)
รูปที่ 2.8 โครงสร้างทางเคมีของ EGC

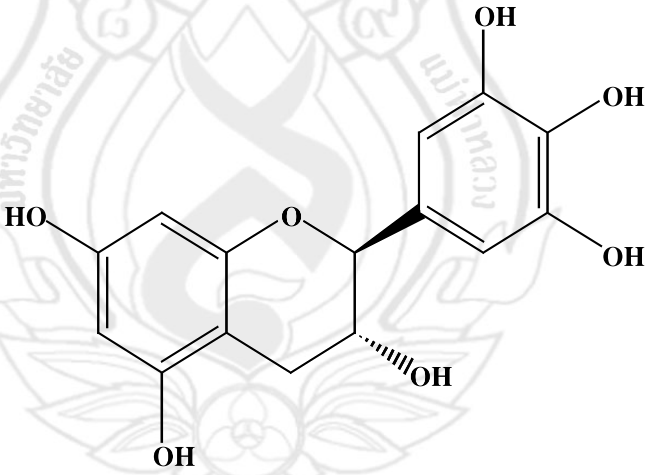


(-) - Epicatechin (EC)
รูปที่ 2.9 โครงสร้างทางเคมีของ EC



(+) – Catechin (C)

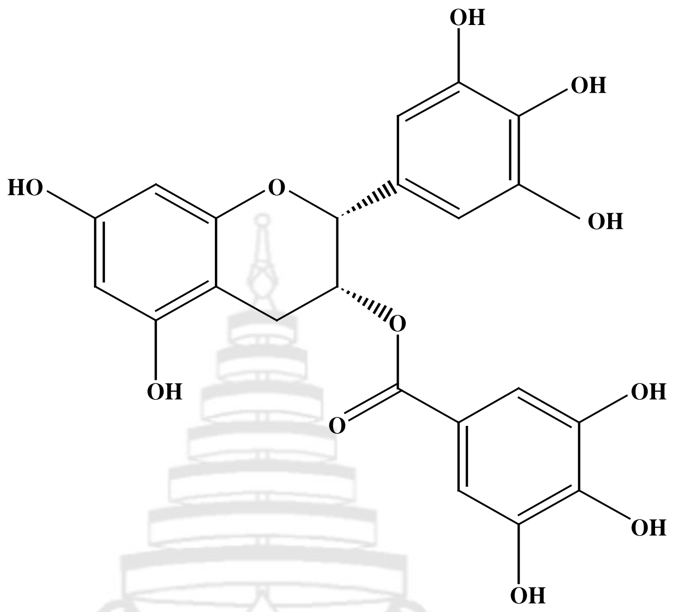
รูปที่ 2.10 โครงสร้างทางเคมีของ C



(+) – Gallocatechin (GC)

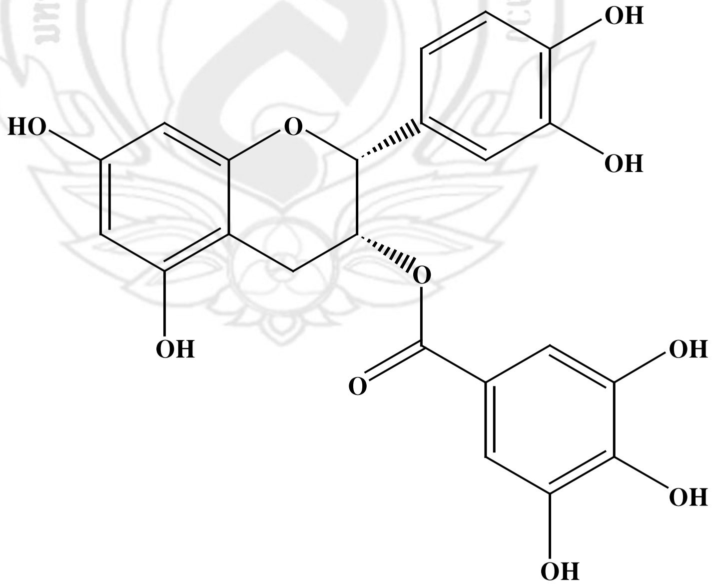
รูปที่ 2.11 โครงสร้างทางเคมีของ GC

2. Catechin gallate ประกอบด้วย EGCG, ECG, GCG, CG ซึ่งสูตรโครงสร้างทางเคมีดังรูปที่ 2.12-2.15



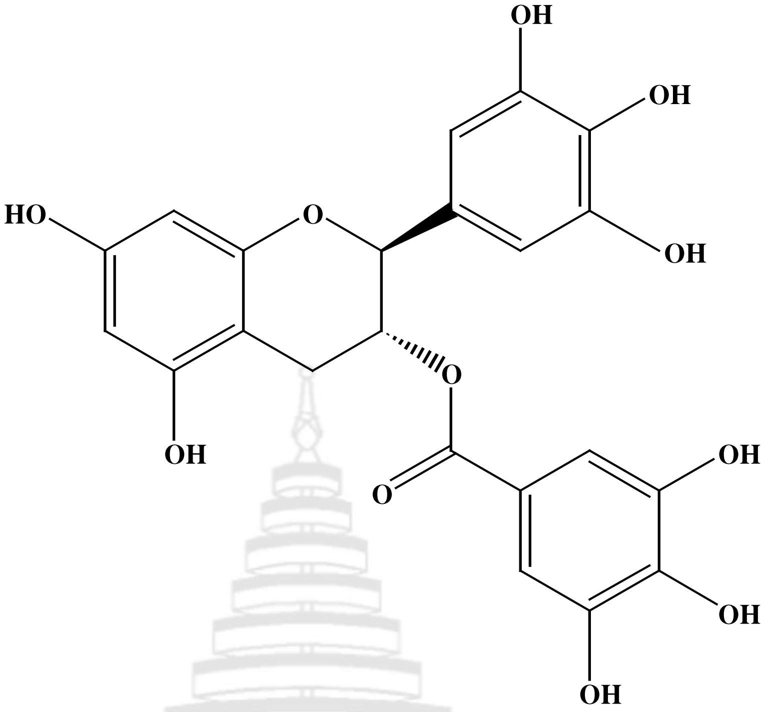
(-) - Epigallocatechin gallate (EGCG)

รูปที่ 2.12 โครงสร้างทางเคมีของ EGCG



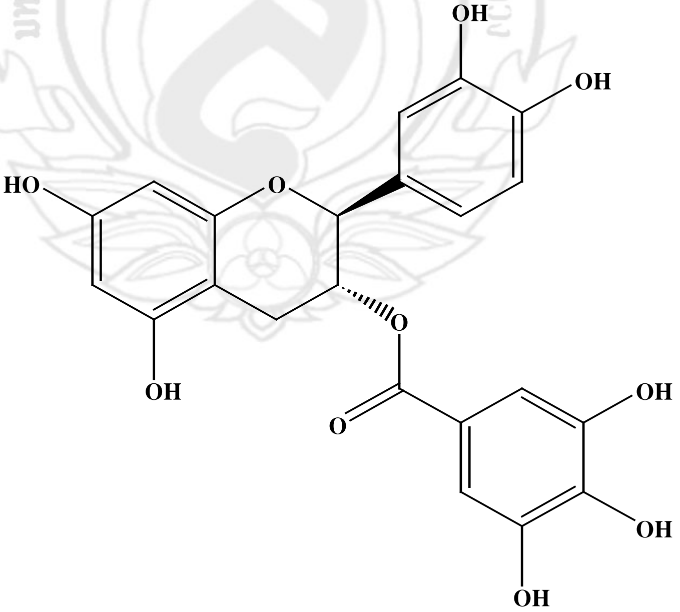
(-) - Epicatechin gallate (ECG)

รูปที่ 2.13 โครงสร้างทางเคมีของ ECG



(-) - Gallocatechin gallate (GCG)

รูปที่ 2.14 โครงสร้างทางเคมีของ GCG



(-) - Catechin gallate (CG)

รูปที่ 2.15 โครงสร้างทางเคมีของ CG

สารประกอบกลุ่ม catechins ที่รู้จักกันดีมีอยู่ 4 ชนิด คือ EGCG, EGC, ECG, และ EC ซึ่งมีปริมาณรวมในใบชาประมาณ 30% (w/w) ของน้ำหนักแห้ง (Baruah *et al*., 1986; Harbowy and Balentine, 1997) ซึ่ง catechins สามารถพบได้ในทุกส่วนของชา แต่จะพบมากตรงส่วนยอดรวมไปถึงใบที่สองและใบที่สามถัดจากยอด ซึ่งส่วนใหญ่จะสัมพันธ์กับการเก็บเฉพาะหนึ่งยอดสองใบ ของใบชาสดมาผ่านกระบวนการต่าง ๆเพื่อให้ได้ชาที่มีคุณภาพและปริมาณ catechins สูง

ในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของใบชาโดยเฉพาะสารในกลุ่ม catechins สามารถนำเทคนิคทางเคมีมาวิเคราะห์มากมาย โดยเริ่มจากเทคนิค Liquid Chromatography (LC) เทคนิคดั้งเดิมที่มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องและยังคงเป็นเครื่องมือที่ทันสมัยอยู่เสมอสำหรับงานวิเคราะห์และการเตรียมตัวอย่าง ปัจจุบันคอลัมน์ LC ที่ได้รับความนิยมยังเป็นชนิดมาตรฐานรูปทรงกระบอกแบบ 1 มิติ แต่สามารถปรับเปลี่ยนหรือเลือกใช้ตัวตรวจวัด หรือระบบ Interface ให้เหมาะสมกับตัวอย่างได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่อุปสรรคในการใช้งานเครื่อง LC คือ ความล่าช้าในการปรับเงื่อนไขการทดลองให้เหมาะสมและมีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่ยุ่งยาก ซึ่งไม่สามารถหลีกเลี่ยงได้ (แม้น และ อมร, 2534) ดังนั้นในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคทาง LC ขึ้นมาเรียกว่า High Speed Liquid Chromatograpy (HPLC) มาใช้ในการวิเคราะห์สารกลุ่ม catechins ซึ่ง HPLC เป็นเครื่องมือใช้สำหรับแยกสารประกอบที่สนใจที่ผสมอยู่ในตัวอย่าง โดยกระบวนการแยกสารประกอบที่สนใจจะเกิดขึ้นระหว่างเฟส 2 เฟส คือ เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) นั่นก็คือ column กับเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) จะถูกแยกออกมาในเวลาที่ต่างกัน ซึ่งสารผสมที่อยู่ในตัวอย่างสามารถถูกแยกออกจากกันได้นั้นขึ้นอยู่กับความสามารถในการเข้ากันได้ดีของสารนั้นกับ mobile phase หรือ stationary phase สารประกอบตัวไหนที่สามารถเข้ากันได้ดีกับ mobile phase สารนั้นก็จะถูกแยกออกมาก่อนส่วนสารที่เข้ากันได้ไม่ดีกับ mobile phase หรือเข้ากันได้ดีกับ stationary phase ก็จะถูกแยกออกมาทีหลัง โดยสารที่ถูกแยกออกมาได้นี้จะถูกตรวจวัดสัญญาณด้วยตัวตรวจวัดสัญญาณที่บันทึกได้จากตัวตรวจวัดจะมีลักษณะเป็นพีค ซึ่งจะเรียกว่า โครมาโตแกรม โดย HPLC สามารถทดสอบได้ทั้งเชิงคุณภาพและทดสอบเชิงปริมาณ โดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน เทคนิค HPLC นี้มีข้อดี คือสามารถแยกสารผสมได้อย่างรวดเร็ว ว่องไว มีประสิทธิภาพดี สะดวก และง่ายต่อการทำปริมาณวิเคราะห์ เหมาะสำหรับใช้วิเคราะห์สารที่มีปริมาณน้อย ๆได้ (แม้น และ อมร, 2534; กรมวิทยาศาสตร์บริการร่วมกับสภาสถาบันราชภัฏ, 2544) ส่วนใหญ่จากการศึกษาสารโพลีฟีนอลในชาโดยเฉพาะกลุ่ม catechins

จากการศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของ polyphenols ในใบชาสดจากส่วนต่าง ๆ 3 ส่วน คือ ใบชาอ่อน ใบชาแก่ และลำต้น พบว่าปริมาณของสาร polyphenols โดยเฉพาะ EGCG ในใบชาสดแต่ละส่วนจะพบว่าในใบชาอ่อนมีมากกว่าใบชาแก่และลำต้นตามลำดับ ในอัตราส่วน total catechins ในใบชาอ่อน ใบชาแก่และลำต้นเป็น 5.6 : 2.9 : 1.0

และอัตราส่วนของคาเฟอีน 7.9 : 4.6 : 1 พบว่าในใบชาอ่อนจะมีปริมาณสูงสุด (Lin *et al*., 1999) ซึ่งได้มีการศึกษาวิจัยในยอดชาพันธุ์อัสสัม ดังตารางที่ 2.2 พบว่าในส่วน ตา ใบแรก ใบที่ 2 จะมีปริมาณสาร catechins สูงตามลำดับ

ตารางที่ 2.2 ปริมาณสาร catechins ในส่วนต่าง ๆของยอดชาพันธุ์อัสสัม

ยอดชา	catechins (% น้ำหนักแห้ง)
ตา	26.5
ใบแรก	25.9
ใบที่ 2	20.7
ใบที่ 3	17.1
ก้านส่วนบน	11.1
ก้านส่วนล่าง	5.3

ที่มา : สัณห์, 2535

จากการศึกษาปริมาณสาร catechins ในชาสายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่าปริมาณ catechins ในใบชาแต่ละสายพันธุ์จะแตกต่างกัน ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ความแตกต่างของปริมาณสารเคมีที่สำคัญในใบชาสดที่ต่างสายพันธุ์

สายพันธุ์	polyphenols (% dry weight)					
	C	EC	ECG	EGC	EGCG	Caffeine
Sinensis	0.07	1.13	1.35	2.38	8.58	2.78
Assamica	0.02	1.44	3.35	0.35	12.10	2.44

ที่มา : Yamamoto *et al*., 1997

จะเห็นได้ว่า EGCG และ ECG จะพบในปริมาณสูงในชา *assamica* ส่วนในชา *sinensis* จะพบว่ามี EGC ในปริมาณที่สูงกว่า นอกจากสายพันธุ์ที่แตกต่างกันแล้ว ฤดูกาล

ปริมาณแร่ธาตุอาหาร การเก็บเกี่ยว การดูแล เป็นปัจจัยสำคัญต่อปริมาณสารประกอบกลุ่ม catechins (สัณห์, 2535)

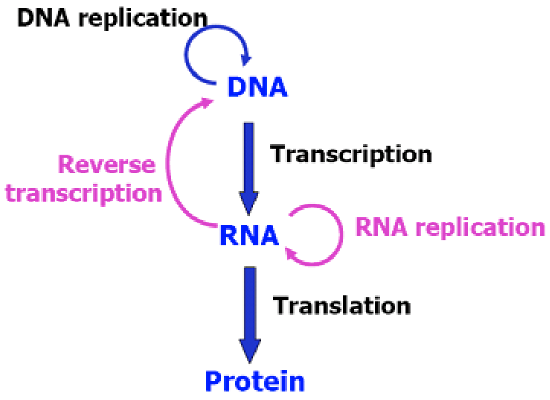
2.6 การตรวจสอบการแสดงออกของยีน

การแสดงออกของยีนสามารถตรวจสอบการแสดงออกของยีนทำได้ 2 รูปแบบ คือ ที่ระดับ RNA และระดับโปรตีน หากเป็น RNA สามารถใช้ DNA หรือ RNA ที่มีลำดับเบสคู่สมกับส่วนหนึ่งของ RNA เป้าหมายเป็นตัวบ่งชี้แสดง วิธีนี้จะใช้ตรวจสอบการแสดงออกของยีนได้ครั้งละมาก ๆและมีประสิทธิภาพ แต่ต้องมี probe ที่เหมาะสมด้วย (สุรินทร์, 2539)

ในปัจจุบันมีวิธีทาง Molecular Biology หลายวิธีที่สามารถใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของยีน จากการศึกษาพบว่ามีการใช้เทคนิค Northern blot analysis, FISH, และ RT-PCR ซึ่ง Northern blot analysis มีหลักการเหมือนกับ Southern แต่เป็นการสกัด RNA จากเนื้อเยื่อต่าง ๆแทนที่จะสกัด DNA ผลบวกของ Northern จะบอกว่าในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่าง ๆที่เราทำการศึกษานั้นมีมีการแสดงออกของยีนนั้น ๆ หรือไม่ถ้ามีขนาด mRNA นั้นมีความยาวเท่าไร ส่วนเทคนิค FISH ใช้หลักการเดียวกันสามารถศึกษาการแสดงออกของเนื้อเยื่อของยีนนั้น ๆในระดับ histologic section ได้โดยการทำ FISH โดยใช้ probe ที่ติดกับ mRNA แต่ผลที่ได้มีความไวไม่สูงนัก ทำให้ไม่สามารถตรวจสอบตัวอย่างที่มีปริมาณที่น้อย ๆได้ ดังนั้นในปัจจุบันการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนจึงนิยมนำเทคนิค RT-PCR มาใช้อย่างแพร่หลายโดยเฉพาะอย่างยิ่งในวงการแพทย์ เนื่องจากวิธีนี้มีความไวสูง แม่นยำ และประสิทธิภาพดี นอกจากนี้ยังใช้ประโยชน์อย่างอื่นได้อีกด้วย เช่น ใช้ตรวจสอบ GMO และใช้ในการศึกษา allelic discrimination เป็นต้น

เทคนิค RT-PCR เป็นเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน โดยการถอดรหัสจาก DNA ไปเป็นโปรตีน ดังรูป 2.16 ต้องผ่านขั้นตอน 2 ขั้นตอน โดยขั้นตอนแรกคือ transcription เป็นการคัดลอกรหัสจาก DNA ไปเป็นรหัสใน RNA ก่อน จากนั้นในขั้นตอนที่ 2 คือ translation เป็นการแปรรหัสที่อยู่ใน RNA ไปเป็นลำดับกรดอะมิในโปรตีน ในกระบวนการ transcription จาก DNA ไปเป็นโปรตีนนั้นเริ่มต้นจากการที่มีโปรตีนจำนวนหนึ่งไปจับอยู่บนตำแหน่งของ DNA ที่มีหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่ต้องการ โดยโปรตีนเหล่านี้ประกอบไปด้วยเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ RNA คือ RNA polymerase และโปรตีนอื่นที่มีหน้าที่ในการควบคุมกระบวนการสังเคราะห์อีกเป็นจำนวนมาก RNA ที่ถูกสร้างขึ้นจากยีนบนเส้น DNA นี้เรียกว่า mRNA จะทำหน้าที่ในการส่งข้อมูลจาก DNA ไปเป็นโปรตีน

ในการศึกษาการแสดงออกของยีนสามารถใช้ Elongation factor (EF-1) เป็นยีน housekeeping ในพืช จะใช้เป็นตัว control เพื่อใช้ดูปริมาณ RNA ที่ใช้ใน RT-PCR reaction ว่ามีปริมาณเท่ากันทุก reaction หรือไม่ โดยดูจากแถบแบนที่ปรากฏขึ้น



รูปที่ 2.16 Central Dogma of Molecular Biology

2.7 หลักการของเทคนิค RT-PCR

Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction หรือ RNA-PCR เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณ RNA ที่ประกอบด้วยสองปฏิกิริยา reverse transcription เป็นการสร้างสาย DNA คู่สม หรือเรียกว่า complementary DNA (cDNA) จากแม่พิมพ์ RNA โดยเอนไซม์ reverse transcriptase (RT) และปฏิกิริยา PCR โดยใช้ cDNA ที่สร้างขึ้นเป็นแม่พิมพ์ โดยมีขั้นตอนดังนี้

Initial denaturation ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนเริ่มต้นก่อนเข้าวงจรลูกโซ่ โดยใช้อุณหภูมิ 92-94 องศาเซลเซียส เวลา 2 นาที เพื่อให้สายแม่พิมพ์แยกกันอย่างสมบูรณ์ เป็นผลให้ primers สามารถเข้าจับกับแม่พิมพ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่ออุณหภูมิลดลง ในทางกลับกันการใช้อุณหภูมิต่ำไป การแยกสายพิมพ์จะเกิดไม่สมบูรณ์ ประสิทธิภาพการเข้าไปจับกับแม่พิมพ์เพื่อสร้างสายดีเอ็นเอใหม่ของ primers จะลดลง

ขั้นตอน Denaturation เป็นขั้นตอนการแยกคู่ของ DNA แม่พิมพ์ให้เป็นสายเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิ 90-95 องศาเซลเซียส

ขั้นตอน Annealing เป็นขั้นตอนลดอุณหภูมิลงมาที่ 50-55 องศาเซลเซียส เพื่อให้ primers สามารถมาจับ DNA แม่พิมพ์สายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม

ขั้นตอน Extension เป็นขั้นตอนการสร้างสาย DNA ใหม่ต่อจาก primers ในทิศทาง 5′→ 3′ อุณหภูมิที่ใช้ขั้นนี้จะอยู่ในช่วง 70-50 องศาเซลเซียส

การสังเคราะห์จะดำเนินตามลำดับ 3 ขั้นตอน ซ้ำกันเป็นจำนวน 20-40 รอบ ทำให้ได้ PCR product หรือ amplified product เป็น DNA สายใหม่เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก

Final extension โดยทั่วไปในรอบสุดท้ายของ PCR มักใช้เวลา 5-10 นาที ที่ 72 องศาเซลเซียส เพื่อช่วยให้การสร้างสาย PCR product เกิดขึ้นสมบูรณ์

RT ที่ใช้ส่วนใหญ่ได้มาจาก retrovirus ซึ่งมีคุณสมบัติโดยทั่วไป ดังนี้ คือ เป็น RNA และ DNA-dependent DNA polymerase โดยต้องใช้ primers ร่วมในการสร้างสาย cDNA ไม่มี Proofreading หรือ 3′→5′ exonuclease activity มี RNaseH activity

ในปัจจุบันมีเอนไซม์ RT หลายชนิดที่นำมาใช้ในการสร้างสาย cDNA ได้แก่ Moloney Murine Leckemai Virus (MMLV) RT, Avian Myeoblastosis Virus (AMV) RT, SuperScript™RNaseH⁻, SuperScript™ II RNaseH⁻ RT และ Expand Reverse Transcriptase เอนไซม์ทั้งสามเป็น MMLV RT กลายพันธุ์ที่ปราศจาก RNaseH activity, *Tth* DNA Polymerase เป็น thermostable DNA polymerase จาก *Thermus thermophilus* ที่มี RT activity ในสภาวะที่มี Mn^{2+} อยู่ แต่ไม่มี RNaseH activity

เนื่องจาก RT แต่ละชนิดมีคุณสมบัติที่ต่างกัน ดังนั้นเพื่อให้การสร้าง cDNA จาก RNA มีประสิทธิภาพและเหมาะสมกับการใช้งานที่กำลังทำอยู่ จึงมีข้อควรพิจารณาในการทำ RT-PCR ดังนี้ (ตารางที่ 2.4)

1. อุณหภูมิ การใช้อุณหภูมิสูง (50-70 องศาเซลเซียส) ในปฏิกิริยา reverse transcription จะช่วยขจัดปัญหาการเกิดโครงสร้างทุติยภูมิของแม่พิมพ์ RNA และช่วยเพิ่มความจำเพาะของ primers ในการจับกับแม่พิมพ์ อย่างไรก็ดี การใช้อุณหภูมิสูงจะใช้ได้ในกรณี gene specific primers เท่านั้น ไม่สามารถใช้กับ primers ประเภท oligo (dT) หรือ random hexamers

2. RNaseH activity : MMLV และ AMV RT เป็น RT ที่มี RNaseH activity ซึ่งสามารถย่อยสลาย RNA ในสาย RNA : DNA hybrid ในขณะที่มีการสร้างสาย cDNA ดังนั้นในการทำ RT-PCR จำเป็นต้องคำนึงถึงขนาดของ cDNA ที่ต้องการว่ามีขนาดยาวมากน้อยเพียงใด ถ้าต้องการ cDNA ที่มีความยาวสมบูรณ์ควรเลือกใช้ RT ที่ปราศจาก RNaseH activity เช่น SuperScript™ II RNaseH⁻ RT หรือ Expand Reverse Transcriptase เป็นต้น นอกจากนี้เอนไซม์ที่กล่าวมา ยังเหมาะสำหรับใช้สร้างสาย cDNA จากแม่พิมพ์ RNA ที่มีโครงสร้างทุติยภูมิ เนื่องจากเอนไซม์เหล่านี้สามารถทำงานได้ในอุณหภูมิสูง

3. ความต้องการ Divalent ion : เอนไซม์ส่วนใหญ่ต้องการ divalent ion สำหรับการทำงานเอนไซม์ที่ใช้ Mg^{2+} สามารถสร้างสาย cDNA ได้ถูกต้อง แม่นยำกว่าเอนไซม์ที่ใช้ Mn^{2+} เนื่องจาก Mn^{2+} มีผลต่อความถูกต้องแม่นยำในการสร้างสาย cDNA

2.8 การเลือกชนิดและการออกแบบ primers สำหรับงาน RT-PCR

การเลือกชนิดของ primers มีผลต่อขนาดและความจำเพาะของสาย cDNA ที่สร้างขึ้นในขั้นตอน reverse transcription primers ที่ใช้ในการสร้างสาย cDNA มี 3 แบบ คือ

1. Random hexamers เป็น primers ที่มักใช้ในกรณีที่แม่พิมพ์ RNA มีโครงสร้างทุติยภูมิซึ่งทำให้การสร้างสาย cDNA ทำได้ลำบาก การใช้ primers แบบนี้ RNA ทั้งหมดสามารถทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์สำหรับสร้าง cDNA ประมาณ 90% ของ cDNA ทั้งหมดได้มาจาก ribosomal RNA ส่วนขนาดของ cDNA ที่สร้างขึ้นจะขึ้นกับอัตราส่วนระหว่าง primers กับแม่พิมพ์ RNA ในปฏิกิริยา ซึ่งจะต้องปรับอัตราส่วนที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ cDNA ในขนาดที่ต้องการ

2. Oligo (dT) primers เป็น primers ที่จำเพาะต่อสาย RNA ที่มี poly (A) ซึ่งมีปริมาณ 1-4% ของ eukaryotic RNA ทั้งหมด ปริมาณของ cDNA ที่ได้จากการใช้ primers แบบนี้จะน้อยกว่าการใช้ random hexamers และ cDNA ที่ได้ส่วนใหญ่มีความยาวที่สมบูรณ์ (full length cDNA)

3. Gene specific primers การใช้ primers ชนิดนี้ จำเป็นที่ต้องรู้ข้อมูลลำดับเบสของแม่พิมพ์ RNA ที่สนใจอยู่ เพื่อใช้ในการออกแบบ primers ให้มีความจำเพาะต่อแม่พิมพ์ RNA ที่สนใจเท่านั้น cDNA ที่สร้างขึ้นจึงเป็น cDNA ที่ต้องการเท่านั้น ซึ่งช่วยให้ความจำเพาะในการทำ PCR มีมากขึ้น

ในการศึกษาการแสดงออกของยีนในพวก eukaryotes โดยใช้ RT-PCR มีข้อพึงระวังการเกิดผลบวกเท็จจากการเตรียมตัวอย่าง RNA ที่ไม่บริสุทธิ์ทำให้มี DNA ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างตรวจ วิธีการในการป้องกันปัญหานี้มี 2 แบบ คือ การใช้ DNase เพื่อขจัด DNA ในตัวอย่าง และการออกแบบ primers ซึ่งสามารถแยกได้ว่า PCR products ที่สร้างขึ้นมาจากแม่พิมพ์ RNA หรือ DNA ซึ่งการออกแบบ primers มี 2 แบบคือ

1. ออกแบบ primers ให้มีตำแหน่งอยู่ใน exon ที่ต่างกัน เช่น primers เส้นแรกที่มีตำแหน่งใน exon 1 primers อีกเส้นมีตำแหน่งอยู่ใน exon 2 การออกแบบ primers ในลักษณะนี้จะทำให้สามารถแยกได้ว่า PCR product มาจากแม่พิมพ์ DNA หรือ RNA โดย PCR product จากแม่พิมพ์ DNA จะมีขนาดใหญ่กว่า PCR product ที่สร้างจากแม่พิมพ์ RNA

2. ออกแบบ primers ให้มีตำแหน่งคร่อมสอง exons primers ในลักษณะนี้จะไม่สามารถเพิ่มขยายแม่พิมพ์ที่เป็น DNA ได้

2.9 รูปแบบการทำ RT-PCR

ในการทำ RT-PCR สามารถทำได้ 2 แบบ คือ

1. แบบสองขั้นตอน (Two-step RT-PCR)

ในขั้นตอนแรก เป็นขั้นตอนทำ reverse transcription เพื่อสร้างสาย cDNA โดยใช้แบบใดก็ได้ ในขั้นตอนที่สอง cDNA ที่ได้จากหลอดปฏิกิริยาแรก จะถูกนำมาใช้ในการทำ PCR ต่อในหลอดที่สอง

2. แบบขั้นตอนเดียว (One-step RT-PCR)

RT-PCR แบบนี้ทั้งปฏิกิริยา Reverse transcription และ PCR จะเกิดต่อเนื่องภายในหลอดเดียวกัน primers ที่ใช้ในปฏิกิริยา reverse transcription จะต้องใช้ gene - specific primers เท่านั้น จะใช้ primers ชนิดอื่นไม่ได้ ซึ่งได้เปรียบเทียบของรูปแบบการทำ RT-PCR ทั้งสองดังแสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.4 ปัจจัยต่าง ๆที่ควรพิจารณาในการทำ RT-PCR

เอนไซม์	ขนาดของแม่พิมพ์ (Kb)	อุณหภูมิการทำงาน($^{\circ}C$)	Factor	RNaseH activity	Full length cDNA	ความถูกต้องของ cDNA	One-step RT-PCR
Expand RT	≤ 14	42-50	Mg^{2+}	-	+++	+	++
AMV RT	≤ 12	42-60	Mg^{2+}	++	++	+	++
MMLV RT	≤ 10	37	Mg^{2+}	+	+	+	+
Tth DNA Polymerase	≤ 1	60-70	Mn^{2+}	-	-	-	++

ที่มา : Laboratory Manual From Cell to ATGC in 7 Days, 2547

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

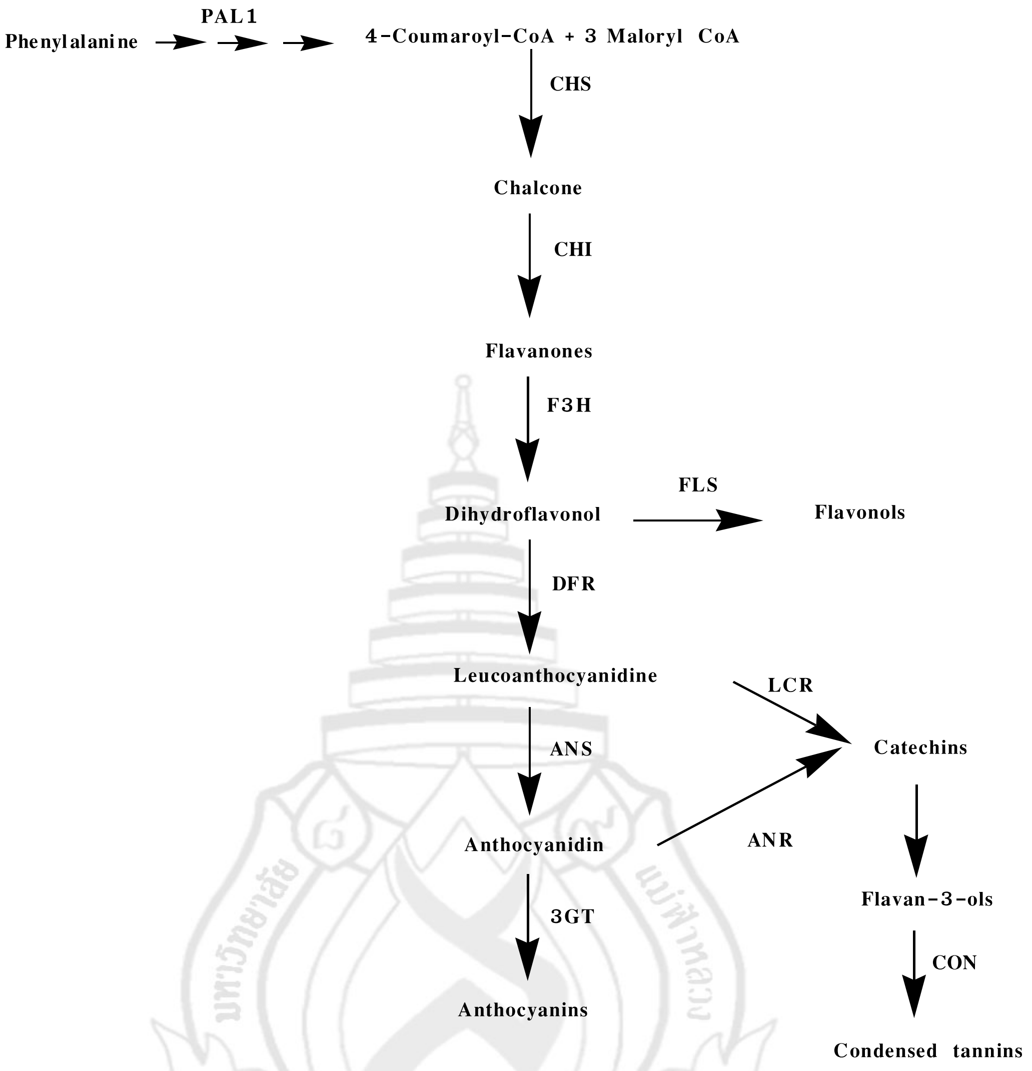
ตารางที่ 2.5 การเปรียบเทียบข้อได้เปรียบของ RT-PCR แบบขั้นตอนเดียวและสองขั้นตอน

RT-PCR แบบขั้นตอนเดียว	**RT-PCR แบบสองขั้นตอน**
- ระยะเวลาที่ใช้ในการทำ เนื่องจากปฏิกิริยาเกิดในหลอดเดียว การดูดถ่ายสารละลายต่าง ๆ จึงน้อย และยังช่วยลดความผิดพลาดในการดูดถ่ายด้วย	- สามารถปรับสภาวะให้เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา reverse transcription และ PCR เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดทั้งสองปฏิกิริยา
- ลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อน เนื่องจากไม่ต้องมีการดูดถ่ายสารละลายจากหลอดปฏิกิริยาแรกไปทำปฏิกิริยาต่อในหลอดที่สอง	- สามารถนำ cDNA ที่ได้ในปฏิกิริยา reverse transcription ไปใช้ประยุกต์ในการทำ PCR ที่จะเพาะต่อยีนต่าง ๆ หรือใช้ในงานวิเคราะห์ต่าง ๆ ได้มากมาย
- เพิ่มความไวและความจำเพาะของการสร้างสาย cDNA เนื่องจากขั้นตอนสร้างสาย cDNA สามารถใช้อุณหภูมิสูง (เนื่องจากเอนไซม์สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิสูง) ลดปัญหาแม่พิมพ์เกิดโครงสร้างทุติยภูมิ และ cDNA ที่เกิดขึ้นทั้งหมดในหลอดจะถูกใช้เป็นแม่พิมพ์ในการทำ PCR	- เมื่อใช้เอนไซม์ RT ร่วมกับ thermostable DNA polymerase ที่เหมาะสม สามารถใช้เพิ่มขยาย RNA ที่มีขนาดยาวถึง 14 kb ได้

ที่มา : Laboratory Manual From Cell to ATGC in 7 Days, 2547

การสังเคราะห์สาร catechins พบในพืช มีเอนไซม์จะเป็นตัวเร่งในกระบวนการสังเคราะห์ catechins เช่น glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) และ shikimate dehydrogenase (SDH) และต้องผ่านกลไกในการสังเคราะห์มากมาย เช่น glucose metabolism pathway, pentose pathway, shikimate pathway, และ flavonoid pathway ซึ่งในการสังเคราะห์ catechins นั้นจะเริ่มจากกระบวนการของ flavonoid pathway ดังรูปที่ 2.17

กระบวนการสังเคราะห์ catechins เริ่มจากการเปลี่ยนกรดอะมิโน phenylalanine เป็น cinnamic acid โดยเกิดปฏิกิริยา elimination ของแอมโมเนีย โดยเอนไซม์ phenylalanine ammonia-lyase 1 (PAL1) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา หลังจากนั้นเอนไซม์ cinnamate-4-hydroxylase จะช่วยเปลี่ยน cinnamic acid ไปเป็น *p* – coumaric acid ซึ่งอยู่ในรูปที่ไม่แอคทีฟ กระบวนการสังเคราะห์ *p* – coumaric acid จาก phenylalanine ดังกล่าวเรียกว่า general phenylpropanoid metabolism จากนั้นเอนไซม์ 4 – coumalate – CoA lyase จะเปลี่ยน *p* – coumaric acid เป็น *p*-coumaryl – CoA (4 – coumaroyl – CoA) ซึ่งเป็นรูปที่แอคทีฟ *p* – coumaryl – CoA จะรวมตัวกับ 3 malonyl – CoA ได้เป็น chalcone โดยมีเอนไซม์ chalcone synthase (CHS) ช่วยในการเร่งปฏิกิริยา ถือได้ว่าทั้ง *p* – coumaryl CoA และ malonyl – CoA เป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์ anthocyanin จากนั้น chalcone จะถูกเปลี่ยนเป็น flavanone โดยอาศัยเอนไซม์ช่วยในการเร่งปฏิกิริยาคือ chalcone isomerase (CHI) ต่อจากนั้น flavonone จะเกิดปฏิกิริยา glycosylation และ acylation ได้เป็น anthocyanidin โดยผ่านทาง dihydroflavanol ที่สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นสารประกอบในกลุ่มโพลีฟีนอลต่างๆหลายตัว โดยเอนไซม์ leucoanthocyanidin reductase (DFR) จะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งจะอยู่ของ flavan 3, 4 – diols ในกระบวนการสังเคราะห์สาร anthocyanin และ flavonols โดยเอนไซม์ flavonol synthase (FLS) เป็นตัวเร่งและเอนไซม์ anthocyanidin synthase (ANS) จะได้ผลผลิตของ anthocyanidin จากกระบวนการนี้สามารถสังเคราะห์สาร catechins โดยอาศัยเอนไซม์ anthocyanidin reductase (ANR) เป็นตัวเร่ง และอีกทางหนึ่งสามารถสังเคราะห์จาก leucoanthocyanidin และใช้เอนไซม์ leucoanthocyanidin reductase (LCR) เป็นตัวเร่งในกระบวนการสังเคราะห์ catechins



รูปที่ 2.17 กระบวนการสังเคราะห์ catechins

ซึ่งสามารถสรุปหน้าที่ของเอนไซม์แต่ละตัวที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ catechins ได้ดังนี้

PAL1 ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการสังเคราะห์ catechins ให้เกิดเป็นผลผลิต คือ 4-coumaroyl-CoA กับ 3 malonyl-CoA

CHS ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการสังเคราะห์ catechins ให้เกิดเป็นผลผลิต คือ chalcone

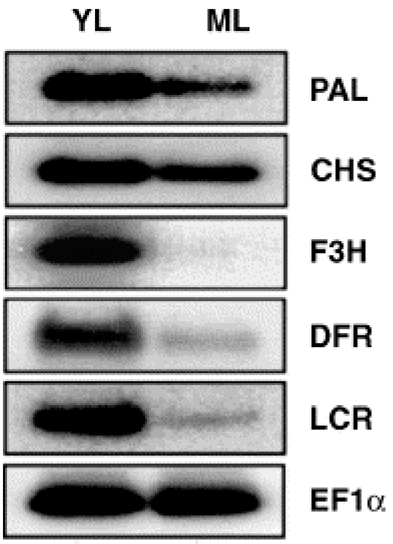
F3H ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการสังเคราะห์ catechins ให้เกิดเป็นผลผลิต คือ dihydroflavonol

DFR ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการสังเคราะห์ catechins ให้เกิดเป็นผลผลิต คือ leucoanthocyanidin

LCR ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการสังเคราะห์ catechins ให้เกิดเป็นผลผลิต catechins และเป็นเอนไซม์ตัวแรกของเกิด condensed tannin

จากการแสดงออกของยีน CHS ได้มาจาก 1 โมเลกุลของ 4-coumaroyl – CoA รวมกับ 3 โมเลกุลของ malonyl – CoA โดยได้ผลผลิต chalcone เมื่อเปรียบเทียบ sequence ทั้งหมดใน secondary metabolism ในกลุ่มจะถูก encoded โดย CHS กับการแสดงออกของ sequence หลายตัวที่เกี่ยวข้องเป็นตัวแทนในแต่ละยีน พบว่า CHS พบในยีนในพืชหลายตระกูลและจะแสดงออกในการควบคุมความแตกต่างของระดับของ transcription ปัจจุบัน CHS มี 3 isoforms ที่สามารถระบุได้จากใบชาอ่อน ซึ่งมีรายงานแล้วว่ายีน LCR เป็นเอนไซม์ตัวแรกของ condensed tannin จากกระบวนการสังเคราะห์ flavonoid และยีนดังกล่าวสามารถทำให้บริสุทธิ์จากเมล็ดอ่อนของ *Arabidopsis* และเมล็ดอ่อนของ *Medicago truncatula* รายงานว่า Xie และคณะ (2003) ค้นพบว่ายีน ANR สามารถถอดรหัสเปลี่ยนแปลง anthocyanidins ไปเป็น 2,3 – *cis* – flavan – 3 – ols ซึ่งยีน LCR ถูกค้นพบเป็นตัวแรกที่พบในใบ แต่อย่างไรก็ตามในการสังเคราะห์ catechins และ consed tannins ก็ยังรู้ว่าเอนไซม์ gallic acid trasferase เป็นตัวขนส่ง leucoanthocyanidin และ catechins ในเนื้อเยื่อ vacuolar แต่ยังไม่รู้หน้าที่ที่แน่นอนของเอนไซม์นี้ ยังพบอีกว่าการแสดงออกของยีนในใบอ่อนมีมากกว่าใบแก่ จึงใช้เทคนิค RT-PCR ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างcatechins ในใบชาซึ่งสกัดยีนที่เกี่ยวข้องในการผลิตโพลีฟีนอลและยีนอื่นของ secondary metabolism ว่าสัมพันธ์กันมากน้อยในใบอ่อน เพื่อเป็นตัวบ่งให้ชัดเจนเกี่ยวข้องกับยีนการสังเคราะห์ catechins (Park *et al.*, 2004)

จากงานวิจัยของ Park และคณะ (2004) ดังแสดงในรูปที่ 2.18 พบว่า F3H, DFR, LCR, PAL1, และ CHS มีการแสดงออกในใบชาอ่อนมากกว่าใบชาแก่ โดย PAL และ CHS มีการแสดงออกเล็กน้อยในใบแก่ ในขณะที่ F3H ไม่มีการแสดงออกเลย จึงสามารถสรุปได้ว่า การแสดงออกของยีนจะมีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์ flavonoids ในยอดอ่อนและใบแก่ของชา



รูปที่ 2.18 ปริมาณการวิเคราะห์ RT-PCR ของการแสดงออกยีนในยอดและใบแก่ของ โดย Park และคณะ (2004)

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และ สารเคมี สำหรับ HPLC

3.1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. HPLC, 2695 Separation module, 2996 Photodiode Array Detector, Water
2. Ultrasonic washer, Transonic, Elmal
3. เครื่องชั่ง, Mettler, AB 204-S
4. Micropipete, Eppendorf
5. pH meter
6. Syringes
7. Membrane filters 0.45 ไมครอน
8. Vials
9. กระดาษกรอง เบอร์ 4
10. กระดาษชั่งสาร
11. เครื่องแก้ว

3.1.2 สารละลายมาตรฐาน

1. (-) - Epicatechin, AR grade, Sigma
2. (-) - Epigallocatechin, AR grade , Sigma
3. (-) - Epicatechin gallate, AR grade , Sigma
4. (-) - Epigallocatechin gallate, 98% HPLC, Sigma
5. (-) - Catechin, AR grade, Sigma
6. (-) - Catechin gallate, 98% HPLC, Sigma
7. (-) - Gallocatechin gallate, 98% HPLC, Sigma
8. (-) - Gallocatechin, 98% HPLC, Sigma
9. Caffeine, Sigma

3.1.3 สารเคมี

1. Trifluoroacetic acid (TFA), AR grade, Fluka
2. Acetonitrile (ACN), HPLC grade, J.T. Baker
3. Methanol (MeOH), HPLC grade, J.T Baker

3.2 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี สำหรับ RNA

3.2.1 วัสดุและอุปกรณ์

1. Centrifuge, Hettich, Mikro 22R
2. Spectrophotometer
3. Hot air oven, Memmert
4. pH meter
5. Autoclave oven, ALP, CL-OOM
6. เครื่องชั่ง, Mettler, AB 204-S
7. Micropipette
8. Microtubes, Naptune
9. Pipettetip, Gilson
10. Vortex

3.2.2 สารเคมีสำหรับการสกัด RNA

1. TRIzol® Reagent, Invitrogen
2. Liqiud nitrogen
3. Chloroform, AR grade
4. Isopropanol, AR grade
5. Ethanol, AR grade
6. Diethylpyrocarbonate (DEPC), 97.5% High Purity Reagent, Amresco

3.3 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี สำหรับ RT-PCR

3.31 วัสดุและอุปกรณ์

1. PCR tubes
2. Thermocycler, Biometra

3.3.2 สารเคมี

1. SuperScript™ III One - Step RT-PCR with Platinum® Taq, Invitrogen
2. 2X Reaction Mix, Invitrogen Primer CHS#2F, Invitrogen
   Sequence 5′ - 3′ CAT GGT TGT GGT TGA AGT GC
3. Primer CHS#2R, Invitrogen
   Sequence 5′ - 3′ CTA GGC CCA CGG AAG GTG AC
4. Primer DFR#2F , Invitrogen
   Sequence 5′ - 3′ TTC ACA TCC TCT GCT GGA AC
5. Primer DFR#2R, Invitrogen
   Sequence 5′ - 3′ GGT AGC ATC ATG GGA GGA GA
6. Primer LCR#2F, Invitrogen
   Sequence 5′ - 3′ AAC AGA GCT TTG ATG CCC CC
7. Primer LCR#2R, Invitrogen
   Sequence 5′ - 3′ CTT TGA TAC AGG ATG CCC CC
8. Primer PAL#2F, Invitrogen
   Sequence 5′-3′ CAC AAA TTG AAG CAC CAC CC
9. Primer PAL#2R, Invitrogen
   Sequence 5′ - 3′ TGG CAA CTC CGG CTC CCT TG
10. Primer F3H#2F, Invitrogen
    Sequence 5′ - 3′ CTC AAG ATG GCC CGA CAA GC
11. Primer F3H#2R, Invitrogen
    Sequence 5′ - 3′ GAT CCG CAT TCT TGA ACC TC
12. Primer PAL1- R, BIOSERVICE UNIT
    Sequence 5′ - 3′ ACT TGG CTA ACA CTG TTC TTG AC
13. Primer PAL1- F, BIOSERVICE UNIT
    Sequence 5′ - 3′ ACA ACA ATG GGT TGC CAT CGA AT

14. Primer CHS - R, BIOSERVICE UNIT
    Sequence 5′ - 3′ GAT GAG CCC AGG AAC ATC CTT GA
15. Primer CHS - F, BIOSERVICE UNIT
    Sequence 5′ - 3′ ACC AAG GTT GCT TTG CCG GTG GC
16. Primer F3H - R, BIOSERVICE UNIT
    Sequence 5′ - 3′ CGG CTT CTC TCC CTC CCT AAT CT
17. Primer F3H - F, BIOSERVICE UNIT
    Sequence 5′-3′ CAG GTT GGT GGG CTC CAG GCC AC
18. Primer DFR - R, BIOSERVICE UNIT
    Sequence 5′ - 3′ ATT TAA ACC TTG TTG CCA TTG AC
19. Primer DFR - F, BIOSERVICE UNIT
    Sequence 5′ - 3′ ATC ATG AAA GAC TCT GTT GCT TC
20. Primer LCR - R, BIOSERVICE UNIT
    Sequence 5′ - 3′ AAG GAC CAG CTG TAA GAG TAG GG
21. Primer LCR - F, BIOSERVICE UNIT
    Sequence 5′-3′ TAA CTG ATG AAC AGA GCT TTG AT
22. Primer EF1 - R, BIOSERVICE UNIT
    Sequence 5′-3′ CAG GTA CCA GTG ATC ATG TTC TT
23. Primer EF1 - F, BIOSERVICE UNIT
    Sequence 5′ - 3′ GTT CAC ATT AAC ATT GTG GTC AT

3.4 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี สำหรับ agarose gel electrophoresis

3.4.1 วัสดุและอุปกรณ์

1. Gel chamber
2. Power supply
3. Gel Documentation System, Bio-Rad
4. Microwave, Sharp

3.4.2 สารเคมี

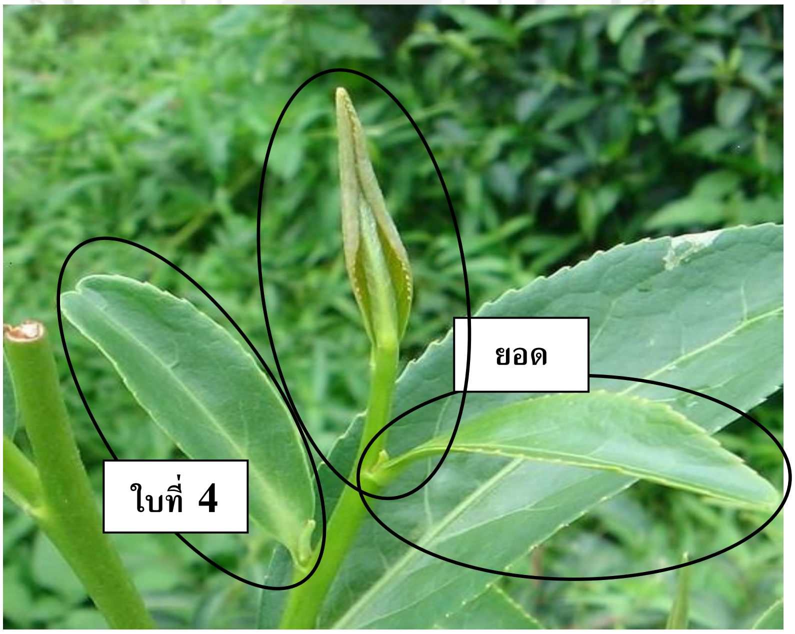
1. Ultra Pure™ Agarose, Bio - Rad
2. Boric acid, gread electrophoresis Purity Reagent, Bio-Rad
3. Ethylenediaminetetraacetic acid, (EDTA), disodium salt dihydrate Bio-Rad
4. Tris-base (Tris), Bio-Rad
5. Ethidium bromide, Invitrogen

3.5 วิธีการศึกษา

3.5.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บยอดชาตรงส่วนยอดและใบที่ 4 ดังรูปที่ 3.1 ใส่ถุงไล่อากาศออกให้หมด จึงปิดปากถุง นำไปเก็บแช่ในถังน้ำแข็งสำหรับใช้ในการสกัด RNA

ส่วนที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่ม catechins ให้นำใบชาไปอบด้วยเครื่องไมโครเวฟโดยใช้กำลังไฟขนาด 800 วัตต์ ความร้อนสูงสุด (อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 นาที (Gulati *et al.*, 2003) นำมาวิเคราะห์ทันทีหรือเก็บบรรจุในถุงพลาสติกเก็บไว้ในตู้เย็น



รูปที่ 3.1 การเก็บยอดและส่วนใบที่ 4 ของตัวอย่าง

3.5.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานของ catechins และ caffeine

เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 100 ppm (Stock solution) โดยชั่งสาร C, EC, ECG, CG, EGC, EGCG, GC, GCG, และ CF มาอย่างละ 1 มิลลิกรัม ผสมรวมกัน ละลายด้วยน้ำกลั่นให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 10 มิลลิลิตร จากนั้นเตรียมสารละลายที่ความเข้มข้นที่ 1, 5, 20, 40, 60, 80 และ 100 ppm โดยเตรียม Stock solution ในปริมาตรต่าง ๆดังตารางที่ 3.1 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 3000 ไมโครลิตร กรองสารละลายมาตรฐานที่ได้ด้วย syringe filter membrane 0.45 ไมครอน ใส่ vial ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC

ตารางที่ 3.1 การเจือจางสารละลาย Stock solution ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

Conc. (ppm)	**Stock solution (µl)**
1	30
5	150
20	600
40	1200
60	1800
80	2400
100	3000

3.5.3 การเตรียมสารสกัดจากยอดชา

ชั่งตัวอย่างชาบด 1 กรัม สกัดด้วยน้ำเดือด 100 มิลลิลิตร กวนผสมบน stirrer 10 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 4 จากนั้นทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นอัตราส่วนดังนี้ คือ น้ำชา : น้ำกลั่น (20:80) และ น้ำชา : น้ำกลั่น (10:90) แล้วกรองสารละลายตัวอย่างที่สกัดได้ด้วย syringe filter membrane ขนาด 0.45 ไมครอน ใส่ vial ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC

3.5.4 สภาวะของเครื่องของ HPLC

Column	:	Platinum EPS C18 100A 3U ขนาด 53x7 mm Rocket
Mobile phase	:	Water : Acetonitrile in 0.05% TFA (87:13)
Column temperature	:	30 องศาเซลเซียส
Flow rate	:	2 มิลลิลิตรต่อนาที
Detector	:	210 นาโนเมตร
Runtime	:	13 นาที
Injection volume	:	10 ไมโครลิตร

3.5.5 การเตรียมสกัด RNA จากยอดและใบที่ 4 ของชา

บดยอดและใบที่ 4 ของชาสดประมาณ 50-100 มิลลิกรัม ให้เป็นผงละเอียดใน liquid nitrogen เพื่อให้ตัวอย่างเย็นแข็งอยู่ตลอดเวลาและให้ง่ายต่อการบดและป้องกันการสลายตัวของ RNA ใส่ตัวอย่างที่บดแล้วลงใน eppendorf tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี TRIzol® reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติม chloroform 0.2 มิลลิลิตร พร้อมทั้งเขย่า 15 วินาที แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที นำไปปั่นที่ 10,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นดูดสารละลายชั้นบนใส่หลอดใหม่ เติม Isopropry alcohol 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเบา ๆทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำไปปั่นที่ 10,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เพื่อทำการตกตะกอน RNA แล้วเอาส่วนที่เป็น supernatant ออกพร้อมทั้งล้างตะกอน RNA ด้วย 75% Ethanol 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นที่ 7000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นเท supernatant ทิ้ง แล้วทำให้ตะกอน RNA ให้แห้ง และนำตะกอน RNA ที่ได้ละลายด้วย DEPC water 20 ไมโครลิตร ให้เข้ากันดีและเก็บ RNA ที่ได้ที่ -70 องศาเซลเซียส

3.5.6 การวัดปริมาณ RNA

ปิเปตตัวอย่าง RNA มา 4 ไมโครลิตร แล้วเติม DEPC water 996 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำวัดความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของ RNA ที่ 260 และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วคำนวณหาปริมาณ RNA เนื่องจาก RNA มีส่วนประกอบที่สำคัญ คือ เบสพิวรีนและไพริมิดีนซึ่งสามารถดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลตได้ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร จึงสามารถนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (OD_{260}) นี้นำมาใช้หาความเข้มข้นของ RNA โดยค่ามาตรฐาน 1 OD_{260} ของ

RNA มีค่าเท่ากับ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การทดลองนี้วัดปริมาณ RNA ที่เตรียมได้โดยการนำ RNA มาทำการเจือจางด้วย DEPC water แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ แล้วคำนวณหาความเข้มข้นของ RNA จากสมการดังต่อไปนี้

ความเข้มข้นของ RNA = OD_{260}ของRNA x จำนวนเท่าของ RNA ที่ถูกเจือจาง x 40 μl /ml

3.5.7 การวิเคราะห์คุณภาพ RNA

การวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของ RNA โดยการหาอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 นาโนเมตร RNA ที่มีความบริสุทธิ์จะต้องมีอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 1.8-2 (Center for Functional Genomics, 2003) ซึ่งค่าที่ได้ในช่วงนี้ยังอาจจะมีส่วนของดีเอ็นเอและโปรตีนปนเปื้อน แต่ถ้าค่าที่ได้ต่ำกว่า 1.8 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนอยู่มาก ซึ่งในการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของ RNA จะใช้เทคนิค gel electrophoresis ร่วมด้วย

3.5.8 การวิเคราะห์ RT-PCR

เตรียมส่วนประกอบของ RT-PCR reaction โดยปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 2X Reaction Mix (0.4 mM dNTP, 3.2 mM $MgSO_4$), 1 ไมโครกรัมของ RNA template, Forward Primer (10 μM), Reverse Primer (10 μM) และ SuperScript™ III RT/ Platinum® *Taq* Mix 2 Unit จากนั้นปรับปริมาตรด้วย DEPC water ให้มีปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำหลอดทั้งหมดเข้าเครื่อง Auto PCR โดยใช้โปรแกรมให้ดำเนินการตามลำดับดังนี้ โดยเริ่ม cDNA synthesis 1 รอบ : 55 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที Denaturation 1 รอบ : 94 องศาเซลเซียส นาน 2 นาทีจากนั้น PCR amplification 44 รอบ : 94 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที (denature) 60 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที (anneal) 68 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 30 วินาที (extend) สุดท้าย Final extension 1 รอบ 68 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที

3.5.9 การวิเคราะห์ผลผลิตที่ได้จากการทำ RT-PCR

เตรียมเจล 1.5% ใน 1x TBE ที่ปลอดเชื้อและเอนไซม์ RNase ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปหลอมในตู้ไมโครเวฟจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน วางทิ้งไว้จนกระทั่งอุณหภูมิลดลงประมาณ 55-60 องศาเซลเซียส จากนั้นก็เทลงในเบ้าสำหรับเตรียมเจล ทิ้งไว้จน agarose แข็งตัว นำไปใส่ในชุด electrophoresis เติม 1x TBE บัพเฟอร์จนท่วมผิวเจล นำตัวอย่างจาก RT-PCR 5 ไมโครลิตร เติม 6x loading dye 1 ไมโครลิตร และ DEPC water 3 ไมโครลิตร ผสมกัน แล้วนำไปหยอดในเจล จากนั้นทำการแยกโดยใช้กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ ผ่านเจลประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นนำเจลที่ได้ไปแช่ในสารละลาย ethidium bromide 5 นาที แล้วล้างด้วย sterile distilled water 15 นาที แล้วดูแถบที่ปรากฏภายใต้แสง UV

บทที่ 4

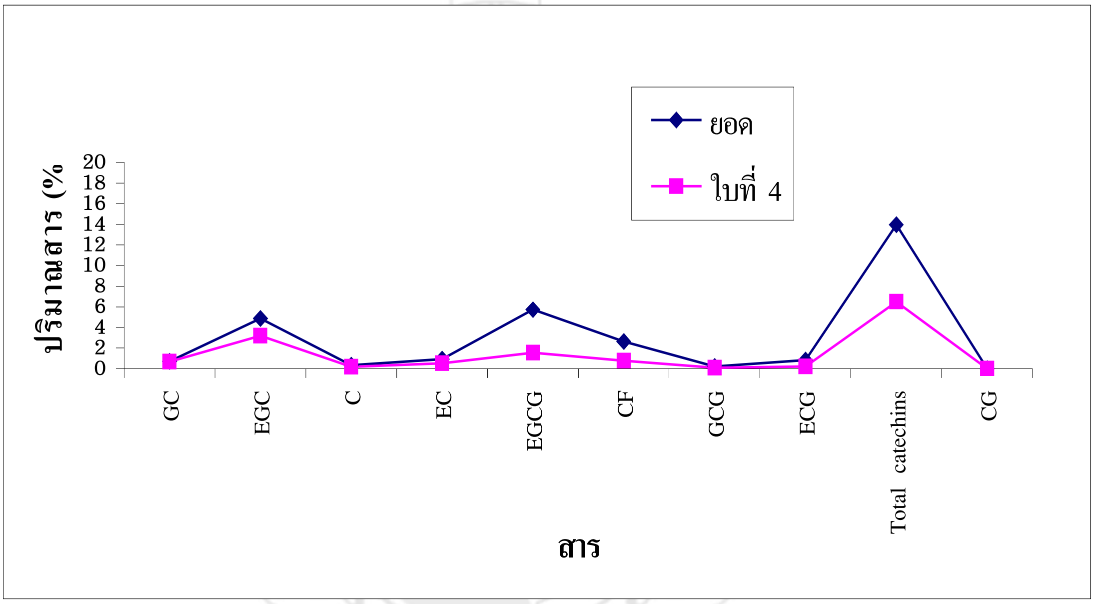
ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

4.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่ม catechins

จากการวิเคราะห์หาปริมาณสารในกลุ่ม catechins ได้แก่ GC, EGC, C, EC, EGCG, GCG, CG, ECG และ CF ซึ่งใช้น้ำร้อนสกัดจากยอดและใบที่ 4 ของชาอูหลงเบอร์ 17 โดยเทคนิค HPLC และใช้ mobile phase คือ Water : Acetronitrile in 0.05 % Trifluoroacetic acid (87:13) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส flow rate 2 นาทีต่อมิลลิลิตร และที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร ที่ใช้ในการแยกสารสกัดจากชาครั้งนี้ พบว่ามีปริมาณสารในกลุ่ม catechins และ caffeine แต่ละตัวในยอดและใบที่ 4 โดยเฉลี่ยแสดงดังตารางที่ 4.1 ดังนี้ GC 0.709%, EGC 4.860%, C 0.338%, EGCG 5.740%, EC 0.914%, GCG 0.210%, ECG 0.823%, และ CF 2.617% ส่วนปริมาณ CG ไม่สามารถวัดได้ ส่วนในใบที่ 4 พบว่ามีปริมาณสารในกลุ่ม catechins และ caffeine แต่ละตัวโดยเฉลี่ยดังนี้ GC 0.682%, EGC 3.198%, C 0.198%, EC 0.535%, EGCG 1.559%, GCG 0.104%, ECG 0.225%, และ CF 0.783% ส่วนปริมาณ CG ไม่สามารถวัดได้ ซึ่งผลรวมค่าเฉลี่ยของสารกลุ่ม catechins สามารถนำมาใช้เป็นค่าปริมาณ total catechins ได้ พบว่ามีค่าเฉลี่ยในยอดเท่ากับ 13.594% และในใบที่ 4 6.501% เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบในกลุ่ม catechins และ caffeine ในยอดและใบที่ 4 จะเห็นได้ว่าปริมาณสารแต่ละตัวในยอดจะมีปริมาณสูงกว่าในใบที่ 4 อย่างเห็นได้ชัดเจน (รูปที่ 4.1) จากการวิเคราะห์ทางสถิติ t-test พบว่าปริมาณ EGCG, ECG และ total catechins ในยอดและใบที่ 4 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $\alpha = 0.05$ ซึ่งจากการศึกษาวิเคราะห์ผลปริมาณสารในกลุ่ม catechins และ caffeine ที่ได้จะสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lin และคณะ (1996) ซึ่งพบว่าในยอดจะมีปริมาณสารในกลุ่ม catechins และ caffeine อยู่มากเมื่อเปรียบเทียบกับใบแก่และลำต้น

ตารางที่ 4.1 ปริมาณสารในกลุ่ม catechins และ caffeine ในยอดและใบที่ 4 ของชา

Name	**total catechins**	ปริมาณสาร (%)								
		GC	EGC	C	EC	EGCG	CG	GCG	ECG	CF
ยอด	13.594	0.709	4.860	0.338	0.914	5.740	trace	0.210	0.823	2.617
ใบที่ 4	6.501	0.682	3.198	0.198	0.535	1.559	trace	0.104	0.225	0.783



รูปที่ 4.1 เปรียบเทียบปริมาณสารในยอดและใบที่ 4 ของชา

4.2 ผลการของการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR

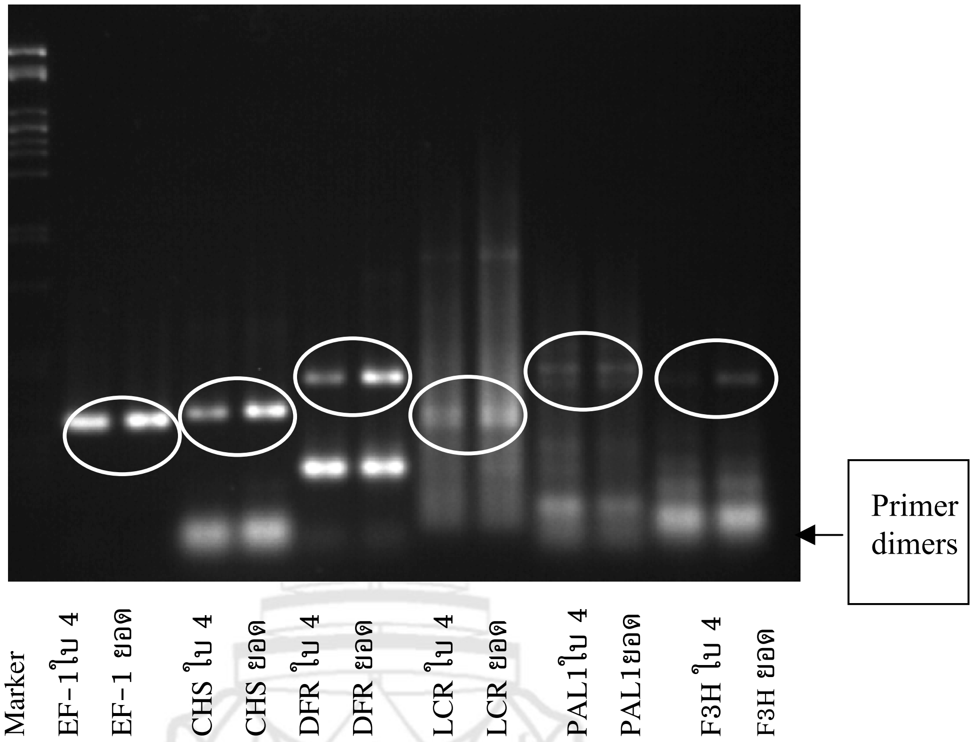
จากผลวิเคราะห์ปริมาณ catechins พบว่ามีความแตกต่างกันในยอดและใบที่ 4 จากนั้นจึงทำการศึกษาดูการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ catechins ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยเริ่มจากการวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของ RNA โดยการหาอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 nm RNA ที่มีความบริสุทธิ์จะต้องมีอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 nm เท่ากับ 2.0 ถ้าต่ำกว่า 2.0 แต่มากกว่า 1.8 แสดงว่าอาจจะมีส่วนของ DNA และโปรตีนปนเปื้อน แต่ถ้าหากค่าที่ได้ต่ำกว่า 1.8 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนอยู่มาก (Center for Functional Genomics, 2003) จากการทดลองการสกัด RNA จากยอดและใบที่ 4 ของชาอูหลง เบอร์ 17 โดยใช้ Trizol Reagent พบว่าปริมาณ RNA ในยอดมี 1.850 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และในใบที่ 4 มีปริมาณ 2.060 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เมื่อนำไปวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของ RNA จากอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 ต่อ 280 นาโนเมตร พบว่าในยอดชามีค่าเท่ากับ 1.360 และในใบที่ 4 มีค่าเท่ากับ 1.420 ซึ่งต่ำกว่า 1.8 แสดงว่าตัวอย่าง RNA จากทั้งสองแหล่งอาจมีการปนเปื้อนของโปรตีน

ผลการวิเคราะห์ของการแสดงของยีน CHS, DFR, LCR, PAL1, และ F3H ในยอดและใบที่ 4 ของชาอูหลง เบอร์ 17 ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ primers ที่ออกแบบขึ้นมาใหม่ พบว่าผลของการแสดงออกของแต่ละยีน เมื่อดูจากแถบแบนที่ปรากฏจะเกิดขึ้นหลายแบนดังรูปที่ 4.1 ซึ่งอาจเกิดจากการออกแบบ primers ที่ใช้ไม่จำเพาะกับยีนนั้นๆ และเกิด dimer primers ขึ้นจึงทำให้มีหลายแถบ DNA เกิดขึ้น นอกจากนั้นอาจเป็นได้ที่ยีนต่างๆเหล่านี้มีมากกว่า 1 copy ในตัวอย่างชาอูหลง เบอร์ 17 ของการวิจัยนี้ ทำให้เกิด RT-PCR products ขึ้นหลายแถบ อย่างไรก็ดีขนาดของ RT-PCR product ของแต่ละยีนที่คาดหมายไว้คือ EF-1 305 bp, CHS 348 bp, DFR 405 bp, LCR 448 bp, PAL1 326 bp, และ F3H 246 bp ซึ่งจะใช้ EF-1 ซึ่งเป็นยีน housekeeping ในพืช ถูกใช้เป็นตัว control เพื่อให้ปริมาณ RNA ที่ใช้ในแต่ละ RT-PCR reaction มีความสม่ำเสมอเท่ากันทุก reaction ผลการทดลองพบว่าการแสดงออกของยีน CHS, DFR, LCR ในยอดมีมากกว่าในใบที่ 4 แต่สำหรับการแสดงออกของยีน PAL1 ไม่สามารถระบุความแตกต่างได้ ส่วนยีน F3H พบว่ามีการแสดงออกในยอดแต่ในใบที่ 4 ไม่ปรากฏ

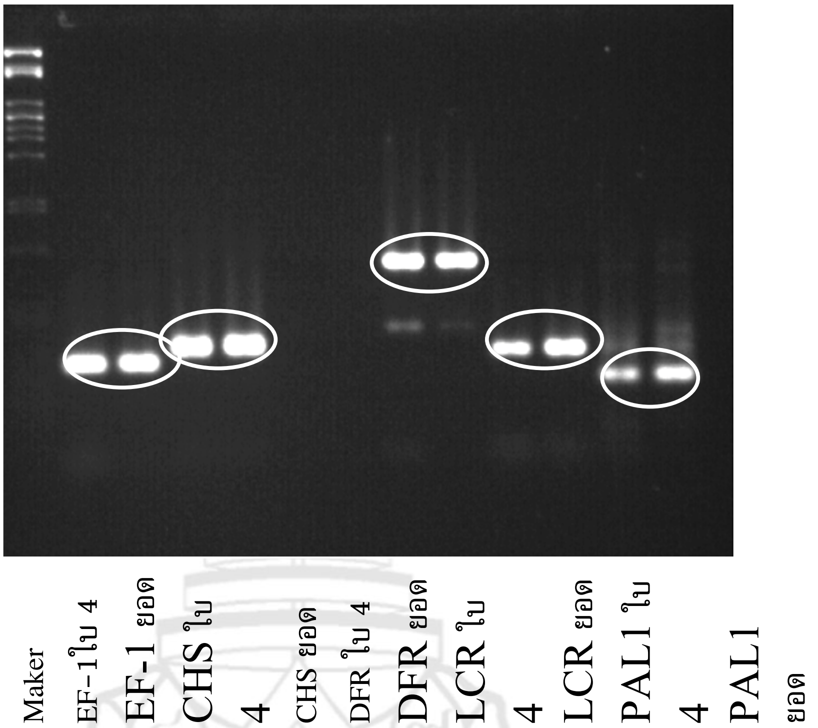
อย่างไรก็ดีผลการทดลองที่ได้จาก primers ที่ออกแบบขึ้นมาใหม่ ไม่สามารถนำมาสรุปเป็นแบบแผนการแสดงออกของยีนต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ catechins ที่น่าเชื่อถือได้ เนื่องจากแถบ DNA ที่เกิดขึ้นหลายแถบดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ดังนั้นเพื่อผล RT-PCR ที่ดีขึ้นจึงได้นำ primers ที่ออกแบบโดย Park และคณะ (2004) มาใช้ในการศึกษาตัวอย่างชา

อูหลง เบอร์ 17 ซึ่งขนาดที่คาดหมายของ RT-PCR products ของแต่ละยีน คือ PAL1 326 bp, CHS 348 bp, LCR 448 bp, F3H 246 bp, และ EF-1 305 bp ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.3 พบว่าแต่ละคู่ primers ให้ RT-PCR products เพียงแถบเดียว สำหรับยีน DFR ไม่พบว่าเกิด RT-PCR product ขึ้น ซึ่งอาจเกิดจากความแตกต่างของพันธุ์กรรมของชาอูหลง เบอร์ 17 ที่เราใช้ กับตัวอย่างชาที่ Park และคณะใช้ในปี 2004

สำหรับการแสดงออกของยีน F3H PAL1 ที่เห็นได้ชัดเจนว่ามีการแสดงออกในยอดมากกว่าในใบที่ 4 ส่วน CHS และ LCR พบว่ามีการแสดงออกไม่แตกต่างกันมากนักในยอดและในใบที่ 4 ซึ่งจากการวิจัยของ Park และคณะ (2004) ที่ดูการแสดงออกของยีนเหล่านี้ในยอดอ่อนและใบแก่ พบว่ามีความแตกต่างเป็นอย่างมาก ดังรูปที่ 2.18 ทั้งนี้ตัวอย่างที่เราใช้นั้น คือ RNA จากยอดซึ่งรวมใบที่ 2 และใบที่ 3 เปรียบเทียบกับ RNA จากใบที่ 4 ซึ่งอายุของทั้งสองตัวอย่างไม่ต่างกันนัก จึงอาจทำให้การแสดงออกของยีนไม่ต่างกันมากอย่างที่พบในการวิจัยของ Park และคณะ (2004) การมีจำนวน copy ของยีนมากกว่า 1 copy ในตัวอย่างชาอูหลง เบอร์ 17 อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผลการแสดงออกของยีนไม่แตกต่างกันมากนัก



รูปที่ 4.2 ผลการแสดงออกของยีนแต่ละยีนในยอดและใบที่ 4 โดยใช้ primers ที่ออกแบบขึ้นมาใหม่ แถบ DNA ในวงรี คือ แถบที่มีขนาดตรงกับที่คาดหมายของยีนแต่ละตัว



รูปที่ 4.3 ผลการแสดงออกของยีนแต่ละยีนในยอดและใบที่ 4 โดยใช้ primers ที่ออกแบบโดย Park และคณะ (2004) แถบ DNA ในวงรี คือ แถบที่มีขนาดตรงกับที่คาดหมายของยีนแต่ละตัว

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล

จากความสัมพันธ์ของปริมาณสารในกลุ่ม catechins โดยเทคนิค HPLC กับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ catechins โดยเทคนิค RT-PCR ในยอดและใบที่ 4 ของชาอูหลง เบอร์ 17 พบว่ามีปริมาณ total catechins, EGCG, และ ECG ในยอดมีปริมาณสารสูงกว่าในใบที่ 4 อย่างเห็นได้ชัดเจน ส่วนการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ catechins พบว่า PAL1 และ F3H มีการแสดงออกในยอดมากกว่าในใบที่ 4 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Park และคณะ (2004) ส่วนการแสดงออกของ CHS และ LCR ไม่สามารถระบุความแตกต่างได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะมียีนดังกล่าวในชาอูหลง เบอร์ 17 มากกว่า 1 copy ซึ่งสามารถทำการพิสูจน์โดยใช้วิธี Southern analysis ความเป็นไปได้อีกประการ คือ การแสดงออกของยีนในยอดชาและใบชาที่ 4 ไม่แตกต่างกันมาก เนื่องจากอายุของตัวอย่างที่ไม่ต่างกันมาก ทั้งนี้สังเกตได้จากการแสดงออกของ PAL1 และ F3H ในใบที่ 4 ยังค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับการแสดงออกของยีนดังกล่าวในใบแก่ (ไม่ได้ระบุว่าเป็นใบที่เท่าไร) Park และคณะ (2004) ส่วนยีน DFR ไม่พบการแสดงออกเลย เมื่อใช้ primers ที่สร้างจาก Park และคณะ (2004) ทั้งนี้น่าจะเป็นเพราะชาที่ใช้ในการทดลองนี้มีความแตกต่างทางพันธุ์กรรมกับชาของ Park และคณะ (2004) ซึ่งไม่ได้ระบุว่าเป็นชาชนิดใด

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ในการสกัด RNA ให้ได้ปริมาณมากและสมบูรณ์นั้นต้องอาศัยความชำนาญในระดับหนึ่ง เนื่องจากว่า RNA จะสลายตัวได้ง่ายและเร็ว ปัญหาที่พบจากการสกัด RNA คือ ปริมาณ RNA ที่ได้น้อยและมีการปนเปื้อนของ DNA สามารถตรวจสอบโดยเทคนิค electrophoresis จะเห็นแถบของ DNA ปรากฏในเจลด้วย นอกจากนั้นอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัด RNA ต้องผ่านกระบวนการทำให้ปลอดจาก RNase โดยการ clave ฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง รวมทั้งควรใส่ถุงมือทุกครั้งที่มีการจับอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการสกัด RNA เนื่องจากอาจเกิดการปนเปื้อน RNase จากผิวหนังได้ด้วย

2. ในการทดลองวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ครั้งนี้พบว่าค่า retention time ของสารละลายมาตรฐานบางตัวจะมีการคาดเคลื่อนบางเล็กน้อย อันเนื่องมาจากประสิทธิภาพของ column และ guard column ที่มีการใช้งานมาก จึงมีผลต่อการแยกของ peak และ ค่า retention time นอกจากนี้ยังเกิดจากสาเหตุการเตรียมตัวอย่าง และ mobile phase ทำให้มีผลต่อการแยก จึงจำเป็นต้องเปลี่ยน column ใหม่ ดังที่กล่าวมานี้ในการทดลองทุกครั้งจึงต้องอาศัยความละเอียดอย่างมากในการชั่งและตวงสารเคมีทุกครั้งต้องมั่นใจว่าสารเคมีละลายผสมกันเป็นเนื้อเดียวกัน และที่สำคัญวัสดุอุปกรณ์ของ HPLC จะแพง จึงต้องมีการวางแผนก่อนทุกครั้ง จากประสบการณ์ของผู้วิจัยในบางครั้งต้องมีการปรับเปลี่ยนสภาวะของ HPLC เพื่อให้เหมาะสมกับการทดลองในแต่ละครั้งเมื่อเกิดปัญหาขึ้น

บรรณานุกรม

การใช้เครื่องมือวิเคราะห์ทางเคมี. : เอกสารประกอบการฝึกอบรม, (2544). กรุงเทพฯ : กรมวิทยาศาสตร์บริการ.

แม้น อมรสิทธิ์ และ อมร เพชรสม. (2539). **หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ.** กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สัณห์ ละอองศรี. (2535). **ชา.** กรุงเทพฯ : รั้วเขียว.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. (2543). **พันธุ์วิศวกรรมเบื้องต้น.** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เอกสารเทศกาลชาโลก 6-5 กุมภาพันธ์ (2547). เชียงราย : กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

Laboratory Manual From Cell to ATGC in 7 Days. (2547). ณ อาคารกิบไทย 30 ตุลาคม- 5พฤศจิกายน. กรุงเทพฯ : สมาคมเทคนิคการแพทย์แห่งประเทศไทย.

Baruah, S., and et..al. (1986). The effect of plucking intervals on the chemical constituents of CTC black teas. **Agric. Biol. chem.** 50 : 1093 - 1041.

Chen, Z.M. and Han, B.Y. (2002). Composition of the volatiles from intact and tea aphid - damaged tea shoots and their allurement to several natural enemies of the tea aphid. **J. Applied Entomology** 126 : 497.

Cheng, I.F. and Breen, K. (2000). On the ability of four favonoids, baicilein, luteolin, naringenin, and quercetin, tosuppress the fenton reaction of the iron-ATP complex. **Biomaterials.** 13 : 7-11.

Dalluge, J.J. and Nelson, B.C. (2000). Determination of tea catechins. **J. Chromatography A.** 881 : 411-424.

Duthie, G.G., and et..al. (2000). Plant polyphenols in cancer and heart disease : implications as nutritional antioxidants. **Nutr. Res. Rev.** 13 : 79-106.

Forrest, G.I. and Bendall, D.S. (1969). The distribution of polyphenols in the tea plant *(Camellia Sinensis L)*. **J. Biochem.** 113 : 741-755.

Graham, H.N. (1992). Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. **Prev. Med.** 21 : 334-350.

Gulati, A., and et..al. (2003). Application of Microwave Energy in the Manufacture of Enhanced-Quality Green Tea. **J. Agric. Food Chem.** 51 : 4764-4768.

Hara, Y., and et..al. (1995). Special issue on tea. **Food Rev. Int.** 1(3) : 371-345.

Harbowy, M.E. and Balentine, D.A. (1997). Tea Chemistry. Crit. Rev. In **Plant Sci.** 16(5) : 415-480.

Hilton, P.J. and Palmer, J.R. (1973). Relationship between the flavanol composition of fresh tea shoot and the theaflavin content of manufactured tea. **J. Sci. Food Agric.** 24(7) : 813-818.

Katiyar, S.K., and et..al. (1994). Inhibition of spontaneous and photo- enhanced lipid peroxdation in mouse epidermal microsome by epicatechin derivative from green tea. **Cancer Lett.** 79 : 61-66.

Lakenbrink, C., and et..al. (2000). Flavonoid and other polyphenol in consumer brews of tea and other caffeinated beverages. **J. Agric. Food Chem.** 48(7) : 2848-2852.

Park, J.S., and et..al. (2004). EST analysis of genes involved in secondary metabolism in *Camellia sinensis* (tea), using suppression subtractive hybridization. **Plant Science.** 166 : 953-961.

Peterson, J. and Dwyer, J. (1998). Flavonoids : dietary occurrence and biochemical activity. **Nutr. Res** 18(12) : 1995-2018.

Soczynska-Kordala,M., and et..al. (2001). Metal ion-flavonoid associations in bilayer phospholipid membranes. **Cell Mol. Biol. Lett.** 6 : 277-281.

Xie, D.Y., and et..al. (2003). Role of anthocyanidin reductase encode by *BANYULS* in plant flavonoid biosynthesis. **J.Science.** 299 : 396-399.

Yang, M., and et..al. (2001). Green, oolong and black tea extracts modulate lipid metabolism in hyperlipidemia rats fed high-sucrose diet. **J. Nutr. Biochem.** 12(1) : 14-20.

Yamamoto, T., and et..al. (1997). **Chemistry and Applications of Green Tea.** New York : CRC.

ภาคผนวก ก

ข้อมูลของ RT-PCR

1. ผลการคำนวณปริมาณ RNA

นำค่า OD_{260} มาใช้หาความเข้มข้นของ RNA โดยให้ค่ามาตรฐาน 1 OD_{260} ของ RNA มีค่าเท่ากับ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ใบที่ 4

ความเข้มข้นของRNA = 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร x OD_{260} x ค่าการเจือจาง
= 40 x 0.206 x 250
= 2060 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
= 2.060 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

ยอด

ความเข้มข้นของRNA = 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร x OD_{260} x ค่าการเจือจาง
= 40 x 0.185 x 250
= 1850 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
= 1.850 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

2. ผลการคำนวณคุณภาพของคุณภาพของ RNA

หาได้จากการนำค่า OD_{260} หารด้วย OD_{280} มาคำนวณ

ใบที่ 4

$$\frac{0.206}{0.145} = 1.420$$

ยอด

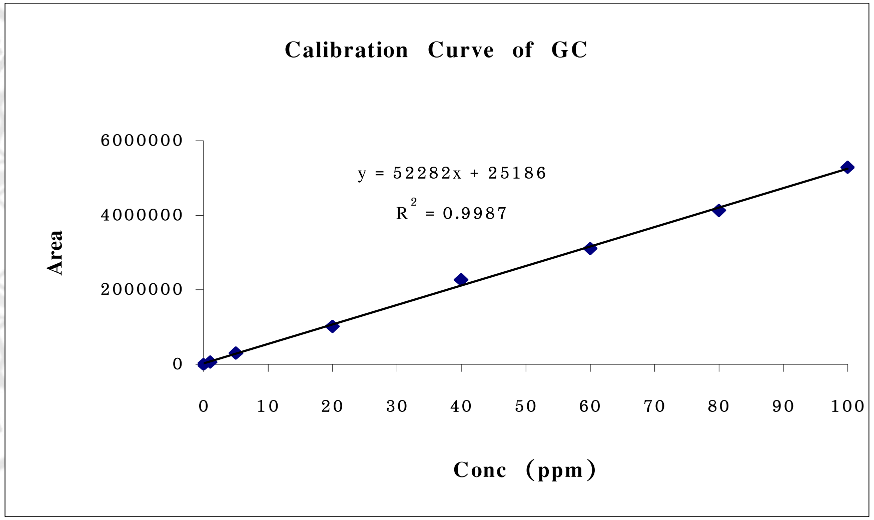
$$\frac{0.185}{0.136} = 1.360$$

ภาคผนวก ข

ข้อมูลดิบของ HPLC

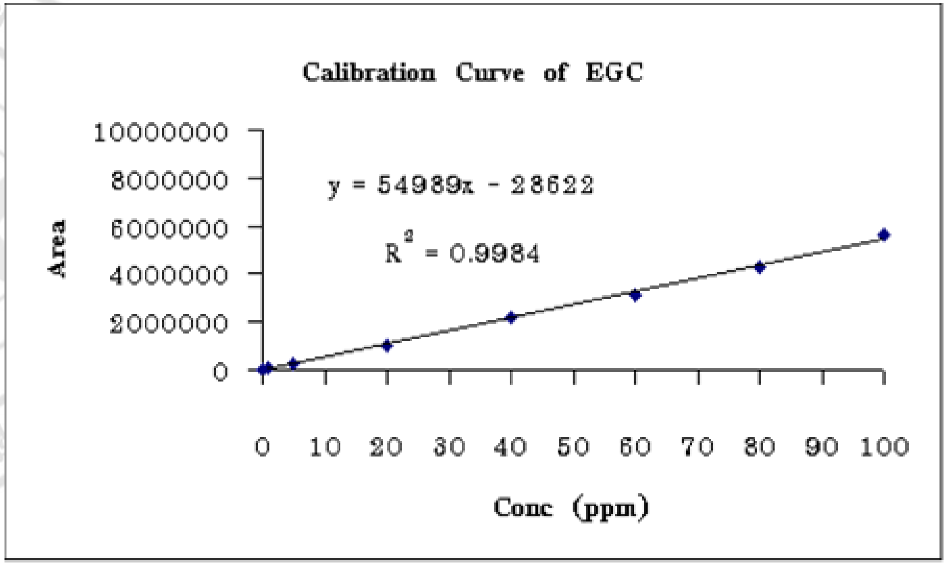
ตารางที่ 1 ผล และ Calibration curve ของสารละลายมาตรฐานของสาร GC ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Conc	Area	Calc.value	%Deviation
0	0	0	0
1	61144.6	1.16174	16.174
5	308155	5.85493	17.099
20	1025740	19.489	-2.555
40	2269802	43.1261	7.815
60	3110344	59.0963	-1.506
80	4135871	78.5813	-1.773
100	5288678	100.485	0.485



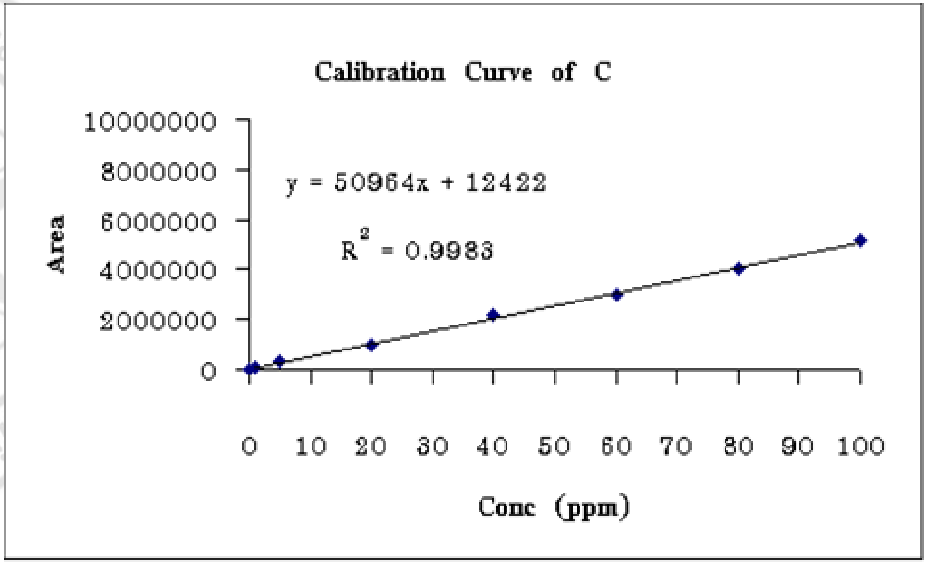
ตารางที่ 2 ผล และ Calibration curve ของสารละลายมาตรฐานของสาร EGC ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Conc	Area	Calc.value	%Deviation
0	0	0	0
1	54140.5	1.07701	7.701
5	264446	5.2606	5.212
20	905269	18.0084	-9.958
40	2065881	41.0963	2.741
60	2854816	56.7905	-5.349
80	3926904	78.1174	-2.353
100	5196727	103.378	3.378



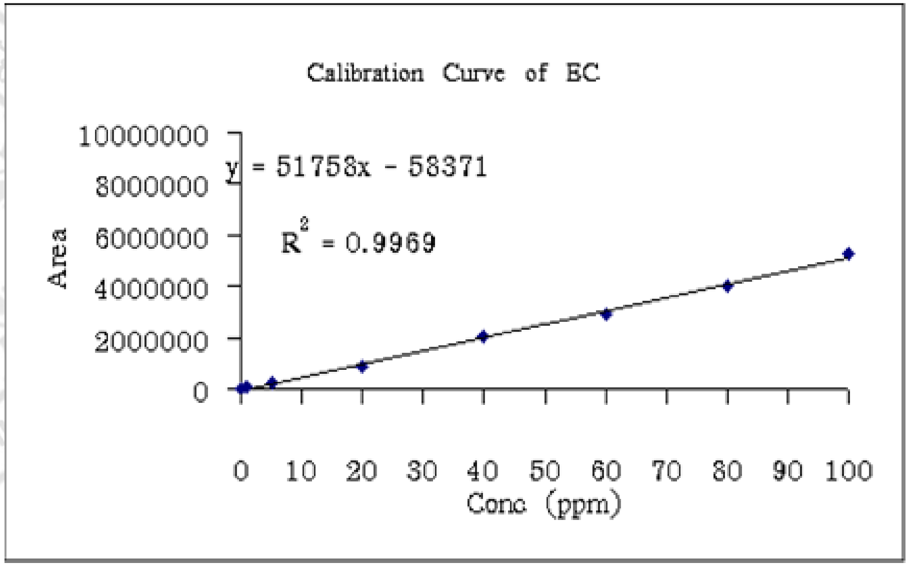
ตารางที่ 3 ผล และ Calibration curve ของสารละลายมาตรฐานของสาร C ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

Conc	Area	Calc.value	%Deviation
0	0	0	0
1	65709.7	1.28499	28.499
5	291685	5.70406	14.081
20	984856	19.2594	-3.703
40	2182128	42.6727	6.682
60	2983076	58.3357	-2.774
80	3992282	78.0713	-2.411
100	5194564	101.583	1.583



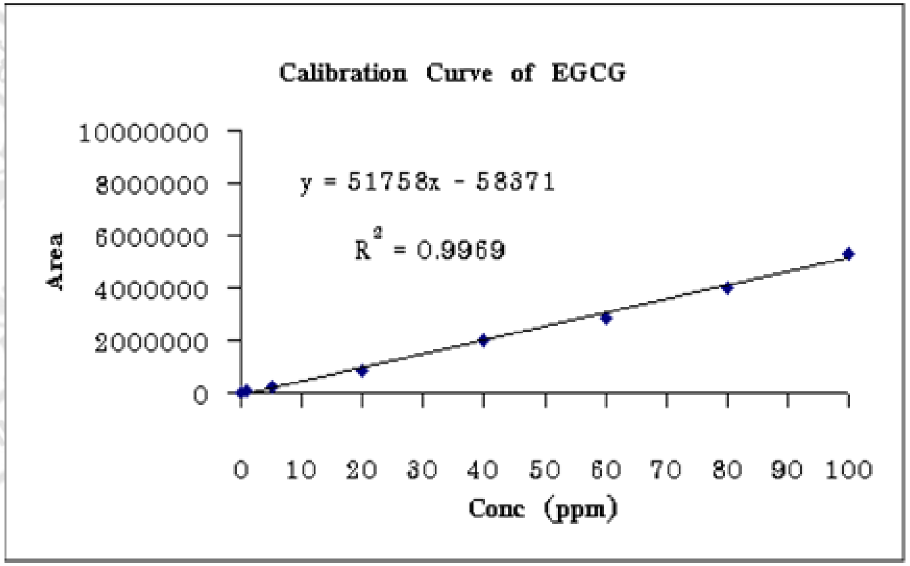
ตารางที่ 4 ผล และ curve ของสารละลายมาตรฐานของสาร EC ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

Conc	Area	Calc.value	%Deviation
0	0	0	0
1	45286.9	0.88889	-11.111
5	247856	4.86493	-2.701
20	881954	17.3111	-13.445
40	2021593	39.68	-0.8
60	2876529	56.4607	-5.899
80	3999912	78.5106	-1.862
100	5297958	103.989	3.989



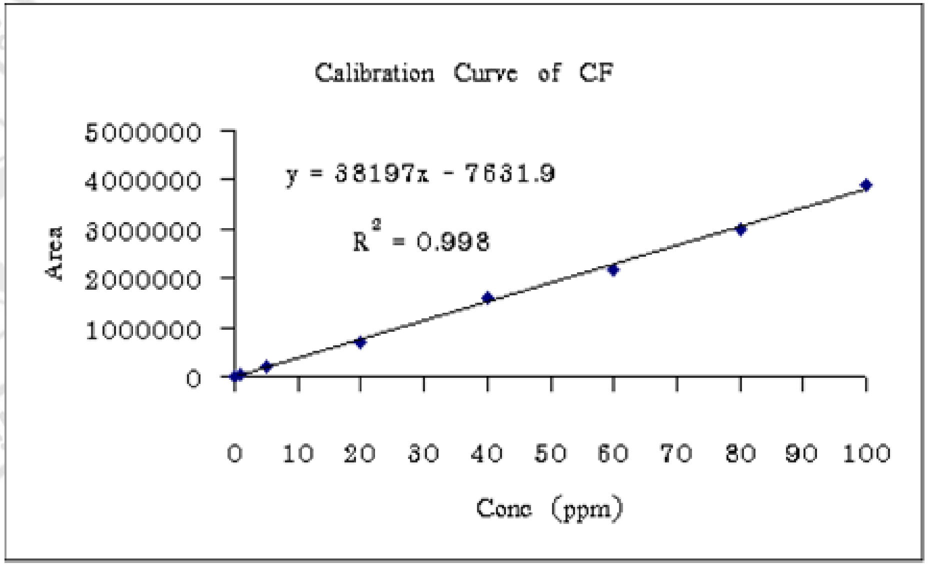
ตารางที่ 5 ผล และ Calibration curve ของสารละลายมาตรฐานของสาร EGCE ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

Conc	Area	Calc.value	%Deviation
0	0	0	0
1	45286.9	0.88889	-11.111
5	247856	4.86493	-2.701
20	881954	17.3111	-13.445
40	2021593	39.68	-0.8
60	2876529	56.4607	-5.899
80	3999912	78.5106	-1.862
100	5297958	103.989	3.989



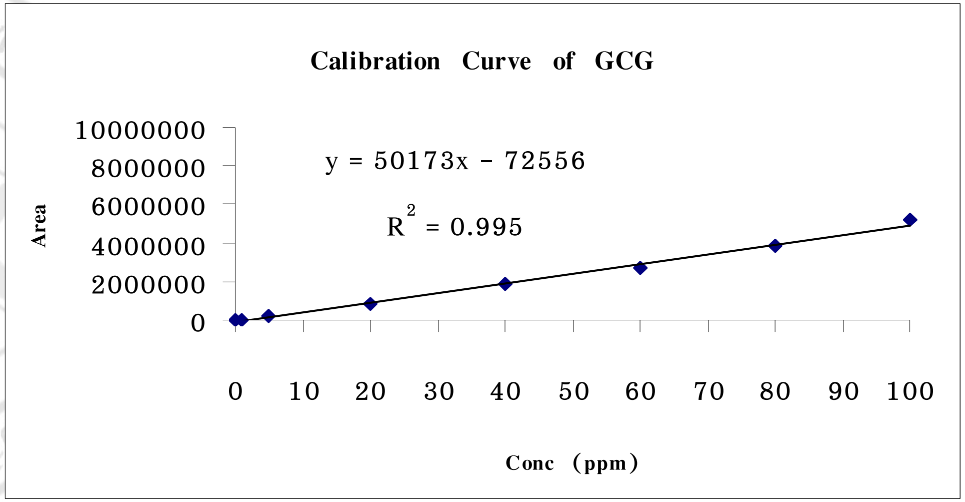
ตารางที่ 6 ผล และ Calibration curve ของสารละลายมาตรฐานของสาร CF ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

Conc	Area	Calc.value	%Deviation
0	0	0	0
1	46938.2	1.23225	23.225
5	215268	5.65135	13.027
20	708017	18.5874	-7.063
40	1582441	41.5433	3.858
60	2185418	57.3731	-4.378
80	2981616	78.2754	-2.156
100	3907646	102.586	2.586



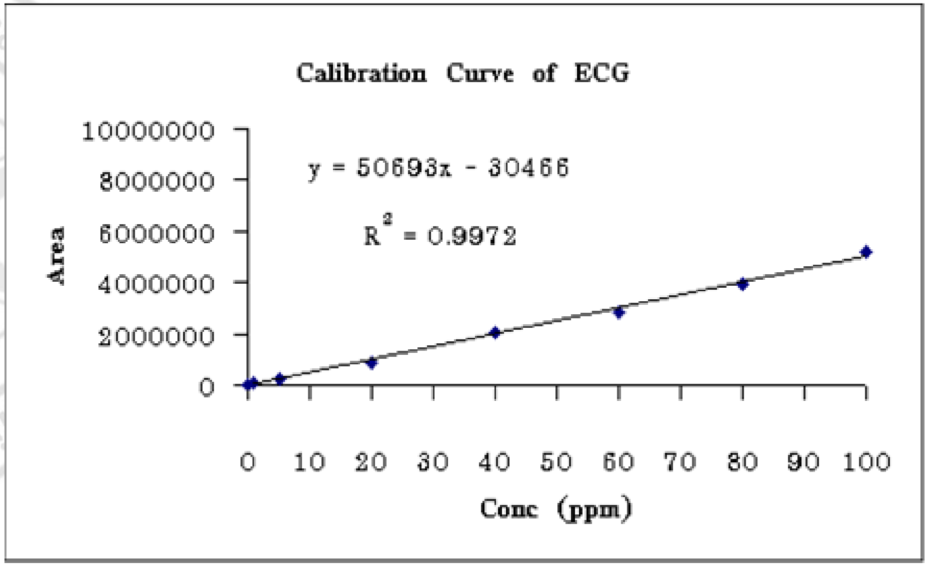
ตารางที่ 7 ผล และ Calibration curve ของสารละลายมาตรฐานของสาร GCG ที่ความเข้มข้นต่างๆ

Conc	Area	Calc.value	%Deviation
1	43577.8299	0.88635	-11.364
5	240860.047	4.89899	-2.02
20	835029.960	16.9841	-15.076
40	1913679.85	38.9234	-2.691
60	2697583.19	54.8677	-8.554
80	3880974.38	78.9374	-1.328
100	5160832.52	104.969	4.969



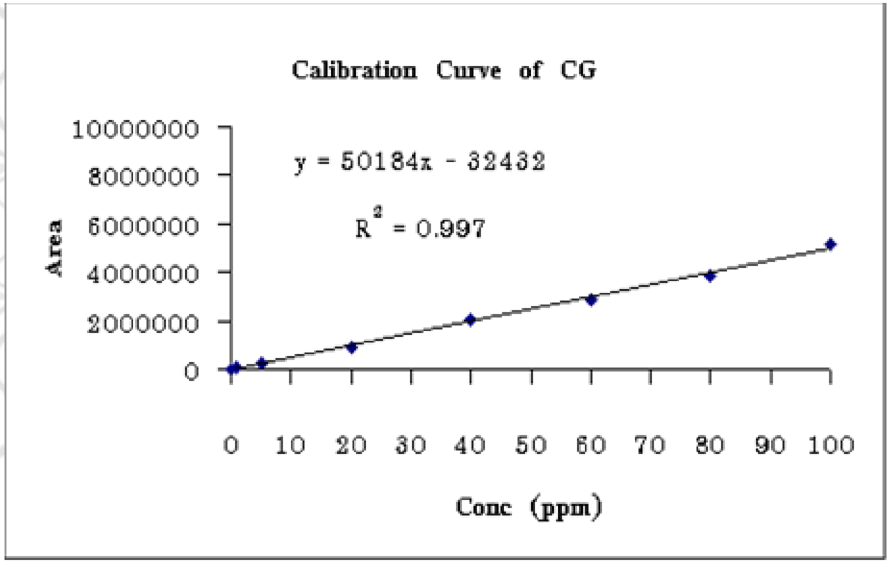
ตารางที่ 8 ผล และ Calibration curve ของสารละลายมาตรฐานของสาร ECG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

Conc	Area	Calc.value	%Deviation
0	0	0	0
1	54140.5	1.07701	7.701
5	264446	5.2606	5.212
20	905269	18.0084	-9.958
40	2065881	41.0963	2.741
60	2854816	56.7905	-5.349
80	3926904	78.1174	-2.353
100	5196727	103.378	3.378



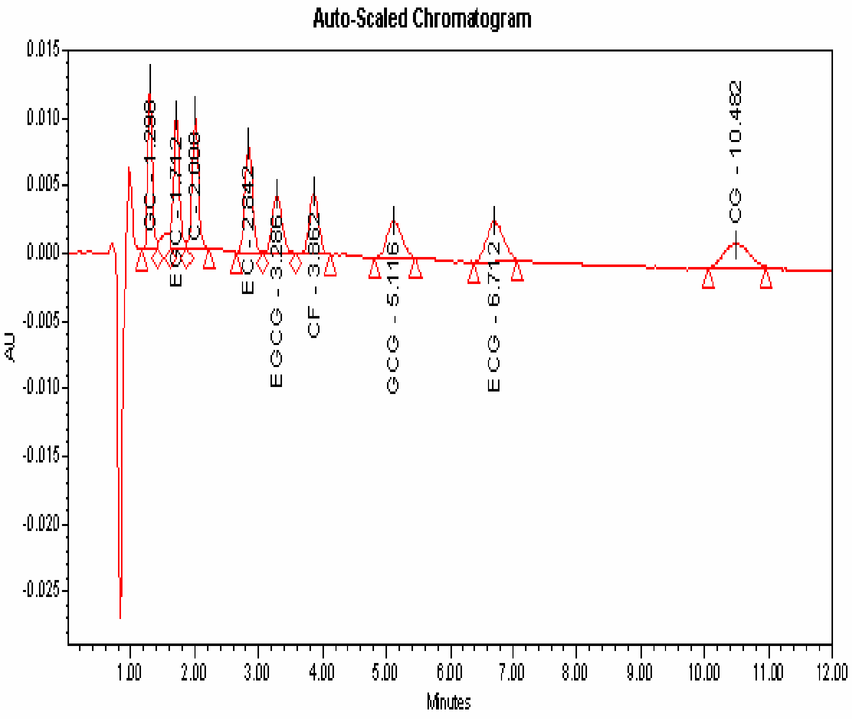
ตารางที่ 9 ผล และ Calibration curve ของสารละลายมาตรฐานของสาร CG ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

Conc	Area	Calc.value	%Deviation
0	0	0	0
1	48260.3	0.97037	-2.963
5	245371	4.93369	-1.326
20	907395	18.2451	-8.775
40	2050736	41.2343	3.086
60	2836708	57.0379	-4.937
80	3853331	77.4792	-3.151
100	5155138	103.655	3.655



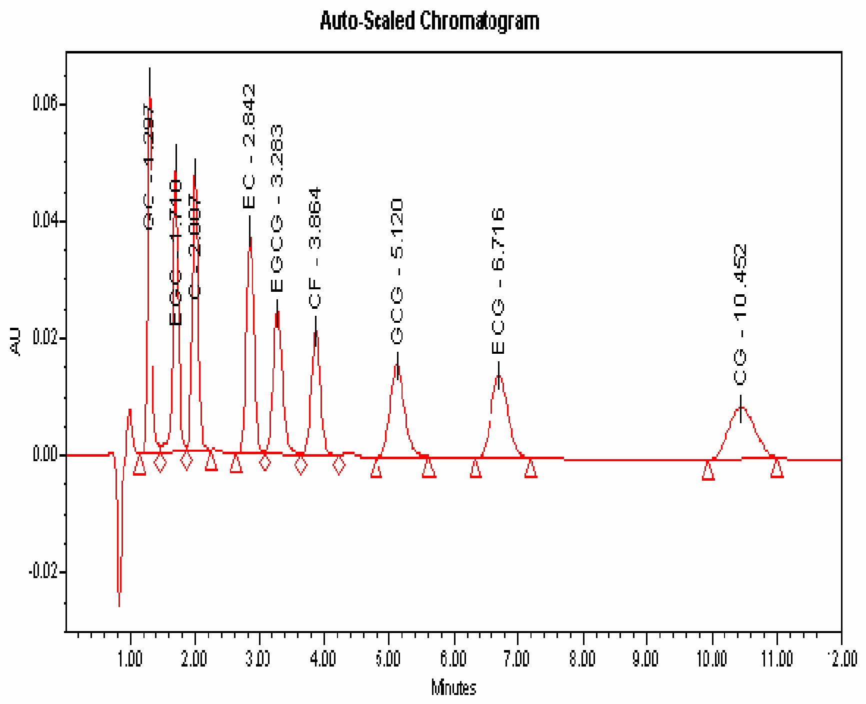
ตารางที่ 10 ผลและ chromatogram มาตรฐานของสารในกลุ่ม catechins และ caffeine ที่ความเข้มข้น 1 ppm

Name	RT	Area	Height	Amount	Unit
GC	1.298	61145	12593	1	ppm
EGC	1.712	606622	9793	1	ppm
C	2.008	65710	10219	1	ppm
EC	2.842	64774	7984	1	ppm
EGCG	3.286	45287	4329	1	ppm
CF	3.862	46938	4586	1	ppm
GCG	5.116	43578	2755	1	ppm
ECG	6.712	54141	2887	1	ppm
CG	10.482	48260	1784	1	ppm



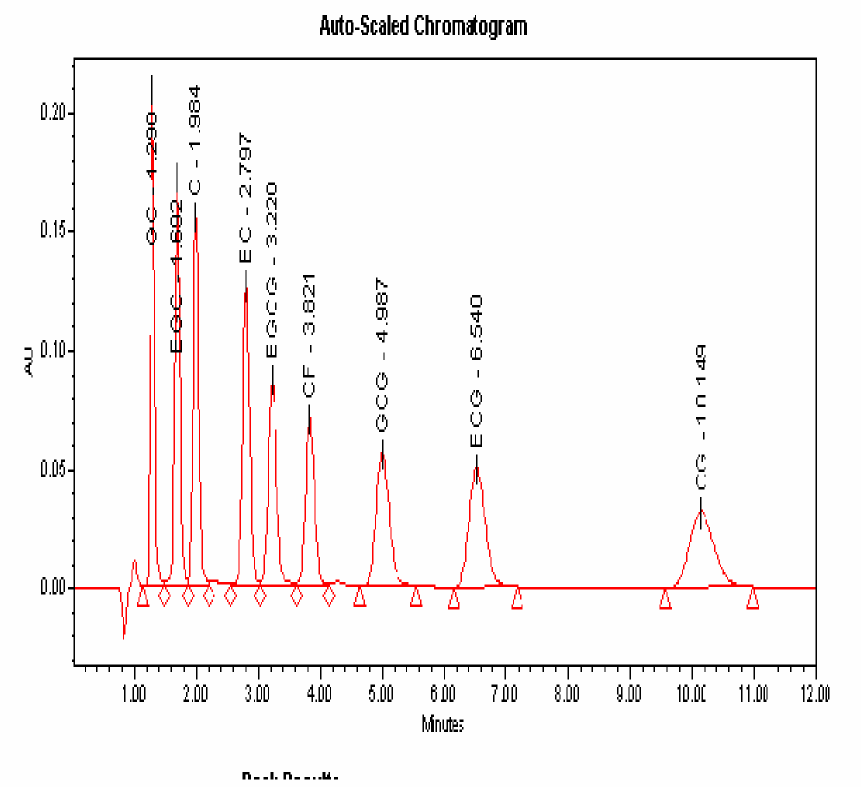
ตารางที่ 11 ผลและ chromatogram มาตรฐานของสารในกลุ่ม catechins และ caffeine ที่ความเข้มข้น 5 ppm

Name	RT	Area	Height	Amount	Unit
GC	1.297	308155	63062	5	ppm
EGC	1.710	293136	49558	5	ppm
C	2.007	291685	47514	5	ppm
EC	2.842	301395	38169	5	ppm
EGCG	3.283	247856	24502	5	ppm
CF	3.864	215268	21431	5	ppm
GCG	5.120	240860	15680	5	ppm
ECG	6.716	264446	14347	5	ppm
CG	10.452	245371	8881	5	ppm



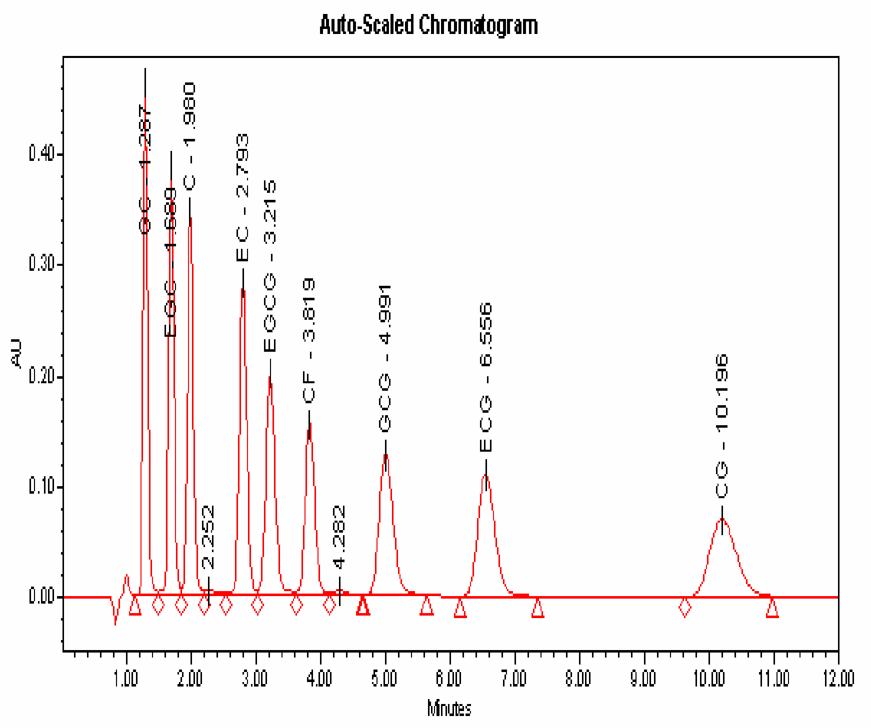
ตารางที่ 12 ผลและ chromatogram มาตรฐานของสารในกลุ่ม catechins และ caffeine ที่ความเข้มข้น 20 ppm

Name	RT	Area	Height	Amount	Unit
GC	1.29	1025740	208431	20	ppm
EGC	1.692	987047	170969	20	ppm
C	1.984	984856	157218	20	ppm
EC	2.797	1014203	127533	20	ppm
EGCG	3.220	881954	88020	20	ppm
CF	3.821	708017	70573	20	ppm
GCG	4.987	835030	56281	20	ppm
ECG	6.540	905269	50079	20	ppm
CG	10.149	907395	31823	20	ppm



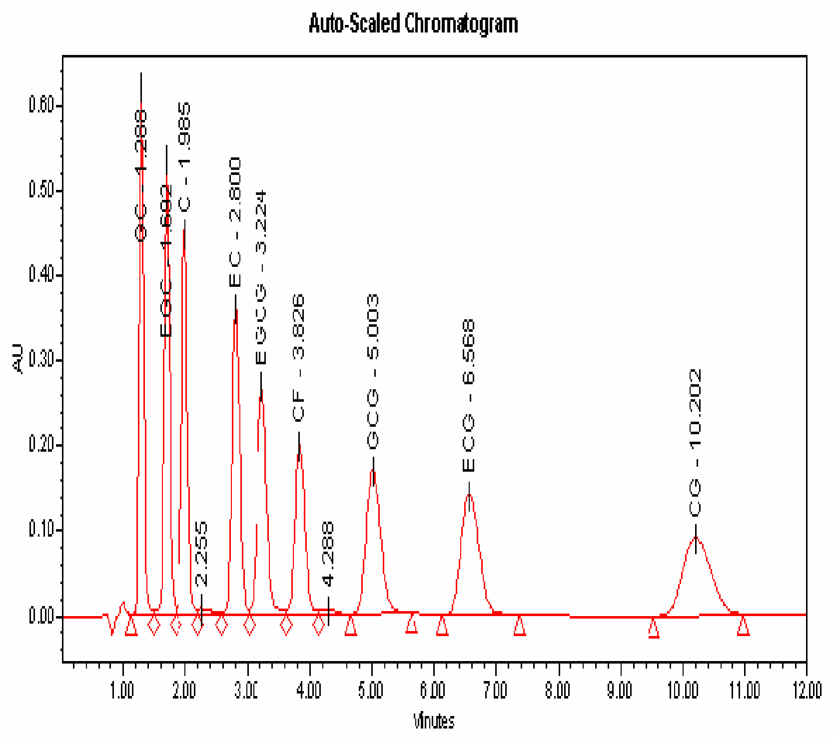
ตารางที่ 13 ผลและ chromatogram มาตรฐานของสารในกลุ่ม catechins และ caffeine ที่ความเข้มข้น 40 ppm

Name	RT	Area	Height	Amount	Unit
GC	1.287	2269802	463336	40	ppm
EGC	1.689	2211645	388887	40	ppm
C	1.980	2182128	349852	40	ppm
EC	2.793	2260155	281623	40	ppm
EGCG	3.215	2021593	202164	40	ppm
CF	3.819	1582441	155275	40	ppm
GCG	4.991	1913680	127465	40	ppm
ECG	6.556	2065881	111090	40	ppm
CG	10.196	2050736	70426	40	ppm



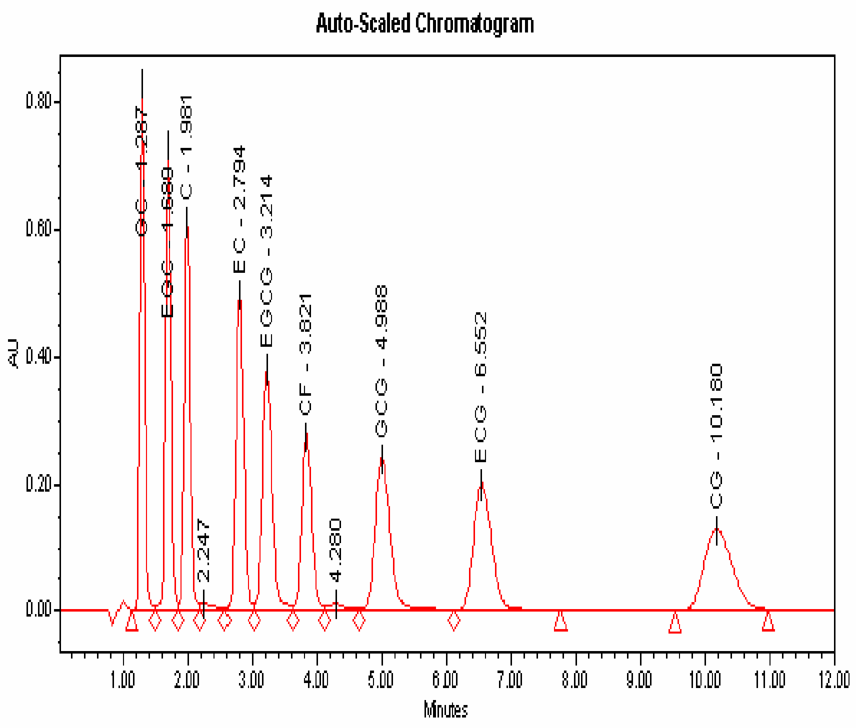
ตารางที่ 14 ผลและ chromatogram มาตรฐานของสารในกลุ่ม catechins และ caffeine ที่ความเข้มข้น 60 ppm

Name	RT	Area	Height	Amount	Unit
GC	1.288	3110344	621070	60	ppm
EGC	1.692	3142099	513522	60	ppm
C	1.985	2983076	452917	60	ppm
EC	2.800	3088462	362000	60	ppm
EGCG	3.224	2876529	269359	60	ppm
CF	3.826	2185418	199322	60	ppm
GCG	5.003	2697583	168224	60	ppm
ECG	6.568	2854816	142279	60	ppm
CG	10.202	2836708	90707	60	ppm



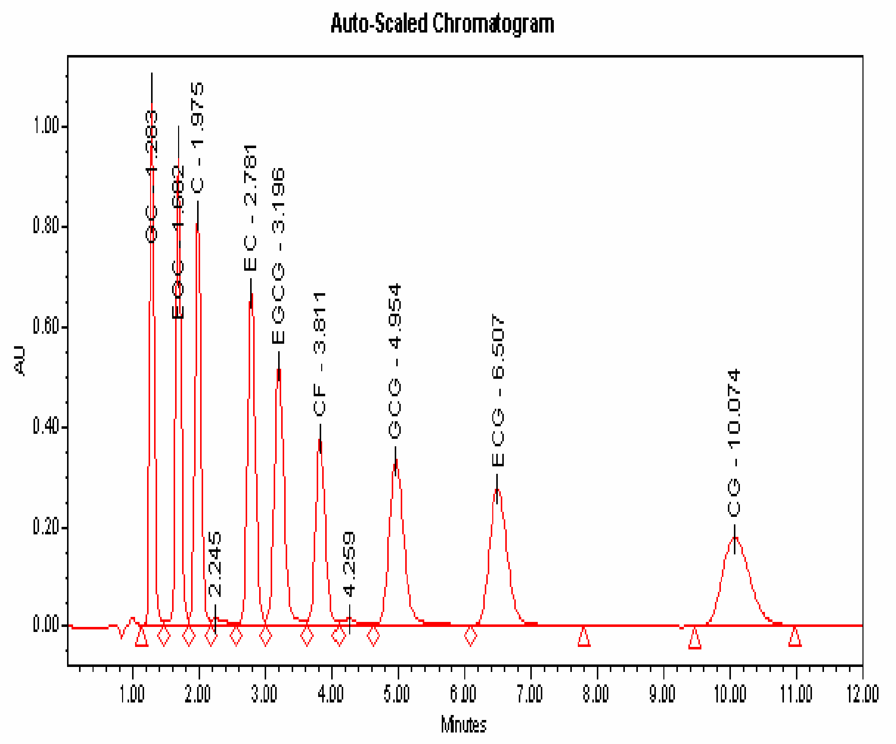
ตารางที่ 15 ผลและ chromatogram มาตรฐานของสารในกลุ่ม catechins และ caffeine ที่ความเข้มข้น 80 ppm

Name	RT	Area	Height	Amount	Unit
GC	1.287	4135871	831236	80	ppm
EGC	1.689	4307116	734781	80	ppm
C	1.981	3992282	617005	80	ppm
EC	2.794	4173482	497409	80	ppm
EGCG	3.214	3999912	381614	80	ppm
CF	3.821	2981616	276338	80	ppm
GCG	4.988	3880974	238903	80	ppm
ECG	6.552	3926904	199510	80	ppm
CG	10.18	3853331	127120	80	ppm

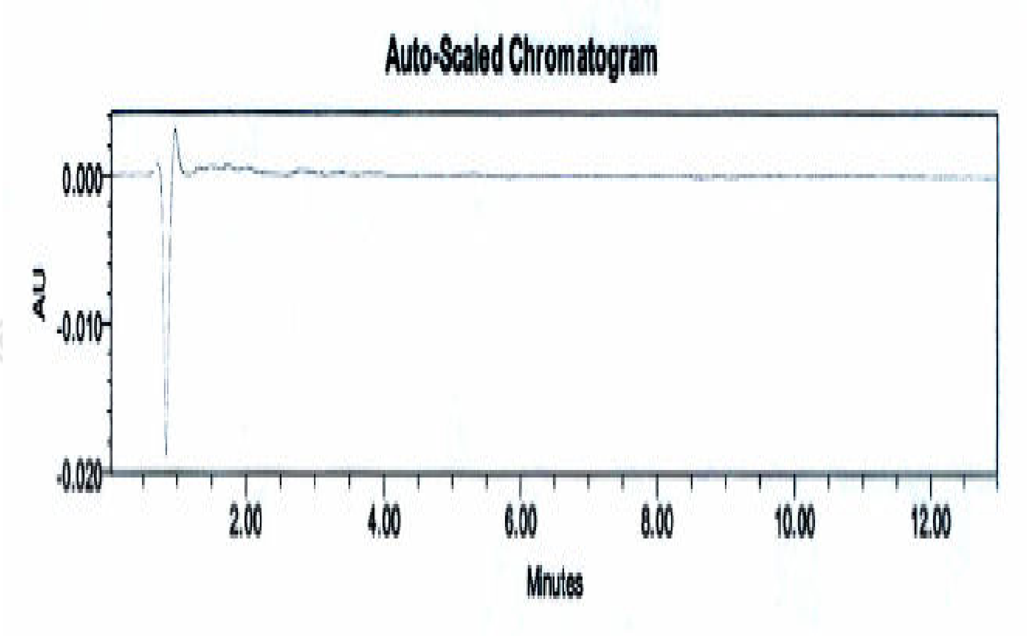


ตารางที่ 16 ผลและ chromatogram มาตรฐานของสารในกลุ่ม catechins และ caffeine ที่ความเข้มข้น 100 ppm

Name	RT	Area	Height	Amount	Unit
GC	1.283	5788678	1082773	100	ppm
EGC	1.682	5596045	975823	100	ppm
C	1.975	5194564	821748	100	ppm
EC	2.781	5463682	671708	100	ppm
EGCG	3.196	5297958	523411	100	ppm
CF	3.811	3907646	376527	100	ppm
GCG	4.954	5160833	331274	100	ppm
ECG	6.507	516727	276522	100	ppm
CG	10.074	5155138	177803	100	ppm

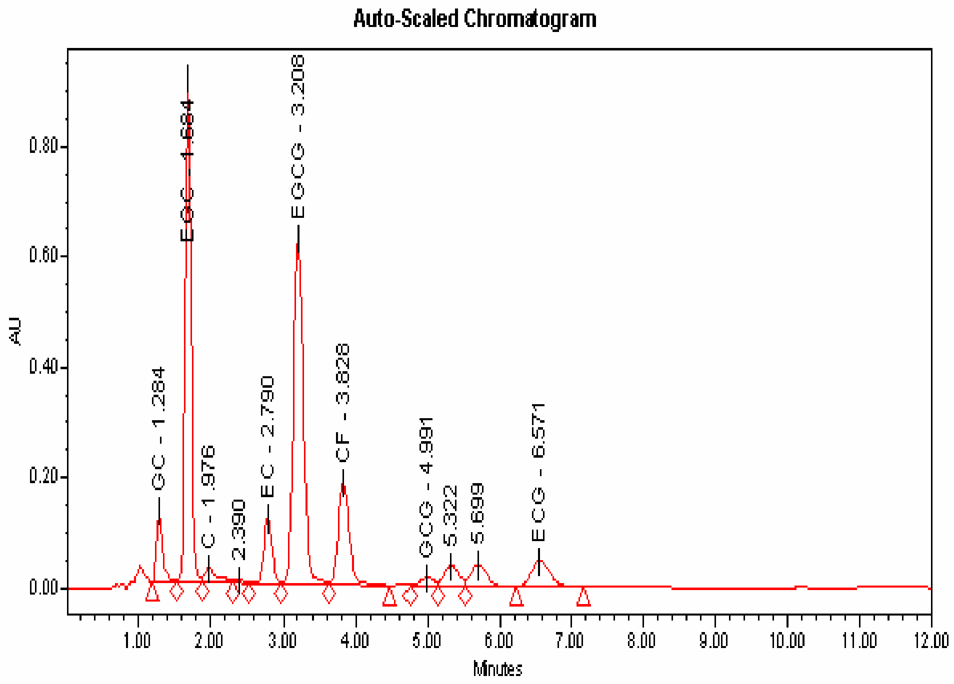


ตารางที่ 17 ผลของ chromatogram ของ Blank



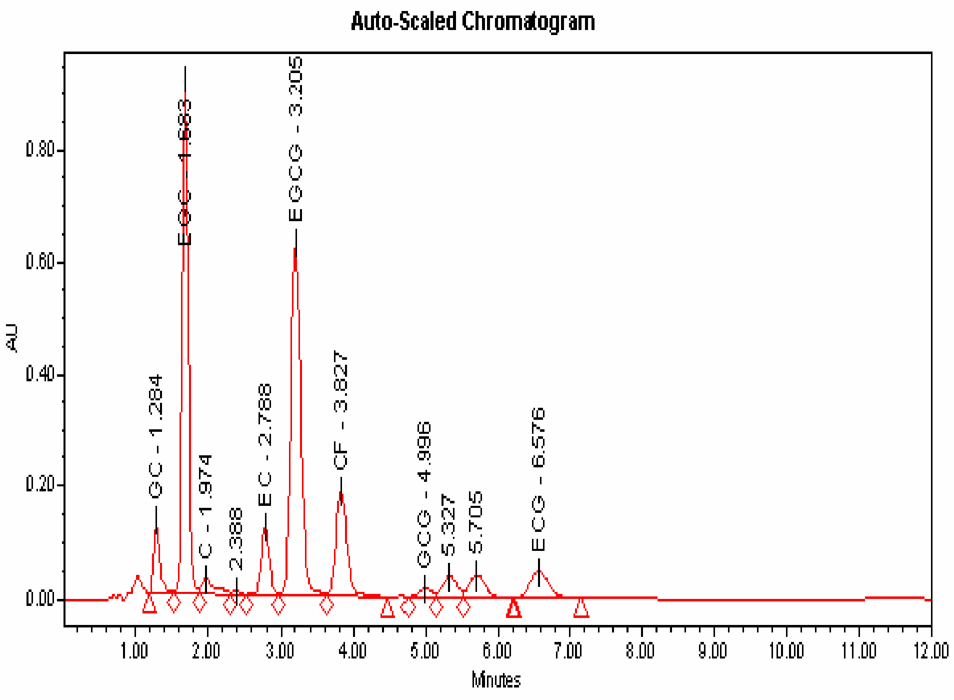
ตารางที่ 18 โครมาโทแกรมสารในกลุ่ม catechins ในยอดชา สกัดครั้งที่ 1 (B1/1-02)

Name	RT	Area	Height	Amount	Units
GC	1.284	745424	130387	14.163	ppm
EGC	1.684	5181861	918646	94.92	ppm
C	1.976	342600	279790	6.700	ppm
EC	2.790	955045	119451	17.86	ppm
EGCG	3.208	6039325	631807	118.54	ppm
CF	3.828	1991944	187930	52.294	ppm
GCG	4.991	210762	160370	4.287	ppm
ECG	6.571	857490	473520	17.058	ppm
CG	10.074	0	0	0	ppm



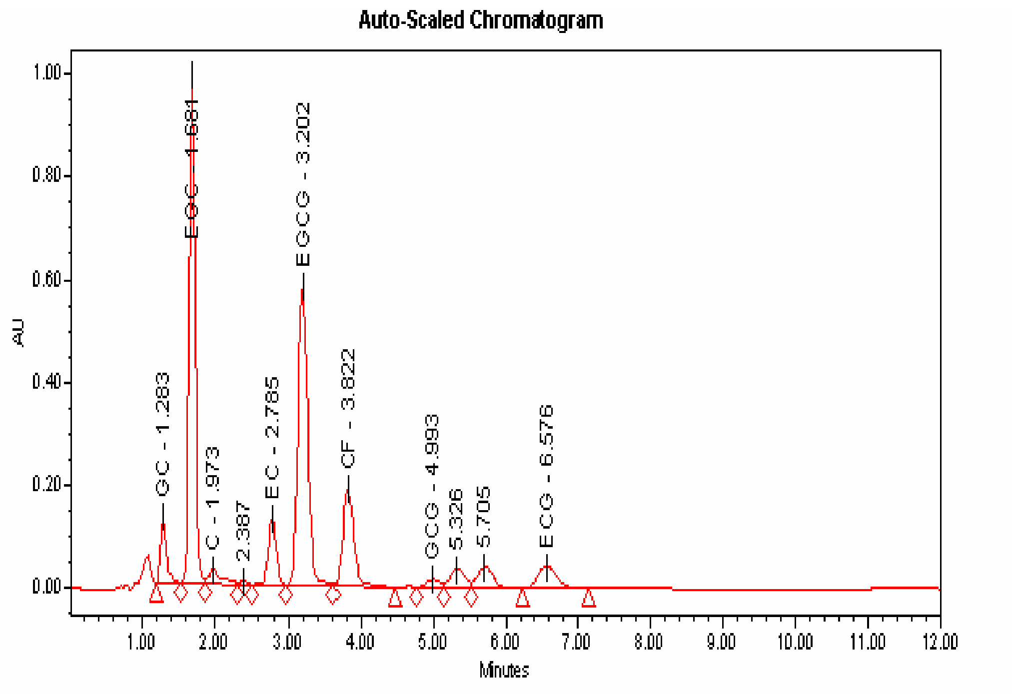
ตารางที่ 19 ผล chromatogram ของสารในกลุ่ม catechins และ caffeine ในยอดชา **สกัดครั้งที่ 2** (B1/2-02)

Name	RT	Area	Height	Amount	Units
GC	1.284	743384	130841	14.124	ppm
EGC	1.683	5192107	921064	95.108	ppm
C	1.975	339524	27861	6.64	ppm
EC	2.788	956261	119839	17.883	ppm
EGCG	3.205	6029552	632121	118.35	ppm
CF	3.827	1995426	188668	52.385	ppm
GCG	4.996	206720	15938	4.205	ppm
ECG	6.576	854743	47450	17.003	ppm
CG	10.074	0	0	0	ppm



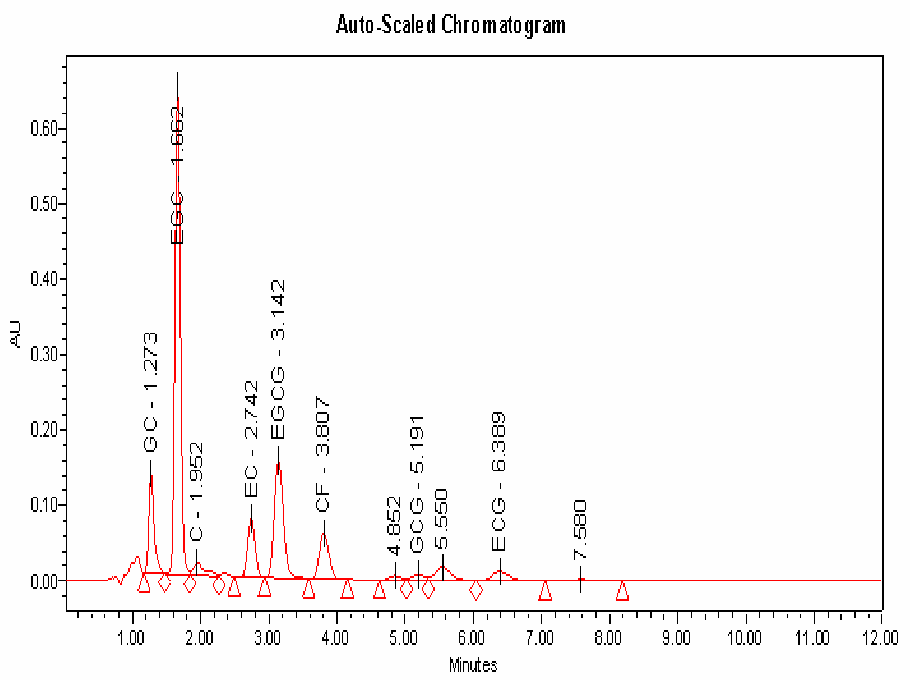
ตารางที่ 20 ผล chromatogram ของสารในกลุ่ม catechins และ caffeine ในยอดชา สกัดครั้งที่ 3 (B1/3-02)

Name	RT	Area	Height	Amount	Units
GC	1.283	749969	132318	14.249	ppm
EGC	1.681	5544461	992088	101.56	ppm
C	1.973	354931	28679	6.941	ppm
EC	2.785	1019599	129935	19.067	ppm
EGCG	3.202	5477330	584147	107.51	ppm
CF	3.822	1990157	191431	52.247	ppm
GCG	4.993	200972	15629	4.088	ppm
ECG	6.576	768550	43325	15.289	ppm
CG	10.074	0	0	0	ppm



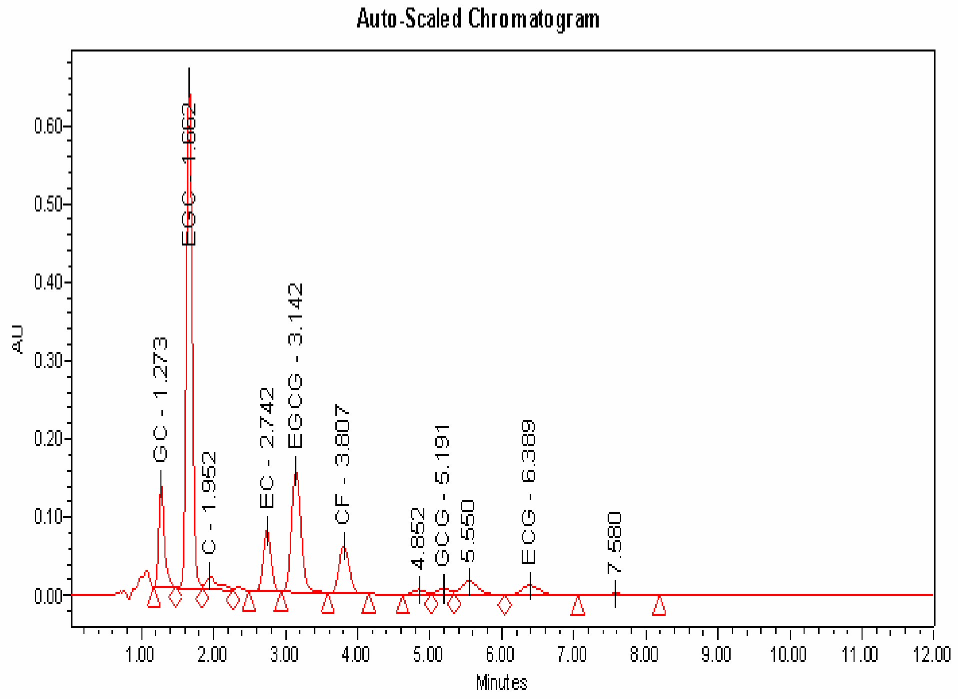
ตารางที่ 21 ผล chromatogram ของสารในกลุ่ม catechins และ caffeine ในใบที่ 4 ของชา สกัดครั้งที่ 1 (L1/1-02)

Name	RT	Area	Height	Amount	Units
GC	1.273	714592	127781	13.577	ppm
EGC	1.652	3E+06	613481	63.043	ppm
C	1.952	201646	16814	3.943	ppm
EC	2.742	561662	72241	10.503	ppm
EGCG	3.142	2E+06	170364	32.456	ppm
CF	3.807	607497	58420	15.948	ppm
GCG	5.191	104874	7244	2.133	ppm
ECG	6.389	226610	12449	4.508	ppm
CG	10.074	0	0	0	ppm



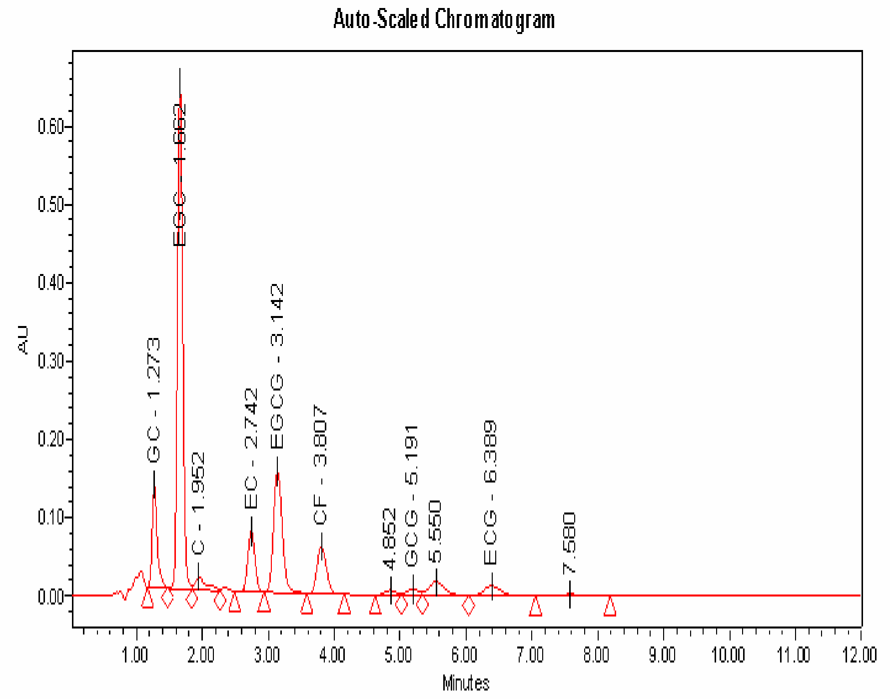
ตารางที่ 22 ผล chromatogram ของสารในกลุ่ม catechins และ caffeine ในใบที่ 4 ของชา สกัดครั้งที่ 2 (L1/2-02)

Name	RT	Area	Height	Amount	Units
GC	1.273	721522	131099	13.709	ppm
EGC	1.663	4E+06	652033	65.707	ppm
C	1.952	206568	17200	4.04	ppm
EC	2.742	589946	78217	11.032	ppm
EGCG	3.142	1E+06	156259	28.729	ppm
CF	3.807	591201	60235	15.521	ppm
GCG	5.191	101742	7511	2.069	ppm
ECG	6.389	226610	12449	4.508	ppm
CG	10.074	0	0	0	ppm



ตารางที่ 23 ผล chromatogram ของสารในกลุ่ม catechins และ caffeine ในใบที่ 4 ของชา สกัดครั้งที่ 3 (L1/3-02)

Name	RT	Area	Height	Amount	Units
GC	1.273	717562	129372	13.634	ppm
EGC	1.652	3E+06	622681	63.161	ppm
C	1.952	198688	16746	3.885	ppm
EC	2.742	563354	73906	10.535	ppm
EGCG	3.142	2E+06	174502	32.351	ppm
CF	3.807	591601	59612	15.531	ppm
GCG	5.191	101157	7421	2.057	ppm
ECG	6.389	226610	12449	4.508	ppm
CG	10.074	0	0	0	ppm



ตารางที่ 24 ผลปริมาณสารในกลุ่ม catechins และ caffeine ในยอดชา

ชื่อสาร	ปริมาณสาร (ppm)		
	B1/1-02	**B1/2-02**	**B1/3-02**
GC	70.815	70.620	71.245
EGC	474.600	475.540	507.810
C	33.500	33.200	34.705
EC	89.300	89.415	95.335
EGCG	592.700	591.745	537.545
CF	261.925	261.925	261.235
GCG	21.435	21.025	20.440
ECG	85.290	85.015	76.445
CG	0	0	0

หมายเหตุ
เนื่องจากการทดลองวิเคราะห์ปริมาณสารครั้งนี้มีการเจือจางตัวอย่าง (5 เท่า) จึงต้องเอาค่าการเจือจางคูณกับค่าปริมาณวิเคราะห์ทุกครั้ง

ตารางที่ 25 ผลคำนวณปริมาณสารในกลุ่ม catechins และ caffeine ในใบที่ 4

ชื่อสาร	ปริมาณสาร (ppm)		
	L1/1-02	**L1/2-02**	**L1/3-02**
GC	67.885	68.545	68.170
EGC	315.215	328.535	315.805
C	19.715	20.200	19.425
EC	52.515	55.16	52.675
EGCG	162.280	143.645	161.755
CF	79.740	77.605	77.655
GCG	10.665	10.345	10.285
ECG	220540	22.540	22.540
CG	0	0	0

หมายเหตุ

เนื่องจากการทดลองวิเคราะห์ปริมาณสารครั้งนี้มีการเจือจางตัวอย่าง (5 เท่า) จึงต้องเอาค่าการเจือจางคูณกับค่าปริมาณวิเคราะห์ทุกครั้ง

1. การคำนวณปริมาณสารกลุ่ม catechins และ caffeine ในยอด

ปริมาณสาร CG 70.816 ppm

. สาร CG 70.816 ppm = 70.816 μg/ml

สารละลาย 1 ml มีสาร CG อยู่ 70.816 μg

สารละลาย 100 ml มีสาร CG อยู่ 70.816 μg x 100 = 7081.6 μg

จากหน่วย μg ทำให้เป็นหน่วย g

7081.6 μg = 7.0816 x 10^{-3} g

ดังนั้น ในสารละลาย 100 ml มีสาร CG 7.0816 x 10^{-3} g

ชา 1 g มีสาร CG 7.0816 x 10^{-3} g

ชา 100 g มีสาร CG 7.0816 x 10^{-3} g x 100 g = 0.70816 g

หมายเหตุ สารตัวอื่นคิดตามนี้

ตารางที่ 26 ผลการคำนวณปริมาณสารในกลุ่ม catechins และ caffeine ในยอด

ชื่อสาร	ปริมาณสาร (%)		
	B1/1-02	**B1/2-02**	**B1/3-02**
GC	0.70815	0.70620	0.71245
EGC	4.74600	4.75540	5.07810
C	0.33500	0.33200	0.34705
EC	0.89300	0.89415	0.95335
EGCG	5.92700	5.91745	5.37545
CF	2.61925	2.61925	2.61235
GCG	0.21435	0.21025	0.20440
ECG	0.85290	0.85015	0.76445
CG	0	0	0

ตารางที่ 26 ผลการคำนวณปริมาณสารในกลุ่ม catechins และ caffeine ในใบที่ 4

ชื่อสาร	ปริมาณสาร (%)		
	L1/1-02	**L1/2-02**	**L1/3-02**
GC	0.67885	0.68450	0.68170
EGC	3.15215	3.28500	3.15805
C	0.19715	0.20200	0.19425
EC	0.52515	0.55160	0.52675
EGCG	1.62280	1.43645	1.61755
CF	0.79740	0.77605	0.77655
GCG	0.10665	0.10345	0.10285
ECG	0.22540	0.22540	0.22540
CG	0	0	0

ตารางที่ 27 คำนวณผลทางสถิติของค่าเฉลี่ยในยอด

ครั้ง	ปริมาณสาร (%)								
	CG	EGC	C	EC	EGCG	CF	GCG	ECG	CG
B1/1-02	0.708	4.746	0.335	0.893	5.927	2.619	0.214	0.853	0.000
B1/2-02	0.706	4.755	0.332	0.894	5.917	2.619	0.210	0.850	0.000
B1/3-02	0.712	5.078	0.347	0.953	5.375	2.612	0.204	0.764	0.000
Mean 1	0.709	4.860	0.338	0.914	5.740	2.617	0.210	0.823	0.000
SD 1	0.003	0.154	0.007	0.028	0.258	0.003	0.004	0.041	0.000
%RSD	0.368	3.177	1.924	3.085	4.491	0.124	1.947	4.992	0.000

หมายเหตุ
- ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ 28 คำนวณผลทางสถิติของค่าเฉลี่ยในใบที่ 4

ครั้ง	ปริมาณสาร (%)								
	CG	**EGC**	**C**	**EC**	**EGCG**	**CF**	**GCG**	**ECG**	**CG**
L1/1-02	0.679	3.152	0.197	0.525	1.623	0.797	0.107	0.225	0.000
L1/2-02	0.685	3.285	0.202	0.552	1.436	0.776	0.103	0.225	0.000
L1/3-02	0.682	3.158	0.194	0.527	1.618	0.777	0.103	0.225	0.000
Mean 2	0.682	3.198	0.198	0.535	1.559	0.783	0.104	0.225	0.000
SD 2	0.002	0.061	0.003	0.012	0.087	0.010	0.002	0.000	0.000
%RSD	0.338	1.916	1.616	2.266	5.557	1.270	1.599	0.000	0.000

หมายเหตุ

- ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 29 ค่าทางสถิติ โดย t-test และ ค่าความแปรปรวน โดย F-test

ค่า	ปริมาณสาร (%)								
	CG	**EGC**	**C**	**EC**	**EGCG**	**CF**	**GCG**	**ECG**	**CG**
F-test	1.278	6.334	4.125	5.431	8.854	0.111	5.817	0	0
t-test	0.031	2.809	0.171	0.656	7.111	3.175	0.182	0.577	0

หมายเหตุ

1. สมมุติฐาน
   สมมุติฐานหลัก คือ ค่าเฉลี่ยของปริมาณสารแต่ละชนิดในยอดชา เท่ากับ ในใบที่ 4
   สมมุติฐานรอง คือ ค่าเฉลี่ยของปริมาณสารแต่ละชนิดในยอดชา มากกว่า ในใบที่ 4
2. ในการทดสอบใช้นัยสำคัญ เท่ากับ 0.05 และที่ความแปรปรวนที่ 95%
3. ค่าวิกฤต เท่ากับ 2.132
4. การตัดสินใจ ถ้าค่า t-test ที่คำนวณได้มากกว่าหรือเท่ากับค่าวิกฤต จะปฏิเสธสมมติฐานหลัก แต่ถ้าไม่มากกว่าจะไม่ปฏิเสธหลักซึ่งจากการคำนวณค่า t มากกว่าค่าวิกฤต จึงปฏิเสธสมมติฐานรอง

2. การคำนวณ Total catechims

สามารถนำค่าเฉลี่ยของสาร ทั้ง 7 ตัว มาคำนวณได้เลย

total catechins ในยอด

total catechins = 0.709+4.860+0.338+0.914+5.740+0.210+0.823
= 13.594

total catechins ในใบที่ 4

total catechins = 0.682+3.198+0.198+0.535+1.559+0.104+0.225
= 6.501

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

ภาคผนวก ค

การเตรียมสารละลาย

1. การเตรียม 0.1% DEPC water

ปิเปต DEPC 1 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น จนได้ 1 ลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งค้างคืน 1 คืน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง

2. การเตรียม 75% Ethanol

ปิเปต ethanol 375 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย DEPC water ให้มีปริมาตร 500 มิลลิลิตร

3. การเตรียม 5X TBE

ชั่งสารดังต่อไปนี้

Tris-base	108	กรัม
EDTA	9.3	กรัม
Boric acid	55	กรัม
DEPC water	1500	มิลลิลิตร

ปรับ pH 8-8.2 แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 2 ลิตร

จาก 5X TBE เจือจางให้มีความเข้มข้น 1X TBE โดยตวง 5X TBE มา 200 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย DEPC water ให้มีปริมาตร 1 ลิตร

4. การเตรียม Marker DNA

λ DNA	20	ไมโครลิตร
10X buffer *Pst* I (H)	5	ไมโครลิตร
Pst I	4	ไมโครลิตร
Autoclaved distilled water	21	ไมโครลิตร

นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมงจากนั้น spin down แล้วต้ม 5 นาที แล้วเติม

Autoclaved distilled water	116	ไมโครลิตร
6X dry	34	ไมโครลิตร

5. การเตรียม Water : Acetonitrile in 0.05% TFA (87 : 13)

เตรียม Water : Acetonitrile (87 : 13) โดยตวงน้ำ 1740 มิลลิลิตร และ Acetonitrile 260 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปิเปต TFA มา 1 มิลลิลิตร ใส่ volumetric flask ใหม่ขนาด 2 ลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยWater : Acetonitrile ให้ได้ 2 ลิตร เขย่าสารละลายให้เข้ากัน กรองด้วย filter membrane ขนาด 0.45 ไมครอน นำไป degas 15 นาที และวัด pH ของ mobile phase ทุกครั้ง

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ	นางสาวศิริพัชร์ กังแฮ
วัน เดือน ปีเกิด	1 มิถุนายน 2521
ประวัติการศึกษา	
ระดับมัธยมศึกษา	โรงเรียนย่านตาขาวรัฐชนูปถัมภ์ อำเภอย่านตาขาว จังหวัดตรัง พ.ศ. 2539
ระดับปริญญาตรี	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมี) สถาบันราชภัฏภูเก็ต อำเภอเมือง จังหวัดภูเก็ต พ.ศ. 2544
ประวัติการทำงาน	พ.ศ. 2544-2546 นักวิชาการผู้เชี่ยวชาญด้านเคมี ศูนย์วิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ สถาบันราชภัฏภูเก็ต พ.ศ. 2545 ผู้ช่วยนักวิจัยโครงการทุนวิจัยพวส. สภาสถาบันราชภัฏ การศึกษาและวิเคราะห์คุณภาพน้ำทิ้งในคลองก่อนไหลลงสู่ชายฝั่งทะเลในจังหวัดภูเก็ต