



การแสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ชาโดยวิธีวิเคราะห์ RFLP ของ
ชิ้นส่วนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ Catechins

DIFFERENTIATION AMONG TWO VARIETIES OF TEA
(*Camellia sinensis* Linn.) REVEALED BY RFLP ANALYSIS OF
FRAGMENTS OF GENES INVOLVED IN CATECHINS BIOSYNTHESIS

กิตติพงศ์ วิโรจน์แสงทอง

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

2550

©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

การแสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ชาโดยวิธีวิเคราะห์ RFLP ของ
ชิ้นส่วนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ Catechins

DIFFERENTIATION AMONG TWO VARIETIES OF TEA
(*Camellia sinensis* Linn.) REVEALED BY RFLP ANALYSIS OF
FRAGMENTS OF GENES INVOLVED IN CATECHINS BIOSYNTHESIS

กิตติพงศ์ วิโรจน์แสงทอง

วิทยานิพนธ์เสนอต่อมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวงเพื่อเป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

2550

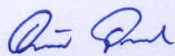
©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

การแสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ชาโดยวิธีวิเคราะห์ RFLP ของ
ชิ้นส่วนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ Catechins

กิตติพงษ์ วิโรจน์แสงทอง

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
2550

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



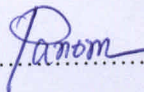
.....ประธานกรรมการ

(รศ.ดร. อภินันท์ อุคมกิจ)



.....กรรมการ

(ดร. ประภัสสร ดำรงกุล อึ้งวิชยพันธ์)



.....กรรมการ

(ดร. พนม วิญญายอง)



.....กรรมการ

(ดร. ศรัณยา ศรีสุวรรณ)

©ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ดร.ประภัสสร คำรงกุล อึ้งวนิชพันธ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.อภิรักษ์ อุดมกิจ จากสถาบันอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล อาจารย์สยาม ภพลือชัย และ ดร.พนม วิญญูของ ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา แนะนำแนวทางที่เป็นประโยชน์ทุกๆด้าน ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่งตลอดมา อีกทั้งยังตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆจนวิทยานิพนธ์สำเร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.อภิรักษ์ อุดมกิจ ที่อนุเคราะห์ให้เข้าใช้ห้องปฏิบัติการภายในสถาบันอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์ เพื่อทำงานวิจัยนี้และให้การดูแลเป็นอย่างดีตลอดมา

ขอขอบพระคุณ ดร.ศรinya ศรีสุวรรณ ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ และให้คำแนะนำตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณเจ้าของไร่ชาทุกแห่งโดยเฉพาะอย่างยิ่งไร่บุญรอดเชียงราย และสถาบันชา มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างชาที่ใช้ในงานวิจัยนี้ บุคลากรและเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการชีววิทยา ห้องปฏิบัติการเคมี และศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวงทุกท่าน ที่อำนวยความสะดวกทุกด้านการทำงานวิจัยนี้ รวมไปถึงบุคลากรในสถาบันอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์ทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีเมื่อครั้งไปทำงานวิจัยนี้ในห้องปฏิบัติการของ รศ.ดร.อภิรักษ์ อุดมกิจ สถาบันอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา

ท้ายที่สุดนี้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณมารดา บิดา ขอบคุณ พี่ น้อง มิตรสหาย และบุคคลอันเป็นที่รักทุกท่านที่ให้โอกาสทางการศึกษาและคอยช่วยเหลือในทุกๆด้านด้วยดีตลอดมา จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสิ้นสมบูรณ์

อนึ่งงานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุนจากศูนย์พันธุกรรมวิสกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

กิตติพงษ์ วิโรจน์แสงทอง

ชื่อเรื่อง	การแสดงความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ชาโดยวิธีวิเคราะห์ RFLP ของชิ้นส่วนยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ catechins		
ผู้เขียน	นายกิตติพงศ์ วิโรจน์แสงทอง		
หลักสูตร	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ)		
คณะกรรมการที่ปรึกษา	ดร.ประภัศร ดำรงกุล อึ้งวณิชยพันธ์	ประธานกรรมการ	
	รศ.ดร. อภินันท์ อุคมกิจ	กรรมการ	
	ดร.พนม วิญญูयोग	กรรมการ	

บทคัดย่อ

การหาความแตกต่างของชา (*Camellia sinensis* Linn.) สายพันธุ์ต่างๆ ที่เก็บจาก germplasm collection ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง 15 สายพันธุ์ โดยวิธี Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) โดยอาศัยยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ catechins 2 ยีน คือ phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*) และ chalcone synthase (*CHS*) เป็นตัวติดตาม พบว่าในชาทั้งหมดสามารถจำแนกออกได้เป็นกลุ่มอุ้งหลงเบอร์ 12 จำนวน 3 ตัวอย่าง กลุ่มอุ้งหลงเบอร์ 17 ชาอัสสัม 5 ตัวอย่าง และกลุ่มชาชิงชิง 2 ตัวอย่าง ซึ่งรูปแบบของแถบ DNA ในชาชิงชิงนั้นมีความคล้ายคลึงทั้งชาจีนและชาอัสสัม ซึ่งข้อมูลที่ได้นี้ยังต้องอาศัยข้อมูลอื่นประกอบ เช่น การแสดงออกของยีน *PAL* และ *CHS* หรือปริมาณการสร้าง catechins ในชาแต่ละสายพันธุ์ เพื่อให้สามารถเชื่อมโยงข้อมูลของรูปแบบของแถบ DNA กับข้อมูลอื่นได้ อย่างไรก็ตามไม่สามารถจำแนกความแตกต่างในชาทั้ง 15 สายพันธุ์ได้จากการทำ PCR-RFLP

คำสำคัญ : *Camellia sinensis*/ ชา/ Restriction Fragment Length Polymorphism /RFLP
/catechins/ phenylalanine ammonia-lyase/ chalcone synthase

Title	Differentiation Among Two Varieties Of tea (<i>Camellia sinensis</i> Linn.) Revealed By RFLP Analysis Of Fragments Of Genes Involved In Catechins Biosynthesis	
Author	Mr. Kittipong Wirote-saengthong	
Degree	Master of Science (Biotechnology)	
Supervisory Committee	Dr. Prapassorn D. Eungwanichayapant	Chairperson
	Asso.Prof.Dr. Apinunt Udomkit	Member
	Dr. Panom Winyayong	Member

ABSTRACT

Fifteen tea (*Camellia sinensis* Linn.) accessions collected from the germplasm collection of Mae Fah Luang University, Chiang Rai, were analyzed to determine the differences among cultivars by Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) using fragments of phenylalanine ammonia lyase (*PAL*) and chalcone synthase (*CHS*) as DNA probes. The fifteen tea specimens could be divided into three groups according to the RFLP patterns: Chinese group (6 accessions), Assam group (2 accessions) and Ching-ching group (2 accessions). The hybridized bands of Ching-ching strains showed a mixed pattern between that of Chinese and Assam tea. Further studies in gene expression and levels of catechins biosynthesis are needed for more relevant data to reveal the relation between RFLP patterns and levels of catechins biosynthesis. However, another technique used in this study, PCR-RFLP, failed to detect any differences among the fifteen accessions.

Keywords : *Camellia sinensis* / tea / Restriction Fragment Length Polymorphism/ RFLP / catechins / phenylalanine ammonia lyase / chalcone synthase

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
สารบัญตาราง	ณ
สารบัญภาพ	ญ
บทที่	
1 บทนำ	1
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	6
2.4 ชนิดของชาแบ่งตามกระบวนการผลิต	9
2.5 องค์ประกอบทางเคมีของใบชา	9
2.6 เทคนิคทางอนุชีววิทยาที่ใช้แยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์	11

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3 วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี	13
3.1 ตัวอย่างพืช	13
3.2 สารเคมี	13
3.3 เวกเตอร์	13
3.4 สายพันธุ์แบคทีเรีย	15
3.5 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย	15
3.6 เอนไซม์และบัฟเฟอร์	15
3.7 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์	16
3.8 อุปกรณ์อื่นๆ	17
3.9 การสกัด DNA โดยวิธี DNeasy plant mini (QIAGEN)	17
3.10 วิธีการสกัด DNA โดยชุดสกัด Ezi DNA (Sunnolin Crop.)	18
3.11 การเพิ่มชิ้น DNA ของยีน PAL และ CHS จาก genomic DNA โดย Polymerase Chain Reaction (PCR)	19
3.12 Gel electrophoresis	19
3.13 การ Purify DNA จากเจล agarose โดยใช้ชุดสกัด QIAquick gel extraction (QIAGEN)	19
3.14 การ Ligation	20
3.15 การ Transformation	21
3.16 วิธีสกัด Plasmid โดยชุดสกัด QIAquick plasmid extraction (QIAGEN)	21
3.17 การติดฉลาก DNA probe ด้วย Dioxygenin-11-dUTP (Roche) ด้วยวิธี PCR labelling	22
3.18 การตกตะกอน DNA เพื่อทำ gel electrophoresis สำหรับ southern blot transfer และการทำSouthern blot transfer	22
3.19 วิธี Hybridization	23

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.20 การ Washing and detection	23
4 ผลและวิจารณ์การทดลอง	24
4.1 การสกัด Genomic DNA ด้วย ชุดสกัด DNeasy plant mini	24
4.2 การสกัด Genomic DNA ด้วย ชุดสกัด Ezi DNA	26
4.3 การวัดปริมาณ DNA	26
4.4 การตัด Genomic DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	29
4.5 การเตรียมชิ้น DNA probe ด้วยวิธี PCR และ การติดฉลาก DNA probe ด้วย Dioxygenin (DIG)-11-dUTP	29
4.6 การทำ Hybridization	29
4.7 PCR-RFLP	35
5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	40
เอกสารอ้างอิง	41
ภาคผนวก	45
ประวัติผู้วิจัย	49

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
2.1 องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของไบชาสด	10
3.1 แสดงเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการวิจัย	16
3.2 แสดงลำดับเบสของ Oligonucleotide primer	16



สารบัญรูป

รูป	หน้า
2.1 ลักษณะใบชา	5
2.2 ลักษณะดอกชา	5
2.3 ลักษณะผลชา	7
2.4 ลักษณะผลชา	7
2.5 ลักษณะเมล็ดชา	7
2.6 ลักษณะของชาจีน	8
2.7 ลักษณะของชาอัสสัม	8
2.8 ลักษณะของชาเขมร	8
3.1 แสดงแผนที่ยืนของเวกเตอร์ pGEM®-T Easy	14
4.1 แสดงแถบ Genomic DNA ของชาอัสสัมที่สกัดจากยอดและใบแก่ โดยใช้ชุดสกัด DNeasy plant mini	25
4.2 แสดงแถบ Genomic DNA ของชา 15 สายพันธุ์เลนที่ 1 DNA marker: Lamda DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>Hind</i> III เลนที่ 2 ชาอู่หลงเบอร์ 12 จากไร่บุญรอด เลนที่ 3 ชาอู่หลงเบอร์ 12 จากไร่สุวิรุฬห์ เลนที่ 4 ชาอู่หลงเบอร์ 12 จากไร่ศุภชัย เลนที่ 5 ชาอู่หลงเบอร์ 12 จากบ้านพญาไพร เลนที่ 6 ชาอู่หลงเบอร์ 17 จากไร่สุวิรุฬห์ เลนที่ 7 ชาอู่หลงเบอร์ 17 ก้านอ่อนจากบ้านแม่จรหลวง เลนที่ 8 ชาอู่หลงเบอร์ 17 จากบ้านพญาไพร เลนที่ 9 ชาอู่หลงเบอร์ 17 จากไร่วังพุดตาล เลนที่ 10 ชาอัสสัมจากบ้านพญาไพร เลนที่ 11 ชาอัสสัมจากบ้านห้วยหยวกป่าโซ เลนที่ 12 ชาอัสสัมยอดแดงจากไร่คอยาวี เลนที่ 13 ชาชิงชังจากศูนย์วิจัยคอยาวี เลนที่ 14 ชาชิงชังเบอร์ 12 จากไร่คอยอมพาย เลนที่ 15 ชา CK-10 จากไร่บุญรอด และเลนที่ 16 ชา Yamatomidori จากไร่บุญรอด	27
4.3 แสดงแถบ Genomic DNA ของชาอัสสัมจากบ้านพญาไพร ชาอัสสัมจากบ้านห้วยหยวกป่าโซและชาอัสสัมยอดแดงจากไร่คอยาวีที่สกัดครั้งที่ 2 เลนที่ 1 DNA marker: Lamda DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>Hind</i> III เลนที่ 2 ชาอัสสัมจากบ้านพญาไพร	

สารบัญรูป (ต่อ)

	หน้า
เลนที่ 3 ซาอัสสัมจากบ้านห้วยหวกป่าโซ เลนที่ 4 ซาอัสสัมยอดแดงจากไร่คอยาวี 4.4 แสดง Genomic DNA ของซาทั้ง 15 สายพันธุ์ หลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Dra</i> I เลนที่1 DNA marker: Lamda DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ <i>Hind</i> III เลนที่ 2 ซาอู่หลงเบอร์ 12 จากไร่บุญรอด เลนที่ 3 ซาอู่หลงเบอร์ 12 จากไร่สุวิรุฬห์ เลนที่ 4 ซาอู่หลงเบอร์ 12 จากไร่สุขชัย เลนที่ 5 ซาอู่หลงเบอร์ 12 จากบ้านพญาไพร เลนที่ 6 ซาอู่หลงเบอร์ 17 จากไร่สุวิรุฬห์ เลนที่ 7 ซาอู่หลงเบอร์ 17 ก้านอ่อนจากบ้านแม่จรหลวง เลนที่ 8 ซาอู่หลงเบอร์ 17 จากบ้านพญาไพร เลนที่ 9 ซาอู่หลงเบอร์ 17 จากไร่วังพุดตาล เลนที่ 10 ซาอัสสัมจากบ้านพญาไพร เลนที่ 11 ซาอัสสัมจากบ้านห้วยหวกป่าโซ เลนที่ 12 ซาอัสสัมยอดแดงจากไร่คอยาวี เลนที่ 13 ซาชิงชิงจากศูนย์วิจัยคอยาวี เลนที่ 14 ซาชิงชิงเบอร์ 12 จากไร่คอยอมพาย เลนที่ 15 ซา CK-10 จากไร่บุญรอด และเลนที่ 16 ซา Yamatomidori จากไร่บุญรอด	28
4.5 แสดงขนาดของแถบ PCR product ของ PAL DNA probe และ CHS DNA probe เลนที่ 1 DNA marker 100bp+1.5kb เลนที่ 2 PAL DNA probe ที่ยังไม่ติดฉลาก เลนที่ 3 PAL DNA probe ที่ติดฉลากด้วย DIG-11-dUTP เลนที่ 4 CHS DNA probe ที่ยังไม่ติดฉลาก เลนที่ 5 CHS DNA probe ที่ติดฉลากด้วย DIG-11-dUTP	30
4.6 ผลการทำ Hybridization ของ Genomic DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Dra</i> I กับ DNA probe ของยีน CHS ในซาทั้ง 15 สายพันธุ์ เลนที่ 1 ซาอู่หลงเบอร์ 12 จากไร่บุญรอด เลนที่ 2 ซาอู่หลงเบอร์ 12 จากไร่สุวิรุฬห์ เลนที่ 3 ซาอู่หลงเบอร์ 12 จากไร่สุขชัย เลนที่ 4 ซาอู่หลงเบอร์ 12 จากบ้านพญาไพร เลนที่ 5 ซาอู่หลงเบอร์ 17 จากไร่สุวิรุฬห์ เลนที่ 6 ซาอู่หลงเบอร์ 17 ก้านอ่อนจากบ้านแม่จรหลวง เลนที่ 7 ซาอู่หลงเบอร์ 17 จากบ้านพญาไพร เลนที่ 8 ซาอู่หลงเบอร์ 17 จากไร่วังพุดตาล เลนที่ 9 ซาอัสสัมจากบ้านพญาไพร เลนที่ 10 ซาอัสสัมจากบ้านห้วยหวกป่าโซ เลนที่ 11 ซาอัสสัมยอดแดงจากไร่คอยาวี เลนที่ 12 ซาชิงชิงจากศูนย์วิจัยคอยาวี เลนที่ 13 ซาชิงชิงเบอร์ 12 จากไร่คอยอมพาย เลนที่ 14 ซา CK-10 จากไร่บุญรอด	31

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

เลนที่ 15 ซา Yamatomidori จากไร่บุญรอด	33
4.7 ผลการทำ Hybridization ของ Genomic DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Dra</i> I กับ DNA probe ของยีน PAL ในชาทั้ง 15 สายพันธุ์ เลนที่ 1 ซาอุหลงเบอร์ 12 จากไร่บุญรอด เลนที่ 2 ซาอุหลงเบอร์ 12 จากไร่สุวิรุฬห์ เลนที่ 3 ซาอุหลงเบอร์ 12 จากไร่ศุภชัย เลนที่ 4 ซาอุหลงเบอร์ 12 จากบ้านพญาไพร เลนที่ 5 ซาอุหลงเบอร์ 17 จากไร่สุวิรุฬห์ เลนที่ 6 ซาอุหลงเบอร์ 17 ก้านอ่อนจากบ้านแม่จรหลวง เลนที่ 7 ซาอุหลงเบอร์ 17 จากบ้านพญาไพร เลนที่ 8 ซาอุหลงเบอร์ 17 จากไร่วังพุดตาล เลนที่ 9 ซาอุสัสมจากบ้านพญาไพร เลนที่ 10 ซาอุสัสมจากบ้านห้วยหยวกป่าโซ เลนที่ 11 ซาอุสัสมยอดแดงจากไร่คอยาวี เลนที่ 12 ซาซิงซิงจากศูนย์วิจัยฯคอยาวี เลนที่ 13 ซาซิงซิงเบอร์ 12 จากไร่คอยอมพาย เลนที่ 14 ซา CK-10 จากไร่บุญรอด เลนที่ 15 ซา Yamatomidori จากไร่บุญรอด	35
4.8 ผลการทำ Hybridization ของ Genomic DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Xba</i> I กับ DNA probe ของยีน PAL ในชาทั้ง 10 สายพันธุ์ เลนที่ 1 ซาอุหลงเบอร์ 12 จากไร่สุวิรุฬห์ เลนที่ 2 ซาอุหลงเบอร์ 12 จากไร่ศุภชัย เลนที่ 3 ซาอุหลงเบอร์ 12 จากบ้านพญาไพร เลนที่ 4 ซา Fukumidori จากไร่บุญรอด เลนที่ 5 ซาอุหลงเบอร์ 17 จากไร่สุวิรุฬห์ เลนที่ 6 ซาอุหลงเบอร์ 17 ก้านอ่อนจากบ้านแม่จรหลวง เลนที่ 7 ซาอุหลงเบอร์ 17 จากบ้านพญาไพร เลนที่ 8 ซาซิงซิงจากศูนย์วิจัยฯคอยาวี เลนที่ 9 ซา CK-10 จากไร่บุญรอด เลนที่ 10 ซา Yamatomidori จากไร่บุญรอด	36
4.9 แสดง PCR product ของยีน PAL ในตัวอย่างชาทั้ง 15 ตัวอย่าง หลังจากตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRV</i> เลนที่ 1 DNA marker: 100bp+1.5kb เลนที่ 2 ซาอุหลงเบอร์ 12 จากไร่บุญรอด เลนที่ 3 ซาอุหลงเบอร์ 12 จากไร่สุวิรุฬห์ เลนที่ 4 ซาอุหลงเบอร์ 12 จากไร่ศุภชัย เลนที่ 5 ซาอุหลงเบอร์ 12 จากบ้านพญาไพร เลนที่ 6 ซาอุหลงเบอร์ 17 จากไร่สุวิรุฬห์ เลนที่ 7 ซาอุหลงเบอร์ 17 ก้านอ่อนจากบ้านแม่จรหลวง เลนที่ 8 ซาอุหลงเบอร์ 17 จากบ้านพญาไพร เลนที่ 9 ซาอุหลงเบอร์ 17 จากไร่วังพุดตาล	

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

	เลนที่ 10 ซาฮัสสัมจากบ้านพญาไพร เลนที่ 11 ซาฮัสสัมจากบ้านห้วยหวกป่าโซ เลนที่ 12 ซาฮัสสัมยอดแดงจากไร่คอยาวี เลนที่ 13 ซาซิงซิงจากศูนย์วิจัยคอยาวี เลนที่ 14 ซาซิงซิงเบอร์ 12 จากไร่คอยอมพาย เลนที่ 15 ซา CK-10 จากไร่บุญรอด และเลนที่ 16 ซา Yamatomidori จากไร่บุญรอด	37
4.10	แสดง PCR product ของยีน CHS ในตัวอย่างซาทั้ง 15 ตัวอย่าง หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hinc</i> II เลนที่ 1 DNA marker: 100bp+1.5kbเลนที่ 2 ซาอุหลงเบอร์ 12 จากไร่บุญรอด เลนที่ 3 ซาอุหลงเบอร์ 12 จากไร่สุวิรุฬห์ เลนที่ 4 ซาอุหลงเบอร์ 12 จากไร่ศุภชัย เลนที่ 5 ซาอุหลงเบอร์ 12 จากบ้านพญาไพร เลนที่ 6 ซาอุหลงเบอร์ 17 จากไร่สุวิรุฬห์ เลนที่ 7 ซาอุหลงเบอร์ 17 ก้านอ่อนจากบ้านแม่จรหลวง เลนที่ 8 ซาอุหลงเบอร์ 17 จากบ้านพญาไพร เลนที่ 9 ซาอุหลงเบอร์ 17 จากไร่วังพุดตาล เลนที่ 10 ซาฮัสสัม จากบ้านพญาไพร เลนที่ 11 ซาฮัสสัมจากบ้านห้วยหวกป่าโซ เลนที่ 12 ซาฮัสสัม ยอดแดงจากไร่คอยาวี เลนที่ 13 ซาซิงซิงจากศูนย์วิจัยคอยาวี เลนที่ 14 ซาซิงซิงเบอร์ 12 จากไร่คอยอมพาย เลนที่ 15 ซา CK-10 จากไร่บุญรอด และเลนที่ 16 ซา Yamatomidori จากไร่บุญรอด	38

บทที่ 1

บทนำ

1.1 หลักการและเหตุผล

ชา (Camellia sinensis Linn.) เป็นเครื่องดื่มสมุนไพรชนิดหนึ่งที่รู้จักกันมานานแล้ว โดยมีหลักฐานพบว่าประเทศจีนเป็นประเทศแรกของโลกที่มีการดื่มชา และหลังจากนั้นได้มีการติดต่อค้าขายกับชาวต่างชาติ จึงทำให้มีการเผยแพร่ไปยังหลายประเทศทั่วโลก โดยมีการปลูกและขยายพันธุ์ไปตามที่ต่างๆ ด้วยรสชาติและกลิ่นที่เป็นเอกลักษณ์ ทำให้เครื่องดื่มชาเป็นที่นิยมอย่างรวดเร็ว ซึ่งส่วนใหญ่ได้มีการค้นพบว่าเครื่องดื่มชาจะเกี่ยวข้องกับวัฒนธรรม วิถีชีวิต ศิลปวัฒนธรรม เศรษฐกิจ และสุขภาพของผู้คนในยุคนี้จนถึงปัจจุบันนี้ เชื่อกันว่าการใช้ประโยชน์จากใบชานั้นมีมานานแล้วตั้งแต่ 5,000-6,000 ปีก่อน ซึ่งในยุคนี้จะใช้ชาเป็นพืชสมุนไพรในการรักษาโรคต่างๆ ต่อมาก็ได้มีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการใช้ประโยชน์จากใช้เป็นยามาเป็นเครื่องดื่มจึงทำให้มีการดื่มชาแพร่หลายไปสู่คนทั่วไปในประเทศจีน เพราะทำให้ร่างกายสดชื่น กระชุ่มกระชวย ไม่ง่วงซึม และสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ นั่นก็หมายความว่า การที่ดื่มชาสม่ำเสมอจะทำให้ร่างกายแข็งแรง และป้องกันโรคได้

ในประเทศไทยชา นับเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอย่างหนึ่ง ซึ่งมีพื้นที่แหล่งเพาะปลูกที่สำคัญอันดับหนึ่งอยู่ในจังหวัดเชียงราย ประมาณ 97,000 ไร่ ทำให้สามารถผลิตชาได้ปีละ 6,000 ตัน ทำรายได้ให้กับประเทศเฉลี่ยปีละ 100 ล้านบาท นอกเหนือจากเชียงรายแล้วยังมี เชียงใหม่ ลำปาง แม่ฮ่องสอน แพร่ ตาก ที่มีการปลูกชากันมาก (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์จังหวัดเชียงราย, 2547) ทำให้มีการเรียกขานกันว่าเป็นจังหวัดชาแห่งชาติ และทำให้ชาเชียงรายได้รับคัดเลือกให้เป็นสินค้า OTOP PRODUCT CHAMPION ที่ทำรายได้ให้แก่เกษตรกรที่ปลูก และเป็นชาที่มีคุณภาพดี

การศึกษาค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับชาที่มีมาจนถึงปัจจุบัน ทำให้เครื่องดื่มชาได้รับความนิยมจากผู้คนเป็นอันดับหนึ่ง สาเหตุมาจากองค์ประกอบทางเคมีที่มีอยู่ในใบชา โดยเฉพาะ

อย่างยิ่งสารประกอบกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenols) ที่เรียกว่าคาทีชิน (catechins) ที่สำคัญ คือ Epigallocatechin gallate (EGCG) เป็นสารแอนติออกซิแดนท์ (antioxidant) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าวิตามินอี ถึง 20 เท่า (Peterson and Dwyer, 1998) ดังนั้นจึงเชื่อกันว่าการดื่มชาเป็นประจำสามารถป้องกันโรคและความบกพร่องต่างๆที่เกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระ (free radicals) ซึ่งรวมถึง โรคหัวใจ โรคมะเร็ง โรคไขมันอุดตันในเส้นเลือด โรคอัลไซเมอร์ (Duthie *et al.*, 2000) โรคภูมิแพ้ (Katiyar and Mukhtar, 2001) อาการแทรกซ้อนในโรคเบาหวาน (Yang *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังพบว่าชาามีฤทธิ์เป็นสารปฏิชีวนะ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหลายชนิด จึงทำให้สามารถบรรเทาอาการอักเสบและการติดเชื้อในช่องปากได้ (Graham, 1992) ซึ่งเห็นได้ว่าสาร catechins มีความสำคัญอย่างมากต่อคุณภาพชา แหล่งของสาร polyphenols เหล่านี้ จากการศึกษาวิจัยพบว่ามีมากในชาจีนและชาญี่ปุ่น ที่ผลิตเป็นแบบชาเขียว

จากการศึกษากระบวนการสังเคราะห์ catechins พบว่าในการสังเคราะห์ catechins นั้นส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ ซึ่งจะเป็ตัวเร่งในกระบวนการสังเคราะห์ 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)

ชาเขียวรายนั้นยังมีการศึกษาวิจัยน้อยมากทั้งในด้านองค์ประกอบทางเคมี และด้านพันธุศาสตร์ของชา ในงานวิจัยนี้ถึงมีจุดมุ่งหมายที่จะทำการศึกษาวิจัยเพื่อหาความแตกต่างของสายพันธุ์ชาเขียวรายในระดับโมเลกุลโดยอาศัยยีนที่อยู่ในกระบวนการสร้าง catechins ด้วยเทคนิค RFLP และ PCR-RFLP เพื่อสามารถนำข้อมูลพื้นฐานครั้งนี้ไปใช้ในการพัฒนาและสนับสนุนส่งเสริมปรับปรุงชาเขียวรายให้มีคุณภาพยิ่งขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาหาความแตกต่างของสายพันธุ์ชาบางชนิดในระดับโมเลกุลโดยเทคนิค RFLP และ PCR-RFLP

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จะใช้ตัวอย่างชา 15 ชนิดจาก germplasm collection ของสถาบันชา มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง โดยการสุ่ม (ใบอ่อน 3 ใบแรก) และใบที่ 4 มาสกัด DNA แล้วนำ DNA ที่ได้ไปวิเคราะห์โดยเทคนิค RFLP และ PCR-RFLP

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลพื้นฐานของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ catechins ในชาเชียงรายเพื่อนำไปใช้ในการคัดเลือกต้นชาและปรับปรุงคุณภาพชาต่อไป

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อนุกรมวิธานของชา

ชาเป็นพืชดอก (Angiosperms) ซึ่งสามารถจัดหมวดหมู่ทางอนุกรมวิธานของชาได้ดังนี้

วงศ์ (Family)	:	Theaceae
สกุล (Genus)	:	<i>Camellia</i>
ชื่อวิทยาศาสตร์ (Scientific name)	:	<i>Camellia sinensis</i> Linn.
ชื่อสามัญ (Common name)	:	Tea

2.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของชา

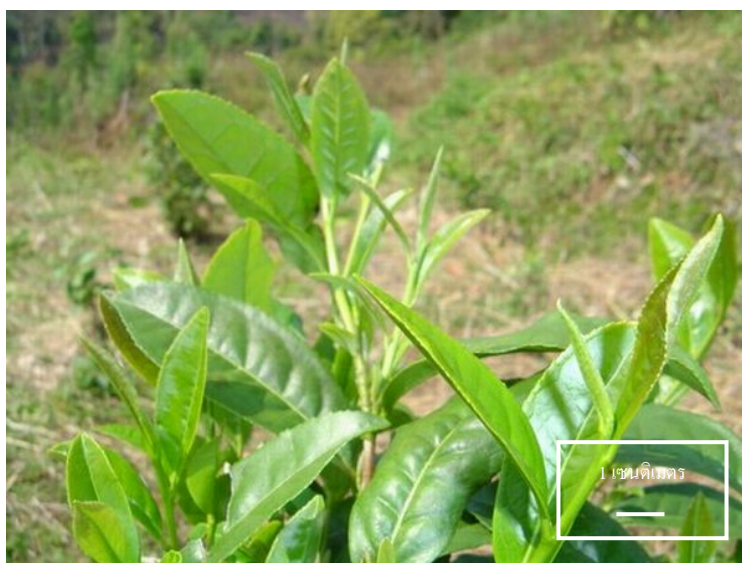
2.2.1 ราก (roots)

ประกอบด้วยรากแก้ว รากฝอยสำหรับหาอาหาร และมีการสะสมคาร์โบไฮเดรตในรูปแป้ง รากอาจมีความยาวถึง 1.5-3.0 เมตร ขึ้นอยู่กับชนิดของดินและสภาพดิน

2.2.2 ใบ (leaves)

ใบชาจะเป็นใบเดี่ยว มีการจัดเรียงตัวของใบแบบสลับ 1 ใบต่อ 1 ข้อขอบใบหยักแบบฟันเลื่อย ปลายใบแหลม แผ่นใบหนาเหนียว หน้าใบเป็นมันวาว ยาวประมาณ 7-30 เซนติเมตร ใต้ใบมีขนอ่อนปกคลุม ปากใบพบมากบริเวณใต้ใบ กลุ่มชาจีนใบแคบขนาดเล็กและสีค่อนข้างคล้ำ ดังรูปที่ 2.1 ส่วนชาอัสสัมใบจะมีขนาดใหญ่

2.2.3 ดอก (flowers)



รูปที่ 2.1 ลักษณะของใบชา



รูปที่ 2.2 ลักษณะของดอกชา

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

2.2.4 ผล (fruits)

มีลักษณะเป็นแคปซูล (Capsule) เปลือกหนาสีน้ำตาลอมเขียว แบ่งเป็น 3 ช่อง ภายในมีเมล็ด เปลือกเมล็ดบางสีน้ำตาลอ่อน ดังรูปที่ 2.3, 2.4 และ 2.5

2.3 การจำแนกพันธุ์ชา

กลุ่มพันธุ์ชาที่ปลูกกันทั่วโลก สามารถจำแนกได้เป็น 3 กลุ่มตามลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ดังนี้

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

ชาสายพันธุ์ *sinensis* หรือเรียกว่า ชาจีน ดังรูปที่ 2.6 ลักษณะลำต้นเป็นพุ่มเตี้ย สูงประมาณ 2-3 เมตร ใบมีสีเขียวเข้มขนาดเล็ก ยาว 3.8-6.4 เซนติเมตร ใบแคบหยักแบบฟันเลื่อย เส้นใบมองไม่ชัด ข้อถี่ ปล้องสั้น ทนทานต่ออุณหภูมิต่ำและสภาพแวดล้อมที่ผันแปรได้ดี ชาพันธุ์นี้ปลูกมากในประเทศจีน ปัจจุบันได้มีการทดลองนำชาจีนพันธุ์ใหม่ๆ เข้ามาปลูก ส่วนใหญ่นำต้นกล้ามาจากประเทศไต้หวัน สายพันธุ์ที่นิยมปลูกจะแตกต่างกันไปในแต่ละท้องที่ เช่นชาที่นิยมปลูกในจังหวัดเชียงราย ได้แก่สายพันธุ์ อุหลงก้านอ่อน อุหลงเบอร์ 12 ซิงซิงอุหลง ลีถูดุ ถิกวนอิม ชากลุ่มนี้ต้องการการดูแลในขณะที่ปลูกอย่างดีและใกล้ชิด ทำให้มีราคาค่อนข้างแพงเมื่อนำมาผลิตชาเพื่อบริโภค

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

ชาสายพันธุ์ *assamica* หรือเรียกว่าชาอัสสัม หรือ ชาพื้นเมือง หรือ ชาป่า ดังรูปที่ 2.7 มีถิ่นกำเนิดมาจากทางตอนล่างของทวีปเอเชียแถวๆ ประเทศอินเดีย (Bokuchava and Skobeleva, 1980) ชาที่ขึ้นกระจายตามธรรมชาติทางตอนบนของประเทศไทย จัดเป็นชาอัสสัม (สันต์, 2535) และลักษณะเป็นไม้ยืนต้นลำต้นเดี่ยว ทรงต้นค่อนข้างใหญ่ สูงประมาณ 6-8 เมตร ใบใหญ่ ดอกออกเป็นช่อ ช่อละ 2-4 ดอก เจริญเติบโตเร็ว ทนแล้ง

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

ชาเขมร มีลักษณะลำต้นเดี่ยว สูงประมาณ 5 เมตร ใบแข็งเป็นมันยาวประมาณ 7 เซนติเมตร ขอบใบหยักเป็นฟันเลื่อย แผ่นใบมีขนงอเป็นรูปตัววี (V-shape) ก้านใบออกสีแดง ถูแล้วใบจะมีสีแดงเรื่อๆ ดังรูปที่ 2.8 ทนแล้งได้ดี ยอดอ่อนรสชาติจะฝาด



รูปที่ 2.3 ลักษณะของผลชา



รูปที่ 2.4 ลักษณะของผลชา



รูปที่ 2.5 ลักษณะของเมล็ดชา



รูปที่ 2.6 ลักษณะของชาจีน (*Camellia sinensis* var. *sinensis*)



รูปที่ 2.7 ลักษณะของชาอัสสัม (*C. sinensis* var. *assamica*)



รูปที่ 2.8 ลักษณะของชาเขมร (*C. sinensis* var. *indo-china*)

2.4 ชนิดของชาแบ่งตามกระบวนการผลิต

2.4.1 ชาเขียว (Green tea) หรือ non-ferment tea

เป็นชาที่ไม่ผ่านกระบวนการหมักเลย โดยมีการยับยั้งปฏิกิริยาเคมีต่างๆ ที่เกิดขึ้นได้กับสาร polyphenols ในใบชา โดยการอาศัยความร้อนสูงๆ ไปทำลายเอนไซม์ให้เสียสภาพ จึงทำให้ปริมาณ catechins มีอยู่สูงเมื่อเทียบกับชาชนิดอื่น มีรสอ่อน น้ำชาที่ได้มีสีเขียวถึงเหลืองอ่อน พันธุ์ชาที่นิยมนำมาผลิต ได้แก่ ชาพันธุ์อัสสัม อุหลงเบอร์ 12 เป็นต้น

2.4.2 ชาอู่หลง (Oolong tea) หรือ semi - fermentated tea

เป็นชาที่ผ่านกระบวนการหมักในระยะเวลาอันสั้น กล่าวคือ ในขั้นตอนการผลิต จะมีการปล่อยให้เกิดการหมักในบางส่วน การผลิตค่อนข้างละเอียดและอาศัยความเชี่ยวชาญ รวมทั้งต้องการเทคโนโลยีการผลิตที่ค่อนข้างซับซ้อน มีคุณสมบัติอยู่ระหว่างชาดำและชาเขียว ชาชนิดนี้จะมีกลิ่นหอมละมุน รสชาติดี

2.4.3 ชาฝรั่งหรือชาดำ (Black tea) หรือ fully-fermented tea

เป็นชาที่มีการปล่อยให้เกิดการหมักอย่างสมบูรณ์เต็มที่ สาร Polyphenols ในใบชาจะเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์ ได้แก่ สารพวก Theaflavins และ Thearubigins คนจีนมักเรียกว่า ชาแดงหรือหงละ เพราะสีของน้ำชาจะออกสีแดงคล้ำสีทองแดงและมีกลิ่นหอม

2.5 องค์ประกอบทางเคมีของใบชา

จากการนำใบชามาใช้ประโยชน์ทำเป็นเครื่องดื่ม ทำให้มีการศึกษาวิจัยองค์ประกอบทางเคมีของใบชากันมากในหลายสายพันธุ์ โดยมีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญของใบชาดังสรุปในตารางที่ 2.1 ซึ่งในใบชาจะประกอบด้วยสารประกอบอินทรีย์และสารประกอบอนินทรีย์ ทั้งสารที่สามารถละลายน้ำได้ดีและละลายได้เล็กน้อย สารอนินทรีย์ที่พบจะอยู่ในรูปเกลือหรือแร่ธาตุ เช่น โพแทสเซียมที่พบมากที่สุด ส่วนสารประกอบอินทรีย์ ได้แก่ สารกลุ่มโพลีฟีนอล คาเฟอีน สารให้กลิ่น กรดอะมิโนและสารประกอบไนโตรเจน คาเฟอีนพบในใบชาประมาณ 3-4% ของน้ำหนักแห้ง เป็นสารอินทรีย์ที่ช่วยกระตุ้นประสาทและทำให้รสชาติของชาดีขึ้น ส่วนกรดอะมิโนและสารประกอบไนโตรเจนในใบชาประกอบด้วย กรดอะมิโน เอไมด์ กรดนิวคลีอิก และโปรตีน ซึ่งมีประมาณร้อยละ 4.5-6.0 และมีกรดอะมิโน คือ thiamine และ glutamic acid อยู่กว่าครึ่งของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในชา ส่วนโปรตีนที่พบ 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
Soluble 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) โดยทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันทำให้สาร polyphenols กลายเป็นสารจำพวก Quinone ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาถูกโซ่ต่อกลายเป็นสารที่มีสีเข้ม (Baruah, 2003) เรียกปฏิกิริยานี้ว่ากระบวนการเกิด browning ของพืช (Lee *et al.*, 2002) และนอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ที่สำคัญ คือ เอนไซม์ Catechol oxidase ทำหน้าที่ในการออกซิไดซ์ catechins โดยระดับความสูงต่ำของเอนไซม์สามารถบอกให้ทราบถึงคุณภาพของการหมักใบชา 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) ในใบชาสดจะมีสารเคมีกลุ่ม polyphenols อยู่ประมาณ 20-35% ค่อนข้างน้อย ใบสดซึ่งจัดเป็นสารประกอบ phenols ที่เป็น secondary phytochemicals ที่พบได้ในส่วนต่างๆ ของพืช เช่น เมล็ด ใบ เปลือก และ ดอก ของพืชหลายชนิด สารกลุ่มนี้มีโมเลกุลขนาดเล็กและมีวง flavan เป็นโครงสร้างหลักของโมเลกุล ส่วนในกลุ่ม flavonoids และ tannins มีผลต่อสุขภาพในแง่ที่มีฤทธิ์เป็นสาร antioxidants และมีคุณสมบัติจับกับไอออนโลหะได้ (Cheng and Breen, 2000; Soczynska-Kordala *et al.*, 2001) ซึ่งอาจเรียกสารพวก flavonols ในใบชาได้ว่า เป็นสารพวก catechins โดยพบในส่วนต่างๆ อันได้แก่ ยอด ก้าน ใบ ลำต้น ราก และเมล็ด ซึ่งมี ส่วนประกอบของปริมาณสารที่แตกต่างกัน

2.6 เทคนิคทางอนุชีววิทยาที่ใช้แยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์

การแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ โดยเทคนิคทางอนุชีววิทยา สามารถทำได้หลายวิธี ซึ่งวิธีที่นิยมใช้โดยทั่วไป มีดังนี้

2.6.1 Randomly Amplified Polymorphic DNAs (RAPD) เป็นวิธีที่ใช้ตรวจสอบความแตกต่างหรือความหลากหลายของจีโนมซึ่งถูกทำให้เพิ่มปริมาณโดย Polymerase Chain Reaction (PCR) จากการใช้ Universal primers จึงสามารถจับเบสคู่สมกับ DNA template ได้หลายตำแหน่งแบบสุ่ม หากการจับเบสคู่สมนั้นเกิดขึ้นในทิศทางที่เหมาะสมก็จะทำให้เกิดการจำลองตัวของจีโนม ซึ่งความแตกต่างของสารพันธุกรรมนี้ได้นำไปทำให้เกิดความแตกต่างในความสามารถของการเกิดการจำลองตัวและขนาดชิ้น DNA ที่ถูกจำลองตัว เช่น การหาความแตกต่างสายพันธุ์ของถั่งเช่า (*Cordyceps sinensis*) 29 สายพันธุ์ ซึ่งผลที่ได้จากเทคนิค RAPD เมื่อนำไปทำ phylogenetic tree ทำให้สามารถแบ่งถั่งเช่าออกได้เป็น 3 กลุ่ม (Chen *et al.*, 1999)

2.6.2 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) เป็นการตรวจสอบความแตกต่างหรือความหลากหลายของซันดิเอ็นเอหลังจากถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) สารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตต่างสายพันธุ์กันย่อมมีลำดับเบสที่แตกต่างกันไม่มากนักน้อยความแตกต่างนี้อาจเกิดจากการกลายพันธุ์ (mutation) ตามธรรมชาติ ซึ่งมีผลให้ตำแหน่งจดจำ (recognition site) ของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป โดยอาศัยซันดิเอ็นเอตรวจสอบ (probe) สามารถตรวจพบความเปลี่ยนแปลงนั้นได้จากรูปแบบการจับกัน (hybridization) ระหว่างเส้นดิเอ็นเอคู่สม (complementary DNA) ซึ่งในสายพันธุ์ที่แตกต่างกันจะให้รูปแบบการ hybridize ที่แตกต่างกัน มีรายงานการหาความแตกต่างในสายพันธุ์ชาญี่ปุ่นด้วยวิธี (RFLP) ซึ่งใช้ PAL เป็น probe ชาที่ปลูกอยู่ในญี่ปุ่นทั้งที่เป็นชาสายพันธุ์พื้นเมือง และสายพันธุ์ที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์มาแล้วน่าจะมีต้นกำเนิดมาจากชาในประเทศจีน (Matsumoto *et al*, 2002)

2.6.3 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) เป็นวิธีการตรวจสอบความแตกต่างหรือความหลากหลายของซัน DNA ที่ได้ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะซึ่งตรวจสอบได้โดยปฏิกิริยาลูกโซ่จำลองตัว เป็นการรวมหลักการของ RFLP และ RAPD เข้าด้วยกัน DNA จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสองชนิดที่มีตำแหน่งจดจำแตกต่างกัน ซัน DNA ที่ได้จะถูกต่อเข้ากับซัน DNA สังเคราะห์ทราบรหัส (adapter) 2 ชนิด จากนั้นทำ PCR โดยอาศัย primer ที่จำเพาะกับซันดิเอ็นเอสังเคราะห์ทราบรหัสและเบสคัดเลือก (N) ในซันดิเอ็นเอเป้าหมาย ข้อดีของ AFLP คือมีความแน่นอนของผลการตรวจสอบสูงเหมือน RFLP และสามารถตรวจสอบความหลากหลายได้หลายตำแหน่งภายในสารพันธุกรรมเหมือน RAPD ซึ่งเทคนิคการทำ (AFLP) นี้ถูกนำมาใช้จำแนกหาความแตกต่างใน *Brassica juncea* สามารถจำแนกออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยกลุ่มที่สามารถจำแนกออกมานั้นในกลุ่มแรกจะไม่มี ความหลากหลายอยู่เลย ในขณะที่อีกกลุ่มหนึ่งมีความหลากหลายอยู่มาก (Qi *et al.*, 2007)

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

3.1 ตัวอย่างพืช

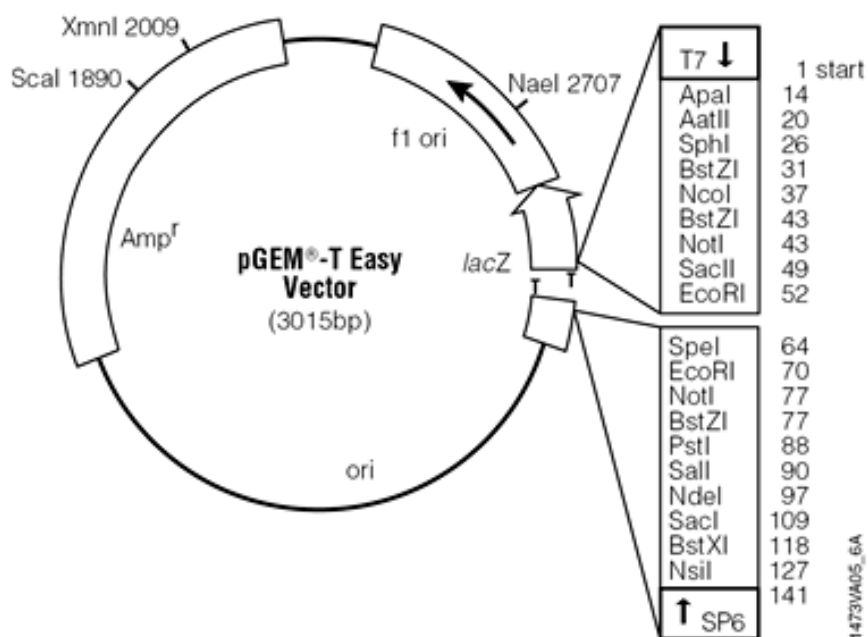
ในการทดลองครั้งนี้ใช้ยอดชา 15 สายพันธุ์ ดังนี้ ชาอู่หลงเบอร์ 12 จากไร่บุญรอด ชาอู่หลงเบอร์ 12 จากไร่สุวิรุฬห์ ชาอู่หลงเบอร์ 12 จากไร่ศุภชัย ชาอู่หลงเบอร์ 12 จากบ้านพญาไพร ชาอู่หลงเบอร์ 17 จากไร่สุวิรุฬห์ ชาอู่หลงเบอร์ 17 ก้านอ่อนจากบ้านแม่จรหลวง ชาอู่หลงเบอร์ 17 จากบ้านพญาไพร ชาอู่หลงเบอร์ 17 จากไร่วังพุดตาล ชาอัสสัมจากบ้านพญาไพร ชาอัสสัมจากบ้านห้วยหยวกป่าโซ ชาอัสสัมยอดแดงจากไร่คอยาวี ชาชิงชังจากศูนย์วิจัยคอยาวี ชาชิงชังเบอร์ 12 จากไร่คอยอมพายชา CK-10 จากคอย่างเคียนจังหวัดเชียงใหม่ และชา Yamatomidori จากไร่บุญรอด ซึ่งทั้งหมดเก็บจาก germplasm collection ของมหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง จังหวัดเชียงราย

3.2 สารเคมี

สารเคมีทุกชนิดในการทดลองนี้ใช้สารเคมีที่มีความบริสุทธิ์ในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งซื้อจาก บริษัท BIO-RAD, Bio Basic Inc., Gibco BRL, Merck, Promega, Sigma, Invitrogen, USB Corporation, BDH Laboratory Supplies, Research Organics, Amersham Pharmacia Biotech และ Fermentus เป็นต้น

3.3 เวกเตอร์

pGEM[®]-T Easy (3015 คู่เบส) (Promega) ซึ่งเวกเตอร์นี้มีความเหมาะสมในการโคลนชิ้น DNA ที่ได้จากการทำ PCR ซึ่งมีแผนที่ยีนตามรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 รูปภาพแสดงแผนที่ยีนของเวกเตอร์ pGEM®-T Easy ซึ่งประกอบด้วยบริเวณ multiple cloning site ขนาบข้างด้วย T7 และ SP6 RNA polymerase promoter เอนไซม์ β -galactosidase (*lac Z*) และยีนที่ต้านทานต่อยาแอมพิซิลิน ซึ่งเหมาะสำหรับการโคลนนิ่ง DNA จากการทำให้ PCR

3.4 สายพันธุ์แบคทีเรีย

ในงานวิจัยนี้ใช้แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ **DH5 α** [*supE44*, Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*] (GIBCO BRL) ใช้เป็นโฮสต์ในการ transformation

3.5 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

อาหารเลี้ยงเชื้อ LB ซึ่งเหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* ประกอบด้วย tryptone หรือ peptone ความเข้มข้น 1% (w/v), yeast extract ความเข้มข้น 0.5% (w/v) และ โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1% (w/v) โดยมีค่าความเป็นกรดด่าง (pH) เท่ากับ 7.5

อาหารวุ้น LB เตรียมโดยการผสมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB กับ bacto-agar ความเข้มข้น 1% (w/v) ขบวนการเพาะเชื้อใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีพลาสมิดถูกผสม

3.6 เอนไซม์และบัฟเฟอร์

Taq DNA polymerase (Promega), T4 DNA ligase (Gibco BRL) และเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Promega) ดังแสดงในตาราง 3.1

10X buffer B : 60 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl, 60 mM MgCl₂ and 10 mM DTT

10X buffer D : 60 mM Tris-HCl (pH7.9), 1.5 M NaCl, 60 mM MgCl₂ and 10 mM DTT

10X buffer H : 900 mM Tris-HCl (pH 7.5), 500 mM NaCl and 100 mM MgCl₂ and 10mM DTT

ตารางที่ 3.1 แสดงเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการวิจัย

เอนไซม์ตัด จำเพาะ	ลำดับเบสจำเพาะ	อุณหภูมิที่ เหมาะสม	บัฟเฟอร์ที่ เหมาะสม	บริษัท
<i>EcoR</i> I	G↓AATTC	37°C	Buffer H	Promega
<i>Xba</i> I	T↓CTAGA	37°C	Buffer D	Promega
<i>EcoR</i> V	GAT↓ATC	37°C	Buffer D	Promega
<i>Hinc</i> II	GT(T/C)↓(A/C)AC	37°C	Buffer B	Promega
<i>Dra</i> I	TTT↓AAA	37°C	Buffer B	Promega

↓ แสดงบริเวณตัดจำเพาะ

3.7 Oligonucleotide primer

งานวิจัยนี้ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ซึ่งสังเคราะห์โดย Proligo Singapore Pty Ltd. ดังแสดงในตาราง 3.2

ตารางที่ 3.2 แสดงลำดับเบสของ Oligonucleotide primer

Experiment	Name	Sequences (5'-3')	Size (bp)	Tm (°C)
Southern blot และ PCR- RFLP	PAL-F	TCCTCAATGGCTAGGACCAC	20	62
	PAL-R	GGAAGTGAATTGTTGACCGG	20	60
	CHS-2F	CATGGTTGTGGTTGAAGTGC	20	60
	CHS-2R	CTAGGCCACGGAAGGTGAC	20	66

3.8 อุปกรณ์อื่นๆ

-DNeasy plant mini kit	QIAGEN
-e-z DNA kit	Sunoloin
-Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs)	AmershamPharmaciaBiotech
-Standard DNA markers	Fermentas,Biolabs, GibcoBRL
-QIAquick [®] gel purification kit	QIAGEN
-Ampicillin	Sigma
-QIAquick [®] plasmid extraction kit	QIAGEN
-DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II	Roche

3.9 วิธีสกัด DNA โดยชุดสกัด DNeasy plant mini (QIAGEN)

บดตัวอย่างใบชาในไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดเป็นผงแล้วตักใส่หลอด microfuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ประมาณ 1/3 ของหลอด(หรือ 100 มิลลิกรัม) เติม buffer AP1 400 ไมโครลิตร และ เอนไซม์ RNase A (ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 4 ไมโครลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ระหว่างนั้นให้กลับหลอดไปมาเป็นครั้งคราว ประมาณ 2-3 ครั้ง แล้วเติม buffer AP2 130 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ จากนั้นนำไปแช่น้ำแข็งไว้ 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นดูดส่วนใสใส่ใน QIAshredder Mini spin column ที่อยู่ในหลอด microfuge ขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อ นาที นาน 2 นาที จากนั้นดูดส่วนใสที่ไหลผ่าน column ลงมาใส่ในหลอด microfuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยระวังอย่าให้โดนตะกอน และเติม buffer AP3/E เป็นปริมาณ 1.5 เท่าของสารละลายที่ดูดได้แล้วผสมให้เข้ากันโดยการดูดขึ้นลงเบาๆ ด้วย micropipette ก่อนนำมาใส่ใน QIAshredder Mini spin column ที่อยู่ในหลอด microfuge ขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ทั้งสารละลายที่ไหลผ่าน column จากนั้นปั่นซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัด สารละลายที่อยู่ใน column ออกให้มากที่สุด นำ QIAshredder Mini spin column ไปใส่หลอด

microfuge ขนาด 2 มิลลิลิตร หลอดใหม่ แล้วเติม buffer AW 500 ไมโครลิตร เพื่อล้าง DNA ที่อยู่ใน column จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ทิ้งสารละลายที่ไหลผ่าน column ลงมาและเติม buffer AW อีกครั้งในปริมาณ 500 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ทิ้งสารละลายที่ไหลผ่าน column ลงมา และปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เพื่อกำจัด buffer AW ออกจาก column ให้ได้มากที่สุด จากนั้นนำ QIAshredder Mini spin column ไปใส่หลอด microfuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ แล้วเติม buffer AE 100 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที จากนั้นจึงเก็บ DNA ที่อยู่ในหลอดเพื่อทำ gel electrophoresis ต่อไป

3.10 วิธีการสกัด DNA โดยชุดสกัด Ezi DNA (Sunnolin)

บดตัวอย่างใบชาในไนโตรเจนเหลวให้ละเอียดเป็นผงแล้วตักใส่หลอด microfuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ประมาณ 1/3 ของหลอด(หรือ 100 มิลลิกรัม) จากนั้นเติม buffer DA ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 500 ไมโครลิตร, buffer DB ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 40 ไมโครลิตร, 2-mercapto methanol 2 ไมโครลิตร และเอนไซม์ RNase A (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 2 ไมโครลิตร ลงในหลอดตัวอย่าง แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 10 วินาที จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วย้ายหลอดมาตั้งที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที จากนั้นเติม phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) 500 ไมโครลิตร นำไป vortex เป็นเวลา 10 วินาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นดูดส่วนใสชั้นบน ไปใส่หลอด microfuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ ทำขั้นตอนนี้อีกครั้งหนึ่งแล้วเติม chloroform:isoamyl alcohol (24:1) 500 ไมโครลิตร นำไป vortex เป็นเวลา 10 วินาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นดูดส่วนใสชั้นบน ไปใส่หลอด microfuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่แล้วเติม 3 M Sodium acetate 50 ไมโครลิตร และ Absolute Ethanol ที่แช่เย็น 500 ไมโครลิตร เพื่อตกตะกอน DNA กลับหลอดไปมาเบาๆเป็นเวลา 30 วินาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นดูดสารละลายทิ้งแล้วล้างตะกอน DNA ด้วย 80% Ethanol ที่แช่เย็น 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ดูดสารละลายทิ้งแล้วนำตะกอน DNA ไปทำให้แห้ง และละลายด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อและนำไปทำ gel electrophoresis ต่อไป

3.11 การเพิ่มชิ้น DNA ของยีน PAL และ CHS จาก genomic DNA โดย

Polymerase Chain Reaction (PCR)

เตรียมส่วนผสมของ PCR reaction ในปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 5X PCR buffer , 100 นาโนกรัมของ DNA template, Forward Primer และ Reverse Primer อย่างละ 10 μ M dNTP 15 mM และ Taq polymerase (Promega) 1 unit ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นหนึ่งมา เชื้อให้มีปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำเข้าเครื่อง PCR โดยตั้งโปรแกรมให้ดำเนินการตามลำดับดังนี้ โดยเริ่มจาก Denaturing ที่ 96 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้น PCR amplification 30 รอบ : 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที (denature) 60 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที (annealing) 72 องศาเซลเซียส นาน 60 วินาที (extension) แล้วตามด้วย extension รอบสุดท้ายที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที

3.12 Gel electrophoresis

เตรียมเจล agarose 0.8% ใน 1X TBE ปริมาตร 50 มิลลิตร นำไปอุ่นในตู้ไมโครเวฟจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน วางทิ้งไว้จนกระทั่งอุณหภูมิลดลงประมาณ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นเทลงในพิมพ์สำหรับเตรียมเจลแล้วเสียบ comb เพื่อให้เกิดหลุมสำหรับใส่สารตัวอย่าง ทิ้งไว้จน agarose แข็งตัว นำไปใส่ในชุด electrophoresis เติม 1X TBE จนท่วมผิวเจลนำ comb ออกจากเจล นำตัวอย่างจาก PCR product 2 ไมโครลิตร เติม 6X loading dye 1 ไมโครลิตร และ น้ำกลั่น 3 ไมโครลิตร ผสมกัน แล้วนำไปหยอดในหลุมเจล ทำการแยกโดยใช้กระแสไฟฟ้า 90 โวลต์ ผ่านเจลประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเจลที่ได้ไปแช่ในสารละลาย ethidium bromide (0.5mg/ml) ประมาณ 2-5 นาที แล้วแช่ในน้ำกลั่น 15 นาทีเพื่อกำจัด ethidium bromide ส่วนเกินออก จากนั้นดูแถบ DNA ที่ปรากฏภายใต้แสง UV

3.13 การสกัด DNA จากเจล agarose โดยใช้ชุดสกัด QIAquick gel

extraction (QIAGEN)

ตัดเจลในบริเวณที่มีแถบ DNA ที่ต้องการด้วยมีดที่คมและสะอาด ชั่งน้ำหนักแล้วใส่ใน

หลอด microfuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม buffer QG 3 เท่าของน้ำหนักรหัส (100 ไมโครลิตร ต่อเจล 100 มิลลิกรัม) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 10 นาที หรือจนกระทั่งเจลละลายดีและคอย สังเกตดูว่า buffer QG ในหลอดไม่เปลี่ยนสี จากนั้นเติม isopropanol 1 เท่าของน้ำหนักรหัส แล้วดูด สารละลายใส่ column และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ที่ซึ่งสารละลายที่อยู่ใน หลอดรองรับภายนอก เติม buffer PE 750 ไมโครลิตร เพื่อล้าง column แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที 1 นาที ที่ซึ่งสารละลายที่อยู่ในหลอดรองรับภายนอก จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเพิ่มอีก 1 นาที เพื่อกำจัด buffer PE ออกให้หมดแล้วนำ column ไปใส่ใน microfuge หลอดใหม่ เติม buffer EB หรือน้ำกลั่นนิ่งมาเชื้อ 50 ไมโครลิตร ลงตรงกลาง column ที่ซึ่ง ไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที และ เก็บ DNA ในหลอดที่ 4 องศาเซลเซียส

3.14 การ Ligation

ในการ Ligation ต้องใช้อัตราส่วนของชิ้น DNA insert และ vector ที่เหมาะสมซึ่ง โดยทั่วไปใช้อัตราส่วนโมล insert: vector เท่ากับ 3:1 โดยสามารถคำนวณปริมาณ DNA insert ที่ ต้องใช้ได้จากสูตร

$$\frac{\text{ng of vector} \times \text{size of insert (kb)}}{\text{size of vector (kb)}} \times \text{insert : vector molar ratio} = \text{ng of insert}$$

ในการทดลองนี้ใช้ pGEMT-Easy เป็น vector ซึ่งมีขนาด 3 กิโลเบส (kb) และใช้ปริมาณ 50 นาโน กรัม ซึ่งจากสูตรทำให้คำนวณได้ว่าจะต้องใช้ PAL DNA probe (0.9 kb) ในปริมาณ

$$\frac{50 \text{ ng vector} \times 0.9 \text{ kb insert}}{3.0 \text{ kb}} \times 3/1 = 45 \text{ ng}$$

ในขณะที่จะต้องใช้ CHS DNA probe (0.3 kb) ในปริมาณ

$$\frac{50 \text{ ng vector} \times 0.3 \text{ kb insert}}{3.0 \text{ kb}} \times 3/1 = 15 \text{ ng insert}$$

จากนั้นเตรียม Reaction สำหรับการทำให้ ligation ในปริมาตรที่เหมาะสม โดยมี DNA insert ใน ปริมาณที่ได้จากการคำนวณข้างต้นและ 50 นาโนกรัม pGEMT-Easy vector ใน 1X rapid ligation buffer แล้วเติม 5 unit ของเอนไซม์ T4 DNA ligase ปรับให้ได้ปริมาตรสุดท้ายตามต้องการด้วยน้ำ

deionize หนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นนำ reaction ใส่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน (ประมาณ 14-16 ชั่วโมง)

3.15 การ Transformation

นำ ligation reaction ที่ ligate ไว้แล้ว 14-16 ชั่วโมงไปใส่ในหลอด microfuge ที่มี competent *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5- α 200 ไมโครลิตร (ที่เตรียมโดยวิธี...) จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แล้วจุ่มลงในน้ำที่มีอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส (Heat shock) นาน 90 วินาที จากนั้นนำลงแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth 800 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียที่ได้ไป spread บน LB Ampicilin agar plate ที่มี 2% x-gal และ 100 mM IPTG 1:5 spread อยู่ก่อนแล้ว จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากครบ 16 ชั่วโมงแล้วเลือกเฉพาะ colony ที่มีสีขาว มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth เพื่อนำไปสกัด plasmid ต่อไป

3.16 วิธีสกัด Plasmid โดยชุดสกัด QIAquick plasmid extraction (QIAGEN)

ละลายตะกอนเซลล์แบคทีเรียใน buffer P1 ที่เติม RNase A แล้ว 250 ไมโครลิตร จากนั้นเติม buffer P2 250 ไมโครลิตร แล้วกลับหลอดไปมาเบาๆ ให้เข้ากัน แล้วเติม buffer N3 350 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาเบาๆ ให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วดูดส่วนใสไปใส่ใน QIAprep column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 30-60 วินาที ที่สารละลายที่อยู่ในหลอดรองรับภายนอก แล้วล้าง column ด้วยการเติม buffer PE 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 30-60 วินาที ที่สารละลายที่อยู่ในหลอดรองรับภายนอก จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เพิ่มอีก 1 นาที เพื่อกำจัด buffer PE ออกให้หมด แล้วนำ column ไปใส่ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ เติม buffer EB หรือน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 50 ไมโครลิตร ลงตรงกลาง column ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บสารละลาย plasmid ที่อยู่ในหลอดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.17 การติดฉลาก DNA probe ด้วย Dioxygenin-11-dUTP (Roche) ด้วยวิธี

PCR labelling

เตรียม Reaction สำหรับการทำให้ PCR ดังนี้ (reaction 50 ไมโครลิตร) 10X PCR buffer 5 ไมโครลิตร 25mM MgCl₂ 3 ไมโครลิตร DNA template (10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)

1 ไมโครลิตร 10 μM forward primer 10 μM reverse primer 10mM dATP 10mM dCTP 10mM dGTP และ 10mM dTTP อย่างละ 1 ไมโครลิตร 1mM DIG-dUTP 3.5 ไมโครลิตร Taq polymerase 5U/μl (Promaga) 0.75 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นหนึ่งมาเชื้อให้ เป็น 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำ reaction เข้าเครื่อง thermo cycler และตั้ง condition เหมือนกับการเพิ่มชิ้น DNA probe

3.18 การตกตะกอน DNA เพื่อทำ gel electrophoresis สำหรับ southern blot

transfer และการทำ Southern blot transfer

นำ reaction ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมารวมกันใน microfuge หลอดใหม่จากนั้นเติม 3M sodium acetate ปริมาตร 1/10 เท่าของปริมาตรรวมในหลอด และเติม isopropanol อีก 1 เท่าของปริมาตรรวมแล้วผสมให้เข้ากันด้วยการกลับลดลงไปมาเบาๆ จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที (สามารถทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ได้ข้ามคืน) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทสารละลายส่วนใสทิ้ง จากนั้นล้างตะกอน DNA ด้วย 70% Ethanol 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ซึ่งทำขั้นตอนนี้ 2 รอบ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งตะกอน DNA แห้งและละลายตะกอน DNA ด้วยน้ำกลั่นหนึ่งมาเชื้อ 20 ไมโครลิตร เพื่อทำ gel electrophoresis จากนั้นแช่เจล ที่ผ่านขั้นตอน gel electrophoresis มาแช่ใน Depurination buffer 10 นาที หรือจนกระทั่งสีของ dye ในเจลกลายเป็นสีเหลือง แล้วล้างเจลด้วยน้ำกลั่น จากนั้นแช่เจลใน denaturation solution นาน 15 นาที นำเจลวางลงบนแผ่น nylon membrane ที่อยู่บนเครื่อง vacuum transfer blotting ซึ่งในระหว่างการ transfer หมั่นหยด alkaline transfer buffer ให้ทั่วเจล ใช้เวลาในการ transfer ประมาณ 2-3 ชั่วโมง เมื่อการ transfer เสร็จสิ้น นำ nylon membrane จุ่มลงในสารละลาย 2x SSC 2 ครั้ง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 ชั่วโมง หากยังไม่ทำการ hybridize สามารถเก็บ nylon membrane ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการ hybridize ต่อไป

3.19 วิธี Prehybridization และ Hybridization

อุ่น Hybridization buffer ไว้ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จากนั้นต้ม Salmon sperm DNA และ DNA probe 5 นาที เพื่อแยกสาย DNA ให้กลายเป็น DNA สายเดี่ยวและจุ่มลงในน้ำแข็งทันที เพื่อให้คงสภาพความเป็น DNA สายเดี่ยว แล้วนำ nylon membrane แच्छลงใน hybridization buffer 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติม salmon sperm DNA ลงใน hybridization buffer ให้มีความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการ prehybridize นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จากนั้นเติม DNA probe ที่ต้มไว้ตอนต้นลงใน prehybridization solution ให้มีความเข้มข้น 5-25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ hybridize ไว้ข้ามคืน (ประมาณ 16-18 ชั่วโมง) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

3.20 การ Washing and detection

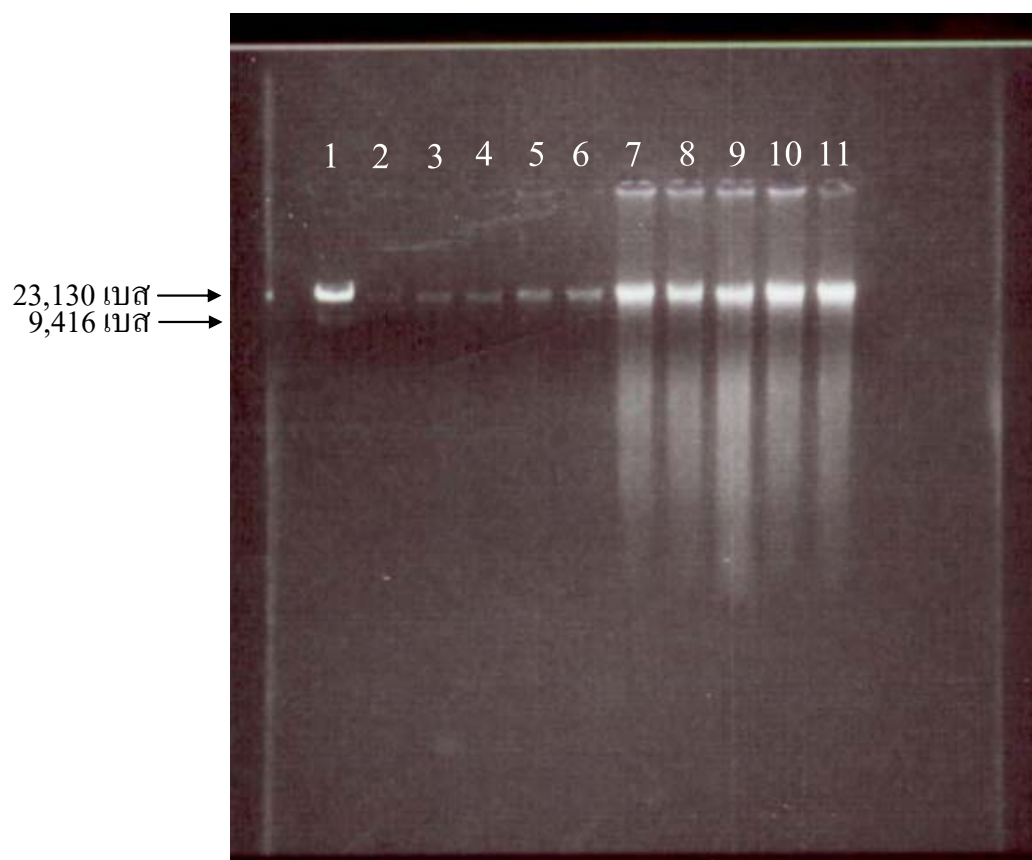
นำแผ่น nylon membrane ที่ hybridize เสร็จแล้วมาแช่เบาๆใน hybridization washing buffer I นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง 2 รอบ จากนั้นนำแผ่น nylon membrane แช่เบาๆใน hybridization washing buffer II นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 2 รอบ แล้วนำแผ่น nylon membrane แच्छใน washing buffer 5 นาที จากนั้นแช่ใน blocking solution เป็นเวลา 30 นาที และต่อด้วยแช่ใน antibody solution นาน 30 นาที จากนั้นล้างแผ่น nylon membrane ด้วย washing buffer 2 รอบรอบละ 15 นาที แล้วแช่แผ่น nylon membrane ใน detection buffer 5 นาที จากนั้นนำแผ่น nylon membrane วางบนถุงพลาสติกโดยให้ด้านที่มี DNA หายขึ้น และหยด CSPD ready-to-use ลงบนแผ่น nylon membrane ประมาณ 1-2 มิลลิลิตร ให้ทั่วบริเวณผิวหน้าของแผ่น nylon membrane แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นรีดเอาของสารละลายส่วนที่เกินออกและใช้เครื่องซีลปิดถุงพลาสติกให้สนิท แล้วนำแผ่น nylon membrane ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำถุงพลาสติกที่ใส่แผ่น nylon membrane ไปติดใน cassette โดยพยายามทำให้แผ่น nylon membrane เรียบที่สุด จากนั้นนำฟิล์ม x-ray ประกบลงบนแผ่น nylon membrane นาน 15-25 นาที หรือตามเวลาที่ต้องการและนำฟิล์ม x-ray ไปล้างโดยใช้เครื่องล้างฟิล์มต่อไป ทั้งนี้ในขั้นตอนการประกบฟิล์ม x-ray และการล้างฟิล์ม x-ray นั้นจะต้องทำให้ห้องมืดเท่านั้น

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การสกัด Genomic DNA ด้วย ชุดสกัด DNeasy plant mini

หลังจากที่สกัด Genomic DNA จากใบอ่อนและใบแก่ของชาอัสสัมจากบ้านพญาไพรด้วยชุดสกัด DNeasy plant mini และนำ DNA ที่ได้ไปทำ gel electrophoresis ดังแสดงในรูปที่ 4.1 พบว่า Genomic DNA ที่สกัดได้ปรากฏเป็นแถบ DNA ขนาดประมาณ 23 กิโลเบส แต่มีแถบ DNA smear เป็นสายยาวปรากฏอยู่ทั้งในยอดและใบแก่ ซึ่งเป็นลักษณะของ Genomic DNA ที่มีการฉีกขาด โดยในยอดจะสามารถสกัด DNA ได้ปริมาณมากกว่าในใบแก่ โดยดูจากความสว่างของแถบ DNA คือแถบ DNA ของใบอ่อนมีความสว่างมากกว่าในใบแก่อย่างเห็นได้ชัด ซึ่งน่าจะเพราะว่าในใบอ่อนนั้นมีการแบ่งเซลล์ที่มากกว่าใบแก่ จำนวนเซลล์จึงมีมากกว่า ทำให้สกัดได้ Genomic DNA ได้ปริมาณมากกว่าใบแก่ ส่วนการฉีกขาดของ DNA นี้มีความเป็นไปได้ที่เกิดจากขั้นตอนการผ่าน column ในการสกัด ซึ่ง Genomic DNA จะติดอยู่บน membrane และสิ่งปนเปื้อนต่างๆจะไหลผ่านออกไป และในขั้นตอนสุดท้ายจะใช้การชะเอา Genomic DNA ออกจาก membrane เพื่อนำไปทดสอบต่อไป Genomic DNA ที่สกัดได้นั้นจึงอาจเกิดการฉีกขาดเสียหายได้ นอกจากนี้ยังพบว่าสารละลาย DNA ที่ elute ออกจาก column นั้นมีสีคล้ำน้ำชาอีกด้วย ซึ่งอาจแปลว่า DNA ที่สกัดได้จากชุดสกัด DNeasy plant mini นั้นนอกจากจะเกิดการฉีกขาดแล้วยังมีการปนเปื้อนของสารกลุ่ม Polyphenol อีกด้วย DNA ที่ได้นี้จึงไม่เหมาะจะนำไปทำการทดสอบ ผู้วิจัยจึงหาวิธีการสกัด DNA แบบอื่นที่จะเหมาะสมกับตัวอย่างใบชา พบว่ามีรายงานของ Chaudshry *et al.* (1999) ซึ่งได้นำเสนอวิธีการสกัด Genomic DNA จากฝ้ายซึ่งมีปริมาณสารพวก phenolic compound และ polysaccharide อยู่มาก ในการทดลองของ Chaudshry *et al.* นั้นได้สกัด Genomic DNA แล้วนำไปทำ PCR และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะแล้วได้ผลดี แต่ในงานวิจัยนี้เมื่อลองใช้วิธีสกัดแบบเดียวกันแล้วปรากฏว่าเกิดตะกอนสีน้ำตาลไม่ละลายน้ำในขั้นตอนการสกัดไม่สามารถสกัดออกมาจนได้เป็น Genomic



รูปที่ 4.1 แสดงแถบ Genomic DNA ที่สกัดจากใบอ่อนและใบแก่ของชาอัสสัมจากบ้านพญาไพร โดยใช้ชุดสกัด DNeasy plant mini เลนที่ 1 DNA marker: Lamda DNA ตัดด้วย *Hind*III เลนที่ 2-6 แถบ DNA ที่สกัดได้จากใบแก่ เลนที่ 7-11 แถบ DNA ที่สกัดได้จากใบอ่อน

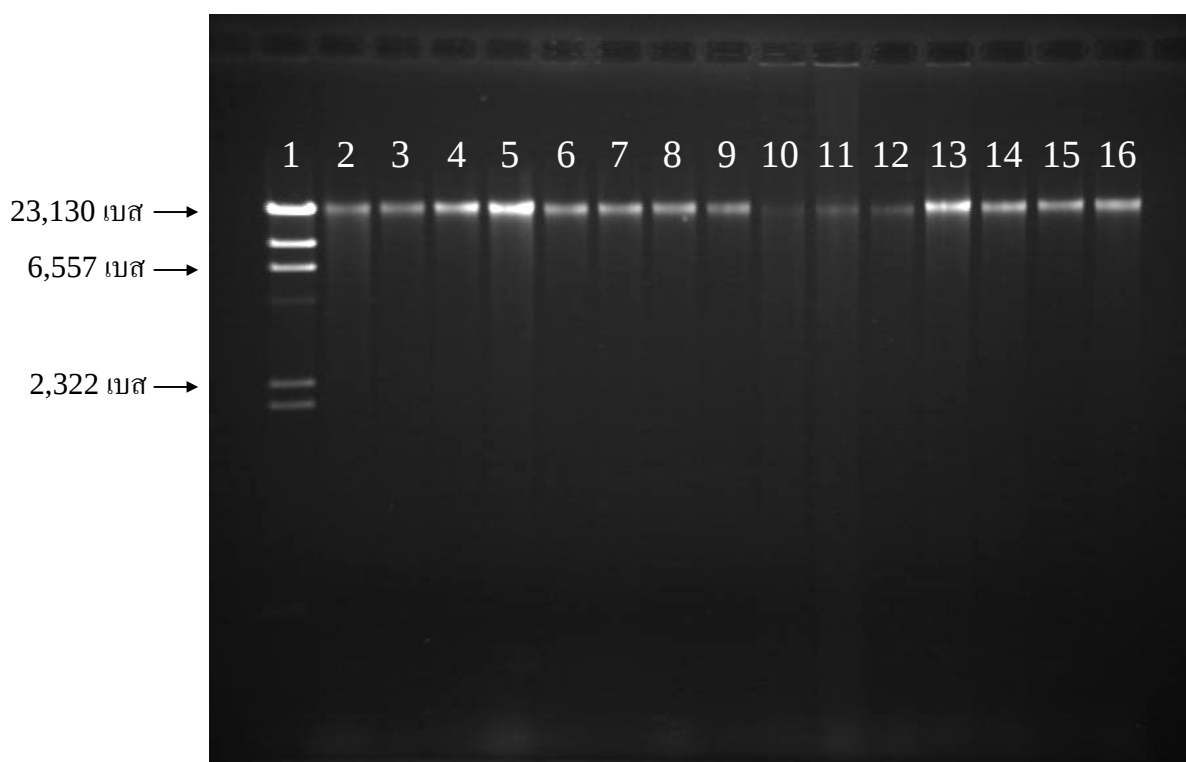
DNA ได้ และจากรายงานที่เปรียบเทียบวิธีสกัด DNA 5 วิธีที่ทำในพืชสกุล *Dalbergia* ซึ่งมีสารพวก secondary metabolites มากพบว่าในวิธีที่เติม polyvinylpyrrolidone (PVP) สามารถกำจัดสารกลุ่ม phenolic compounds ได้ดีที่สุด (Ribeiro and Lovato, 2007) ซึ่งเป็นวิธีที่ควรเลือกใช้ในงานวิจัยนี้ แต่เมื่อลองใช้วิธีนี้สกัด DNA จากยอดชาแล้ว ไม่ได้ผลเป็นที่น่าพอใจเนื่องจากเกิดปัญหาในการกำจัดโปรตีนและ Polysaccharides โดยเกิดตะกอนไม่ละลายน้ำสีขาวในขั้นตอนการสกัดทำให้ไม่ได้ Genomic DNA ออกมา และต่อมาได้ทดลองใช้ชุดสกัด Ezi DNA ซึ่งปรากฏว่าได้ผลเป็นที่น่าพอใจ

4.2 การสกัด Genomic DNA ด้วย ชุดสกัด Ezi DNA

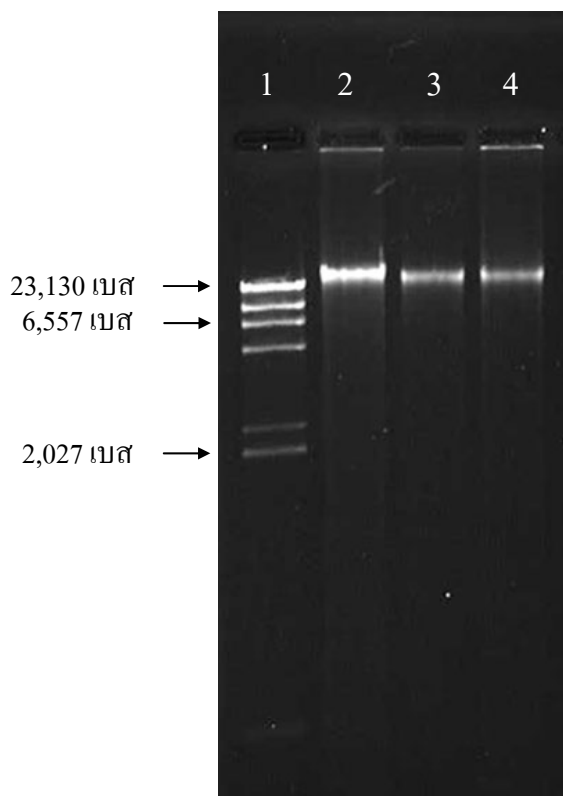
หลังจากที่สกัด Genomic DNA จากยอดชา 15 สายพันธุ์ ด้วยชุดสกัด Ezi DNA พบว่า สารละลาย DNA ที่ได้นั้นใสไม่มีตะกอน และเมื่อนำ Genomic DNA ที่ได้ไปทำ gel electrophoresis ปรากฏว่าเห็นแถบ DNA ขนาดประมาณ 23 กิโลเบส และมีแถบ DNA smear เล็กน้อยในทุกตัวอย่าง แต่ในตัวอย่างชาอัสสัม (พญาไพร) ชาอัสสัม (ห้วยห้วยกป้าโซ) และชาอัสสัมยอดแดง (ดอยวาวี) มีปริมาณน้อยกว่าตัวอย่างอื่นๆ (รูปที่ 4.2) จึงทำการสกัดอีกครั้งด้วยปริมาณตัวอย่างสดที่มากกว่าเดิม พบว่ามีปริมาณ DNA เพิ่มขึ้นโดยดูจากความเข้มของแถบ DNA เมื่อทำ gel electrophoresis ซึ่งกล่าวได้ว่าในวิธีการสกัด DNA ด้วยชุดสกัด Ezi DNA นั้นจะให้ DNA ที่มีคุณภาพดีที่สุดในการทดลองนี้ (รูปที่ 4.3)

4.3 การวัดปริมาณ DNA

ทำการวัดปริมาณ Genomic DNA ที่สกัดได้โดย เทียบความเข้มของแถบ DNA กับแถบของ DNA marker (lamda DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind* III) พบว่า Genomic DNA ที่สกัดได้ มีความเข้มข้นระหว่าง 70-80 นาโนกรัม/ไมโครลิตร หรือมีปริมาณทั้งหมดประมาณ 5-6 ไมโครกรัม จากใบชา 400 มิลลิกรัม



รูปที่ 4.2 แสดงแถบ Genomic DNA ของชา 15 สายพันธุ์ เลนที่ 1 DNA marker: Lamda DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind* III เลนที่ 2 ชาอุ้มหลงเบอร์ 12 จากไร่บุญรอด เลนที่ 3 ชาอุ้มหลงเบอร์ 12 จากไร่สุวิรุฬห์ เลนที่ 4 ชาอุ้มหลงเบอร์ 12 จากไร่ศุภชัย เลนที่ 5 ชาอุ้มหลงเบอร์ 12 จากบ้านพญาไพร เลนที่ 6 ชาอุ้มหลงเบอร์ 17 จากไร่สุวิรุฬห์ เลนที่ 7 ชาอุ้มหลงเบอร์ 17 ก้านอ่อนจากบ้านแม่จรหลวง เลนที่ 8 ชาอุ้มหลงเบอร์ 17 จากบ้านพญาไพร เลนที่ 9 ชาอุ้มหลงเบอร์ 17 จากไร่วังพุดตาล เลนที่ 10 ชาฮัสสัมจากบ้านพญาไพร เลนที่ 11 ชาฮัสสัมจากบ้านห้วยหวกป่าโซ เลนที่ 12 ชาฮัสสัมยอดแดงจากไร่คอยาวี เลนที่ 13 ชาชิงชังจากศูนย์วิจัยคอยาวี เลนที่ 14 ชาชิงชังเบอร์ 12 จากไร่คอยอมพาย เลนที่ 15 ชา CK-10 จากคอย่างเกียน และเลนที่ 16 ชา Yamatomidori จากไร่บุญรอด



รูปที่ 4.3 แสดงแถบ Genomic DNA ของชาอัสสัมจากบ้านพญาไพร ชาอัสสัมจากบ้านห้วยหวกป่า
โซและชาอัสสัมยอดแดงจากไร่คอยาวีที่สกัดครั้งที่ 2 เลนที่ 1 DNA marker: Lamda DNA ที่ตัดด้วย
เอนไซม์ *Hind* III เลนที่ 2 ชาอัสสัมจากบ้านพญาไพร เลนที่ 3 ชาอัสสัมจากบ้านห้วยหวกป่าโซ
เลนที่ 4 ชาอัสสัมยอดแดงจากไร่คอยาวี

4.4 การตัด Genomic DNA ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

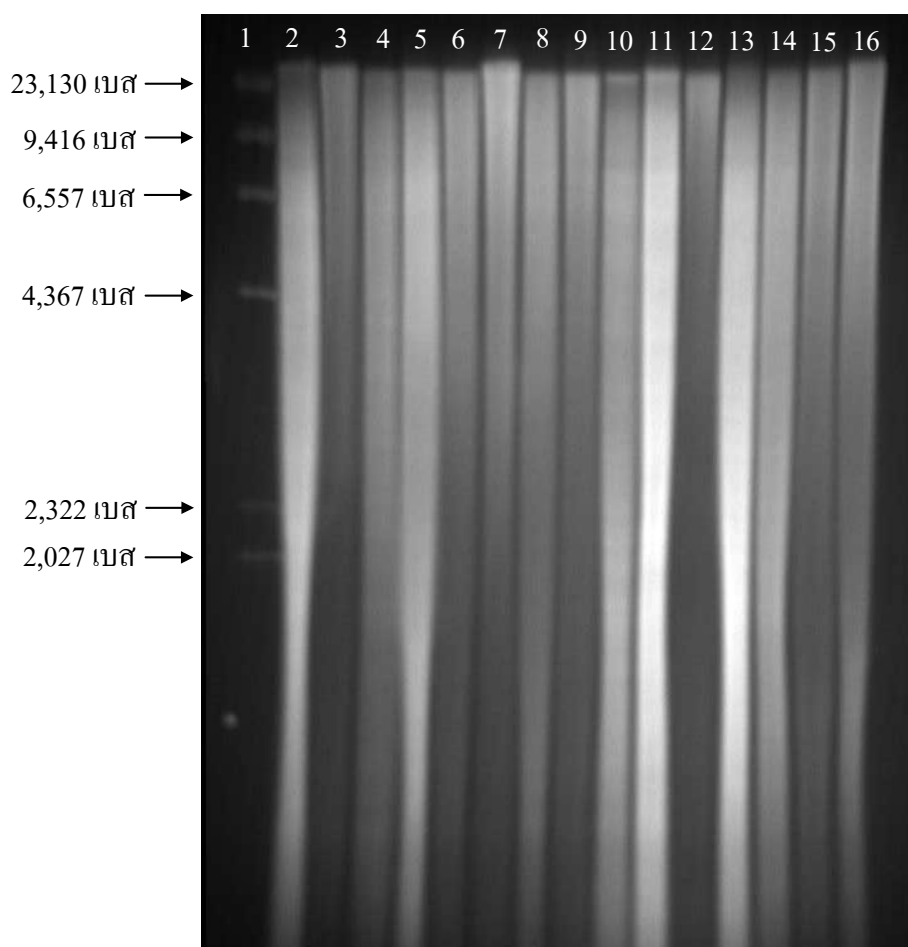
เมื่อนำ Genomic DNA 5 ไมโครกรัม ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dra* I ที่ใส่ไว้ข้ามคืนพบว่าแถบของ Genomic DNA ที่มีขนาดประมาณ 23 กิโลเบสหายไปหรือมีปริมาณน้อยลง และปรากฏเป็นแถบ smear มีลักษณะเป็นสายขาว ดังแสดงในรูปที่ 4.4

4.5 การเตรียมชิ้น DNA probe ด้วยวิธี PCR และการติดฉลาก DNA probe ด้วย Digoxigenin (DIG)-11-dUTP

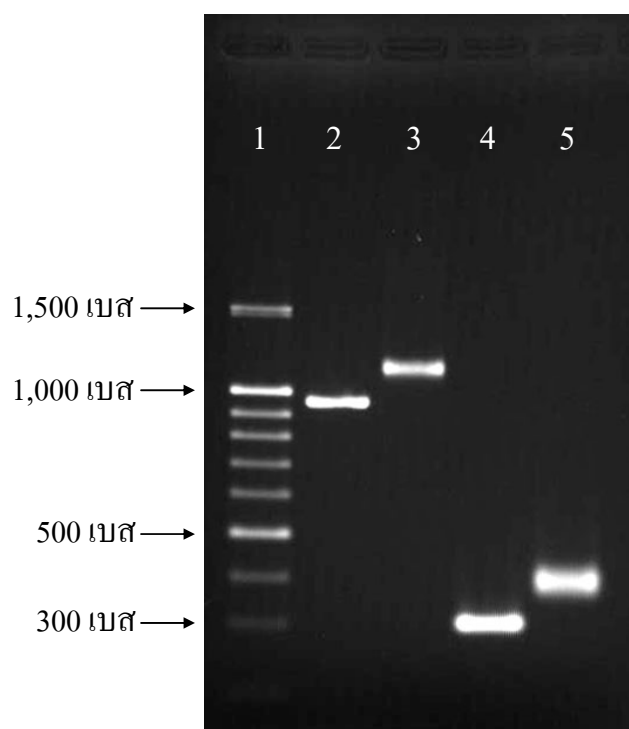
เมื่อนำ DNA ต้นแบบของชาอัสสัมไปทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวนของชิ้น DNA ที่จะใช้เป็น probe พบว่าได้ PCR product ของชิ้น DNA ที่จะใช้เป็น probe ของยีน *PAL* ที่มีขนาด 916 เบส ในขณะที่ชิ้น DNA ที่จะใช้เป็น probe ของยีน *CHS* จะให้ PCR product ที่มีขนาด 318 เบส เมื่อสกัดแยก PCR product ทั้งสองชิ้น ไปหาลำดับเบส และนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล (ดูภาคผนวก) พบว่ามีลำดับเบสเหมือนกับยีน *PAL* และยีน *CHS* ของชา ที่มีอยู่ในฐานข้อมูล และเมื่อนำชิ้น DNA probe ทั้งสองไปติดฉลากด้วย digoxigenin (DIG)-11-dUTP ด้วยการทำ PCR-labeling แล้ววิเคราะห์ผลของการติดฉลากโดย agarose gel electrophoresis พบว่า ชิ้น DNA probe ทั้งสอง ที่ติดฉลากมีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าชิ้น DNA ก่อนที่จะติดฉลาก (รูปที่ 4.5)

4.6 การทำ Hybridization

เมื่อนำ DNA probe ของยีน *PAL* และ *CHS* ไป hybridize กับ membrane ที่มี genomic DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dra* I แล้วติดตามผลโดยใช้ substrate ของเอนไซม์ Alkaline phosphatase ที่จับกับ antibody ของ digoxigenin ที่จะให้ product เป็นสาร chemoluminescence และตรวจผลด้วยฟิล์ม X-ray พบว่ามีแถบ DNA ที่ตรวจวัดได้โดย DNA probe จำนวนหลายแถบในตัวอย่างใบชาแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งน่าจะเกิดจากในยีน *PAL* และ *CHS* มีจำนวน copy number ของยีนมากกว่าหนึ่ง copy (Matsumoto *et al.*, 2002) กระเจาอยู่ใน Genomic DNA หรืออาจเป็นไปได้ว่าจะเป็นแถบที่เกิดจากการจับของ probe อย่างไม่จำเพาะเจาะจง (nonspecific bands) กับบริเวณใดบริเวณหนึ่งบน Genomic DNA โดยแถบที่ไม่จำเพาะเจาะจงนี้อาจจะเกิดขึ้นได้ในขั้นตอนของการ hybridize และการ wash ซึ่งอาจกำจัดได้โดยการทำ hybridization ที่อุณหภูมิสูงขึ้น และ/หรือ wash



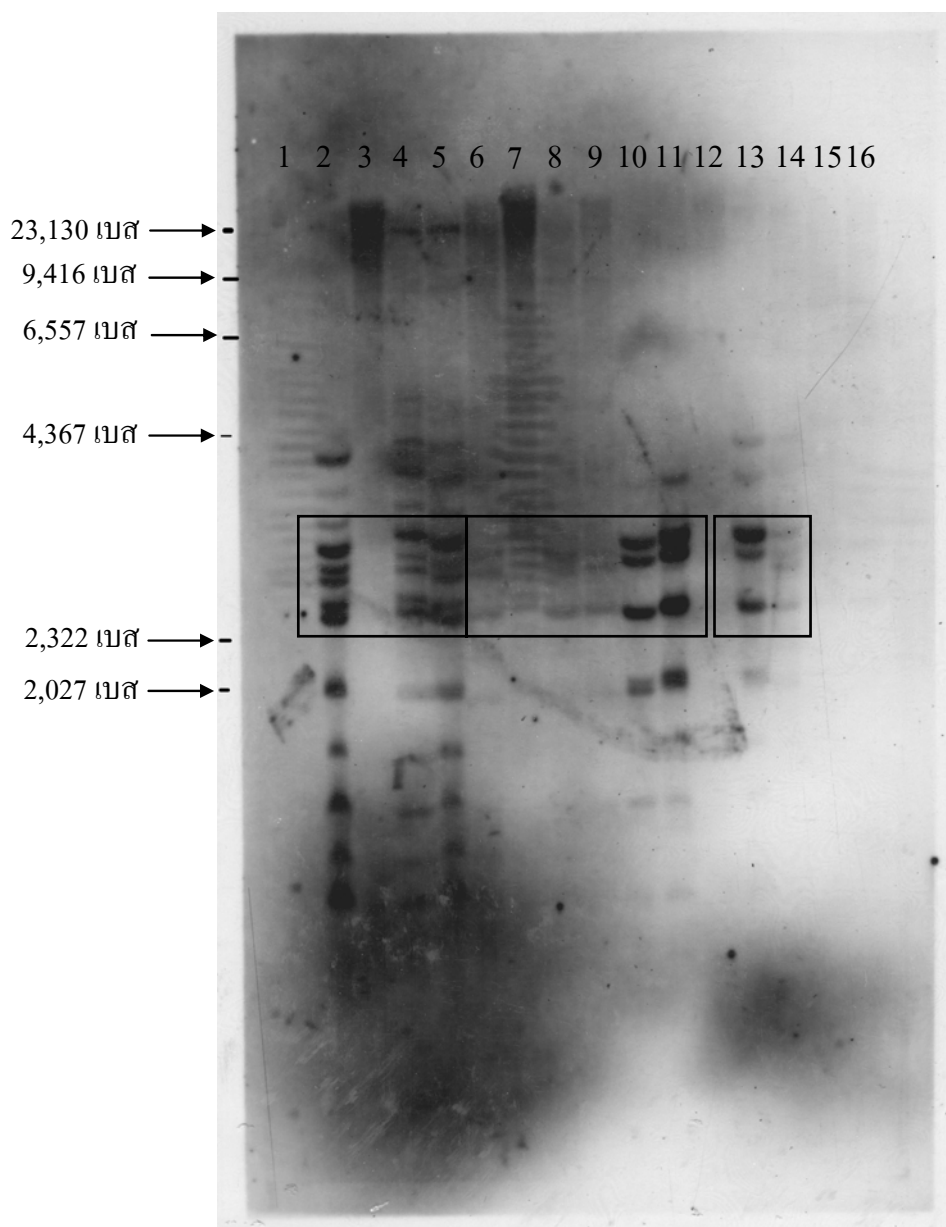
รูปที่ 4.4 แสดง Genomic DNA ของชาทั้ง 15 สายพันธุ์ หลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Dra I เลนที่ 1 DNA marker: Lamda DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ Hind III เลนที่ 2 ชาอุ้มหล่องเบอร์ 12 จากไร่บุญรอด เลนที่ 3 ชาอุ้มหล่องเบอร์ 12 จากไร่สุวิรุฬห์ เลนที่ 4 ชาอุ้มหล่องเบอร์ 12 จากไร่ศุภชัย เลนที่ 5 ชาอุ้มหล่องเบอร์ 12 จากบ้านพญาไพร เลนที่ 6 ชาอุ้มหล่องเบอร์ 17 จากไร่สุวิรุฬห์ เลนที่ 7 ชาอุ้มหล่องเบอร์ 17 ก้านอ่อนจากบ้านแม่จรหลวง เลนที่ 8 ชาอุ้มหล่องเบอร์ 17 จากบ้านพญาไพร เลนที่ 9 ชาอุ้มหล่องเบอร์ 17 จากไร่วังพุดตาล เลนที่ 10 ชาอัสสัมจากบ้านพญาไพร เลนที่ 11 ชาอัสสัมจากบ้านห้วยหวกป่าโซ เลนที่ 12 ชาอัสสัมยอดแดงจากไร่คอยาวี เลนที่ 13 ชาชิงชังจากศูนย์วิจัยคอยาวี เลนที่ 14 ชาชิงชังเบอร์ 12 จากไร่คอยอมพาย เลนที่ 15 ชา CK-10 จากคอยช้างเคียน และเลนที่ 16 ชา Yamatomidori จากไร่บุญรอด



รูปที่ 4.5 แสดง PCR product ของ *PAL* DNA probe และ *CHS* DNA probe เลนที่ 1 DNA marker 100bp+1.5kb เลนที่ 2 *PAL* DNA probe ที่ยังไม่ติดฉลาก เลนที่ 3 *PAL* DNA probe ที่ติดฉลากด้วย DIG-11-dUTP เลนที่ 4 *CHS* DNA probe ที่ยังไม่ติดฉลาก เลนที่ 5 *CHS* DNA probe ที่ติดฉลากด้วย DIG-11-dUTP

ในสภาวะ astringency สูง เช่น ความเข้มข้นของเกลือต่ำๆ และอุณหภูมิสูง นอกจากนี้ยังเกิด background ขึ้นบนฟิล์ม X-ray ทำให้การวิเคราะห์ผลการทดลองทำได้ยากขึ้น โดยการเกิด background ขึ้นนี้มีสาเหตุได้หลายสาเหตุ หนึ่งในนั้นคืออาจเกิดจากการทำ prehybridization (ดูหัวข้อ 3.19) ซึ่งใช้ salmon sperm DNA โดยให้ salmon sperm DNA เกาะที่ membrane เพื่อลดแถบที่ไม่จำเพาะเจาะจง บนแผ่น membrane ก่อนการทำ hybridization ที่ไม่ทั่วถึง ทำให้ DNA probe สามารถเกาะที่ผิวของ membrane ได้ไม่สม่ำเสมอเมื่อนำไปทำขั้นตอน washing และ detection และประกอบฟิล์ม X-ray จะทำให้เห็นบริเวณนั้นเป็นสีดำ รวมถึงในขั้นตอนการหยด substrate ที่ไม่ทั่วถึง และรีดสารละลายส่วนเกินออกไม่มากพอก่อนที่จะซีลปิดถุงพลาสติกเพื่อนำไปประกอบฟิล์ม X-ray ล้วนทำให้เกิด background สีดำได้เช่นเดียวกัน

เมื่อใช้ probe ของยีน *CHS* พบว่า genomic DNA จากชาทั้ง 15 สายพันธุ์ มีรูปแบบของแถบ DNA ที่แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มของชาอู่หลงเบอร์ 12 จำนวน 3 สายพันธุ์ (ชาอู่หลงเบอร์ 12 จากไร่บุญรอด ชาอู่หลงเบอร์ 12 จากไร่สุขชัย ชาอู่หลงเบอร์ 12 จากบ้านพญาไพร ดังรูปที่ 4.6 เลนที่ 1 3 และ 4) กลุ่มชาอู่หลงเบอร์ 17 ชาอัสสัม จำนวน 5 สายพันธุ์ (ชาอู่หลงเบอร์ 17 จากไร่สุวิรุฬห์ ชาอู่หลงเบอร์ 17 จากบ้านพญาไพร ชาอู่หลงเบอร์ 17 จากไร่วังพุดตาล ชาอัสสัมจากบ้านพญาไพร และชาอัสสัมจากบ้านห้วยห้วยกป้าโซ ดังรูปที่ 4.6 เลนที่ 5 7 8 9 และ 10) และกลุ่มชาชิงชิง จำนวน 2 สายพันธุ์ (ชาชิงชิงจากศูนย์วิจัยฯคอยาวี และชาชิงชิงเบอร์ 12 จากคอยอมพาย ดังรูปที่ 4.6 เลนที่ 12 และ 13) โดยชาในกลุ่มเดียวกันจะมีรูปแบบของแถบ DNA เหมือนกัน โดยในตัวอย่างชาชิงชิงจากศูนย์วิจัยฯคอยาวี และชาชิงชิงเบอร์ 12 จากไร่คอยอมพาย ให้รูปแบบของแถบ DNA ที่มีลักษณะร่วมกันบางส่วนกับชาทั้งในกลุ่มชาอู่หลงเบอร์ 12 และ กลุ่มชาอู่หลงเบอร์ 17 ชาอัสสัม ซึ่งอาจจะกล่าวได้ว่าลักษณะของแถบ DNA ที่แตกต่างกันในแต่ละกลุ่มนี้น่าจะแบ่งตามรูปแบบของยีนเท่านั้นยังไม่สามารถบอกละเอียดอื่นได้ ซึ่งควรจะต้องมีการศึกษาต่อไปไม่ว่าจะเป็นการแสดงออกของยีน หรือปริมาณการสังเคราะห์ catechins ในตัวอย่างชุดนี้ เพื่อนำข้อมูลผลการทดลองในครั้งนี้ไปเทียบกับข้อมูลที่จะตามมา จะได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ขึ้นในด้านรูปแบบของยีน การแสดงออกของยีน และปริมาณการสังเคราะห์ catechins เพื่อให้ทราบว่าข้อมูลต่าง ๆ นั้นมีความสัมพันธ์กันหรือไม่อย่างไร ทั้งนี้ ในตัวอย่างชาอู่หลงเบอร์ 12 จากไร่สุวิรุฬห์ ชาอู่หลงเบอร์ 17 ก้านอ่อนจากบ้านแม่จรหลวง ชาอัสสัมยอดแดงจากไร่คอยาวี ชา CK-10 จากคอยางเฉียง ชา Yamatomidori จากไร่บุญรอด ไม่ปรากฏรูปแบบของแถบ DNA ที่ตรวจวัดด้วย DNA probe ได้น่าจะมีเหตุผลมาจากปริมาณของ Genomic DNA ที่ใช้มีน้อยเกินไป (รูปที่ 4.6 เลนที่ 2 6 11 14 และ 15) ส่วนการใช้ probe ของยีน *PAL* นั้นให้ผลในการจำแนกกลุ่มชาได้ชัดเจนในกลุ่มชาอัสสัม ส่วนในชาอู่หลงเบอร์ 12 ชาอู่หลงเบอร์ 17 และชาชิงชิงนั้น มี background ของการทำ hybridization มา



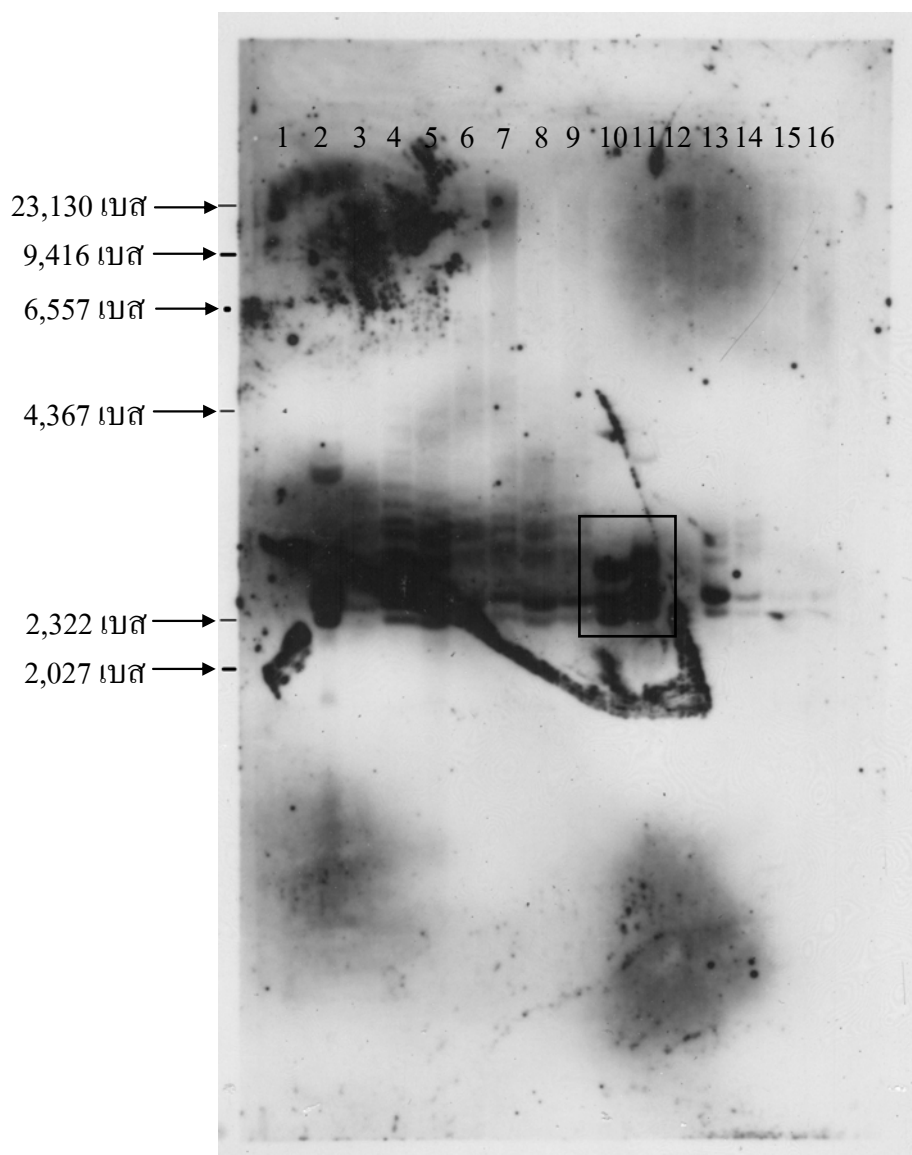
รูปที่ 4.6 ผลการทำ Hybridization ของ Genomic DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dra* I กับ DNA probe ของยีน *CHS* ในชาทั้ง 15 สายพันธุ์ (เลนที่ 1 DNA marker: Lamda DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind* III เลนที่ 2 ชาอุหลงเบอ 12 จากไร่บุญรอด เลนที่ 3 ชาอุหลงเบอ 12 จากไร่สุวิรุฬห์ เลนที่ 4 ชาอุหลงเบอ 12 จากไร่ศุภชัย เลนที่ 5 ชาอุหลงเบอ 12 จากบ้านพญาไพร เลนที่ 6 ชาอุหลงเบอ 17 จากไร่สุวิรุฬห์ เลนที่ 7 ชาอุหลงเบอ 17 ก้านอ่อนจากบ้านแม่จรหลวง เลนที่ 8 ชาอุหลงเบอ 17 จากบ้านพญาไพร เลนที่ 9 ชาอุหลงเบอ 17 จากไร่วังพุดตาล เลนที่ 10 ชาอัสสัมจากบ้านพญาไพร เลนที่ 11 ชาอัสสัมจากบ้านห้วยหวกป่าโซ เลนที่ 12 ชาอัสสัมยอดแดงจากไร่คอยาวี เลนที่ 13 ชาชิงชังจากศูนย์วิจัยคอยาวี เลนที่ 14 ชาชิงชังเบอ 12 จากไร่คอยอมพาย เลนที่ 15 ชา CK-10 จากคอย่างเกียน และเลนที่ 16 ชา Yamatomidori จากไร่บุญรอด)

บ่งในบริเวณที่เป็นแถบ DNA ทำให้เห็นได้ไม่ชัดเจนนัก (รูปที่ 4.7) ซึ่งมีการทำ RFLP ทดสอบหาความแตกต่างในกลุ่มชาญี่ปุ่นพันธุ์พื้นเมืองและกลุ่มของชาที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์ พบว่าในชา 2 กลุ่มดังกล่าวมีความแตกต่างกันในลักษณะของรูปแบบของแถบ DNA (Matsumoto *et al.*, 2002) แสดงว่าวิธี RFLP มีศักยภาพที่จะให้ข้อมูลในการหาความแตกต่างของสายพันธุ์ชา

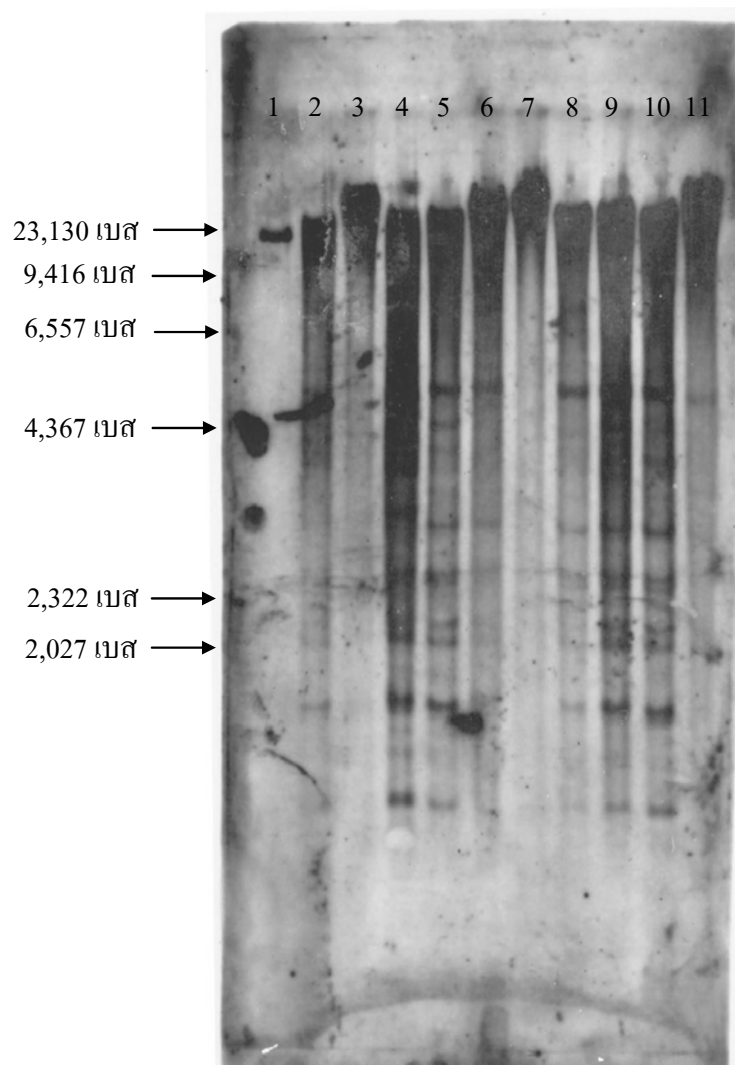
อย่างไรก็ตามเมื่อทำ Hybridization ในชา 10 ตัวอย่าง คือ ชาอุหลงเบอร์ 12 จากไร่สุวิรุฬห์ ชาอุหลงเบอร์ 12 จากไร่ศุภชัย ชาอุหลงเบอร์ 12 จากบ้านพญาไพร ชา Fukumidori จากไร่บุญรอด ชาอุหลงเบอร์ 17 จากไร่สุวิรุฬห์ ชาอุหลงเบอร์ 17 ก้านอ่อนจากบ้านแม่จรหลวง ชาอุหลงเบอร์ 17 จากบ้านพญาไพร ชาชิงชังจากศูนย์วิจัยชาดอยาวี ชา CK-10 จากไร่บุญรอดและชา Yamatomidori จากไร่บุญรอด ซึ่งเป็นชาที่อยู่ในกลุ่มชาจีนทั้งหมด ด้วย DNA probe จากยีน *PAL* แต่ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba* I ในการตัด Genomic DNA ผลปรากฏว่าในชาทั้ง 10 สายพันธุ์มีรูปแบบของแถบ DNA รูปแบบเดียวกัน (รูปที่ 4.8) อาจจะเป็นเพราะว่าในเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba* I เมื่อตัด Genomic DNA แล้วทำให้ได้ชิ้นส่วนของ Genomic DNA ที่มีขนาดเท่าๆกันในทุกตัวอย่าง ทำให้ตำแหน่งที่ probe มาเกาะอยู่ในตำแหน่งเดียวกันในแต่ละตัวอย่าง เมื่อนำไปทำ Hybridization จึงทำให้เห็นรูปแบบของแถบ DNA ลักษณะเดียวกัน

4.7 PCR-RFLP

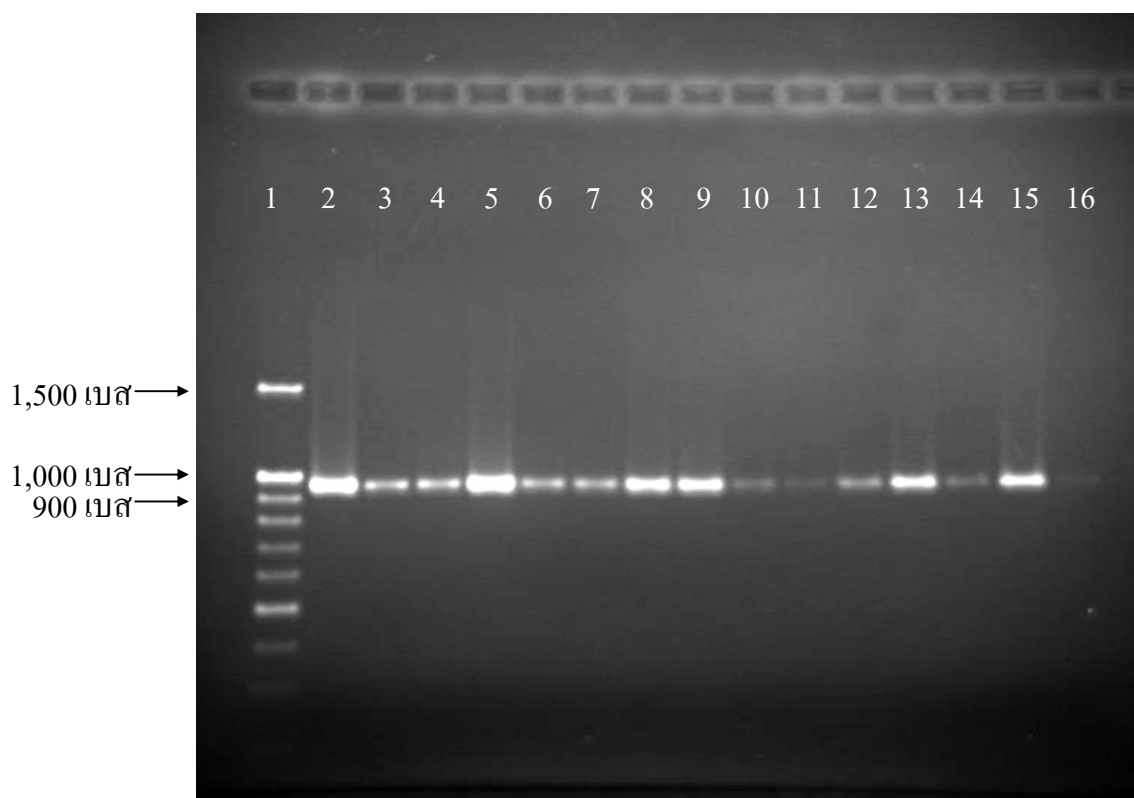
หลังจากทำ PCR เพิ่มปริมาณชิ้น DNA ของยีน *PAL* และ *CHS* โดยใช้ DNA คัดแบบเป็น genomic DNA จากชาทั้ง 15 สายพันธุ์ แล้วนำ PCR product ที่ได้ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดย PCR product ของยีน *PAL* นำไปตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRV* ซึ่งสามารถตัดสาย DNA ในชิ้น PCR product ของยีน *PAL* ได้หนึ่งตำแหน่ง พบว่า PCR product ของยีน *PAL* ในทุกตัวอย่างไม่เกิดการตัดของเอนไซม์ ซึ่งดูได้จากแถบ DNA ของยีน *PAL* ยังมีขนาดเท่าเดิมก่อนตัด 916 เบส (รูปที่ 4.9) ส่วน PCR product ของยีน *CHS* นำไปตัดด้วยเอนไซม์ *HincII* ซึ่งสามารถตัดสาย DNA ในชิ้น PCR product ของยีน *CHS* ได้หนึ่งตำแหน่งเช่นกัน พบว่า PCR product ของยีน *CHS* ในทุกตัวอย่างเกิดการตัดของเอนไซม์ที่ตำแหน่งของเบสที่ 69 ซึ่งดูได้จากแถบ DNA ของยีน *CHS* ในเจลซึ่งมีขนาด 69 เบส และ 249 เบส (รูปที่ 4.10) นอกจากนี้ยังมีแถบ DNA ที่ขนาดประมาณ 200 เบสอยู่ในทุกตัวอย่าง ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าในชิ้น DNA ของยีน *CHS* ที่มีขนาด 318 เบสนั้น มีชิ้น DNA ของยีน *CHS* 2 แบบที่มีลำดับเบสจำเพาะ (restriction sites) ของเอนไซม์ตัดจำเพาะดังกล่าวในตำแหน่งที่ต่างกัน ต่างกันจึงทำให้เมื่อตัดแล้วทำให้ได้ชิ้น DNA ที่มีขนาดต่างจากที่คาดไว้ปรากฏอยู่ด้วย ซึ่งจากการทดลองอาจจะกล่าวได้ว่า วิธี PCR-RFLP ไม่สามารถแสดงความแตกต่างของสายพันธุ์ชาในจีน



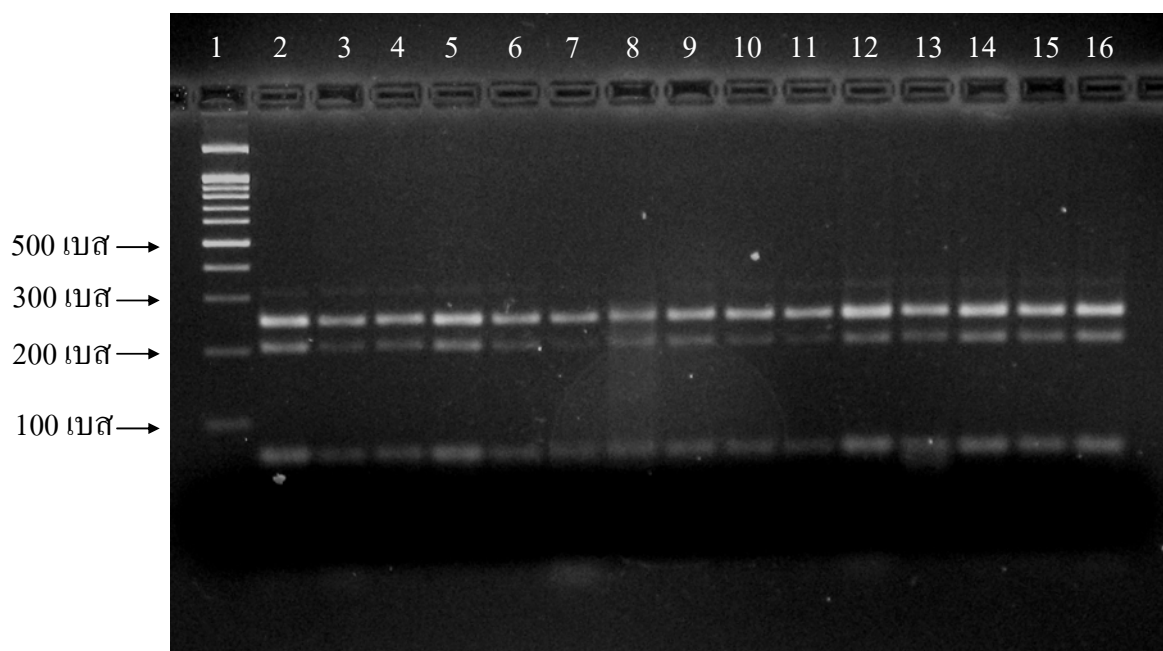
รูปที่ 4.7 ผลการทำ Hybridization ของ Genomic DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dra* I กับ DNA probe ของยีน *PAL* ในชาทั้ง 15 สายพันธุ์ (เลนที่ 1 DNA marker: *Lamda* DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hind* III เลนที่ 2 ชาอู่หลงเบอร์ 12 จากไร่บุญรอด เลนที่ 3 ชาอู่หลงเบอร์ 12 จากไร่สุวิรุฬห์ เลนที่ 4 ชาอู่หลงเบอร์ 12 จากไร่ศุภชัย เลนที่ 5 ชาอู่หลงเบอร์ 12 จากบ้านพญาไพร เลนที่ 6 ชาอู่หลงเบอร์ 17 จากไร่สุวิรุฬห์ เลนที่ 7 ชาอู่หลงเบอร์ 17 ก้านอ่อนจากบ้านแม่จรหลวง เลนที่ 8 ชาอู่หลงเบอร์ 17 จากบ้านพญาไพร เลนที่ 9 ชาอู่หลงเบอร์ 17 จากไร่วังพุดตาล เลนที่ 10 ชาอัสสัมจากบ้านพญาไพร เลนที่ 11 ชาอัสสัมจากบ้านห้วยหยวกป่าโซ เลนที่ 12 ชาอัสสัมยอดแดงจากไร่คอยาวี เลนที่ 13 ชาชิงชังจากศูนย์วิจัยคอยาวี เลนที่ 14 ชาชิงชังเบอร์ 12 จากไร่คอยอมพาย เลนที่ 15 ชา CK-10 จากคอย่างเคียน และเลนที่ 16 ชา Yamatomidori จากไร่บุญรอด)



รูปที่ 4.8 ผลการทำ Hybridization ของ Genomic DNA ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba* I กับ DNA probe ของยีน *PAL* ในชาทั้ง 10 สายพันธุ์ (เลนที่ 1 ชาอุ๋หลงเบอร์ 12 จากไร่สุวิรุฬห์ เลนที่ 2 ชาอุ๋หลงเบอร์ 12 จากไร่ศุภชัย เลนที่ 3 ชาอุ๋หลงเบอร์ 12 จากบ้านพญาไพร เลนที่ 4 ชา Fukumidori จากไร่บุญรอด เลนที่ 5 ชาอุ๋หลงเบอร์ 17 จากไร่สุวิรุฬห์ เลนที่ 6 ชาอุ๋หลงเบอร์ 17 ก้านอ่อนจากบ้านแม่จรหลวง เลนที่ 7 ชาอุ๋หลงเบอร์ 17 จากบ้านพญาไพร เลนที่ 8 ชาชิงชิงจากศูนย์วิจัยฯคอยาวี เลนที่ 9 ชา CK-10 จากคอยช้างเคียน และเลนที่ 10 ชา Yamatomidori จากไร่บุญรอด)



รูปที่ 4.9 แสดง PCR product ของยีน *PAL* ในตัวอย่างชาทั้ง 15 ตัวอย่าง หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRV* เลนที่ 1 DNA marker: 100bp+1.5kb เลนที่ 2 ชาอุ้มหลงเบอร์ 12 จากไร่บุญรอด เลนที่ 3 ชาอุ้มหลงเบอร์ 12 จากไร่สุวิรุฬห์ เลนที่ 4 ชาอุ้มหลงเบอร์ 12 จากไร่ศุภชัย เลนที่ 5 ชาอุ้มหลงเบอร์ 12 จากบ้านพญาไพร เลนที่ 6 ชาอุ้มหลงเบอร์ 17 จากไร่สุวิรุฬห์ เลนที่ 7 ชาอุ้มหลงเบอร์ 17 ก้านอ่อนจากบ้านแม่จรหลวง เลนที่ 8 ชาอุ้มหลงเบอร์ 17 จากบ้านพญาไพร เลนที่ 9 ชาอุ้มหลงเบอร์ 17 จากไร่วังพุดตาล เลนที่ 10 ชาอัสสัมจากบ้านพญาไพร เลนที่ 11 ชาอัสสัมจากบ้านห้วยหวกป่าโซ เลนที่ 12 ชาอัสสัมยอดแดงจากไร่คอยาวี เลนที่ 13 ชาชิงชิงจากศูนย์วิจัยคอยาวี เลนที่ 14 ชาชิงชิงเบอร์ 12 จากไร่คอยอมพาย เลนที่ 15 ชา CK-10 จากไร่บุญรอด และเลนที่ 16 ชา Yamatomidori จากไร่บุญรอด



รูปที่ 4.10 แสดง PCR product ของยีน *CHS* ในตัวอย่างชาทั้ง 15 ตัวอย่าง หลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hinc* II เลนที่ 1 DNA marker: 100bp+1.5kb เลนที่ 2 ชาอุ้มหลงเบอร์ 12 จากไร่บุญรอด เลนที่ 3 ชาอุ้มหลงเบอร์ 12 จากไร่สุวิรุฬห์ เลนที่ 4 ชาอุ้มหลงเบอร์ 12 จากไร่ศุภชัย เลนที่ 5 ชาอุ้มหลงเบอร์ 12 จากบ้านพญาไพร เลนที่ 6 ชาอุ้มหลงเบอร์ 17 จากไร่สุวิรุฬห์ เลนที่ 7 ชาอุ้มหลงเบอร์ 17 ก้านอ่อนจากบ้านแม่จรหลวง เลนที่ 8 ชาอุ้มหลงเบอร์ 17 จากบ้านพญาไพร เลนที่ 9 ชาอุ้มหลงเบอร์ 17 จากไร่วังพุดตาล เลนที่ 10 ชาอัสสัมจากบ้านพญาไพร เลนที่ 11 ชาอัสสัมจากบ้านห้วยหวกป่าโซ เลนที่ 12 ชาอัสสัมยอดแดงจากไร่คอยาวี เลนที่ 13 ชาชิงชิงจากศูนย์วิจัยคอยาวี เลนที่ 14 ชาชิงชิงเบอร์ 12 จากไร่คอยอมพาย เลนที่ 15 ชา CK-10 จากไร่บุญรอด และเลนที่ 16 ชา Yamatomidori จากไร่บุญรอด

PAL และ *CHS* อาจเป็นเพราะชิ้นส่วน DNA ของยีน *PAL* และ *CHS* ที่นำมาใช้ในการทดลอง ไม่มีความแตกต่างของลำดับเบสที่จะถูกตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งหากเปลี่ยนบริเวณของชิ้นส่วน DNA ของยีน *PAL* และ *CHS* ที่จะนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ หรือเปลี่ยนชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่จะนำไปตัด PCR product ของชิ้นส่วน DNA ยีน *PAL* และ *CHS* อาจจะทำให้เห็นความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

เมื่อทำ RFLP โดยเทคนิค southern blot hybridization โดยใช้ชิ้นส่วนของยีน *PAL* และ *CHS* เป็น probe ในชาอู่หลงเบอร์ 12 จากไร่บุญรอด ชาอู่หลงเบอร์ 12 จากไร่สุวิรุฬห์ ชาอู่หลงเบอร์ 12 จากไร่ศุภชัย ชาอู่หลงเบอร์ 12 จากบ้านพญาไพร ชาอู่หลงเบอร์ 17 จากไร่สุวิรุฬห์ ชาอู่หลงเบอร์ 17 ก้านอ่อนจากบ้านแม่จรหลวง ชาอู่หลงเบอร์ 17 จากบ้านพญาไพร ชาอู่หลงเบอร์ 17 จากไร่วังพุดตาล ชาอัสสัมจากบ้านพญาไพร ชาอัสสัมจากบ้านห้วยหยวกป่าโซ ชาอัสสัมยอดแดง จากไร่คอยาวี ชาชิงชังจากศูนย์วิจัยคอยาวี ชาชิงชังเบอร์ 12 จากไร่คอยอมพายชา CK-10 จากคอยช่างเคียนจังหวัดเชียงใหม่ และชา Yamatomidori จากไร่บุญรอด แล้วสามารถจำแนกออกได้เป็น 3 กลุ่มตามลักษณะรูปแบบของแถบ DNA คือ กลุ่มชาอู่หลงเบอร์ 12 กลุ่มชาอู่หลงเบอร์ 17 ชาอัสสัม และกลุ่มชาชิงชัง ซึ่งอาจจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ทราบว่ลักษณะรูปแบบของแถบ DNA ที่ปรากฏนั้นมีความเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ catechins หรือไม่ ในขณะที่วิธี PCR-RFLP นั้นไม่พบความแตกต่างระหว่างตัวอย่างชาในการใช้ชิ้นส่วน DNA ของยีน *PAL* และยีน *CHS*

เอกสารอ้างอิง

สันต์ ละอองศรี.(2535). ชา. กรุงเทพฯ : ไร่เขียว.

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

Baruah S, Hazarika M, Mahanta PK, Horita H, Murai T. (1986).The effect of plucking intervals on the chemical constituents of CTC black teas. **Agric. Biol. Chem.** (50) : 1041 – 93

Baruah DC, Rajkhowa PK, Goswami NG, Saikia R.(2003).Modification of Helical Blade Puddler for Smaller Bullocks of Assam. **Agricultural Engineering Today.** 27 (1-2): 1-6.

Bokuchava & Skobeleva. (1980) The chemistry of tea. **HerbalGram.** (37) : 41

Chaudhry B, Yasmeen A, Husnain T, Riazuddin S.(1999). Mini-scale genomic DNA extraction from cotton. **Plant Molecular biology reporter.** (17) : 1-7

Chen Y, Zhang YP, Yang Y, Yang D. (1999). Genetic diversity and taxonomic implication of *Cordyceps Sinensis* as Revealed by RAPD markers. **Biochemical Genetics.** (37): 201-12

Chen ZM, Han BY. (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 IF, Breen K. (2000). On the ability of four favonoids, baicilein, luteolin, naringenin, and quercetin, to suppress the fenton reaction of the iron-ATP complex.

Biomaterials. (13) : 7-11.

Dalluge JJ, Nelson BC. (2000). Determination of tea catechins. **J. Chromatography A.**

(881) : 411-24.

Duthie GG, Duthie S, Kyle JAM. (2000). Plant polyphenols in cancer and Heart disease :

implications as nutritional antioxidants. **Nutr. Res. Rev.** (13) : 79-106.

Forrest GI, Bendall DS. (1969). The distribution of polyphenols in the tea plant (*Camellia*

Sinensis L). **J. Biochem.** (113) : 741-55.

Graham HN. (1992). Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry.

Prev. Med. (21) : 334-50.

Gulati A, Rawat R, Singh B, Ravindranath SD. (2003). Application of Microwave Energy in

the Manufacture of Enhanced-Quality Green Tea. **J. Agric. Food Chem.**

(51) : 4764-68.

Hara Y, Luo SJ, Wickremasungha RL, Yamanishi T. (1995). Special issue on tea. **Food Rev.**

Int. 1(3) : 345-71.

Harbowy ME, Balentine DA. (1997). Tea Chemistry. **Crit. Rev. In Plant Sci.** 16(5) : 415-80.

Hilton PJ, Palmer JR. (1973). Relationship between the flavanol composition of fresh tea shoot and the theaflavin content of manufactured tea. **J. Sci. Food Agric.** 24(7) : 813-18.

Katiyar SK, Agarwal R, Mukhtar H. (1994). Inhibition of spontaneous and photo- enhanced lipid peroxidation in mouse epidermal microsome by epicatechin derivative from green tea. **Cancer Lett.** (79) : 61-66.

Katiyar SK, Ahmad N, Mukhtar H. (2000). Green tea and skin. **Arch Dermatol.** (136): 989-94

Lakenbrink C, Lapczynski S, Maiwald B, Engelhardt UH. (2000). Flavonoid and other polyphenol in consumer brews of tea and other caffeinated beverages. **J. Agric. Food Chem.** 48(7) : 2848-52.

Matsumoto S, Kiriwa Y, Takeda Y. (2002). Differentiation of Japanese green tea cultivars as Revealed by RFLP analysis of phenylalanine ammonia-lyase DNA. **Theor. Appl. Genet.** (104): 998-1002.

Park JS, Kim JB, Hahn BS, Kim KH, Ha SH, Kim JB, et al. (2004). EST analysis of genes involved in secondary metabolism in *Camellia sinensis* (tea), using suppression subtractive hybridization. **Plant Science.** (166) : 953-61.

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

- Qi XH, Yang JH, Zhang MF. (2007). AFLP-based genetic diversity assessment among Chinese vegetable mustards (*Brassica juncea* (L.) Czern.) **Genet Resour Crop Evol.** (10). 1007
- Ribeiro RA, Lovato MB. (2007). Comparative analysis of different DNA Extraction protocols in fresh and herbarium specimen of the genus *Dalbergia*. **Genet. Mol.Res.** 6(1): 173-87
- kowska A, Oszmiariski J, Gabrielska J. (2001). Metal ion-flavonoid associations in bilayer phospholipid membranes. **Cell Mol. Biol. Lett.** (6) : 277-81.
- Xie DY, Sharma SB, Paiva NL, Ferreira D, Dixon RA. (2003). Role of anthocyanidin reductase encode by *BANYULS* in plant flavonoid biosynthesis. **J.Science.** (299) : 396-99.
- Yang M, Wang C, Chen H. Green, (2001). oolong and black tea extracts modulate lipid metabolism in hyperlipidemia rats fed high-sucrose diet. **J. Nutr. Biochem.** 12(1) : 14-20.
- Yamamoto T, Juneja LR, Chu SC, Kim M. (1997). **Chemistry and Applications of Green Tea.** New York : CRC.

ภาคผนวก

ลำดับเบสของ DNA probe

สามารถหาลำดับเบส PCR product ของชิ้น DNA ที่จะใช้เป็น probe ของยีน *CHS* ได้ตาม ตารางที่ 1 และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพบว่ามีลำดับเบสเหมือนกับยีน *CHS* ของชา ที่มี อยู่ในฐานข้อมูล ตามรูปที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงลำดับเบสของชิ้น DNA ที่จะใช้เป็น probe ของยีน *CHS*

>Chalcone synthase (<i>CHS</i>)	
CATGGTCGTCGTTGAAGTGCCAAAGCTAGGAAAAGAGGCTGCAACTAAGGCAATCAAAGAATGG GGTCAACCAAAATCCAAAATTACCCACTTGGTCTTTTGCACCAGCACTGGTGTGGACATGCCCGG TGCCGACTACCAGCTCACCAAGCTCCTCGGCCTTCGCCCATCGGTCAAGAGGCTCATGATATACCA ACAAGGTTGCTTTGCCGGTGGCACGGTTCTTCGCCTAGCCAAGGATTTGGCCGAGAACAACAAAGG TGCCCGGGTTTTAGTTGTGTGCTCTGAGATCACTGCGGTACCTTCCGTGGGCCTAG	

Distance tree of results NEW

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AY146709.1	Camellia salicifolia clone CsalA1 chalcone synthase (Chs2) gene, exoi	553	553	96%	2e-154	99%	
AY146701.1	Camellia yunnanensis clone CyunA1 chalcone synthase (Chs2) gene,	553	553	96%	2e-154	99%	
AY656677.1	Camellia sinensis chalcone synthase (CHS) mRNA, complete cds	521	521	100%	5e-145	96%	
D26595.1	Camellia sinensis CHS3 mRNA for chalcone synthase, complete cds, c	521	521	100%	5e-145	96%	
AY146710.1	Camellia salicifolia clone CsalA2 chalcone synthase (Chs2) gene, exoi	520	520	96%	2e-144	97%	
AY146702.1	Camellia yunnanensis clone CyunA2 chalcone synthase (Chs2) gene,	520	520	96%	2e-144	97%	
AY146697.1	Camellia fascicularis clone CfasA2 chalcone synthase (Chs2) gene, ex	520	520	96%	2e-144	97%	
AY146705.1	Camellia qrisii clone CqriA2 chalcone synthase (Chs2) gene, exon 2 ;	492	492	96%	4e-136	95%	
D26593.1	Camellia sinensis CHS1 mRNA for chalcone synthase, complete cds, c	477	477	100%	1e-131	93%	
AY169403.1	Camellia sinensis chalcone synthase (CHS) mRNA, complete cds	472	472	100%	5e-130	93%	
AY146698.1	Camellia fascicularis clone CfasA3 chalcone synthase (Chs2) gene, ex	470	470	96%	2e-129	94%	
AY146703.1	Camellia yunnanensis clone CyunA3 chalcone synthase (Chs2) gene,	464	464	96%	9e-128	93%	
AY146706.1	Camellia qrisii clone CqriA3 chalcone synthase (Chs2) gene, exon 2 ;	448	448	96%	9e-123	92%	
A1413277.1	Rhododendron simsii mRNA for chalcone synthase (chs gene)	350	350	99%	3e-93	86%	

รูปที่ 1 แสดงผลการนำลำดับเบสของชิ้น DNA ที่จะใช้เป็น probe ของยีน *CHS* นำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล

สามารถหาลำดับเบส PCR product ของชิ้น DNA ที่จะใช้เป็น probe ของยีน *PAL* ได้ตาม ตารางที่ 2 และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลพบว่ามีลำดับเบสเหมือนกับยีน *PAL* ของชา ที่มี อยู่ในฐานข้อมูล ตามรูปที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงลำดับเบสของชิ้น DNA ที่จะใช้เป็น probe ของยีน *PAL*

>Phenylalanine ammonia-lyase (<i>PAL</i>)
AAGGAACAAGGCCTTACATGGTGGAAATTTCCAAGGTACCCCAATCGGAGTCTCCATGGAC AATACACGTCTAGCTGTTGCCTCAATAGGGAAGCTCATGTTTGCCCAATTCTCTGAGCTTGT TAATGACTTCTACAACAATGGGTTACCATCAAATCTTTCCGGGGGACGAAATCCAAGTTTGG ATTATGGTTTCAAGGGAGCTGAGATTGCCATGGCTGCTTATTGCTCAGAACTCCAATTCCTTG CCAATCCTGTAAACCAACCATGTCCAAAGCGCCGAGCAACATAACCAAGATGTGAACCTCTTA GGCCTAATCTCTTCAAGAAAGACAGCCGAGGCAGTTGATATCTTGAAGCTCATGTCCTCTACA TATCTAGTAGCACTCTGCCAAGCCGTAGATTTGAGGCATTTTGAGGAGAATTTGAGGAACAC TGTC AAGAGCACGGTGAGCCAAGTAGCGAAGCGCGTTCTAACCATGGGCGTTAACGGAGAG CTTCACCCCTCAAGGTTTTGTGAAAAGGACTTGCTCAGAGTGGTAGACCGTGAATACATCTTT GCCTACATTGATGACCCCTTGCAGTGCAACCTACCCATTGATGCAAAAACTAAGGCAAGTACT TGTTGAGCATGCGTTGAAAAATGGTGAAAAGTGAGAAGAATTTTGAGCACTTTCAANTCTTC CCAAAAGATTACNNGGCTTTTGAAGGAGGAAATTAAAAGAACCTTTTGGCCTAAAGAGGGTG GACAGTACAAGAGCCAGCACATTGGAGAACCGGGAATTC

[Distance tree of results](#) ^{NEW}

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer

Sequences producing significant alignments:
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
AY694186.1	Camellia sinensis phenylalanine ammonia-lyase mRNA, complete cds	1312	1312	100%	0.0	97%	
D26596.1	Camellia sinensis PAL mRNA for phenylalanine ammonia-lyase, compl	1312	1312	100%	0.0	97%	
X17462.1	P.crispum RNA for PAL4, phenylalanine ammonia-lyase	627	627	90%	3e-176	82%	
AF036948.1	Prunus avium phenylalanine ammonia-lyase (PAL1) mRNA, complete	617	617	96%	2e-173	81%	
EF031063.1	Prunus armeniaca phenylalanine ammonia-lyase mRNA, partial cds	601	601	96%	2e-168	81%	
D85850.1	Daucus carota qDcPAL1 gene for phenylalanine ammonia-lyase, comp	590	590	96%	4e-165	81%	
AF206634.1	Prunus persica cultivar Loring phenylalanine ammonia lyase (PAL) qer	582	582	94%	6e-163	81%	
AJ238753.1	Citrus clementina X Citrus reticulata mRNA for phenylalanine-ammoni	566	566	94%	6e-158	80%	
EF031064.1	Prunus cerasifera x Prunus munsoniana phenylalanine ammonia-lyase	560	560	90%	3e-156	81%	
X81159.1	P.crispum mRNA for phenylalanine ammonia-lyase 3	558	558	88%	1e-155	81%	
AJ238754.1	Citrus clementina X Citrus reticulata mRNA for phenylalanine-ammoni	538	538	94%	1e-149	80%	

รูปที่ 2 แสดงผลการนำลำดับเบสของจีน DNA ที่จะใช้เป็น probe ของยีน *PAL* นำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ

นายกิตติพงศ์ วิโรจน์แสงทอง

วัน เดือน ปีเกิด

20 มกราคม 2524

ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญาตรี

วิทยาศาสตรบัณฑิต (พฤกษศาสตร์)

มหาวิทยาลัยมหิดล พ.ศ. 2546

ประวัติการทำงาน

พ.ศ. 2550-ปัจจุบัน เจ้าหน้าที่วิจัยประจำห้องปฏิบัติการ
โลหิตวิทยาและอองโคโลยี สาขาวิชาโลหิตวิทยาและ
อองโคโลยี ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์
ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล