

## ส่วนที่ 2

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์  
โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ.....2551-2553.....

โครงการวิจัยรหัส.....ว-ท(ด).20.51

ชื่อโครงการภาษาไทย.....การวิเคราะห์การทำงานของยีนที่ใช้ในการสังเคราะห์สารเคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชัน  
โดย RNA interferenceชื่อโครงการภาษาอังกฤษ Functional analysis of curcuminoid biosynthetic gene in turmeric by RNA  
interferenceชื่อผู้วิจัยภาษาไทย.....สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล<sup>(1)</sup> อมรา ทองปาน<sup>(1)</sup> สมพิศ สามิภักดิ์<sup>(1)</sup>  
ชื่อผู้วิจัยภาษาอังกฤษ Surin Peyachoknagul<sup>(1)</sup> Amara Thongpan<sup>(1)</sup> Sompid Samipak<sup>(1)</sup>

## บทคัดย่อ

จากการตรวจเอกสารทราบว่า การสังเคราะห์สารเคอร์คูมินอยด์เกิดจากการทำงานร่วมกันของ เอนไซม์ 2 ชนิด คือ diketide-CoA synthase (DCS) และ curcumin synthase (CURS) ทำให้ทราบวิถีการสังเคราะห์สารเคอร์คูมินอยด์ และมีรายงานการโคลนยีนทั้ง 2 ยีน ดังกล่าวแล้ว จึงออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณส่วนของยีน DCS และ CURS นำแต่ละยีนมาเชื่อมต่อกันแบบกลับทิศทางในพลาสมิดโดยใช้ระบบ Gateway recombination ถ่ายยีนเข้าสู่ขมิ้นโดยใช้เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA105 ที่มีพลาสมิด pSTARGATE ที่ตัดต่อยีน DCS และ CURS เรียบร้อยแล้ว เพื่อตรวจสอบการทำงานของยีนโดย RNA interference พบยอดที่สามารถเจริญบนอาหารคัดเลือกที่เติมยาปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 3 และ 4 ต้น (คิดเป็น 0.6 และ 0.8 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ ตรวจสอบการมีอยู่ของยีนโดยใช้ไพรเมอร์ของยีน *hygromycin phosphotransferase (hpt)* พบต้นที่มีแถบดีเอ็นเอทั้งหมด 1 และ 4 ต้น ตามลำดับ จากนั้นตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอ พบการแสดงออกของยีนทั้งในส่วนโคนต้นและใบ โดยต้นที่ได้รับการถ่ายยีน DCS และ CURS ที่ตรวจพบยีนเครื่องหมาย มีความเข้มของแถบดีเอ็นเอและปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา RT-PCR น้อยกว่าต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน จำนวน 1 และ 2 ต้น ตามลำดับ แสดงว่าบริเวณที่ออกแบบยีน DCS และ CURS ที่ใช้ในครั้งนี้เป็นบริเวณที่มีความสำคัญสามารถลดการแสดงออกของยีนได้สำเร็จ

คำสำคัญ: ขมิ้นชัน, RNA interference, เคอร์คูมินอยด์

<sup>(1)</sup> ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

Department of Genetics, Faculty of science, Kasetsart University, Bangkok 10900 Thailand.

Pathway of curcuminoids biosynthesis in *Curcuma longa* was reported. They are synthesized by the coordination of two enzyme clusters, diketide-CoA synthase (DCS) and curcumin synthase (CURS). These two genes have been cloned. Therefore, specific primers were designed to amplify the fragment of *DCS* and *CURS* genes from turmeric. The fragment from each gene was separately joined in the inverted orientation for the construction of the plasmid for RNA interference technique using Gateway recombination system. The plasmid pSTARGATE harboring the *DCS* or *CURS* gene in the RNAi construct was transformed to turmeric shoots. Cocultivation of *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 and turmeric shoot tissue was done followed by *in vitro* propagation of turmeric shoot on MS medium supplemented with 10 µg/ml hygromycin. Three (0.6%) and 4 (0.8%) putative *DCS* and *CURS* transformed plants were obtained. One of the *DCS* and all of the *CURS* transformed plants showed the presence of *hpt* marker gene by PCR. The expression of the target genes were also reduced in one *DCS* transformed plant with positive *hpt* gene and two *CURS* transformed plants. The result indicated that the region of *DCS* and *CURS* genes in this construct were successfully used for down regulation of these genes expression.

**Key words:** turmeric, *Curcuma longa*, RNA interference, curcuminoid

## บทนำ

ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) มีถิ่นกำเนิดในประเทศแถบเอเชียใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (สถาบันวิจัยพืชสมุนไพร, 2544) แต่ปลูกมากในประเทศอินเดียและจีน ส่วนของขมิ้นที่นำมาใช้ประโยชน์ คือ ลำต้นใต้ดิน ที่เรียกว่าเหง้า หรือ หัวและแง่ง เหง้าของขมิ้นมีสารสำคัญ 2 กลุ่ม คือ น้ำมันหอมระเหย และสารเคอร์คูมินอยด์ซึ่งมีสีเหลือง ใช้เป็นส่วนประกอบในอาหาร และยาสมุนไพรหลายชนิด สารในกลุ่มเคอร์คูมินอยด์ที่มีมาก คือ เคอร์คูมิน ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารลดการอักเสบ ต้านการเกิดออกซิเดชัน ต้านเชื้อไวรัส HIV ต้านมะเร็ง และมีฤทธิ์ยับยั้งโปรโตซัวที่ทำให้เกิดโรคบางชนิด (Araújo and Leon, 2001) ในประเทศไทย ขมิ้นชันเป็นพืชสมุนไพรที่ได้รับความนิยม และส่งเสริมให้มีการปลูกอย่างแพร่หลาย นำมาใช้เป็นส่วนประกอบของอาหาร ยา และเครื่องสำอางหลายชนิด มีรายงานพบว่าสารเคอร์คูมินอยด์ในเหง้าที่มีอายุต่างกันมีปริมาณไม่เท่ากัน (Chavalittumrong and Jirawattanapong, 1992) ขมิ้นชันต่างพันธุ์ก็ผลิตสารเคอร์คูมินอยด์ได้ไม่เท่ากันและแม้แต่ในพันธุ์เดียวกันถ้าปลูกในสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน ผลผลิตของสารเคอร์คูมินอยด์ก็แตกต่างกันด้วย (ชัยพัฒน์ และคณะ, 2535)

สารกลุ่มโพลีคีไทด์ (polyketide) เป็นสารที่สังเคราะห์จากสิ่งมีชีวิตทั้งแบคทีเรีย เชื้อรา และพืช เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ จัดเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) มีคุณสมบัติต้านเชื้อรา (antifungi) ต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacteria) ต้านมะเร็ง (anticancer) (Hopwood and Sherman, 1990; Shen and Hutchinson, 1993) ทำให้สารกลุ่มนี้มีความสำคัญทางการแพทย์ ในการนำไปผลิตยา เช่น tetracycline, daunorubicin, erythromycin, rapamycin และ lovastatin (Shen, 2003) การสังเคราะห์โพลีคีไทด์อาศัยการ