

บทคัดย่อ

Ecdysone 20-monooxygenase เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม cytochrome P450 ที่มีบทบาทสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนสารแอลฟา-เอกไดโซนไปเป็นเบตา-เอกไดโซน ซึ่งสารเบตา-เอกไดโซนจัดเป็นสเตอรอยด์ฮอร์โมนที่ทำหน้าที่กระตุ้นการลอกคราบ และการเจริญเติบโตของตัวอ่อนในสัตว์จำพวกอาร์โทรพอด งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อโคลนยีนดีเอ็นเอบางส่วนของ cytochrome P450 gene ที่ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์สารเอกไดโซนในต้นไผ่ และศึกษาคุณลักษณะบางประการของยีน จากผลการศึกษาโดยวิธีการเพิ่มจำนวนยีนดีเอ็นเอของ cytochrome P450 gene ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้จากเซลล์พืชเป็นต้นแบบร่วมกับไพรเมอร์จำเพาะที่ออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ของ cytochrome P450 gene จากสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในฐานข้อมูล พบว่า PCR product ที่ได้มีขนาด 0.6 กิโลเบส เมื่อนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบความเหมือนกับ cytochrome P450 gene ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในฐานข้อมูลพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน PCR มีความเหมือนกับ *Drosophila melanogaster* (CYP6A2), *Locusta migratoria* (CYP6H1), *Musca domestica* (CYP6C1) ประมาณ 46%, *Arabidopsis thaliana* (CYP86A4), *Culex quinquefasciatus* (CYP6E1) ประมาณ 45% และ *Homarus americanus* (CYP45A1) ประมาณ 44% จากผลการศึกษาที่ได้คาดว่ายีน PCR product นี้ น่าจะเป็นส่วนหนึ่งของ cytochrome P450 gene โดยเฉพาะในกลุ่ม CYP6 หรือ CYP45 ที่อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารเอกไดโซนในต้นไผ่ และผลจากการติดตามการสังเคราะห์ cytochrome P450 gene ในต้นไผ่ด้วยเทคนิค Southern hybridization พบว่า cytochrome P450 gene น่าจะมีเพียง 1 ชุดบนโครโมโซมของพืช และเมื่อศึกษาถึงการแสดงออกของ cytochrome P450 gene ในระยะต่างๆ ของการเจริญของเซลล์พืชด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่า cytochrome P450 gene มีการแสดงออกมากในระยะที่เซลล์เจริญเข้าสู่ log phase ซึ่งชี้ให้เห็นว่า cytochrome P450 gene น่าจะมีบทบาทสำคัญในระหว่างการเจริญและการพัฒนาการของเซลล์พืช

ABSTRACT

Ecdysone 20-monooxygenase is a cytochrome P450 enzyme involved in the biosynthesis of the potential insect moulting hormone, 20-hydroxyecdysone, found in a diverse range of arthropods and higher plants including *Vitex grabata*, a medicinal plant of Thailand. Using degenerated oligonucleotide primers synthesized based on amino acid sequence of cytochrome P450-homologues enzymes and genomic DNA isolated from 10-day-old cell cultures, the corresponding DNA fragment of cytochrome P450 monooxygenase gene was generated in the polymerase chain reaction. This DNA fragment was cloned and nucleotide sequencing using the dideoxy chain termination methods was performed. Homology analysis of nucleotide sequences of this DNA fragment reveals highly homologous to several cytochrome P450-homologues genes including *CYP6A2* from *Drosophila melanogaster* (46%), *CYP6H1* from *Locusta migratoria* (46%), *CYP6C1* from *Musca domestica* (46%), *CYP86A4* from *Arabidopsis thaliana* (45%), *CYP6E1* from *Culex quinquefasciatus* (45%) and *CYP45A1* from *Homarus americanus* (44%). Southern hybridization analysis revealed that the *V. grabata* cytochrome P450 monooxygenase gene present as a single copy on the plant chromosome. According to the reverse transcription-PCR analysis, the *V. grabata* cytochrome P450 monooxygenase was predominantly expressed at the exponential phase of growth, suggesting that this gene may play a crucial role during growth and development of plant cells.