1. Executive Summary

โครงการนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจะโคลนซีดีเอ็นเอ และ วิเคราะห์บทบาทหน้าที่ของออกซิโดสควาลีนไซเคลส จากใบบัวบกและเปล้าน้อย ยีนออกซิโดสควาลีนไซเคลสเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ออกซิโดสควาลีนไซเคลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในวิถีชีวสังเคราะห์ของไตรเทอร์ปีน โดยทำหน้าที่เปลี่ยน 2,3-ออกซิโดสควาลีนไปเป็นไตรเทอร์ปีนแบบวงแหวน และ สเตอรอลพืชหลายชนิด

การดำเนินการประกอบไปด้วย การสกัดอาร์เอ็นเอจากใบอ่อนของเปล้าน้อยและบัวบก การสังเคราะห์คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ โดยปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชั่น แล้วนำซีดีเอนเอที่ได้มาเป็นต้นแบบพร้อมกับ ออกแบบดีเจเนอเรสไพร์เมอร์จากตำแหน่งลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์ ของออกซิโดสควาลีนไซเคลสพืชที่ทราบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว เพื่อใช้เป็นไพร์เมอร์ในการเพิ่มปริมาณยีนในส่วนกลางของยีน เมื่อได้ชิ้นส่วนกลางของดีเอนเอแล้วทำการ subclone เข้าสู่ พลาสมิด pCR2.1 (invitrogen) นำไปเพิ่มปริมาณในแบคทีเรีย *E.coli* Top10 ก่อนที่จะนำมาสกัด พลาสมิดแล้วนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าสามารถโคลนส่วนกลางของยีน ออกซิโดสควาลีนไซเคลส ได้สองโคลนจากเปล้าน้อย (เรียกชื่อโคลนว่า CSC และ CSD) และ อีกสองโคลนจากบัวบก (เรียกชื่อโคลนว่า CAL และ CAM) จากนั้นออกแบบไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับแต่ละโคลน เพื่อนำไปใช้ในการโคลนส่วนปลาย (3'-end terminal) และส่วนต้น (5'-end terminal) ของยีนทั้งหมด ผลการวิจัยสามารถโคลนยีนในส่วนปลายได้เสร็จสิ้น แต่ไม่สามารถโคลนยีนในส่วนต้นได้สำเร็จ แม้จะเปลี่ยนวิธีการไปหลายวิธีก็ตาม

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ และ กรดอะมิโนของออกซิโดสควาลีนไซเคลส ทั้ง 4 โคลนจากส่วนกลางจนถึงส่วนปลายถูกนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับ ยีนออกซิโดสควาลีนไซเคลส จากพืชที่ทราบข้อมูลแล้ว 17 ชนิด พบว่า CSC และ CSD จากเปล้าน้อยมีความใกล้เคียงกับ ออกซิโดสควาลีนไซเคลสชนิด taraxerol synthase จาก *Taraxacum officinale* และ isomutiflorenol synthase จาก *Luffa cylindrica* ตามลำดับ ส่วน CAL และ CAM มีความใกล้เคียงกับ β-amyrin synthase จากโสมเกาหลี (*Panax ginseng*) และ lupeol synthase จาก *Arabidopsis thaliana* ตามลำดับ

นอกจากการโคลนยีนทั้ง 4 ชนิดแล้ว ได้ลองโคลนยีนซึ่งมีการรายงานก่อนหน้านี้แล้วโดยทีมนักวิจัยของ Kim และคณะ (Kim et al., 2005) ซึ่งสามารถโคลนยีน CabAS ได้ทั้ง open reading frame CabAS gene (GenBank accession number AY520818) โดยการออกแบบไพร์เมอร์ที่เฉพาะเจาะจงจากลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ Kim และคณะ รายงานไว้ เรียกชื่อโคลนนี้ว่า CAK พบว่า CAK ที่โคลนได้มีนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนแตกต่างจากยีน CabAS ที่ Kim และคณะ โคลนได้ 3 ตำแหน่ง เมื่อศึกษาบทบาทหน้าที่ ของยีน CAK โดยการศึกษาการแสดงออกใน ยีสต์สายพันธุ์ GIL77 พบว่า CAK เป็นยีนที่สร้างโปรตีน multifunctional triterpene synthase (MTS) และมี α- และ β-amyrin เป็นผลิตภัณฑ์หลักซึ่งต่างจากรายงานของ Kim และคณะ ในปี 2009 รายงานว่ายีน CabAS เป็น dammarenediol synthase (Kim et al., 2009)