215467

ศิรินรัตน์ วรรณภินพงศ์ 2551: การโคลนยีนและการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CHS-like* ที่สัมพันธ์กับการสังเคราะห์เคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชัน ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์) สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพันธุศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, D. Agr. 55 หน้า

การโคลนชิ้นส่วนยีน *CHS-like* ของขมิ้นชัน เริ่มต้นโดยการเพิ่มปริมาณยีนด้วยวิธี nested PCR ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 850 คู่เบส ซึ่งสามารถนำชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM®-T Easy ต่อไป เมื่อตรวจสอบความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 7 ชนิด พบว่ามีเพียง 4 ชนิดเท่านั้นได้แก่ *Alu*I, *Hin*fI, *Mbo*I และ *Rsa*I ที่แสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันรวม 6 แบบ และพบว่ายีน 6 รูปแบบนี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับส่วนของยีน *CHS-like* ของพืชชนิดอื่นอีกหลายชนิด ผลของ Southern blot hybridization พบว่าจีโนมของขมิ้นชันมีจำนวนชุดของยีนอย่างน้อย 5 ชุด ทั้งนี้เมื่อใช้เทคนิค TAIL-PCR สามารถโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน *CHS-like* ได้ 3 ยีน คือ *ClCHS1*, *ClCHS2* และ *ClCHS3* พบว่าประกอบด้วย เอกซอน 2 เอกซอน โดยเอกซอนที่ 1 มีกรดอะมิโนอยู่ 64 ตัว ส่วนเอกซอนที่ 2 มีกรดอะมิโนอยู่ 223-330 ตัว และมีอินทรอน 1 ตำแหน่ง ขนาด 82-95 คู่เบส อยู่ระหว่างเอกซอนทั้งสอง เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาแปลเป็นกรดอะมิโน และเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของยีนกลุ่มนี้ในพืชชนิดอื่น พบค่าความเหมือนประมาณ 50-60% และยังพบบริเวณ active site, CoA binding site, กรดอะมิโนส่วนอนุรักษ์ของ CHS superfamily enzymes รวมทั้งส่วน substrate specificity ของยีน *CHS-like* อีกด้วย ทั้งนี้เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* และ *CHS-like* ของพืชอื่นรวมทั้งหมด 18 ชนิด พบว่ายีน *ClCHS*1, *ClCHS2* และ *ClCHS3* จัดอยู่ในกลุ่มของพืชมีดอก และจัดอยู่ในกลุ่มย่อยเดียวกันแยกจากกลุ่มย่อยอื่น การแสดงออกของยีน *CHS-like* ในขมิ้นชันพบมากที่สุดในส่วนของแง่งที่มีขนาดเล็ก (น้อยกว่า 2 เซนติเมตร) และ ค่อย ๆ ลดลงในแง่งที่มีขนาดยาวขึ้นตามลำดับ

Sirinrat Wannapinpong 2008: Cloning and Investigation of the Expression of *CHS-like* Gene Related to Curcuminoid Biosynthesis in Turmeric (*Curcuma longa* Linn.). Master of Science (Genetics), Major Field: Genetics, Department of Genetics. Thesis Advisor: Associate Professor Surin Peyachoknagul, D.Agr. 55 pages.

A part of *CHS-like* gene from *Curcuma longa* Linn. was amplified using nested PCR, which resulted in ~850 bp DNA fragment. This fragment was further ligated with pGEM®-T Easy vector. Each inserted part in the positive clones was cut with 7 restriction enzymes. Only 4 enzymes, i.e., *Alu*I, *Hin*fI, *Mbo*I and *Rsa*I, showed polymorphic band patterns contributed to 6 different types. The nucleotide sequences of each type matched well with *CHS-like* genes from other plants. Southern blot hybridization indicated that the *CHS-like* gene contained at least 5 copies. The complete *CHS-like* gene, i.e., *ClCHS1*, *ClCHS2* and *ClCHS*, were cloned and their sequences were determined using TAIL-PCR. These genes were composed of 2 exons; the first exon encoded 64 amino acid while the second exon encoded 223-330 amino acid and having one intron of 82-95 base pair in between. The deduced amino acid sequences showed 50-60% homology to *CHS* and *CHS-like* genes from several other plants. Active sites, CoA binding sites, conserved sequences and substrate specificity of CHS superfamily enzymes were also found. Phylogenetic analysis based on amino acid sequences of *CHS*, *CHS-like* genes from 18 other plants indicated that the *ClCHS1*, *ClCHS2* and *ClCHS3* genes were belonged to the group of *CHS* and *CHS-like* gene from Angiosperm and formed separate group from others. Semi-quantitative RT-PCR analysis revealed that *CHS-like* was expressed at the highest level in the small rhizome size (<2 cm) and become less expressed in the longer ones.