



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)

ปริญญา

พันธุศาสตร์

พันธุศาสตร์

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การโคลนยีนและการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CHS-like* ที่สัมพันธ์กับการสังเคราะห์เคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชัน

Cloning and Investigation of the Expression of *CHS-like* Gene Related to Curcuminoid Biosynthesis in Turmeric (*Curcuma longa* Linn.)

นามผู้วิจัย นางสาวศิรินรรัตน์ วรรณภินพงศ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, D.Agr.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์อมรา ทองปาน, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิเชียร กิรตินิจกาล, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์เลิศลักษณ์ เงินศิริ, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การโคลนยีนและการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CHS-like* ที่สัมพันธ์กับการสังเคราะห์
เคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชัน

Cloning and Investigation of the Expression of *CHS-like* Gene Related to Curcuminoid
Biosynthesis in Turmeric (*Curcuma longa* Linn.)

โดย

นางสาวศิริรัตน์ วรรณภินพงศ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุศาสตร์)
พ.ศ. 2551

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

การโคลนยีนส่วนยีน *CHS-like* ของขมิ้นชัน เริ่มต้นโดยการเพิ่มปริมาณยีนด้วยวิธี nested PCR ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 850 คู่เบส ซึ่งสามารถนำชิ้นดีเอ็นเอดังกล่าวไปเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM®-T Easy ต่อไป เมื่อตรวจสอบความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ 7 ชนิด พบว่ามีเพียง 4 ชนิดเท่านั้น ได้แก่ *AluI*, *HinfI*, *MboI* และ *RsaI* 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 *CICHS1*, *CICHS2* และ *CICHS3* 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 *CICHS1*, *CICHS2* และ *CICHS3* จัดอยู่ในกลุ่มของพืชมีดอก และจัดอยู่ในกลุ่มย่อยเดียวกันแยกจากกลุ่มย่อยอื่น การแสดงออกของยีน *CHS-like* ในขมิ้นชันพบมากที่สุดในส่วนของแ่งที่มีขนาดเล็ก (น้อยกว่า 2 เซนติเมตร) และ ค่อย ๆ ลดลงในแ่งที่มีขนาดยาวขึ้นตามลำดับ

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., *AluI*, *HinfI*, *MboI* and *RsaI*, 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 *ClCHS3*, 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.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ช่วยเหลือในงานวิจัยนี้ในทุกขั้นตอน วางแผนการทดลอง ให้คำปรึกษาตลอดช่วงเวลาที่ทำงานวิจัย ตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ รวมถึงให้กำลังใจข้าพเจ้าเสมอมา ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อมรา ทองปานสำหรับคำปรึกษาในส่วนการเรียบเรียงและแก้ไขวิทยานิพนธ์นี้จนสมบูรณ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร กิรตินิจกาล ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างขมิ้นชันและการวิเคราะห์ปริมาณสารเคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชัน รวมถึงรองศาสตราจารย์ ดร. นิศย์ศรี แสงเดือน ประธานการสอบ และ รองศาสตราจารย์ ดร.บุษบา ฤกษ์อำนาจโชค ผู้ทรงคุณวุฒิ ที่กรุณาให้คำแนะนำ และช่วยเหลือในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และรองศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ อภิสัทธาวิชสำหรับความช่วยเหลือในด้านต่างๆ

ขอกราบขอบพระคุณ คณะอาจารย์ภาควิชาพันธุศาสตร์ทุกท่าน ที่กรุณาถ่ายทอดวิชาความรู้ให้คำปรึกษา ช่วยเหลือและให้กำลังใจเป็นอย่างดีเสมอมา

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ทุกท่าน พี่ๆ และน้องๆ ในภาควิชาพันธุศาสตร์ พี่น้องพันธุศาสตร์รุ่นที่ 21 และเพื่อนๆ โรงเรียนอุดรพิทยานุกูล ที่ให้คำปรึกษาแนะนำ ช่วยเหลือและเป็นที่กำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณพี่ๆทุกคนที่อาคารปฏิบัติการกลางชั้น 7 ที่ให้ความอนุเคราะห์ ความสะดวกในส่วน of ตัวอย่างขมิ้นชัน และการวิเคราะห์ปริมาณสารเคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชัน

ท้ายที่สุดนี้ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ คุณพ่อสุรินทร์ คุณแม่สุดารัตน์ และนายคณิน วรรณภินพงศ์ รวมถึงนายครุฑ ศรีกุลนาถ ที่คอยเอาใจใส่ดูแล สนับสนุน ให้ความช่วยเหลือในทุกเรื่อง และเป็นกำลังใจสำคัญของข้าพเจ้า จนข้าพเจ้าสำเร็จการศึกษา

ศิริรัตน์ วรรณภินพงศ์

กันยายน 2551

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	13
อุปกรณ์	13
วิธีการ	13
ผลและวิจารณ์	25
สรุปและข้อเสนอแนะ	43
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	45
ภาคผนวก	52
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	55

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณส่วนของยีน <i>CHS-like</i> ในขมิ้นชัน	26
2	แสดงรูปแบบการตัดดีเอ็นเอจากโคลนทั้ง 6 แบบด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 7 ชนิด	28
3	แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณส่วนปลาย 5' และ 3' และ ยีนที่สมบูรณ์ของยีน <i>CHS-like</i> ในขมิ้นชัน	33

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ภาพวาดแสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน <i>CHS-like</i> ในขมิ้นชัน	26
2 แสดงผลที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขมิ้นชันโดยวิธี nested และ semi-nested PCR	27
3 แสดงผลที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากโคลนต่าง ๆ โดยใช้ไพรเมอร์ CLF2 และ CLR3 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Hae</i> III	27
4 แสดงผลที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากโคลนต่าง ๆ โดยใช้ไพรเมอร์ CLF2 และ CLR3 ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Rsa</i> I	28
5 แสดงผลที่ได้จากการทำ Southern blot hybridization	30
6 ภาพวาดแสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน <i>CHS-like</i> ในขมิ้นชันด้านปลาย 5' และ 3'	33
7 ผลการเพิ่มปริมาณส่วนของยีน <i>CHS-like</i> ด้านปลาย 3' ด้วยเทคนิค TAIL-PCR	34
8 แสดงการเปรียบเทียบยีน <i>CHS-like</i> จากขมิ้นชันเปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่น 18 ชนิด	35
9 ผลจากการทำ phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MrBayes	40
10 ผลจากการทำ semi-quantitative RT-PCR	42
ภาพผนวกที่	
1 แสดงผลที่ได้จากการทำ multiple alignment ของยีน <i>CICH</i> S1, <i>CICH</i> S2 และ <i>CICH</i> S3	53

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ACS	=	acridone synthase
ADP	=	arbitrary degenerate primer
ALS	=	aloesone synthase
BAS	=	benzalacetone synthase
BBS	=	bibenzyl synthase
BSA	=	bovine serum albumin
CHS	=	chalcone synthase
CHS-like	=	chalcone synthase related enzyme
CTAB	=	cethyl trimethyl ammonium bromide
DEPC	=	diethylpyrocarbonate
dNTP	=	deoxyribonucleoside triphosphate
EDTA	=	ethylenediamine tetraacetic acid
FAS	=	fatty acid synthase
IPTG	=	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
PCR	=	polymerase chain reaction
PKS	=	polyketide synthase
2PS	=	2-pyrone synthase
RT-PCR	=	reverse transcription-polymerase chain reaction
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
SP	=	nested sequence-specific primer
SSC	=	standard saline citrate solution
STC	=	stilbenecarboxylate synthase
STS	=	stilbene synthase
TAIL-PCR	=	thermal asymmetric interlaced PCR
VPS	=	valerophenone synthase
X-gal	=	beta-D-galactopyranoside
YAC	=	yeast artificial chromosome

**การโคลนนิ่งและการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CHS-like* ที่สัมพันธ์กับการ
สังเคราะห์เคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชัน**

**Cloning and Investigation of the Expression of *CHS-like* Gene Related to
Curcuminoid Biosynthesis in Turmeric (*Curcuma longa* Linn.)**

คำนำ

ขมิ้นชัน พืชสมุนไพรที่คนไทยรู้จักและใช้ประโยชน์มาตั้งแต่โบราณ การนำขมิ้นชันมาใช้ประโยชน์มีหลายรูปแบบ เป็นเครื่องเทศเพิ่มรส กลิ่น และสีให้อาหาร เช่น แกงเหลือง แกงไตปลา เป็นเครื่องสำอางในการพอกบำรุงผิวพรรณ เป็นยาแผนโบราณรักษาโรคแผลในกระเพาะอาหาร ท้องอืด ท้องเฟ้อ ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์พบคุณสมบัติใหม่ ๆ ของขมิ้นชันเพิ่มขึ้น คือ สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิด เช่น เชื้อซัลโมเนลลาที่ก่อโรกระบบทางเดินอาหาร กระตุ้นการหลั่งเมือกมาเคลือบกระเพาะอาหาร มีสารสำหรับป้องกันยุง สารสำคัญที่ทำให้ขมิ้นชันมีสรรพคุณในการรักษาโรค คือ น้ำมันหอมระเหยและสารเคอร์คูมินอยด์ จากการศึกษาสารเคอร์คูมินอยด์พบว่า เป็นสารที่มีประโยชน์มาก มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันการติดเชื้อและการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง เช่น มะเร็งเต้านม มะเร็งปอด มะเร็งลำไส้ใหญ่ ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บางชนิด ช่วยขจัดมลพิษในกระแสเลือด ลดการอักเสบของเนื้อเยื่อสมองที่เกิดจากโรคอัลไซเมอร์ ออกฤทธิ์ขับน้ำดีช่วยระบบย่อยอาหาร ด้วยประโยชน์เหล่านี้ปัจจุบันมีการสกัดสารเคอร์คูมินอยด์แล้วทำให้อยู่ในรูปแคปซูลเพื่อรับประทาน และเป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอางบำรุงผิวพรรณ การศึกษาเกี่ยวกับสารเคอร์คูมินอยด์นั้นมักจะเน้นเกี่ยวกับคุณสมบัติของสาร การสกัดสารออกจากขมิ้นชัน หรือการสังเคราะห์สารทางเคมีเพื่อให้มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับสารธรรมชาติ แต่ยังไม่มีการศึกษาขึ้นที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์สารนี้แต่อย่างใด

การสังเคราะห์เคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชัน มีรายงานว่า เกิดจากปฏิกิริยาการรวมกันของ ซินนามาเตนในรูป cinnamoyl CoA 1 โมเลกุลกับมาโลเนต (malonyl CoA) 5 โมเลกุล นอกจากนี้สารตั้งต้นที่ใช้และปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ รวมถึงโครงสร้างทางเคมีและคุณสมบัติของสารเคอร์คูมินอยด์นั้นคล้ายกับสารธรรมชาติกลุ่มโพลีคีไทด์ (polyketide) โดยสารกลุ่มโพลีคีไทด์นี้เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่สร้างจากสิ่งมีชีวิต (แบคทีเรีย เชื้อรา และพืช) และจัดเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่มีคุณสมบัติต้านเชื้อรา แบคทีเรียและต้านมะเร็งได้ เอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์สาร

โพลีคีไทด์ (polyketide synthase, PKS) มี 3 กลุ่ม ที่พบในพืชคือ กลุ่มที่ 3 ได้แก่ chalcone synthase (CHS) ที่ใช้ในการสังเคราะห์สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) และ CHS-like ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิในพืชหลายชนิด โดยยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ CHS และ CHS-like ที่พบในพืชมีลักษณะเป็น multigene family นอกจากนี้ยังมีข้อมูลที่น่าสนใจคือ การทำงานของเอนไซม์ CHS-like น่าจะเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารในกลุ่ม diarylheptanoids เช่น curcumin และ polycyclic phenylphenalenones

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะตรวจสอบยีนในกลุ่มนี้ และโคลนยีนที่มีความสัมพันธ์กับการสังเคราะห์สารเคอร์คูมินอยด์ในขมิ้นชัน ซึ่งการตรวจหายีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สารเคอร์คูมินอยด์จะเป็นความรู้พื้นฐาน ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อประโยชน์ในการควบคุมการผลิตสารดังกล่าวให้ได้ปริมาณมาก และในเวลาที่ต้องการโดยการใส่เทคโนโลยีชีวภาพ รวมถึงเพื่อใช้ประโยชน์ด้านต่าง ๆ ต่อไป เช่น อุตสาหกรรม การแพทย์ และการพาณิชย์ เป็นต้น

วัตถุประสงค์

1. โคลนยีน *CHS-like* ที่สัมพันธ์กับการสังเคราะห์เทอร์พีนอยด์ในขมิ้นชัน
2. ตรวจสอบการแสดงออกของยีนในหัวขมิ้นชันที่มีขนาดต่างๆ

การตรวจเอกสาร

ขมิ้นชัน

ขมิ้นชันเป็นพืชในวงศ์ Zingiberaceae ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Curcuma longa* Linn. ชื่อสามัญ คือ turmeric หรือ curcuma รู้จักกันในนามของ ขมิ้น(ทั่วไป) ขมิ้นแกง ขมิ้นหยอก ขมิ้นหัว ขมิ้นชัน (ภาคกลาง ภาคใต้) ขมิ้น หมัน (ภาคใต้) ตายอ (กะเหรี่ยง-ก่าแพงเพชร) สะยอ (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน) (เต็ม, 2544) ขมิ้นเป็นพืชล้มลุก มีถิ่นกำเนิดในแถบเอเชียใต้ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2544) แพร่กระจายไปสู่แถบต่าง ๆ มีบันทึกไว้ว่า มาร์โค โปโล (Marco Polo) ได้นำไปปลูกในจีน เมื่อ พ.ศ.1280 จากนั้นจึงแพร่เข้าสู่ยุโรป และที่อื่น ๆ ของโลก (บัญญัติ, 2543) ขมิ้นมีปลูกกันมากในอินเดีย (โดยเฉพาะเมืองมัทราส บอมเบย์ และ เบงกอล) บังคลาเทศ สาธารณรัฐประชาชนจีน ได้หวัน อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และจาไมกา ในแต่ละปีประเทศต่าง ๆ ผลิตขมิ้นได้ประมาณ 160,000 ตัน ในจำนวนนี้ผลิตจากอินเดียและบังกลาเทศถึง 90 เปอร์เซ็นต์ (กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์, 2532) ในอินเดียนั้นมีความต้องการขมิ้นเป็นอย่างมาก ขมิ้นที่ผลิตได้ในแต่ละปีจะนำไปใช้ภายในประเทศมากถึง 98 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลือนำไปขายยังสหรัฐอเมริกา ศรีลังกา และญี่ปุ่น สำหรับประเทศไทยพบพืชสกุลขมิ้นกระจายอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศประมาณ 34 ชนิด (Lasen, 1996) เนื่องจากขมิ้นชันปลูกง่าย สามารถขึ้นได้ดีในดินทุกประเภท เจริญได้ดีในที่ดอน ไม่ชอบน้ำท่วมขัง ปัญหาของโรคและแมลงรบกวนน้อย

ขมิ้นชันเป็นพืชล้มลุก มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ $2n = 3x = 36$ (Ramachandran, 1961) เป็นหมัน มีการสืบทอดพันธุ์ด้วยวิธีการคัดเลือกพันธุ์และปลูกขยายพันธุ์โดยไม่อาศัยเพศ (สถาบันวิจัยสมุนไพร, 2544) ลักษณะทางสัณฐานของขมิ้นชัน คือ มีลำต้นเหนือดินเป็นลำต้นที่เกิดจากการอัดตัวกันของกาบใบ ลำต้นจริงอยู่ใต้ดินเรียกว่าเหง้าขมิ้น ประกอบด้วย เหง้าหลักใต้ดินที่เรียกว่า หัวแม่ หรือหัวใต้ดิน (mother corm) ซึ่งมีรูปไข่และแตกแขนงทรงกระบอกออกด้านข้างทั้ง 2 ด้านตรงข้ามกันเรียกว่า primary rhizome หรือ finger ที่เรียกว่า แง่ง เนื้อในเหง้ามีสีเหลืองมุกกลั่น เฉพาะ ใบเป็นใบเดี่ยว เจริญออกจากเหง้าเรียงเป็นวงซ้อนทับกัน ใบรูปหอก กว้าง 12-15 เซนติเมตร ยาว 30-40 เซนติเมตร ช่อดอกเจริญออกจากเหง้าแทรกขึ้นระหว่างใบ รูปทรงกระบอก ประกอบด้วยใบประดับ (bract) จำนวนมาก มีสีเขียวอ่อน ใบประดับตรงปลายช่อจำนวน 6-10 ใบ สีขาวหรือขาวแกมชมพูเรื่อ ๆ ดอกสีเหลืองอ่อน เกิดในซอกใบประดับเว้นแต่ในซอกใบตรงปลายช่อ ผลทรงกลมมี 3 พู การปลูกขมิ้นในประเทศไทย เริ่มปลูกในช่วงต้นฤดูฝนประมาณปลายเดือน

เมษายน ถึงต้นเดือนพฤษภาคมของทุก ๆ ปี และจะเก็บเกี่ยวหัวขมิ้น ในช่วงฤดูหนาวหรือประมาณปลายเดือนธันวาคมถึงมกราคม ซึ่งช่วงนี้หัวขมิ้นชันจะแห้งสนิท (องอาจและคณะ, 2541)

การนำขมิ้นชันมาใช้ประโยชน์เริ่มพบในชาวแอสซีเรีย (Assyrian) ตั้งแต่ 600 ปีก่อนพุทธศักราชและแพร่หลายจนถึงปัจจุบัน รูปแบบของการนำขมิ้นชันมาใช้ประโยชน์นั้นมีหลากหลาย เป็นเครื่องเทศใช้ปรุงรส แต่งสี และกลิ่นในอาหาร เช่น แกงเหลือง แกงไตปลา แกงกระหรี หมูสะเต๊ะ เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางบำรุงผิวพรรณ พบมากในแถบตอนใต้ของเอเชีย และในหลายประเทศแถบตะวันออกไกล โดยใช้ขมิ้นชันทาผิวหนัง เพื่อให้ผิวนุ่มนวล ในมาเลเซีย ใช้ขมิ้นชันผสมน้ำสำหรับใช้อาบเพื่อให้ร่างกายสะอาด เป็นสีย้อมผ้า พบมากในอินเดีย จีนและบางส่วนของยุโรป ประโยชน์ที่สำคัญและทำให้ขมิ้นชันเป็นสมุนไพรที่น่าสนใจ คือ เป็นยารักษาโรคตามตำรับแผนโบราณและแผนปัจจุบัน รักษาแผลในกระเพาะอาหาร โดยกระตุ้นการหลั่งเมือก (mucin) มาเคลือบกระเพาะและยับยั้งการหลั่งน้ำย่อยต่าง ๆ เป็นยาลดกรด ขับลม แก้อาการเกร็งของกล้ามเนื้อทำให้การบีบตัวของลำไส้ลดลง เป็นยาเจริญอาหาร น้ำที่ได้จากขมิ้นชันนำมารักษาโรคผิวหนัง หรือนำมาพอกแก้ปวดตามข้อ แก้กโรคตา แก้กบิด แก้ปวดท้อง แก้กิดชาน แก้ท้องร่วง เมื่อนำขมิ้นชันไปต้มกับน้ำนมหรือน้ำตาลสามารถรับประทาน เพื่อป้องกันและรักษาไข้หวัด มีฤทธิ์ในการป้องกันตับถูกทำลายจากสารพิษ (บัญญัติ, 2543) สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร เช่น *Salmonella* spp. (Negi *et al.*, 1999) นอกจากนี้ยังยับยั้งการเจริญของราที่ทำให้อาหารเน่าเสีย เช่น *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus* ได้อีกด้วย (Jayaprakasha *et al.*, 2005) กองวิจัยและพัฒนาสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ได้ศึกษาว่า ขมิ้นชันไม่มีพิษที่รุนแรง ไม่ว่าจะใช้ระยะสั้นหรือระยะยาว สารสำคัญที่ทำให้ขมิ้นชันมีสรรพคุณในการรักษาโรค คือ น้ำมันหอมระเหย (volatile oil, turmeric oil) และสารเคอร์คูมินอยด์ (curcuminoid) ซึ่งพบบริเวณเหง้าของขมิ้นชัน ปริมาณสารเคอร์คูมินอยด์และน้ำมันหอมระเหยแตกต่างกันในช่วงอายุของขมิ้นชัน ในขมิ้นชันอายุ 5-8 เดือน มีปริมาณสารเคอร์คูมินอยด์เพียงร้อยละ 7 น้ำมันหอมระเหยจะมีปริมาณลดลงเรื่อย ๆ เมื่อขมิ้นชันมีการเจริญเติบโตเต็มที่และมีปริมาณน้อยที่สุดในเดือนที่ 8 ของการเจริญเติบโต (บัญญัติ, 2543) คุณภาพของขมิ้นชันขึ้นกับปริมาณสารสำคัญทั้งสองชนิด และด้วยสรรพคุณมากมายเหล่านี้กระทรวงสาธารณสุขจึงมีนโยบายผลักดันให้ขมิ้นชันเป็นสมุนไพรระดับชาติเหมือนโสมของประเทศเกาหลี

น้ำมันหอมระเหย (volatile oil, turmeric oil)

ขมิ้นชันมีน้ำมันหอมระเหยตั้งแต่ 2-6 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันมีสีเหลืองและเรืองแสงได้เล็กน้อย สารเคมีที่พบมากที่สุดคือ เทอร์มิรอน (termerone) ประมาณ 58-59 เปอร์เซ็นต์ สารนี้มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{15}H_{22}O$ รองลงมาได้แก่ ซิงจิเบอริน (zingiberene) 25 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบสารต่าง ๆ อีกหลายชนิด ได้แก่ ซาบินีน (sabinene) บอร์นีออล (borneol) ซินีออล (cineol) เทอร์มิรอล (termerol) เคอร์คิวโมน (curcumone) และฟิแลนเดรีน (phellandrene) (ปัญญาคี, 2543) น้ำมันหอมระเหยมีฤทธิ์ในการขับลม แก้โรคท้องอืด ท้องเฟ้อ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของ จุลินทรีย์บางชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans* และ *Pseudomonas aeruginosa* (Negi *et al.*, 1999) มีฤทธิ์ลดการอักเสบ ลดการแพ้จากแมลงสัตว์กัดต่อยได้ นอกจากนี้สารในน้ำมันหอมระเหยยังสามารถกันยุงได้

สารเคอร์คิวมิน (curcumin)

สารในกลุ่มเคอร์คิวมินอยด์ที่สำคัญและพบในขมิ้นชัน คือ curcumin, demethoxycurcumin และ bis-demethoxycurcumin ซึ่งเคอร์คิวมิน (curcumin) มีประมาณ 2-8 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารสีเหลือง ส้ม หรือสีเหลืองแดง ชื่อทางเคมีเรียกว่า 1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione หรือ diferuloylmethane เป็นสารไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีในแอลกอฮอล์และกรดอะซิติก (Sharma *et al.*, 2005) อยู่ในกลุ่ม diarylheptanoid ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ (natural product) พบครั้งแรกโดย Trommsdorff ปี ค.ศ.1808 สกัดได้ครั้งแรกโดย Vogel และ Pelletier ปี ค.ศ.1815 มีการศึกษาโครงสร้างทางเคมีของสารเคอร์คิวมินโดย Roughley และ Whiting (Chattopadhyay *et al.*, 2004) โครงสร้างของเคอร์คิวมินประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติก 2 โมเลกุล เชื่อมด้วยคาร์บอนสายยาว 7 คาร์บอน สำหรับกระบวนการสังเคราะห์สารเคอร์คิวมินนั้นยังไม่มี การศึกษาอย่างจริงจัง มีเพียงสมมติฐานว่า สารเคอร์คิวมินน่าจะเกิดจากการรวมตัวของหน่วยซินนามेट (cinnamate unit) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงแหวนอะโรมาติก 1 โมเลกุลกับมาโลเนต (malonate unit) 5 โมเลกุล แล้วมีการสร้างวงแหวนอะโรมาติกอีก 1 วงขึ้นภายหลัง (Keserü and Nógrádi, 1995)

สารเคอร์คิวมินในขมิ้นชันมีประโยชน์หลายอย่าง เช่น มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ในการทดสอบกับสัตว์ที่เป็นเบาหวาน พบว่าเคอร์คิวมินสามารถป้องกันการเกิด protein glycosylation และ lipid peroxidation ที่เป็นสาเหตุของการเกิดอนุมูลอิสระ (Jain *et al.*, 2006) สามารถยับยั้งการ

เจริญเติบโตของ *Pseudomonas aeruginosa* (Negi *et al.*, 1999) และ *Plasmodium falciparum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคมาลาเรีย ทำให้ผู้ป่วยมี blood parasitemia ลดลงถึง 80-90% (Reddy *et al.*, 2005) นอกจากนี้ยังยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ integrase ซึ่งเป็นเอนไซม์ของเชื้อ human immunodeficiency virus type I (HIV-I) ไวรัสที่ก่อให้เกิดโรค AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) (Mazumder *et al.*, 1995) ยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation) กระตุ้นการเกิด apoptosis ของเซลล์มะเร็งในมะเร็งเต้านม มะเร็งลำไส้ใหญ่ มะเร็งเม็ดเลือดขาว มะเร็งปอด (Erk *et al.*, 2004; Pillai *et al.*, 2004) กระตุ้นการทำงานของยีน *p53* และยีน *Bax* ทำให้เซลล์หยุดการแบ่งตัว (cell cycle arrest) ในผู้ป่วยมะเร็ง (Shi *et al.*, 2006) ยับยั้งการถอดรหัสของยีน macrophage inflammatory protein-2 (*MIP-2*) ซึ่งเป็นสาเหตุให้ระบบประสาทส่วนกลางอักเสบ (Tomita *et al.*, 2005) และลดการอักเสบของเนื้อเยื่อสมองที่เกิดจากโรคอัลไซเมอร์ สำหรับปริมาณสารเคอร์คูมินอยด์ในเหง้าที่มีอายุต่างกันจะมีปริมาณไม่เท่ากัน (Chavalittumrong and Jirawattanapong, 1992) นอกจากนี้ยังพบว่ามินชันพันธุ์เดียวกันถ้าปลูกในสภาพแวดล้อมต่างกัน ปริมาณเคอร์คูมินอยด์จะแตกต่างกันด้วย (ชัยพัฒน์ และคณะ, 2535) ในการเตรียมมินชันแห้งเพื่อนำไปใช้ทำยาโรคต้องเป็นมินชันแก่เต็มที่ สะอาด และมีปริมาณเคอร์คูมินอยด์ไม่น้อยกว่า 8.64% (องอาจ และคณะ, 2541)

สารกลุ่มโพลีคีไทด์ (polyketide)

สารกลุ่มโพลีคีไทด์ เป็นสารที่สังเคราะห์จากสิ่งมีชีวิตทั้งแบคทีเรีย เชื้อรา และพืช เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ จัดเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) มีคุณสมบัติต้านเชื้อรา (antifungi) ต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacteria) ต้านมะเร็ง (anticancer) (Hopwood and Sherman, 1990; Shen and Hutchinson, 1993) ทำให้สารกลุ่มนี้มีความสำคัญทางการแพทย์ สามารถนำไปผลิตยา เช่น tetracycline, daunorubicin, erythromycin, rapamycin และ lovastatin (Shen, 2003) การสังเคราะห์โพลีคีไทด์อาศัยการทำงานของเอนไซม์ polyketide synthase (PKS) ซึ่งทำงานคล้ายกับเอนไซม์ fatty acid synthase (FAS) ในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันสายยาว (long-chain fatty acid) ของยูแคริโอต การสังเคราะห์กรดไขมันเริ่มจาก acetyl CoA เป็นโมเลกุลเริ่มต้น (starter molecule) และ malonyl CoA เป็นโมเลกุลต่อเติม (extender molecule) มาสร้างคาร์บอนสายหลัก (Hopwood and Sherman, 1990) แต่การทำงานของเอนไซม์ PKS ต่างจากเอนไซม์ FAS คือ มีความหลากหลายในการเลือกโมเลกุลเริ่มต้นและโมเลกุลต่อเติม เช่น propionyl CoA และ butyryl CoA ทำให้สารโพลีคีไทด์มีสายคาร์บอนหลักที่ต่างกัน เมื่อสังเคราะห์คาร์บอนสายหลักอาจเกิดการเชื่อมต่อกันเป็นวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) หรือวงแหวนแลคโตน (lactone ring) และมีการดัดแปลง

โครงสร้างภายหลัง (post-modification) เช่น เดิมหมู่เมทิล (-CH₃) ไฮดรอกซิล (-OH) ทำให้สารที่ได้มีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (อรินทิพย์, 2541; Thamchaipenet, 1999) เอนไซม์ PKS ของแบคทีเรียสามารถแบ่งได้ 3 ชนิด คือ เอนไซม์ PKS ชนิดที่ 1 (Type I PKS) เป็นเอนไซม์หลายหน้าที่ (multifunctional enzyme) เอนไซม์ PKS ชนิดที่ 2 (Type II PKS) เป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่เดียว (monofunctional enzyme) เอนไซม์ PKS ชนิดที่ 3 (Type III PKS) ประกอบด้วยเอนไซม์หลักชนิดเดียว โดยการทำงานของเอนไซม์ PKS ชนิดที่ 3 ต่างจากชนิดที่ 1 และ 2 คือ จะไม่ใช้ acyl carrier protein (ACP) ช่วยในการสร้างคาร์บอนสายหลัก แต่ทำงานโดยตรงที่ acyl CoA (Shen, 2003) และสายโพลีคีไทด์ที่สังเคราะห์ได้จะมีขนาดเล็กกว่า คือ มี ketide unit ไม่เกิน 5 หน่วย (Abe *et al.*, 2004) จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์ PKS ชนิดที่ 3 ใน *Streptomyces* เกี่ยวข้องกับการสร้างรงควัตถุเมลานิน (Funa *et al.*, 1999) นอกจากนี้ยังพบเอนไซม์ชนิดนี้ในพืชด้วย เช่น เอนไซม์ chalcone synthase (CHS) จากการทำ phylogenetic tree ของเอนไซม์ PKS ชนิดที่ 3 ที่พบในแบคทีเรียและพืชพบว่าเอนไซม์ PKS ชนิดที่ 3 จากพืชและแบคทีเรียแบ่งกลุ่มกันอย่างชัดเจน (Abe *et al.*, 2004)

Chalcone synthase-like enzyme (CHS-like)

เอนไซม์ CHS อยู่ใน superfamily ของเอนไซม์ PKS ชนิดที่ 3 (Austin and Noel, 2003) เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารฟลาโวนอยด์ (flavonoid) โดยสังเคราะห์สารตั้งต้น (precursor) ของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ คือ naringenin chalcone ใช้ p-coumaroyl CoA เป็นโมเลกุลเริ่มต้นแล้วนำ malonyl CoA 3 โมเลกุลมาต่อ (Dixon, 1999) เอนไซม์ CHS มีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์สารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (antimicrobial phytoalexin) ต้านมะเร็ง (cancer chemopreventive phenylpropanoid) เป็นตัวเหนี่ยวนำ (inducer) ของสารฟลาโวนอยด์ (Schröder, 1999) จากการศึกษาเอนไซม์ CHS ในพืชต่าง ๆ พบ chalcone synthase related enzyme (CHS-like) จัดอยู่ใน superfamily ของเอนไซม์ที่เรียกว่า CHS superfamily เนื่องจากมีลำดับเบส ลำดับกรดอะมิโน และการทำงานที่ใกล้เคียงกันมาก (Schröder, 1997) CHS-like มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนของเอนไซม์ CHS ประมาณ 60-75% เช่น stilbene synthase (STS) (Schöppner and Kindl, 1984) acridone synthase (ACS) (Lukacin *et al.*, 1999) 2-pyrone synthase (2PS) (Eckermann *et al.*, 1998) valerophenone synthase (VPS) (Okada and Ito, 2001) bibenzyl synthase (BBS) (Preisig-Mueller *et al.*, 1995) aloesone synthase (ALS) (Abe *et al.*, 2004) การทำงานของเอนไซม์ CHS-like ใช้โมเลกุลเริ่มต้นและจำนวน malonyl CoA ต่างกันออกไป (Dixon, 1999) เช่น เอนไซม์ ALS ใช้ acetyl CoA เป็นโมเลกุลเริ่มต้นและใช้ malonyl CoA 6 โมเลกุลเป็นหน่วยต่อเติม (Abe *et al.*, 2004) และผลผลิตที่ได้จากการทำงานของ

เอนไซม์ CHS-like นั้นเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารทุติยภูมิ (secondary plant product) ในพืช เช่น ยีน *VPS* ใน *Humulus lupulus* เกี่ยวข้องกับการสร้างสารที่มีรสขม (bitter acid) สำหรับใช้ในการหมักเบียร์ (Okada and Ito, 2001) ยีน *BAS* (benzalacetone synthase) ใน *Rheum palmatum* ทำให้พืชชนิดนี้มีคุณสมบัติเป็น anti-inflammatory และใช้เป็นยารักษาโรค (Abe *et al.*, 2004) ยีน *STS* ทำหน้าที่ในต่อต้านเชื้อราในพืช (Tropf *et al.*, 1993) เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าการทำงานของเอนไซม์ CHS-like น่าจะเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารในกลุ่ม diarylheptanoids เช่น เคอร์คูมิน และ polycyclic phenylphenalenones (Brand *et al.*, 2006)

ยีนที่เป็นรหัสของเอนไซม์ CHS และเอนไซม์ CHS-like เป็น multigene family โครงสร้างยีนส่วนใหญ่ประกอบด้วย 2 เอกซอน (exons) และ 1 อินทรอน (intron) ยกเว้นใน *Antirrhinum majus* มี 2 อินทรอน โดย อินทรอนที่ 2 อยู่ในเอกซอนที่ 2 เมื่อเทียบกับยีนเดียวกันในพืชอื่น (Sommer and Saedler, 1986) ในพืชมักมีความยาวของเอกซอนที่ 1 ขนาดประมาณ 37-64 กรดอะมิโน เอกซอนที่ 2 ขนาดประมาณ 340 กรดอะมิโน (Jinling *et al.*, 2000) แต่มักพบขนาดของอินทรอนไม่เท่ากัน เช่น *Ipomoea* พบอินทรอนขนาด 84 ถึง 125 คู่เบส (Durbin *et al.*, 1995) *Petunia* พบอินทรอนขนาด 659 คู่เบสถึง 15 กิโลเบส (Kose *et al.*, 1987) ตำแหน่งอินทรอนของยีน *CHS-like* ในพืชทุกชนิดเริ่มที่ตำแหน่งที่ 1 หรือ 2 ของเบสที่เป็นรหัสกรดอะมิโน cysteine (Jinling *et al.*, 2000; Harashima *et al.*, 2004) ยีน *CHS* และ *CHS-like* นั้นพบได้หลายชุดต่างกันขึ้นกับชนิดพืช เช่น *Petunia* มี 8 ยีน *Vitis* มี 3 ยีน *Ipomoea* มี 6 ยีน ใน *Antirrhinum* และ *Arabidopsis* พบเพียง 1 ยีน (Farzad *et al.*, 2005) บางยีนรู้หน้าที่แล้ว แต่บางยีนยังไม่รู้หน้าที่

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* และ *CHS-like* ของพืชหลายชนิดมาเปรียบเทียบกัน พบความแตกต่างของกรดอะมิโนน้อยมาก เพียงบางตัวเท่านั้น (Tropf *et al.*, 1993) และพบบริเวณอนุรักษ์ของพืชทุกชนิด คือ Cys₁₆₄, His₃₀₃, Asn₃₃₆ และ Phe₂₁₅ (Ji and Hongya, 2006) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การเลือกใช้โมเลกุลเริ่มต้นที่ต่างกันของยีน *CHS-like* นั้นเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโนบางตัวในบริเวณ active site เท่านั้น (Jez *et al.*, 2002) และเอนไซม์ในกลุ่ม CHS-superfamily นั้นยังมีบริเวณอนุรักษ์ 374G(F/L)GPG ซึ่งเป็นส่วนของ substrate specificity ของเอนไซม์ด้วย (Suh *et al.*, 2000) จากการหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของยีนทั้งสองกลุ่มพบว่าทั้งยีน *CHS* และ *CHS-like* มีความใกล้ชิดกันมากทั้งในด้านปฏิกิริยาทางเคมี ลำดับเบส และลำดับกรดอะมิโน การทำ phylogenetic tree ระหว่างยีน *CHS* และ *CHS-like* ในพืชนั้น ยีนของพืชที่จัดอยู่ในกลุ่มหรือสายวิวัฒนาการเดียวกันจะเป็นพืชที่อยู่ใน family เดียวกันเป็นส่วนใหญ่ เช่น ยีน *STS* กับ *CHS* เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองนี้คล้ายกันมากทั้งในการเลือกโมเลกุลเริ่มต้น

และจำนวนมาโลเนตที่มากต่อเติม และค่าความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ทั้งสองมีค่าสูงถึง 75-90% (Tropf *et al.*, 1993 และ Ji and Hongya, 2006) และจากการศึกษาความสัมพันธ์นี้ คาดว่ายีน *CHS-like* นั้นเกิดจากการ duplication ของยีน *CHS* และมีบรรพบุรุษร่วมกัน (Ji and Hongya, 2006)

การโคลนยีนและการหาจำนวนชุดของยีนในจีโนม

การโคลนยีนเป็นเทคนิคสำคัญสำหรับงานด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลและพันธุวิศวกรรมเพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจให้มีปริมาณมากเพียงพอสำหรับการศึกษาหน้าที่ ลำดับนิวคลีโอไทด์ หรือถ่ายชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้าในสิ่งมีชีวิต (สุรินทร์, 2545) โดยทั่วไปนิยมทำในแบคทีเรีย เพราะเลี้ยงง่ายและเจริญเติบโตเร็ว (Wu *et al.*, 1997) ในการโคลนยีน ขั้นแรก คือ เตรียมดีเอ็นเอก่อน โดยสกัดแยกดีเอ็นเอทั้งหมดจากจีโนมสิ่งมีชีวิตเรียกว่า genomic DNA หรือสังเคราะห์ขึ้นจาก mRNA ซึ่งเรียกว่า cDNA เมื่อได้ดีเอ็นเอจากแหล่งที่ต้องการแล้ว จึงนำมาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ (vector) ได้ดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA) แล้วนำไปถ่ายเข้าสู่เซลล์ผู้รับ (host) ที่เตรียมให้อยู่ในลักษณะคอมพีเทนต์เซลล์ (competent cell) จากนั้นจึงคัดเลือกเซลล์ที่มียีนที่ต้องการ (Sambrook *et al.*, 2001) ปัจจุบันนี้มีการประยุกต์นำวิธีพีซีอาร์มาช่วยในการโคลนยีน หรือการตรวจสอบการแสดงออกของยีน เช่น การโคลน cDNA ของเอนไซม์ PKS ชนิดที่ 3 จาก *Rheum palmatum* (Abe *et al.*, 2004) การโคลนยีน *Gbchs* จาก *Ginkgo biloba* (Pang *et al.*, 2005) การโคลนกลุ่มยีน *CHS* จาก *Viola cornuta* (Farzad *et al.*, 2005) เป็นต้น สำหรับการหาจำนวนชุดของยีนในจีโนมนั้น มักใช้การทำ Southern blot hybridization เช่น การหาจำนวนชุดของยีน *CHS-like* ใน *Gerbera hybrida* (Helariutta *et al.*, 1995) การหาจำนวนชุดของยีน *CHS-like* ใน *Marchantia paleacea* var. *diptera* (Harashima *et al.*, 2004)

Thermal asymmetric interlaced PCR (TAIL-PCR)

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค thermal asymmetric interlaced PCR (TAIL-PCR) เป็นการประยุกต์จากเทคนิค arbitrarily primed PCR (AP-PCR) ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้ไพรเมอร์ที่ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด (arbitrary degenerate primers; ADP) ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จะปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะจำนวนมาก จึงมีการคิดค้นเทคนิค TAIL-PCR เพื่อนำมาแก้ปัญหานี้ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับชิ้นดีเอ็นเอที่ทราบลำดับเบสที่มีตำแหน่งอยู่ติดกัน (nested sequence-specific primers, SP) ทั้งหมด 3 ไพรเมอร์และไพรเมอร์

ADP สายสั้นเพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบ nested PCR ให้ได้ผลผลิตพีซีอาร์ที่จำเพาะเจาะจง (Weissensteiner *et al.*, 2004)

หลักการของเทคนิค TAIL-PCR คือ เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมทั้งหมด 3 รอบในแต่ละรอบใช้ไพรเมอร์ SP ที่มีตำแหน่งอยู่ติดกัน การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมรอบที่ 1 ใช้ไพรเมอร์ SP1 คู่กับไพรเมอร์ ADP โดยมี genomic DNA เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์มาเจือจางเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในรอบที่ 2 โดยรอบที่ 2 นี้ใช้ไพรเมอร์ SP2 ที่มีตำแหน่งอยู่ถัดจากไพรเมอร์ SP1 เพียงเล็กน้อยคู่กับไพรเมอร์ ADP เส้นเดิม และในรอบที่ 3 ใช้ผลผลิตพีซีอาร์ที่เจือจางจากการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในรอบที่ 2 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบโดยมีไพรเมอร์ SP3 ที่มีตำแหน่งอยู่ถัดจากไพรเมอร์ SP2 คู่กับไพรเมอร์ ADP เส้นเดิม การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในแต่ละรอบจะมีการเปลี่ยนแปลงสถานะของปฏิกิริยาตามอุณหภูมิของไพรเมอร์ SP ในการเข้าเกาะกับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing)

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค TAIL-PCR สามารถใช้กับดีเอ็นเอต้นแบบที่มีปริมาณน้อยประมาณ 1-10 ng (Weissensteiner *et al.*, 2004) เทคนิค TAIL-PCR นิยมใช้ในงานที่เกี่ยวข้องกับการหาลำดับเบสส่วนหัวและส่วนท้ายของชิ้นดีเอ็นเอที่ทราบลำดับเบสแล้ว เช่น การหา flanking sequence ของพืชที่ได้รับการถ่ายยีนด้วย *Agrobacterium* โดยการออกแบบไพรเมอร์ SP จากลำดับเบสของ T-DNA ในส่วน left-border และ right-border เพื่อตรวจสอบว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ถ่ายยีนเข้าไบนั้นแทรกอยู่ที่บริเวณใดในจีโนม เช่น การตรวจสอบการแทรกของ T-DNA ในจีโนม *Arabidopsis* (Liu *et al.*, 1995) และในจีโนมสตรอเบอร์รี่ (Hanhineva and Kärenlampi, 2007) การหาลำดับเบสส่วนปลายของ yeast artificial chromosome (YAC) (Liu and Whittier, 1995) การหาลำดับเบสบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *Pal* และ *Pgi* จาก yams (*Dioscorea*) (Terauchi, 2000) และการหาลำดับเบสที่บริเวณ 5'-flanking ของยีน human natriuretic peptide receptor type A (*NPRA*) และยีน human natriuretic peptide receptor type B (*NPRB*) (Nakayama *et al.*, 2001) นอกจากนี้การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค TAIL-PCR ยังเหมาะสำหรับสิ่งมีชีวิตที่มีข้อมูลจีโนมเพียงเล็กน้อย เช่น Hongkong Kumquat (*Fortunella hindsii*) (Meng *et al.*, 2005)

จากเอกสารต่าง ๆ ที่ศึกษาเกี่ยวกับยีน *CHS* และ *CHS-like* แสดงถึงความหลากหลายของยีนนี้ โดยการทำงานของเอนไซม์ที่สร้างขึ้นจะใช้โมเลกุลตั้งต้นที่ต่างกัน และผลผลิตที่ได้แม้จะมีโครงสร้างหลายแบบแต่ยังคงพบหมู่คีโตน ไฮดรอกซิล หรือคาร์บอนที่มีพันธะคู่อยู่ในโมเลกุล นับเป็นลักษณะเฉพาะของสารโพลีคีไทด์ สารเคอร์คูมินอยด์เกิดจากปฏิกิริยาการรวมกันของซินนามต

(cinnamate unit) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นวงแหวนอะโรมาติก 1 โมเลกุลกับมาโลเนต (malonate unit) 5 โมเลกุล แล้วมีการสร้างวงแหวนอะโรมาติกอีก 1 วงขึ้นภายหลัง (Keserü and Nógrádi, 1995) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นกลุ่มเดียวกับสารตั้งต้นของโพลีคีไทด์และโครงสร้างของสารเคอร์คูมินอยด์ประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติก มีทั้งหมู่คีโตน ไฮดรอกซิล และคาร์บอนที่เป็นพันธะคู่ คล้ายคลึงกับสารกลุ่มโพลีคีไทด์ รวมถึงคุณสมบัติที่เหมือนกันของผลผลิตที่เกิดขึ้นจากการทำงานของยีนนี้ คือ มีคุณสมบัติต้านเชื้อรา (antifungi) ต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacteria) ต้านมะเร็ง (anticancer) (Hopwood and Sherman, 1990; Shen and Hutchinson, 1993) เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าการทำงานของเอนไซม์ CHS-like น่าจะเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารในกลุ่ม diarylheptanoids เช่น เคอร์คูมิน และ polycyclic phenylphenalenones (Brand *et al.*, 2006) ดังนั้นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เคอร์คูมินอยด์จึงน่าจะเป็นยีนในกลุ่มนี้ จากการตรวจเอกสารต่าง ๆ ยังไม่พบการศึกษา ยีนนี้มาก่อน มีการศึกษากระบวนการสังเคราะห์สารทางเคมี การแยกสารบริสุทธิ์ และการนำสารเคอร์คูมินอยด์มาใช้ในการรักษาโรคต่าง ๆ เท่านั้น ดังนั้นถ้าสามารถโคลนยีนและศึกษาการทำงานของยีนที่สังเคราะห์สารเคอร์คูมินอยด์ได้จะเป็นประโยชน์อย่างมาก และเป็นการทดลองที่ยังไม่มีใครทำมาก่อน อาจนำไปสู่การจดสิทธิบัตรยีน หรือใช้ประโยชน์ด้านอื่นต่อไป เช่น อุตสาหกรรมการแพทย์ การพาณิชย์ เป็นต้น

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

ตัวอย่างขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) พันธุ์แดงสยาม ซึ่งเป็นกลุ่มของขมิ้นชันที่มีการวิเคราะห์ว่า มีปริมาณสารเคอร์คูมินอยด์สูง ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร กิรตินิจกาล ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

การสกัดดีเอ็นเอจากใบขมิ้นชัน

นำใบขมิ้นชันมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีประยุกต์จาก Agrawal *et al.* (1992) โดยชั่งใบขมิ้นชันประมาณ 1 กรัม นำมาบดในไนโตรเจนเหลว แล้วบ่มใน extraction buffer [(2%CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide), 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) pH 8.0, 100 mM Tris-HCl pH 8.0)] 0.7 มิลลิลิตร และ 2-mercaptoethanol 1.5 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที เติมคลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (chloroform : isoamylalcohol = 24:1) 0.7 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,700 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แยกสารละลายส่วนบนมาเติม linear polyacrylamide 10 ไมโครลิตร และไอโซโพรพานอล 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,700 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ล้างตะกอนด้วย washing buffer (10 mM sodium acetate pH 5.2, 70% ethanol) 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,700 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ละลายตะกอนด้วย RNase buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 15 mM NaCl) 200 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์ RNase A (10 mg/ml) 4 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที สกัดแยกเอนไซม์ RNase A และโปรตีนที่เหลืออยู่ออกโดยเติมฟีนอล : คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (phenol : chloroform : isoamylalcohol = 25:24:1) 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,700 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แยกสารละลายส่วนบนมาเติม คลอโรฟอร์ม : ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,700 g นาน 5 นาที แยกสารละลายส่วนบนมาเติม linear

polyacrylamide 5 ไมโครลิตร โซเดียมอะซิเตท ความเข้มข้น 3 โมลาร์ (pH 5.2) 10 ไมโครลิตร และ เอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ 400 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,700 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,700 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ผึ่งตะกอนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนแห้งดี ละลายด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ต่อไป

การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะบริเวณอนุรักษ์ของยีน *CHS-like*

สืบค้นข้อมูลของยีนในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) โดยเลือกส่วนที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ของยีน *CHS-like* ของพืช 8 ชนิด นำมาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยทำ multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW (www.ebi.ac.uk/clustalw/) จากนั้นสังเคราะห์ไพรเมอร์จากตำแหน่งที่เหมาะสม ตรวจสอบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม Fast PCR และโปรแกรม Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณอนุรักษ์ของยีน *CHS-like* ด้วยปฏิกิริยาอุณหภูมิสูง

เพิ่มปริมาณส่วนอนุรักษ์ของยีน *CHS-like* ด้วยปฏิกิริยาอุณหภูมิสูง โดยองค์ประกอบในปฏิกิริยาได้แก่ ดีเอ็นเอเริ่มต้น (50 ng/μl) 1 ไมโครลิตร, 5 pmol/μl ไพรเมอร์ CLF1 (5'GCCACCAT(T/C)CTNGCCAT(T/C)GG3') และ ไพรเมอร์ CLR1 (5'GT(G/C)AGACCNNGTCCC(G/A)AANCC3') อย่างละ 1 ไมโครลิตร, 2mM dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 2 ไมโครลิตร, 10X PCR buffer 2 ไมโครลิตร, 50 mM MgCl₂ 0.8 ไมโครลิตร, 5U/μl *Taq* DNA polymerase (invitrogen, USA) 0.1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 11.9 ไมโครลิตร ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาโดยใช้โปรแกรม

94 องศาเซลเซียส 3 นาที 1 รอบ

94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 52 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที 35 รอบ

72 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ

จากนั้นนำผลผลิตที่ได้มาเจือจาง 20 เท่าเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณซ้ำเป็นครั้งที่ 2 โดยองค์ประกอบในปฏิกิริยาได้แก่ ผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณครั้งแรกเจือจาง 20 เท่า 1 ไมโครลิตร, 5 pmol/μl ไพรเมอร์ CL2F (5'CTT(T/C)CGNGTCACCAANAGCGA3') และ ไพรเมอร์ CL3R (5'CCAGAA(A/T)AN(T/G)GAGTTCCAATC3') อย่างละ 1 ไมโครลิตร, 2mM dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 2 ไมโครลิตร, 10X PCR buffer 2 ไมโครลิตร, 50mM MgCl₂ 0.8 ไมโครลิตร, 5U/μl *Taq* DNA polymerase (invitrogen, USA) 0.1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 11.9 ไมโครลิตร ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาโดยใช้โปรแกรม

94 องศาเซลเซียส 3 นาที 1 รอบ

94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 55 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที 35 รอบ

72 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ

ตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอธิเดียม-โบรไมด์ และตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator

การเชื่อมต่อนชิ้นส่วนดีเอ็นเอเข้ากับเวกเตอร์เพิ่มจำนวน และการถ่ายฝากเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli*

เชื่อมต่อสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเข้ากับพลาสมิด pGEM®-T Easy Vector (Promega) โดยองค์ประกอบของปฏิกิริยาได้แก่ 2X rapid ligation buffer 5 ไมโครลิตร, pGEM®-T Easy Vector 0.5 ไมโครลิตร, สารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลีเมอเรส 3.5 ไมโครลิตร และ T4 DNA ligase 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

การถ่ายพลาสมิดเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ XL1blue โดย นำคอมพิเทนที่เซลล์แห้ง (ปริมาตร 100 ไมโครลิตร) ออกมาละลายในน้ำแข็ง เติมสารละลายดีเอ็นเอที่ต่อเข้ากับพลาสมิด 5 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ในน้ำแข็งนาน 30 นาที นำไปทำ heat shock โดยนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที นำมาแช่น้ำแข็งทันที เติมอาหารเหลว SOC 800 ไมโครลิตร นำไปแช่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 250 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4500 g นาน 5 นาที ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อออก 800 ไมโครลิตร ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากับตะกอนเชื้อ spread ลงบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ spread ด้วย 100 mM IPTG 40 ไมโครลิตร และ 20 mg/ml X-gal 40 ไมโครลิตร ไว้แล้ว จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

การคัดเลือกโคลนที่ต้องการด้วยปฏิกิริยาถูกโซโฟลิเมอเรส

ใช้ไม้ม้วนพันเชื้อโคโลนีแบคทีเรียสีขาวจุ่มในหลอด 1.5 มิลลิลิตรซึ่งมีน้ำกลั่น 40 ไมโครลิตร เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาถูกโซโฟลิเมอเรส โดยองค์ประกอบปฏิกิริยาได้แก่ ดีเอ็นเอต้นแบบ 2.75 ไมโครลิตร, 5pmol/μl ไพรมอร์ M13-F และ M13-R อย่างละ 0.75 ไมโครลิตร, 2mM dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 1.5 ไมโครลิตร, 10X buffer 1.5 ไมโครลิตร, 50mM MgCl₂ 0.6 ไมโครลิตร, 5U/μl *Taq* DNA polymerase (invitrogen, USA) 0.08 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 7.07 ไมโครลิตร ปริมาตรรวม 15 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาโดยใช้โปรแกรม

94 องศาเซลเซียส 3 นาที 1 รอบ

94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที 30 รอบ

72 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ

ตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator

การสกัดพลาสมิดสายผสมจากโคลนแบคทีเรีย *E. coli* และการหาลำดับเบส

ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแบคทีเรีย *E. coli* ที่มีพลาสมิดสายผสม 400 ไมโครลิตร มาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ข้ามคืน แล้วนำมาสกัดพลาสมิดด้วยชุด NucleoSpin®Plasmid โดยนำเชื้อไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเชื้อที่ความเร็ว 1500 g นาน 8 นาที เทอาหารทิ้ง ละลายตะกอนด้วย A1 buffer 250 ไมโครลิตร เติมน้ำ A2 buffer 250 ไมโครลิตร ผสมโดยการกลับหลอดไปมา เติมน้ำ A3 buffer 300 ไมโครลิตร ผสมโดยการกลับหลอดไปมา นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,700 g นาน 10 นาที แยกสารละลายใสส่วนบนลงใน NucleoSpin®Plasmid column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,700 g นาน 1 นาที เทสารละลายที่ออกมาทิ้ง เติมน้ำ A4 buffer 600 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,700 g นาน 1 นาที เทสารละลายที่ออกมาทิ้ง นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 12,700 g นาน 1 นาที เทสารละลายที่

ออกมาทิ้ง ข้ายคอล์มน์ลงในหลอดใหม่ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม AE buffer 50 ไมโครลิตรทิ้งไว้ 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,700 g นาน 1 นาที ตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator จากนั้นนำพลาสมิดที่ได้ส่งหาลำดับเบสต่อไป

Southern blot hybridization

1. การเตรียมดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอปริมาณ 10 ไมโครกรัม ไปตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 5 ชนิด คือ *AseI*, *BamHI*, *EcoRI*, *HindIII* และ *SacI* บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator จากนั้นตัดตะกอนสารละลายดีเอ็นเอโดยการเติม โซเดียมอะซิเตท ความเข้มข้น 3 โมลาร์ (pH 5.2) 10 ไมโครลิตร และ เอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ 250 ไมโครลิตรลงในสารละลายดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะสมบูรณ์ บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,700 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,700 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ผึ่งตะกอนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนแห้งดี ละลายด้วย TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.0 mM EDTA pH 8.0) 10 ไมโครลิตร และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ต่อไป

2. การเตรียมโพรบ

2.1 เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนอนุรักษ์ของยีน *CHS-like*

เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนอนุรักษ์ของยีน *CHS-like* ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยใช้ไพรเมอร์ CL2F และ CL3R ตามวิธีเดียวกับที่อธิบายแล้ว

2.2 การคัดลอกโพรบ

นำชิ้นส่วนอนุรักษ์ของยีน *CHS-like* ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด QIAquick PCR Purification Kit เติม PB buffer ปริมาตร 5 เท่า

ของปริมาตรสารละลายดีเอ็นเอผสมให้เข้ากัน ใส่สารละลายผสมลงใน QIAquick column ปั่นเหวี่ยง ที่ 11,700 g นาน 1 นาที เทสารละลายที่ออกมาทิ้ง เติม PE buffer 750 ไมโครลิตรลงในคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,700 g นาน 1 นาที เทสารละลายที่ออกมาทิ้ง นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 11,700 g นาน 1 นาที เทสารละลายที่ออกมาทิ้ง ย้ายคอลัมน์ลงในหลอดใหม่ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม EB buffer 38 ไมโครลิตรทิ้งไว้ 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,700 g นาน 1 นาที ตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator จากนั้นตัดคลากโพรบที่ได้ด้วยชุด Gene Image Random-Prime DNA Labelling Kit (Amersham Bioscience, UK) นำสารละลายดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว 34 ไมโครลิตรเติมน้ำเดือด นาน 5 นาที แล้วแช่น้ำแข็งทันที เติมนucleotide mix 10 ไมโครลิตร, random primer 5 ไมโครลิตร และ เอนไซม์ Klenow 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที จากนั้นนำไปใช้ทันที

3. การย้ายดีเอ็นเอจากเจลมาสู่แผ่นเมมเบรน

นำสารละลายดีเอ็นเอที่ตกตะกอนไว้แล้วมาแยกขนาดด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator ถ่ายภาพที่ได้โดยวางไม้บรรทัดเพื่อการดูขนาดต่อไป นำแผ่นเจลมาแช่ใน 0.25 N HCl นาน 10 นาที จนบรอมฟีนอลบลูเปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีเหลือง ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพโดยแช่เจลในสารละลายล้าง (0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl) เขย่าเบา ๆ นาน 30 นาที ทำให้กลับมามีสภาพเป็นกลางโดยแช่เจลในสารละลายบัฟเฟอร์ (0.5 M Tris-HCl pH 8.0, 1.5 M NaCl) เขย่าเบา ๆ นาน 30 นาที ทำการย้ายดีเอ็นเอมาบนแผ่นเมมเบรนด้วยวิธี capillary transfer โดยใช้สารละลาย 20X SSC (3M NaCl, 0.3M sodium citrate, pH7) ข้ามคั่น ห่อเมมเบรนด้วยพลาสติกใส วางคว่ำบน UV transilluminator นาน 5 นาที เพื่อตรึงดีเอ็นเอให้ติดแน่นบนเมมเบรน นำไปใช้ทันที หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. การไฮบริไดเซชัน

นำแผ่นเมมเบรนที่มีดีเอ็นเอตรึงอยู่มาแช่ในถุงที่มี hybridization buffer (5X SSC, 0.1% SDS, 5% dextran sulphate, 5% liquid block) บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำโพรบที่ตัดคลากแล้วมาทำให้เสียสภาพโดยต้มในน้ำที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วแช่น้ำแข็งทันที เติมโพรบลงในถุงไฮบริไดเซชัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เขย่าข้ามคืน

5. การตรวจสอบผลการไฮบริไดเซชัน

ล้างเมมเบรนที่ทำการไฮบริไดเซชันในสารละลายผสม (1X SSC, 0.1 % SDS) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ล้างเมมเบรนอีกครั้งด้วยสารละลายผสม (0.5X SSC, 0.1% SDS) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จุ่มเมมเบรนใน buffer A (0.1 M TrisHCl, 0.3M NaCl pH 9.5) จากนั้นปั๊มเมมเบรนใน blocking agent (10% liquid block) นาน 60 นาที นำเมมเบรนมาปั๊มต่อใน antibody (1/5,000 เท่าใน 0.5% BSA ใน buffer A) นาน 60 นาที ล้างเมมเบรนใน buffer A ที่มี 0.3% Tween ทั้งหมด 3 รอบ รอบละ 10 นาที ตรวจสอบผลด้วยชุด Gene Image CDP-Star Detection Kit (Amersham Bioscience, UK) โดยนำเมมเบรนมาวางบน wrap ใส่อารตังค์ 1-2 มิลลิลิตร ประกบฟิล์มลงบนเมมเบรน ตรวจสอบผลที่ได้ในห้องมืด

การสกัดแยกอาร์เอ็นเอ

นำใบและแง่ม้วนชิ้นมาสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธีของ Yu and Goh (2000) โดยนำตัวอย่างที่แช่แข็งมา 0.5 กรัม ใส่ลงในโกร่งที่เย็นจัด เติมนิโตรเจนเหลว แล้วบดให้ละเอียด เติมน้ำ Hao buffer ลงไป 3 มิลลิลิตร คูดสารละลายใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,324 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แยกสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ เติมน้ำคลอโรฟอร์ม:ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) ปริมาตรเท่ากับสารละลาย แล้วเขย่าเพื่อผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,324 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แยกสารละลายส่วนใสด้านบนใส่หลอดใหม่ สกัดด้วย คลอโรฟอร์ม:ไอโซเอมิลแอลกอฮอล์ (24:1) ตามขั้นตอนเดิมอีก 2 ครั้ง นำสารละลายที่ได้มาเติม 10M LiCl ปริมาตร 1/3 เท่าของสารละลาย ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมโดยการกลับลอดไปมา นำไปปั่นที่ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เพื่อตกตะกอนอาร์เอ็นเอ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,324 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เทสารละลายทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 2.5M LiCl 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,324 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที เทสารละลายทิ้ง ล้างตะกอนด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำ DEPC (Diethyl pyrocarbonate treated H₂O) 800 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,324 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที คูดสารละลายทิ้ง เปิดฝาทิ้งไว้ให้ตะกอนแห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำ DEPC 30 ไมโครลิตร ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD260, OD260/OD280 และ OD260/OD230 และวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ และตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator เพื่อตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอ

การกำจัดดีเอ็นเอออกจากอาร์เอ็นเอ

นำสารละลายอาร์เอ็นเอ 1 μg มากำจัดดีเอ็นเอออกด้วยชุด Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (Gibco BRL) โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย 10X DNaseI reaction buffer 1 ไมโครลิตร, เอนไซม์ DNaseI (1U/ μl) 1 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นให้ครบ 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นเติม 20mM EDTA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำสารละลายอาร์เอ็นเอไปทำปฏิกิริยารีเวอร์ส ทรานสคริปชันต่อไป

การทำปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชันและปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสของอาร์เอ็นเอ

นำอาร์เอ็นเอที่กำจัดดีเอ็นเอเรียบร้อยแล้วมาเปลี่ยนเป็น cDNA โดยชุดทำรีเวอร์สทรานสคริปชัน SuperScriptTM III Reverse Transcriptase (Invitrogen) โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย อาร์เอ็นเอ 1 μg , 10 pmol/ μl ไพริเมอร์ oligo(dT)₁₅ 0.5 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP mix 1 ไมโครลิตร และเติมน้ำ DEPC ให้ปริมาตรครบ 13 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วนำไปแช่น้ำแข็งทันที นาน 1 นาที เติม 5X first-strand buffer 4 ไมโครลิตร, DTT 1 ไมโครลิตร, RNaseOUTTM 1 ไมโครลิตร และ SuperScriptTM III RT 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เพื่อทำปฏิกิริยารีเวอร์สทรานสคริปชัน จากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 15 นาทีเพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ สารละลายที่ได้นำมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส เพิ่มปริมาณของ cDNA เป้าหมายด้วย ปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลีเมอเรส ซึ่งมีองค์ประกอบของปฏิกิริยาได้แก่ ดีเอ็นเอต้นแบบ (cDNA) 1 ไมโครลิตร, 5 pmol/ μl , ไพริเมอร์ CLF-RNA (5'GCGTCATGATCGACTCAGTGC3') และ ไพริเมอร์ CLR-RNA (5'GTGTCCAGCGAGATTCCCTCC3') อย่างละ 1 ไมโครลิตร, 2mM dNTP mix 1.5 ไมโครลิตร, 10X buffer 1.5 ไมโครลิตร, 50 mM MgCl₂ 0.6 ไมโครลิตร, 1U/ μl Taq DNA polymerase (invitrogen, USA) 1 ไมโครลิตร, และน้ำกลั่น 8.3 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาด้วยโปรแกรม

94 องศาเซลเซียส 3 นาที 1 รอบ

94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 66 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที 25 รอบ

72 องศาเซลเซียส 10 นาที 1 รอบ

ตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิสในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอธิเดียม-โบรไมด์ และตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator

การโคลนปลาย 5' และ 3' ของยีนโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบ thermal asymmetric interlaced (TAIL-PCR)

เพิ่มปริมาณส่วนด้าน 5' ของยีนด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยองค์ประกอบในปฏิกิริยา ได้แก่ ดีเอ็นเอขมึ้นชั้น (50 ng/μl) 1 ไมโครลิตร, 3 pmol/μl ไพรมเมอร์ 5pCHS1 (5'GGGTATTGCTCCAGCAGCTC3') 1 ไมโครลิตร และ 22.5 pmol/μl ไพรมเมอร์ AD2 (5'NGTCGA(G/C)(A/T)GANA(A/T)GAA3') 2 ไมโครลิตร, 2mM dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 1.5 ไมโครลิตร, 10X PCR buffer 1.5 ไมโครลิตร, 50mM MgCl₂ 0.6 ไมโครลิตร, 5U/μl *Taq* DNA polymerase (invitrogen, USA) 0.1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 7.3 ไมโครลิตร ปริมาตรรวม 15 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาโดยใช้โปรแกรม

94 องศาเซลเซียส 3 นาที 1 รอบ

94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 65 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 2.5 นาที 5 รอบ

94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 65 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 2.5 นาที, 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 65 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 2.5 นาที, 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 44 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 2.5 นาที 15 รอบ

72 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ

จากนั้นนำผลผลิตที่ได้มาเจือจาง 50 เท่าเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณซ้ำเป็นครั้งที่ 2 โดยองค์ประกอบในปฏิกิริยา ได้แก่ ดีเอ็นเอขมึ้นชั้นเจือจาง 50 เท่า 1 ไมโครลิตร, 3 pmol/μl ไพรมเมอร์ 5pCHS2 (5'GCGAGTCTTCACAGTCGATC3') 1.33 ไมโครลิตร และ 22.5 pmol/μl ไพรมเมอร์ AD2 1.78 ไมโครลิตร, 2mM dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 2 ไมโครลิตร, 10X PCR buffer 2 ไมโครลิตร, 50mM MgCl₂ 0.8 ไมโครลิตร, 5U/μl *Taq* DNA polymerase (invitrogen, USA) 0.1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 10.99 ไมโครลิตร ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาโดยใช้โปรแกรม

94 องศาเซลเซียส 3 นาที 1 รอบ

94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 63 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 2.5 นาที 5 รอบ

94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 63 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 2.5 นาที, 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 63 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 2.5 นาที, 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 44 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 2.5 นาที 15 รอบ

72 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ

จากนั้นนำผลผลิตที่ได้มาเจือจาง 100 เท่าเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณซ้ำเป็นครั้งที่ 3 ใช้ไพรเมอร์ 5pCHS3 (5'AGAGGTTGCAAGTGTTCGCT3') คู่กับไพรเมอร์ AD2 โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยาเหมือนกับการเพิ่มปริมาณในครั้งที่ 2 โดยใช้โปรแกรม

94 องศาเซลเซียส 3 นาที 1 รอบ

94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 58 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 2.5 นาที 5 รอบ

94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 58 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 2.5 นาที, 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 58 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 2.5 นาที, 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 44 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 2.5 นาที 15 รอบ

72 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ

ตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอธิเดียม-โบรไมด์ และตรวจสอบด้วยเครื่อง UV transilluminator

เพิ่มปริมาณส่วนด้าน 3' ของยีนด้วยปฏิกิริยาถูกโซ่โพลีเมอเรสแบบเดียวกับการเพิ่มปริมาณส่วนปลาย 5' ของยีนโดยใช้ไพรเมอร์ 3pCHS1 (5'GAGAGCGAGGGGAAGATACTG3') คู่กับไพรเมอร์ AD2 ทำปฏิกิริยาโดยใช้โปรแกรม

94 องศาเซลเซียส 3 นาที 1 รอบ

94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 65 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 2.5 นาที 5 รอบ

94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 65 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 2.5 นาที, 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 65 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 2.5 นาที, 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 44 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 2.5 นาที 15 รอบ

72 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ

จากนั้นนำผลผลิตที่ได้มาเจือจาง 50 เท่าแล้วเพิ่มปริมาณโดยใช้ไพรเมอร์ 3pCHS2 (5'GAGAACGGTCTGCGCGTCCAC3') คู่กับไพรเมอร์ AD2 โดยเปลี่ยนอุณหภูมิ annealing เป็น 67 องศาเซลเซียส และนำผลผลิตที่ได้มาเจือจาง 100 เท่าเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มปริมาณซ้ำเป็นครั้งที่ 3 ใช้ไพรเมอร์ 3pCHS3 (5'GCTTAGTGCACGCTCTGAAG3') คู่กับไพรเมอร์ AD2 โดยเปลี่ยนอุณหภูมิ annealing เป็น 63 องศาเซลเซียส

นำผลผลิตจากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค TAIL-PCR จากส่วนปลาย 5' และ 3' ของยีนที่ได้ไปโคลน และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

การโคลนยีน *CHS-like* ที่สมบูรณโดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส

ออกแบบไพรเมอร์จากตัวแทนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากส่วนปลาย 5' ได้ไพรเมอร์เส้น forward ทั้งหมด 3 เส้น และส่วนปลาย 3' ได้ไพรเมอร์เส้น reverse ทั้งหมด 4 เส้น (ชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงในตารางที่ 3) เพิ่มปริมาณยีน *CHS-like* ที่สมบูรณด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส โดยองค์ประกอบในปฏิกิริยาได้แก่ ดีเอ็นเอขม้นชั้น (50 ng/μl) 1 ไมโครลิตร, 5 pmol/μl ไพรเมอร์ forward และ ไพรเมอร์ reverse อย่างละ 1 ไมโครลิตร, 2mM dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 2 ไมโครลิตร, 10X PCR buffer 2 ไมโครลิตร, 50mM MgCl₂ 0.8 ไมโครลิตร, 5U/μl *Taq* DNA polymerase (invitrogen, USA) 0.1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 11.9 ไมโครลิตร ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาโดยใช้โปรแกรม

94 องศาเซลเซียส 3 นาที 1 รอบ

94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, อุณหภูมิขึ้นกับคู่ไพรเมอร์ 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที 35 รอบ

72 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ

ตรวจสอบผลด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ โคลนผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ หาลำดับนิวคลีโอไทด์ และวิเคราะห์ผลที่ได้

การวิเคราะห์ปริมาณสารเคอร์คูมินอยด์

นำตัวอย่างแห้งขมิ้นชันขนาดน้อยกว่า 1 เซนติเมตร, 1-2 เซนติเมตร, 2-3 เซนติเมตร, 3-4 เซนติเมตร, มากกว่า 4 เซนติเมตร และตัวอย่างใบขมิ้นชัน มาสกัดแยกสารเคอร์คูมินอยด์ วัดปริมาณสารที่ได้ด้วยวิธี HPLC (High Performance Liquid Chromatography) (นันทวรรณ, 2549)

ผลและวิจารณ์

การโคลนชิ้นส่วนของยีน *CHS-like* จากขมิ้นชัน

เนื่องจากการโคลนยีน *CHS-like* ของขมิ้นชัน ยังไม่มีใครทำมาก่อน จึงเริ่มจากการออกแบบไพรเมอร์โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHS-like* ในพืชชนิดต่าง ๆ ที่มีในฐานข้อมูล NCBI โดยชนิดของพืชและ accession number ของยีนที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ คือ 2PS จาก *Gerbera hybrida* (Z38097), VPS จาก *Humulus lupulus* (AB015430), BBS จาก *Phalaenopsis* sp. (X79904), *CHS-like* จาก *Pinus strobes* (AJ002156), *ALS* และ *bas* จาก *Rheum palmatum* (AY517486, AF326911), *ACS* จาก *Ruta graveolens* (AJ297788), และ *STS* จาก *Vitis vinifera* (X76892) เมื่อนำมาทำ multiple alignment เพื่อหาส่วนอนุรักษ์สามารถออกแบบไพรเมอร์ forward 2 เส้น ได้แก่ CLF1 และ CLF2 ไพรเมอร์ reverse 3 เส้น ได้แก่ CLR1, CLR2 และ CLR3 โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบมีตำแหน่งต่างกันดังภาพที่ 1 พร้อมแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ในตารางที่ 1

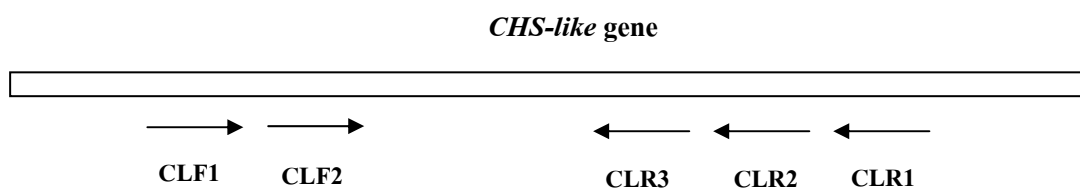
จากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ CLF1 และ CLR1 ได้แถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะจำนวนมาก จึงสลับคู่ไพรเมอร์แบบต่าง ๆ จนครบทุกแบบ แต่ยังไม่ได้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะ แสดงว่า ไพรเมอร์แต่ละชนิดมีตำแหน่งจับได้หลายตำแหน่ง หรือสถานะที่ใช้ไม่เหมาะสม จึงเปลี่ยนมาใช้วิธี nested PCR คือเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอครั้งแรกด้วยคู่ไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งอยู่ด้านนอก แล้วนำผลผลิตที่ได้มาเพิ่มปริมาณซ้ำเป็นครั้งที่ 2 โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งถัดเข้ามาอยู่ภายในผลผลิตครั้งที่ 1 หรือทำ semi-nested PCR คือการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอครั้งที่ 2 โดยใช้ไพรเมอร์ชนิดหนึ่งคงเดิม ส่วนไพรเมอร์อีกชนิดหนึ่งมีตำแหน่งอยู่ถัดเข้ามาภายในผลผลิตครั้งที่ 1 พบว่าได้แถบดีเอ็นเอที่จำเพาะจากการทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ CLF1 และ CLR1 แล้วนำผลผลิตพีซีอาร์มาเจือจาง 20 เท่า ทำพีซีอาร์ครั้งที่ 2 โดยใช้ไพรเมอร์ CLF2 และ CLR3 ซึ่งมีตำแหน่งจับอยู่ภายในชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณในครั้งแรก ผลที่ได้คือ ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 850 คู่เบส (ภาพที่ 2) ซึ่งคาดว่าเป็นส่วนของยีน *CHS-like* เมื่อนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ไปโคลนใน พลาสมิด pGEM-Teasy ได้โคลนทั้งหมด 18 โคลน

เนื่องจากยีนกลุ่มนี้เป็น multigene family และส่วนของดีเอ็นเอที่โคลนได้มาจากการออกแบบไพรเมอร์ บริเวณที่มีลำดับเบสแบบอนุรักษ์ (conserved sequence) โคลนที่ได้มาจากหลายยีนในกลุ่มนี้ จึงนำโคลนทั้ง 18 โคลน มาตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ ด้วยการเพิ่มปริมาณชิ้น

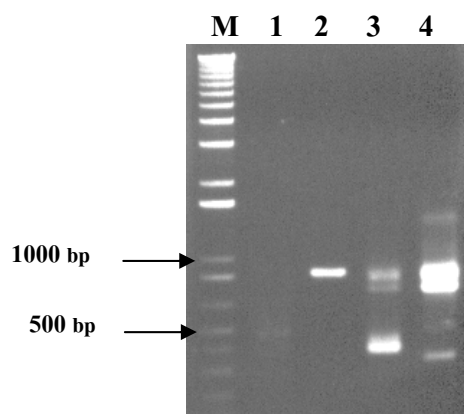
ดีเอ็นเอจากพลาสมิด แล้วตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เพื่อตรวจหาจำนวนยีนเบื้องต้น โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 7 ชนิด ได้แก่ *AluI*, *HinII*, *MboI*, *RsaI*, *HaeIII*, *HhaI* และ *TaqI* ผลการตัดชิ้นดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *HaeIII*, *HhaI*, *TaqI* ไม่สามารถแยกความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอทั้ง 18 โคลนได้ (ภาพที่ 3) แต่เอนไซม์ *AluI*, *HinII*, *MboI*, *RsaI* สามารถแยกความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอได้ 2, 2, 3, 2 แบบตามลำดับ (ภาพที่ 4) เมื่อพิจารณารูปแบบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะของชิ้นดีเอ็นเอทั้ง 18 โคลน พบรูปแบบแตกต่างกันทั้งหมด 6 แบบ (ตารางที่ 2) จึงสกัดพลาสมิด นำมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นตัวแทนในแต่ละแบบ

ตารางที่ 1 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณส่วนของยีน *CHS-like* ในขมิ้นชัน

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ค่า Tm (°C)
CLF1	5'-GCCACCAT(T/C)CTNGCCAT(T/C)GG-3'	60-67
CLF2	5'-CTT(T/C)CGNGTCACCAANAGCGA-3'	60-65
CLR1	5'-GT(G/C)AGACCNGGTCCC(G/A)AANCC-3'	63-69
CLR2	5'-TCNAGAATGGC(A/T)(G/C)GNCCACC-3'	60-65
CLR3	5'-CCAGAA(A/T)AN(T/G)GAGTTCCAATC-3'	55-60



ภาพที่ 1 ภาพวาดแสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน *CHS-like* ในขมิ้นชัน



ภาพที่ 2 แสดงผลที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขั้นบันได โดยวิธี nested และ semi-nested PCR

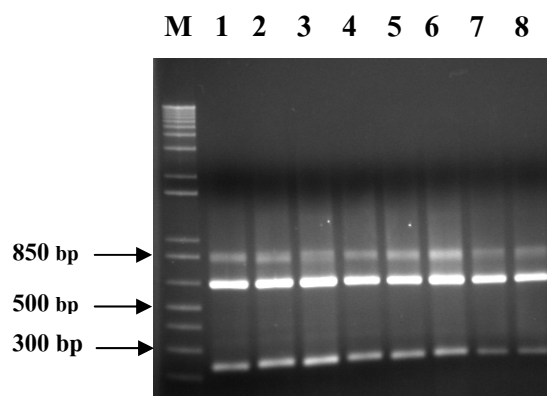
แถวที่ 1 ใช้ไพรเมอร์ CLF1 และ CLR1 แล้วเพิ่มปริมาณซ้ำด้วยไพรเมอร์ CLF2 และ CLR2

แถวที่ 2 ใช้ไพรเมอร์ CLF1 และ CLR1 แล้วเพิ่มปริมาณซ้ำด้วยไพรเมอร์ CLF2 และ CLR3

แถวที่ 3 ใช้ไพรเมอร์ CLF2 และ CLR1 แล้วเพิ่มปริมาณซ้ำด้วยไพรเมอร์ CLF2 และ CLR2

แถวที่ 4 ใช้ไพรเมอร์ CLF2 และ CLR1 แล้วเพิ่มปริมาณซ้ำด้วยไพรเมอร์ CLF2 และ CLR3

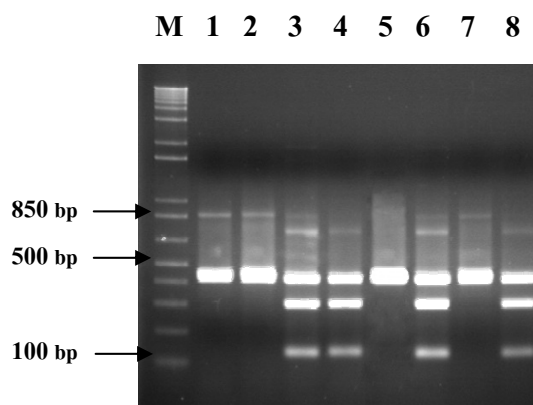
และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb ladder



ภาพที่ 3 แสดงผลที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากโคลนต่าง ๆ โดยใช้ไพรเมอร์ CLF2 และ

CLR3 แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III หมายเลข 1-8 คือ โคลนที่ 1-8 และ M คือ

ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb ladder



ภาพที่ 4 แสดงผลที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากโคลนต่าง ๆ โดยใช้ไพรเมอร์ CLF2 และ CLR3 แล้วตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI* หมายเลข 1-8 คือ โคลนที่ 1-8 โดยโคลนที่ 1, 2, 5, 7 มีรูปแบบการตัดเป็นแบบที่ 1 โคลนที่ 3, 4, 6, 8 มีรูปแบบการตัดเป็นแบบที่ 2 และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb ladder

ตารางที่ 2 แสดงรูปแบบการตัดดีเอ็นเอจากโคลนทั้ง 6 แบบด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 7 ชนิด

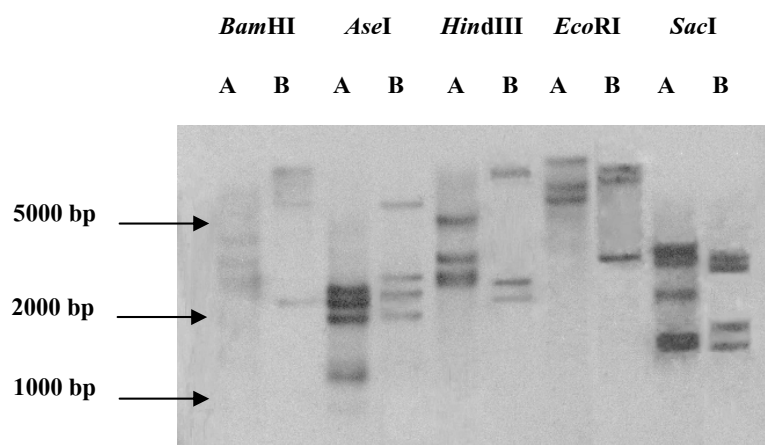
เอนไซม์ตัด จำเพาะ รูปแบบ	<i>AluI</i>	<i>HinfI</i>	<i>MboI</i>	<i>RsaI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HhaI</i>	<i>TaqI</i>
1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	2	1	1	1	1
3	2	1	2	2	1	1	1
4	1	1	2	2	1	1	1
5	1	2	2	2	1	1	1
6	2	1	3	2	1	1	1

เมื่อได้โคลนที่เป็นตัวแทนในแต่ละแบบแล้ว จึงนำมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล พบว่า ตรงกับส่วนของยีน *CHS-like* ของพืชชนิดอื่นที่มีรายงานแล้ว เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับยีน *CHS* ของแป๊ะก๊วย (Pang *et al.*, 2005) และ *CHS-like* ของพืชอื่น (Abe *et al.*, 2004) พบว่ามีอินทรอน 1 ตำแหน่ง ขนาดค่อนข้างสั้น (ประมาณ 90 คู่เบส) เมื่อเทียบกับอินทรอนของยีนในกลุ่มเดียวกันนี้ (Pang *et al.*, 2005) นำลำดับนิวคลีโอไทด์มาแปลเป็นกรดอะมิโน เปรียบเทียบกับกรดอะมิโนของ

ยีนกลุ่มนี้ในฐานข้อมูล พบบริเวณ active site, CoA binding site และส่วนอนุรักษ์ของ CHS superfamily enzymes (Abe *et al.*, 2004) แสดงว่าทั้ง 6 โคลนที่ได้เป็นส่วนของยีน *CHS-like* และลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละโคลนต่างกันเล็กน้อยซึ่งจะต้องนำไปศึกษาต่อไป

การหาจำนวนชุดของยีนในจีโนม

เนื่องจากยีน *CHS-like* เป็น multigene family จึงหาจำนวนชุดของยีนด้วยวิธี Southern blot hybridization (Helariutta *et al.*, 1995; Harashima *et al.*, 2004) เนื่องจากในขมิ้นขาวไม่มีสารเคอร์คูมินอยด์ ซึ่งเป็นสารสีเหลืองในขมิ้นชัน ความแตกต่างของจำนวนชุดของยีน *CHS-like* ระหว่างขมิ้นชันและขมิ้นขาวอาจจะให้ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารนี้ จึงเปรียบเทียบจำนวนชุดของยีน *CHS-like* ในขมิ้นชันและขมิ้นขาว โดยนำดีเอ็นเอของพืชทั้งสองมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI, *Ase*I, *Hind*III, *Eco*RI และ *Sac*I นำมาทำ Southern blot hybridization โดยใช้โพรบที่ได้จากชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณมาจากส่วนของยีน *CHS-like* ของขมิ้นชัน ผลที่ได้พบว่าทั้งในขมิ้นชันและขมิ้นขาวนั้นต่างก็มียีน *CHS-like* อยู่หลายชุด จำนวนชุดของยีนสำหรับขมิ้นชันมีอย่างน้อย 5 ชุด ส่วนขมิ้นขาวมีอย่างน้อย 4 ชุด (ภาพที่ 5) ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่า เป็น multigene family สอดคล้องกับที่พบในพืชชนิดอื่น (Farzad *et al.*, 2005) ผลการทำ Southern blot hybridization เมื่อเปรียบเทียบกับผลการตรวจสอบโคลนด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและการหาลำดับนิวคลีโอไทด์มีจำนวนชุดของยีนแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย อาจเกิดจากชุดของยีนที่อยู่ติดกันเหมือนยีน *CHS* ใน *Trifolium subterraneum* (Arioli *et al.*, 1993) และไม่มีตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกใช้บริเวณยีนแต่ละชุด ทำให้ได้แถบดีเอ็นเอขนาดใหญ่ซึ่งมาจากยีนมากกว่า 1 ชุด นอกจากนี้ยังพบว่าขนาดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในขมิ้นชันและขมิ้นขาวแตกต่างกันทั้งหมด ไม่มีแถบใดมีขนาดเท่ากัน จึงไม่สามารถสรุปได้ว่ากลุ่มของยีน *CHS-like* ในพืชทั้งสองชนิดมีความสัมพันธ์กันอย่างไร



ภาพที่ 5 แสดงผลที่ได้จากการทำ Southern blot hybridization แถว A คือ ดีเอ็นเอที่ได้จากขมิ้นชัน และ B คือ ดีเอ็นเอที่ได้จากขมิ้นขาว

การโคลนยีน *CHS-like* ที่สมบูรณ์

เนื่องจากส่วนของยีน *CHS-like* ที่โคลนได้มีเฉพาะชิ้นส่วนบริเวณกลางยีนซึ่งยังไม่สมบูรณ์ จึงได้นำเอาเทคนิค thermal asymmetric interlaced PCR (TAIL-PCR) มาใช้เพื่อโคลนยีนให้สมบูรณ์ โดยโคลนส่วนปลาย 5' และ 3' ของยีน *CHS-like* ในขมิ้นชันด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบ arbitrarily primed (AP)-PCR-based method (Weissensteiner *et al.*, 2004) วิธีทำคือ ออกแบบไพรเมอร์จากส่วนอนุรักษ์ของยีน *CHS-like* ในขมิ้นชันสำหรับโคลนส่วนปลาย 5' และ 3' ของยีนทั้งหมด 6 ไพรเมอร์ ได้แก่ 5pCHS1, 5pCHS2, 5pCHS3, 3pCHS1, 3pCHS2 และ 3pCHS3 โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบมีตำแหน่งต่างกันดังภาพที่ 6 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะใช้ไพรเมอร์ทั้ง 6 ไพรเมอร์ร่วมกับ degenerate primer AD1, AD2, AD3 (Liu and Whittier, 1995) และ AD7 (Hanhineva and Kärenlampi, 2007) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ทั้งหมดแสดงในตารางที่ 3

จากผลการทดลองสามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตพีซีอาร์ด้านปลาย 5' ได้โดยใช้ไพรเมอร์ 5pCHS1, 5pCHS2 และ 5pCHS3 คู่กับไพรเมอร์ AD2 ทำการเพิ่มปริมาณผลผลิตพีซีอาร์ทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งที่ 1 ใช้คู่ไพรเมอร์ 5pCHS1 และ AD2 นำผลผลิตที่ได้มาเพิ่มปริมาณซ้ำเป็นครั้งที่ 2 โดยใช้คู่ไพรเมอร์ 5pCHS2 และ AD2 จากนั้นนำผลผลิตที่ได้มาเพิ่มปริมาณซ้ำเป็นครั้งที่ 3 โดยใช้คู่ไพรเมอร์ 5pCHS3 และ AD2 ซึ่งผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 550 คู่เบส สามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตพีซีอาร์ด้านปลาย 3' ได้โดยใช้ไพรเมอร์ 3pCHS1, 3pCHS2 และ 3pCHS3 คู่กับ

ไพรเมอร์ AD2 (หรือ AD3) เพิ่มปริมาณผลผลิตพีซีอาร์ทั้งหมด 3 ครั้งเช่นเดียวกับการเพิ่มปริมาณผลผลิตพีซีอาร์ด้านปลาย 5' ซึ่งผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 800 คู่เบส (ภาพที่ 7) จากนั้นโคลนชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ทั้งหมด 19 โคลน สกัดพลาสมิด ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล พบว่า ตรงกับส่วนของยีน *CHS-like* ของพืชชนิดอื่นที่มีรายงานแล้ว จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาทำ multiple alignment ด้วยโปรแกรม clustal W โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 5' สามารถจัดกลุ่มได้ 3 กลุ่ม และลำดับนิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 3' สามารถจัดกลุ่มได้ 4 กลุ่ม ออกแบบไพรเมอร์จากตัวแทนของลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละกลุ่มเพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน *CHS-like* ที่สมบูรณ์ในขมิ้นชัน

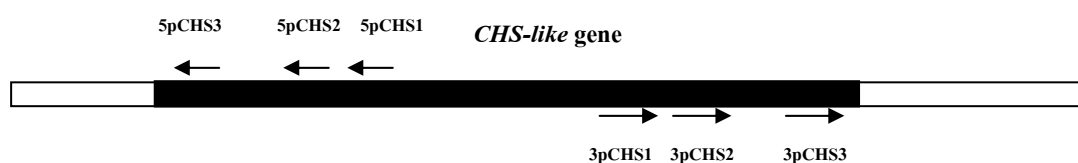
ออกแบบไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณยีน *CHS-like* ทั้งหมด 7 ไพรเมอร์ ได้แก่ forward 3 ไพรเมอร์ (5pCL1F, 5pCL2F และ 5pCL3F) และ reverse 4 ไพรเมอร์ (3pCL1R, 3pCL2R, 3pCL3R และ 3pCL4R) ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์แสดงในตารางที่ 3 เพิ่มปริมาณยีน *CHS-like* ในขมิ้นชัน โดยใช้ไพรเมอร์แบบ forward และ reverse สลับกันจนครบทุกแบบ คู่ไพรเมอร์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้มี 7 คู่ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มีขนาดประมาณ 1,300 คู่เบส นำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้มาโคลนเข้าสู่พลาสมิด ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล พบว่า ตรงกับยีน *CHS-like* ของพืชชนิดอื่นที่มีรายงานแล้ว จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์จากทั้ง 7 โคลนมาทำ multiple alignment สามารถจัดกลุ่มได้ 3 กลุ่ม นั่นคือสามารถโคลนยีน *CHS-like* ที่สมบูรณ์ได้ทั้งหมด 3 ยีน คือ *CICH1*, *CICH2* และ *CICH3* พบว่ายีนทั้ง 3 ยีน มีความแตกต่างกันมากในบริเวณส่วนปลาย 5' และ 3' ที่ไม่ได้แปลรหัส (5' และ 3' untranslated region) และส่วนอินทรอน โดยมีการเพิ่มขึ้นหรือขาดหายของเบส (insertion-deletion) หลายตำแหน่ง และมีการเปลี่ยนแปลงแทนที่เบส (base substitution) จำนวนมากบริเวณปลาย 3' โดยยีน *CICH2* และ *CICH3* มีลำดับนิวคลีโอไทด์หายไป 13 คู่เบสในส่วนอินทรอน ส่วนบริเวณแปลรหัส (coding region) มีความแตกต่างในลักษณะการแทนที่เบสเป็นส่วนใหญ่ซึ่งเมื่อแปลเป็นกรดอะมิโนแล้วพบความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ยกเว้นยีน *CICH3* มีลำดับนิวคลีโอไทด์หายไป 21 คู่เบสในส่วนเอกซอนที่ 2 (ภาพผนวกที่ 1) มีผลให้จำนวนกรดอะมิโนสั้นลง 7 ตัว

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละกลุ่ม พบรหัสสำหรับการเริ่มการแปลรหัส คือ ATG พบเอกซอน 2 เอกซอน เอกซอนที่ 1 ประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโน 64 ตัว เอกซอนที่ 2 ประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโน 223-330 ตัว สอดคล้องกับที่มีรายงานในพืชชนิดอื่น (Jinling *et al.*, 2000) และอินทรอน 1 อินทรอน โดยอินทรอนมีขนาด 82-95 คู่เบส ขนาดใกล้เคียงกับอินทรอน

ของยีน *CHS* ของ *Ipomoea* แต่มีขนาดเล็กเมื่อเทียบกับอินทรอนของยีน *CHS-like* ของพืชอื่น เช่น *Petunia* (Kose *et al.*, 1987; Durbin *et al.*, 1994) นอกจากนี้ยังพบตำแหน่งเริ่มของอินทรอนที่เป็นส่วนอนุรักษ์ของยีนในกลุ่ม *CHS* superfamily ที่พบในพืช คือ เริ่มที่ตำแหน่งที่ 1 หรือ 2 ของเบสที่เป็นรหัสของกรดอะมิโนซิสเตอีน (Jinling *et al.*, 2000; Harashima *et al.*, 2004) และพบรหัสหยุดคือ TAA แสดงว่าโคลนที่ได้เป็นยีนที่อยู่ในกลุ่ม *CHS* superfamily จากนั้นแปลลำดับนิวคลีโอไทด์ให้เป็นลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม ORF ทำ multiple alignment ด้วยโปรแกรม clustal W เพื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS-like* ในพืชอื่น ทั้งหมด 18 ชนิด [2PS จาก *Gerbera hybrida* (CAA86219), *VPS* และ *CHS-like* จาก *Humulus lupulus* (BAA29039, CAD23044), *BBS* จาก *Phalaenopsis* sp. (CAA56277), *BBS* จาก *Bromheadia finlaysoniana* (CAA10514), *CHS-like* และ *STS* จาก *Pinus strobes* (CAA05214 และ CAA87012), *ALS*, *BAS* และ *CHS2* จาก *Rheum palmatum* (AAS87170, AAK82824 และ ABB13608), *ACS* และ *CHS* จาก *Ruta graveolens* (CAC14058 และ CAC14059), *STS* และ *CHS* จาก *Vitis vinifera* (CAA54221 และ AAB72091), *CHS* จาก *Ipomoea nil* (BAA87336), *CHS* จาก *Hordeum vulgare* (ACH42078), *STC* และ *CHS* จาก *Hydrangea macrophylla* (AAN76183 และ AAN76184), *CHS* จาก *Ginkgo biloba* (AAS21057), *CHS* จาก *Zea mays* (CAA42763), *CHS8* จาก *Sorghum bicolor* (AAL49965), *STS* จาก *Arachis hypogaea* (CAA00091), *BBS* จาก *Pinus sylvestris* (CAA43165), *PnI* และ *PnL* จาก *Psilotum nudum* (BAA87925 และ BAA87924) และ *CHS-like* จาก *Marchantia paleacea* var. *diptera* (BAD42328)] พบค่าความเหมือนประมาณ 50-60% เมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่ได้พบบริเวณส่วนอนุรักษ์ของ *CHS* superfamily enzymes ที่พบในพืชทุกชนิด คือ Cys₁₆₄, His₃₀₃, Asn₃₃₆ และ Phe₂₁₅ (Ji and Hongya, 2006) พบบริเวณ active site, CoA binding site ของยีน *CHS-like* แต่มีบางกรดอะมิโนในส่วนอนุรักษ์ของ *CHS* superfamily enzymes ที่แตกต่างกันไปบ้าง (Abe *et al.*, 2004) (ภาพที่ 8) และพบบริเวณ substrate specificity ของยีน *CHS-like* (Suh *et al.*, 2000 และ Harashima *et al.*, 2004) โดยยีน *CHS-like* ของขมิ้นชันมีกรดอะมิโนที่เปลี่ยนไป 1 ตัว คือ เปลี่ยนจาก GFPG เป็น GLPG ซึ่งอาจเกิดจากการเลือกใช้สารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาที่ต่างกัน (Tropf *et al.*, 1993; Jez *et al.*, 2002) จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของยีนทั้ง 3 ยีนนี้ พบว่าโคลนที่ได้มีคุณสมบัติเป็นยีนในกลุ่ม *CHS* superfamily

ตารางที่ 3 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณส่วนปลาย 5', 3' และ ยีน *CHS-like* ที่สมบูรณในขมิ้นชัน

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ค่า Tm (°C)
5pCHS1	5'- GGGTATTGCTCCAGCAGCTC -3'	65
5pCHS2	5'- GCGAGTCTTCACAGTCGATC -3'	63
5pCHS3	5'- AGAGGTTGCAAGTGTTGCT -3'	58
3pCHS1	5'- GAGAGCGAGGGGAAGATACTG -3'	65
3pCHS2	5'- GAGAACGGTCTGCGCGTCCAC -3'	67
3pCHS3	5'- GCTTAGTGCACGCTCTGAAG -3'	63
AD1	5'-NTCGA(G/A)T(A/T)T(G/C)G(A/T)GTT -3'	43.5
AD2	5'- NGTCGA(G/C)(A/T)GANA(A/T)GAA -3'	46.6
AD3	5'- (A/T)GTGNAG(A/T)ANCANAGA -3'	45.3
AD7	5' A(A/T)GCANGNC(A/T)GANATA -3'	44
5pCL1F	5'- CATCCGCTCGCATTGAGAAG -3'	60
5pCL2F	5'- CAGCTAGCGCTACAAGTAGC -3'	60
5pCL3F	5'- CGAGAGAGAAGAAACAGCTAGCG -3'	65
3pCL1R	5'- GCGTTGCAGGAATTACGGGC -3'	63
3pCL2R	5'- CTCCCTGAGTGATATATGAG -3'	56
3pCL3R	5'- GATGTATAATATCATCCGGATC -3'	56
3pCL4R	5'- CTATTTTAGGGTTTAGATGCATG -3'	58



ภาพที่ 6 ภาพวาดแสดงตำแหน่งของไพรเมอร์ที่ออกแบบสำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน *CHS-like* ในขมิ้นชันด้านปลาย 5' และ 3' คู่กับไพรเมอร์แบบ degenerate (AD primer)


```

                                *          *
CHS1      -----MNSLAAARIRELREAQRATGPAAILAIGTANPVGNLLDQESFADYYFNITKSEHL 55
CHS3      -----MNSLAAARIRELREAQRATGPAAILAIGTANPVGNLLDQESFADYYFKITKSEHL 55
CHS2      -----MNSLAAAKIRELREAQRATGPAAILAIGTANPVGNLLDQESFADYYFKITKSEHL 55
Phbbs     -----MPSLESIKKAPRADGFASILAIGRANPD-NIEQSAYPDFYFRVTNSEHL 49
Bfbbs     -----MASQVSPPSINMAPKADGFASILAIGRANPK-NFIEQSTFPDFFFRVTNTEHM 52
Rgacs     -----MESLKEMRKAQKSEGPAAILAIGTATPD-NVYIQADYPDYFFKITKSEHM 49
Inchs     -----MVTVEEVKRAQRAEGPATILAIGTATPA-NCVDQSTYPDYFFRITNSDHM 49
Hmchs     -----MVTVEEVKRAQRAEGPATILAIGTATPP-NYVDQSTYPDYFFRVTNSEHK 49
Rgchs     -----MAAVTVEAIRKAQRADGPAAVLAIGTATPA-NYVTQADYPDYFFRITKSEHM 51
Vvchs     -----MVSVGEIRKSQRAEGPATVLAIGTATPA-NCVYQADYPDYFFRITNSEHM 49
Rpchs     -----MAPTVQEIRKAQRAEGPATVLAIGTATPA-NCIYQADYPDYFFRVTNSEHM 50
Hvchs     -----MA-ATMTVEEVKRAQRAEGPATVLAIGTATPA-NCVYQADYPDYFFKITKSDHM 52
Zmchs     -----MAGATVTVEVRKQQRATGPAATVLAIGTATPA-NCVYQADYPDYFFRITKSDHL 53
Sbchs     -----MTTGKVTLEAVRKAQRAEGPATVLAIGTATPA-NCVYQADYPDYFFRVTKSEHL 53
Vvsts     -----MASVEEIRNAQRAKGPATILAIGTATPD-HCVYQSDYADFFRVTKSEHM 49
Pbchs     -----MPGTLGMNFIAIRKAQRADGPATILAIGTANPP-NAVDQSSYPDYFFRITNSEHM 54
Gbchs     -----MEDLEAFRKAQRSDGPATILAIGTATPP-NAVEQSNYPDYFFRITKSEHM 49
Pssts     ----MSVGMG-IDLEAFRKSQRADGFASILAIGTANPP-NVVDQSTYPDYFFRVTNNEDN 54
Pybbs     -----MGGVDFEGFRKLQRAADGFASILAIGTANPP-NAVDQSTYPDYFFRITGNEHN 51
Ahsts     -----MVSVSGIRKQRAEGPATVLAIGTANPP-NCVDQSTYADYYFRVTNGEHN 49
Rpbas     -----MATEEMKK-----LATVMAIGTANPP-NCYQADFPDYFFRVTNSDHL 42
Hmstc     -----MATKSVAVEEMCKAQKAGGPATILAIGTAVPS-NCYYQSEYPDYFFRVTKSDHL 53
Gh2ps     -----MGSYSSDDVEVIREAGRAQGLATILAIGTATPP-NCVAQADYADYYFRVTKSEHM 54
Rpals     -----MADVLQEIRNSQKASGPATVLAIGTAHPP-TCYPQADYPDYFFRVTCKSEHM 50
Hlvps     -----MASVTVEQIRKAQRAEGPATILAIGTAVPA-NCFNQADFPDYFFRVTKSEHM 51
Hlchs     -----MASVTMEQIRKAQRAEGPATILAIGTACPP-NFVTQADFPDYFFRVTKSEHM 51
Pnpni     MTTGEASLMKNGPASRARREERADGPATELAIGTANPS-NVFDQETYPDYFFDVNTNTDK 59
Pnpnl     MVSGEA----NGTSYQVRRGQSADGPATVLAIGTANPP-NVFEQNSYPDYFFNVTNNTHK 55
Mpchs     -----MANKANATACRHQKAEGPATVLAIGKATPP-TAYPQSEYPDFFFDITNTSHK 51

```

ภาพที่ 8 แสดงลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS-like* จากขม้นชั้นเปรียบเทียบกับพืชชนิดอื่น 18 ชนิด รวม 29 ยีน โดย แถบสีเทาแสดงความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS-like* ใน ขม้นชั้นเทียบกับพืชชนิดอื่น, * แสดงความแตกต่างของกรดอะมิโนส่วนอนุรักษ์ของ CHS superfamily, + แสดงส่วนที่เป็น CoA-binding, # แสดงลำดับกรดอะมิโนอนุรักษ์บริเวณ active site ของ CHS superfamily ที่พบในพืชทุกชนิด และเส้นสีดำแสดงส่วนที่เป็น substrate specificity ของยีน *CHS-like*

+* + +

CHS1	QPPKEKLKIICDRSTVKTRYAHMTEELLEQYPSIRNPNEA-SLEARLGMIDSVPKLGKE	114
CHS3	QPLKEKLKIICDRSTVKTRYAHMTEELLEQYPSIRNPNEA-SLEARLSVMIDSVPKLGKE	114
CHS2	QPLKEKLKIICDRSTVKTRYAHMTEELLEQYPSIRNPNEA-SLEARLGMIDSVPKLGKE	114
Phbbs	VDLKKKFQRIKCEKTAIRKRHFVWNEEFLTANPCFSTFMDK-SLNVQRQEVASEIPKLGAK	108
Bfbbs	VDLKKKFQRIKCDKTSIRKRHFVWNEEFLTANPSLCTFMGN-SLNLRHEVAVREIPKLGAE	111
Rgacs	TELKDKFKTLCEKSMIRKRMCFSEQEFLKANPEVCKHMGK-SLNARQDIIVVETPRIGKE	108
Inchs	TDLKQKFQRMCDKSMITKRYMHLTEELKENPSFCEYMAP-SLDARQDIIVVVEVPKLGKE	108
Hmchs	KELKAKFQRMCDKSNQIKKCYMHLTEELKLNPNICAYMVP-SLDARQDMVVVEIPKLGKE	108
Rgchs	TELKEKFKRMCDKSMIRKRYMHLTEELKENPNMCAYMAP-SLDARQDIIVVVEVPKLGKE	110
Vvchs	TELKEKFKRMCDKSMINKRYMHLNEELKENPNVCAYMAP-SLDARQDMVVVEVPKLGKE	108
Rpchs	TDLKEKFRMCDKSMIEKRYMHLTEELKENQNMCEYMAP-SLDSRQDMVVSEVPRLGKE	109
Hvchs	ADLKEKFKRMCDKSQIRKRYMHLTEELLENPNMCAYMAP-SLDARQDIIVVVEVPKLGKA	111
Zmchs	TDLKEKFKRMCDKSMIRKRYMHLTEELSENPSMAYMAP-SLDARQDIIVVTEVPKLGKA	112
Sbchs	TDLKEKFKRICHSKSMIRKRYMHLTEELLENPNMSSYMAP-SLDARQDILITQEIPLGAE	112
Vvsts	TALKKKFNRIKCDKSMIKKRYIHLTEEMLEHPNIGAYMAP-SLNIRQEIITAIEVPKLGKE	108
Pbchs	TELKEKFKRMCDKSGINKRYMHLTEELKANPNLCYKAT-SLDARQDMVVVEVPKLGKE	113
Gbchs	TELKEKFKRMCDKSAIKKRYMHLTEELKEKPEVCAYMAP-SLDARQDMVVVEVPKLGKE	108
Pssts	TDLKDKFKRICERSAIKKRHYMHLTEELKKNPCLCAFLEVPSLDTRQAMLAEEVPRLGKE	114
Pybbs	TELKDKFKRICERSAIKQRYMHLTEELKKNPVCAFAVEVPSLDARQAMLAEEVPRLGKE	111
Ahsts	TDLKKKFQRICERTQIKNRHYMHLTEELKENPNMCAYKAP-SLDAREDMIREVPRVGKE	108
Rpbas	INLKQKFQRIKCEKTAIRKRHFVWNEEFLTANPCFSTFMDK-SLNVQRQEVASEIPKLGAK	101
Hmstc	TDLKSKFKRMCDKSSITKRYMHLTEELLENPNMCTFAAP-SIDGRQDIIVKEIPKLAKKE	112
Gh2ps	VDLKEKFKRIKCEKTAIRKRHYLALTEELQENPTMCEYMAP-SLNARQDLVVTGVPMLGKE	113
Rpals	TKLKKKMFQICDRSGIRQRFMFHTEENLGKNGMCTFDGP-SLNARQDMLIMEVVPKLGAE	109
Hlvps	TDLKKKFQRMCDKSTIKKRYLHTEELKQNPMLCEYMAP-SLNTRQDMLVVEVPKLGKE	110
Hlchs	TALKNKQFQRIKCDKTMIKRHYLHTEELKQNPMLCEYSAP-SLDTRQDMLVVEVPKLGRE	110
Pnpni	PELKAKFQRMCDK-SLESKKVHVLHGGDVEGQPSMVFIGRI-LLDVQRGRSRASAKLAKKE	117
Pnpnl	DELKAKFQRMCDKSGIRKRYLSFTEELKANPSMGIYWEP-SLDVQRQDILAVEVPKLAKQ	114
Mpchs	TQLKAKFARICKNSGINTRYFHCTEDILKANPSMCTYLEP-SLDVQRQDIAREVPRLAKE	110

* ** * * *

164#

CHS1	AALRALKEWGRPMSSITHVVFACAGVDMPGADYQLVKRLGLSPSVKRVMMYHLGCGYGGG	174
CHS3	AALRALKEWGRPMSSITHVVFACAGVDMPGADYQLVRRRLGLSPSVKRVMMYHLGCGYGGG	174
CHS2	AALRALKEWGRPMSSITHVVFACAGVDMPGADYQLVRRRLGLSPSVKRVMMYHLGCGYGGG	174
Phbbs	AATKAIQEWGQPKSRITHLIFCTTSGMDLPGADYQLTQILGLNPNVERVMLYQQGCFAGG	168
Bfbbs	AATKAIQEWGQPKSFITHLVFCTTSGMDLPGADYQLTQILGLNLDIERVMLHQQGCFAGG	171
Rgacs	AAVKAKEWGQPKSSITHLIFCTTSGVDMPGADYQLTRMLGLNPSVKRMMIYQQGCFAGG	168
Inchs	AAQSAKEWGQPKSKITHLVFCTTSGVDMPGADYQLTKLLGLRPSVKRLMMYQQGCFAGG	168
Hmchs	AATRAKEWGQPKSKITHLVFCTTSGVDMPGADYQLTKLLGLRPSVKRLMMYQQGCFAGG	168
Rgchs	AAVKAKEWGQPKSKITHLVFCTTSGVDMPGADYQLTKLLGLRPSVKRMMYQQGCFAGG	170
Vvchs	AAVKAKEWGQPKSKITHLVFCTTSGVDMPGADYQLTKLLGLRPSVKRLMMYQQGCFAGG	168
Rpchs	AAQKAKEWGQPKSKITHLVFCTTSGVDMPGADYQLTKLLGLRPSVKRMMYQQGCFAGG	169
Hvchs	AAQKAKEWGQPKSKITHLVFCTTSGVDMPGADYQLTKMLGLRPSVKRLMMYQQGCFAGG	171
Zmchs	AAQEAKEWGQPKSRITHLVFCTTSGVDMPGADYQLTKALGLR-VVNRLMMYQQGCFAGG	171
Sbchs	AAEKALKEWGQPKSRITHLVFCTTSGVDMPGADYQLIKLLGLCPVNRMMYHQQGCFAGG	172
Vvsts	AALKALKEWGQPKSKITHLVFCTTSGVDMPGADYKLANLLGLEPSVRRVMLYHQQGCFAGG	168
Pschs	AAAKAKEWGQPKSKITHLVFCTTSGVDMPGADYHLTRLLGLSLSVKRVMMYQQGCFAGG	173
Gbchs	AAAKAKEWGQPKSKITHLVFCTTSGVDMPGADYQLTKLLGLRPGVKRVMMYQQGCFAGG	168
Pssts	AAEKAIQEWGQPKSRITHLVFCTTTTPDLPGADFEVAKLLGLHPSVKRVGVFQHGCFAGG	174
Pybbs	AAEKAIQEWGQSKGITHLVFCTTTTPDLPGADFEVAKLLGLHPSVKRVGVFQHGCFAGG	171
Ahsts	AATKAIQEWGQPKSKITHLVFCTTSGVDMPGADYQLTKLLGLRPSVKRMMYHQQGCFAGG	168
Rpbas	AALKAKEWGQPKSKITHLVFCTTSGVDMPGADYQLTKLLGLRPSVKRMMYHQQGCFAGG	161
Hmstc	AASKAKEWGQPKSNITHLVFCTTSGVDMPGADYQLTRLLGLRPSIKRLMMYQQGCFAGG	172
Gh2ps	AAVKAIDEWGLPKSKITHLVFCTTAGVDMPGADYQLVKLLGLSPSVKRYMLYQQGCAAGG	173
Rpals	AAEKAIQEWGQPKSRITHLVFCTTTSDMPGADYQFATLFGLNPGVSRMVMYQQGCFAGG	169
Hlvps	AAINAKEWGQPKSKITHLVFCTGSSIDMPGADYQCAKLLGLRPSVKRVMLYQLGCGYAGG	170
Hlchs	AAMNAKEWDQPKSKITHLVFCTTSGVDMPGADYQCAKLLGLSPSVKRLMLYQQGCFAGG	170
Pnpni	ASLKALREWGQPKSKITHLVFCTTAPVTLPGVDAALIQSLGLNPSVKRVLLYMQGCFAGG	177
Pnpnl	ASLNAKEWGQPKSNITHLVFCTTGPVS-PGADAALMQMLGLNPSVKRVLLYMQGCFAGG	173
Mpchs	AAIEALTEWGQPRDQITHVVFATTSVGNMPGADLTLLTRLLGLNPSVKRTMLYQQGCFAGG	170

ภาพที่ 8 (ต่อ)

	*	*	++	+	*+ #215																																																								
CHS1	T	V	L	R	V	A	K	D	I	V	E	N	D	R	D	A	R	V	L	T	V	N	V	E	L	C	T	V	S	S	F	R	G	T	E	G	I	S	L	D	T	L	V	A	Q	A	L	F	G	D	G	A	A	L	V	V	G	A	D	234	
CHS3	T	V	L	R	V	A	K	D	I	V	E	N	D	R	D	A	R	V	L	T	V	N	V	E	L	C	T	V	S	S	F	R	G	T	E	G	I	S	L	D	T	L	V	A	Q	A	L	F	G	D	G	A	A	L	V	V	G	A	D	234	
CHS2	T	V	L	R	V	A	K	D	I	V	E	N	D	R	D	A	R	V	L	T	V	N	V	E	L	C	T	V	S	S	F	R	G	T	E	G	I	S	L	D	T	L	V	A	Q	A	L	F	G	D	G	A	A	L	V	V	G	A	D	234	
Phbbs	T	T	L	R	L	A	K	L	A	E	S	R	K	G	A	R	V	L	V	V	C	A	E	T	T	-	T	V	L	F	R	A	P	S	E	E	H	Q	D	L	V	T	Q	A	L	F	A	D	G	A	S	A	V	I	V	G	A	D	227		
Bfbbs	T	T	L	R	L	A	K	L	A	E	S	R	K	G	A	R	V	L	V	V	C	A	E	T	T	-	T	E	F	R	A	P	S	E	E	H	Q	E	D	L	V	T	Q	S	L	F	G	D	G	A	S	A	L	I	V	G	A	D	230		
Rgacs	T	V	L	R	L	A	K	D	L	A	E	N	N	K	G	S	R	V	L	V	V	C	S	E	L	T	-	A	P	T	F	R	G	P	S	D	A	V	D	S	L	V	G	Q	A	L	F	A	D	G	A	A	L	V	V	G	A	D	227		
Inchs	T	V	L	R	V	A	K	D	L	A	E	N	N	K	A	A	R	V	L	V	V	C	S	E	I	T	-	V	V	T	F	R	G	P	N	E	H	L	D	S	L	V	G	Q	A	L	F	A	D	G	A	A	I	V	G	S	D	227			
Hmchs	T	V	L	R	L	A	K	D	L	A	E	N	N	K	G	A	R	V	L	V	V	C	S	E	I	T	-	A	V	T	F	R	G	P	S	D	T	H	L	D	S	L	V	G	Q	A	L	F	A	D	G	A	R	A	V	I	G	S	D	227	
Rgchs	T	V	L	R	L	A	K	D	L	A	E	N	N	R	G	A	R	V	L	V	V	C	S	E	I	T	-	A	V	T	F	R	G	P	A	D	T	H	L	D	S	L	V	G	Q	A	L	F	A	D	G	A	A	A	V	I	V	G	A	D	229
Vvchs	T	V	L	R	L	A	K	D	L	A	E	N	N	A	G	A	R	V	L	V	V	C	S	E	I	T	-	A	V	T	F	R	G	P	S	D	T	H	L	D	S	L	V	G	Q	A	L	F	A	D	G	A	A	I	I	G	A	D	227		
Rpchs	T	V	L	R	L	A	K	D	L	A	E	N	N	R	G	A	R	V	L	V	V	C	S	E	I	T	-	A	I	C	F	R	G	P	T	D	T	H	L	D	S	M	V	G	Q	A	L	F	A	D	G	A	G	A	V	I	G	S	D	228	
Hvchs	T	V	L	R	L	A	K	D	L	A	E	N	N	R	G	A	R	V	L	V	V	C	S	E	I	T	-	A	V	T	F	R	G	P	H	E	S	H	L	D	S	L	V	G	Q	A	L	F	A	D	G	A	A	A	V	I	G	A	D	230	
Zmchs	T	V	L	R	V	A	K	D	V	A	E	N	N	R	G	A	R	V	M	V	V	C	S	E	I	T	-	A	V	T	F	R	G	P	S	E	H	V	D	S	L	V	G	Q	A	L	F	A	D	G	A	A	A	G	R	G	G	A	D	230	
Sbchs	M	V	L	R	L	A	K	D	L	A	E	N	N	R	G	A	R	V	L	I	V	C	S	E	I	T	-	V	V	T	F	R	G	P	S	E	H	L	D	S	L	V	G	Q	A	L	F	A	D	G	A	A	A	V	I	V	G	A	D	231	
Vvsts	T	V	L	R	T	A	K	D	L	A	E	N	N	A	G	A	R	V	L	V	V	C	S	E	I	T	-	V	V	T	F	R	G	P	S	E	D	A	L	D	S	L	V	G	Q	A	L	F	A	D	G	S	A	A	V	I	V	G	S	D	227
Pbchs	T	V	L	R	L	A	K	D	L	A	E	N	N	R	G	A	R	V	L	V	V	C	S	E	I	T	-	A	V	T	F	R	G	P	S	G	T	H	L	D	S	M	V	D	Q	A	L	F	A	D	G	S	A	I	V	G	A	D	232		
Gbchs	T	V	L	R	V	A	K	D	L	A	E	N	N	R	G	A	R	V	L	V	V	C	S	E	I	T	-	A	V	T	F	R	G	P	S	D	T	H	L	D	S	L	V	G	Q	A	L	F	A	D	G	A	A	A	V	I	V	G	A	D	227
Pssts	T	V	L	R	L	A	K	D	L	A	E	N	N	R	G	A	R	V	L	V	V	C	S	E	N	T	-	A	V	T	F	R	G	P	S	E	T	H	L	D	G	L	V	G	L	A	L	F	A	D	G	A	S	A	L	I	V	G	A	D	233
Pybbs	T	V	L	R	M	A	K	D	L	A	E	N	N	R	G	A	R	V	L	I	V	C	S	E	T	-	A	V	T	F	R	G	P	S	E	T	H	L	D	S	L	V	G	Q	A	L	F	A	D	G	A	S	A	L	I	V	G	A	D	230	
Ahsts	T	V	L	R	L	A	K	D	L	A	E	N	N	K	D	A	R	V	L	I	V	C	S	E	N	T	-	A	V	T	F	R	G	P	N	E	T	M	D	S	L	V	G	Q	A	L	F	A	D	G	A	A	A	I	I	G	S	D	227		
Rpbas	T	V	L	R	L	A	K	D	L	A	E	N	N	K	G	A	R	V	L	I	V	C	S	E	M	T	-	T	T	C	F	R	G	P	S	E	T	H	L	D	S	M	I	G	Q	A	L	F	A	D	G	A	A	A	V	I	V	G	A	D	220
Hmstc	T	G	L	R	L	A	K	D	L	A	E	N	N	K	G	A	R	V	L	V	V	C	S	E	M	T	-	V	I	N	F	R	G	P	S	E	A	H	M	D	S	L	V	G	Q	S	L	F	A	D	G	A	S	A	V	I	V	G	S	D	231
Gh2ps	T	V	L	R	L	A	K	D	L	A	E	N	N	K	G	S	R	V	L	I	V	C	S	E	I	T	-	A	I	L	F	H	G	P	N	E	N	H	L	D	S	L	V	A	Q	A	L	F	A	D	G	A	A	L	I	V	G	S	D	232	
Rpals	T	V	L	R	V	K	D	L	A	E	N	N	K	G	A	R	V	L	V	V	C	S	E	I	V	-	A	F	A	F	R	G	P	H	E	D	H	I	D	S	L	I	G	Q	L	L	F	A	D	G	A	A	L	V	V	G	T	D	228		
Hlvps	K	V	L	R	I	A	K	D	L	A	E	N	N	K	G	A	R	V	L	I	V	C	S	E	I	T	-	A	C	I	F	R	G	P	S	E	K	H	L	D	C	L	V	G	Q	S	L	F	A	D	G	A	S	S	V	I	V	G	A	D	229
Hlchs	T	V	L	R	L	A	K	D	L	A	E	N	N	K	G	A	R	V	L	A	V	C	S	E	I	M	T	T	-	S	I	F	H	G	P	T	S	H	F	D	S	M	V	Q	A	L	F	A	D	G	A	S	A	L	V	V	G	A	E	D	230
Pnpni	T	V	L	R	H	A	K	D	L	A	E	N	N	R	G	A	R	V	L	V	V	C	S	E	T	-	A	V	T	F	R	G	P	H	E	N	H	L	D	N	L	V	G	Q	A	L	F	A	D	G	A	S	A	L	I	V	G	S	D	236	
Pnpnl	T	V	L	R	H	A	K	D	L	A	E	N	N	K	G	A	R	V	L	V	V	C	S	E	S	T	-	A	V	T	F	R	G	P	H	E	N	H	L	D	N	L	V	G	Q	A	L	F	A	D	G	A	A	L	I	V	G	S	D	232	
Mpchs	T	V	L	R	V	A	K	D	L	A	E	N	N	K	G	A	R	V	L	T	V	V	S	E	L	T	-	C	V	T	F	R	A	P	N	E	E	H	L	D	N	L	V	G	S	A	I	F	A	D	G	A	S	V	L	I	V	G	S	D	229

	*	*	+	+	+																																																									
CHS1	-	PIEGVENPIFEMAF	AAQ	TILPESE	GKILGQLKENGLRV	HLDR	VEPQIVAGNI	ETSLV	HA	293																																																				
CHS3	-	PIEGVENPIFEMAF	AAQ	TILPESE	GKILGQLKENGLRV	HLDR	VEPQIVAGNI	ETSLV	HA	293																																																				
CHS2	-	PIEGVENPIFEMAF	AAQ	TILPESE	GKILGQLKENGLRV	HLDR	VEPQIVAGNI	ETSLV	HA	293																																																				
Phbbs	P	DEAADERASFV	I	V	S	T	S	Q	V	L	L	P	D	S	A	G	A	I	G	H	V	S	E	G	G	L	L	A	T	L	H	R	D	V	P	Q	I	V	S	K	N	V	G	K	C	L	E	E	A	287												
Bfbbs	P	H	E	G	A	R	E	R	A	S	F	I	L	V	S	S	S	Q	V	L	L	A	N	S	A	H	A	I	T	G	H	V	S	E	G	G	I	K	A	T	L	H	R	D	V	P	Q	I	S	N	N	L	G	K	C	L	E	E	A	290		
Rgacs	P	-	D	T	S	V	E	R	A	L	Y	I	V	S	A	S	Q	M	L	L	P	D	S	D	G	A	I	E	G	H	I	R	E	E	G	L	T	V	H	L	K	K	D	V	P	A	L	F	S	A	N	I	D	T	P	L	V	E	A	286		
Inchs	-	P	T	P	-	A	E	K	P	L	F	Q	L	V	S	A	A	Q	T	I	L	A	P	D	S	C	G	A	I	D	G	H	L	R	E	V	G	L	T	F	H	L	K	D	V	P	S	I	V	S	N	N	I	E	K	C	L	S	E	A	285	
Hmchs	-	P	M	P	E	V	E	K	P	L	F	E	I	V	S	A	A	Q	T	I	L	P	D	S	D	G	A	I	D	G	H	L	R	E	V	G	L	T	F	H	L	K	D	V	P	G	L	S	K	N	I	E	K	S	L	V	E	A	286			
Rgchs	-	P	D	E	S	I	E	R	P	L	Y	Q	L	V	S	A	A	Q	T	I	L	P	D	S	D	G	A	I	D	G	H	L	R	E	V	G	L	T	F	H	L	K	D	V	P	G	L	S	K	N	I	E	K	S	L	V	E	A	288			
Vvchs	-	P	D	T	K	I	E	R	P	L	F	E	L	V	S	A	A	Q	T	I	L	P	D	S	E	G	A	I	D	G	H	L	R	E	V	G	L	T	F	H	L	K	D	V	P	G	L	S	K	N	I	E	K	S	L	V	E	A	286			
Rpchs	-	P	D	S	I	E	R	P	I	F	L	V	W	T	A	Q	T	I	L	P	D	S	E	G	A	I	D	G	H	L	R	E	V	G	L	T	F	H	L	K	D	V	P	G	L	S	K	N	I	H	K	S	L	A	E	A	287					
Hvchs	-	P	D	V	S	V	E	R	P	L	F	Q	L	V	S	A	A	Q	T	I	L	P	D	S	E	G	A	I	D	G	H	L	R	E	V	G	L	T	F	H	L	K	D	V	P	G	L	S	K	N	I	E	R	A	L	E	D	A	289			
Zmchs	-	P	D	G	R	V	E	R	P	L	F	Q	L	V	S	A	A	Q	T	I	L	P	D	S	E	G	A	I	D	G	H	L	R	E	V	G	L	A	F	H	L	K	D	V	P	G	L	S	K	N	I	E	R	A	L	E	D	A	289			
Sbchs	-	P	S	E	P	A	E	R	P	L	F	H	L	V	S	A	S	Q	T	I	L	P	D	S	E	G	A	I	E	G	H	L	R	E	V	G	L	T	F	H	L	Q	R	V	P	Q	L	S	M	N	I	E	R	L	L	E	D	A	290			
Vvsts	-	P	D	S	I	E	R	P	L	F	Q	L	V	S	A	A	Q	T	I	L	P	D	S	E	G	A	I	A	G	N	L	R	E	V	G	L	T	F	H	L	W	P	N	V	P	T	L	I	S	E	N	I	E	K	C	L	T	Q	A	286		
Pschs	-	P	I	P	E	V	E	K	P	C	F	E	L	W	T	A	Q	T	I	P	S	D	A	I	D	G	H	L	N	E	S	G	L	T	F	H	L	K	D	V	P	L	S	K	N	I	E	G	K	S	L	V	E	A	291							
Gbchs	-	P	I	A	E	V	E	K	P	S	F	Q	L	L	W	T	S	Q	T	I	L	P	D	S	D	G	A	I	D	G	H	L	R	E	V	G	L	T	F	H	L	K	D	V	P	G	L	S	I	N	N	I	E	K	S	L	V	E	A	286		
Pssts	-	P	I	P	Q	V	E	K	P	C	F	E	I	V	W	T	A	Q	T	V	V	P	N	S	D	G	A	I	S	G	K	L	R	E	V	G	L	T	F	Q	L	K	G	A	V	P	D	L	I	S	T	N	I	E	K	C	L	V	E	A	292	
Pybbs	-	P	I	P	Q	V	E	K	A	C	F	E	I	V	W	T	A	Q	T	V	V	P	N	S	E	G	A	I	G	G	K	V	R	E	V	G	L	T	F	Q	L	K	G	A	V	P	D	L	I	S	N	I	E	A	I	N	C	M	V	E	A	289
Ahsts	-	P	V	P	E	V	E	N	L	F	E	I	V	W	T	A	Q	T	I	P	N	S	H	G	A	I	G	G	L	R	E	V	G	L	T	F	Y	L	N	K	S	V	P	D	L	I	S	Q	N	I	S	Q	N	I	G	A	L	S	K	A	286	
Rpbas	-	P	D	L	T	V	E	R	P	I	F	E	L	V	S	T	A	Q	T	I	V	P	E	S	H	G	A	I	E	G	H	L	L	E	S	G	L	S	F	H	Y	K	T	V	P	T	L	I	S	N	N	I	K	T	C	L	S	D	A	279		
Hmstc	-	P	D	L	S	T	E	H	P	L	Y	Q	I	M	S	A	S	Q	I	I	V	A	D	S	E	G	A	I	D	G	H	L	R	Q	E	G	L	T	F	H	L	K	D	V	P	S	L	V	S	D	N	I	E	N	T	L	V	E	A	290		
Gh2ps	P	H	L	A	V	-	E	R	P	I	F	E	I	V	S	T	D	Q	T	I	L	P	D	T	E	K	A	M	K	L	H	L	R	E	G	G	L	T	F	Q	L	H	R	D	V	P	L	M	A	K	N	I	E	N	A	E	K	A	291			
Rpals	I	D	E	S	V	-	E	R	P	I	F	Q	I	M	S	A	T	A	T	I	P	N	S	L	H	T	M	A	L	H	L	T	E	A	G	L	T	F	H	L	K	D	V	P	L	M	K	V	K	S	N	D	M	E	L	A	287					
Hlvps	P	D	A	S	V	G	E	R	P	I	F	Q	L	V	S	A	A	Q	T	I	L	P	N	S	D	G	A	I	A	G	H	V	T	E	A	G	L	T	F	H	L	K	D	V	P	G	L	S	I	S	N	I	E	K	S	L	I	E	A	289		
Hlchs	P	D	E	S	V	G	E	R	P	I	F	E	L	A	S	A	A	Q	T	I	M	P	D	S	D	G	A	I	G	G	H	L	K	E	S	G	L	M	L	H	L	I	R	D	V	P	K	L	S	I	N	N	I	E	K	N	L	I	E	A	290	
Pnpni	-	P	I	S	D	L	E	K	P	W	F	E	I	R	W	A	G	S	Y	L	I	P	E	S	G	Q	A	I	A	G	L	K	E	V	G	L	E	F	H	L	T	R	D	V	S	G	L	V	S	K	N	I	V	T	I	L	N	E	A	295		
Pnpnl	-	P	I	P	N	V	E	K	A	W	F	E	I	S	A	E	S	Y	L	I	P	D	S	S	A	I	A	G	L	K	E	V	G	L	E	F	H	L	T	R	D	V	S	P	V	I	S	K	N	I	L	K	I	L	Q	D	A	291				
Mpchs	-	P	V	P	E	V	E	K	P	O	F	E	I	H	S	G	E	T	L	I	P	S	D	G	A	I	E	G	R	L	T	E	A	G	L	T	F	H	L	K	D	V	P	G	L	I	S	R	N	T	L	P	I	N	K	A	288					

303# + + * * #336

CHS1	LKQFGVS	-----	DWNSIFWVAHPGGPAILNQVEAKLQLKPEKLRATRHLVREFGNMSSA	347
CHS3	LKQFGVS	-----	DWNSIFWVAHPGGPAILNQVEAKLQLKPEKLRATRHLVREFGNMSSA	347
CHS2	LKQFGVS	-----	DWNSIFWVAHPGGPAILNQVEAKLQLKPEKLRATRHLVREFGNMSSA	347
Phbbs	FTFPGIS	-----	DWNSIFWVPHPGGPAILDQVEERVGLKPEKLSVSRHVLAEYGNMSSV	341
Bfbbs	FTPLGIS	-----	DWNSIFWVLPHPGGPAILDQVEEKMGLEPEKLLISRHLVLEYNMSSV	344
Rgacs	FRPLGIS	-----	DWNSIFWIAHPGGPAILDQIEVKLGLKEDKL RASKHVMSEYGNMSSS	340
Inchs	FNPLGIS	-----	DWNSIFWIAHPGGPAILDQVEDKLGLKPEKLRATRHLVSEYGNMSSA	339
Hmchs	FRPLDIS	-----	DWNSIFWIAHPGGPAILDQVEKKLALKPEKLRATRNLVSDYGNMSSA	340
Rgchs	FGPIGIS	-----	DWNSIFWIAHPGGPAILDQVEAKLGLKEEKL RATRQVLSEYGNMSSA	342
Vvchs	FKPIGIS	-----	DWNSLFWIAHPGGPAILDQVELKLGLKEEKL RATRHLVSEYGNMSSA	340
Rpchs	FSPLNIT	-----	DWNSLFWIAHPGGPAILDQVEAKLGLKEEKL KATRQVLNDYGNMSSA	341
Hvchs	FKPLGID	-----	DWNSVFWIAHPGGPAILDQVEAKVNLNKRMRATRHLVSEYGNMSSA	343
Zmchs	FEPLGIS	-----	DWNSIFWVAHPGGPAILDQVEAKVGLDKARM RATRHLVSEYGNMSSA	343
Sbchs	FAPLGIS	-----	DWNSIFWVAHPGGPAILNMVEAKVGLDKARM CATRHILA EYGNMSSV	344
Vvsts	FDPLGIS	-----	DWNSLFWIAHPGGPAILDQVEAKLNL DKKKLEATRHLVSEYGNMSSA	340
Pschs	FQQYGIS	-----	DWNKLFWIAHPGGPAILDQVETKLNKPEKLRATRQVLSEYGNMSSA	345
Gbchs	FHQFGIS	-----	DWNLFWIAHPGGPAILDQVESKLNLNPLKMKATRHLVSEYGNMSSA	340
Pssts	FSQFNIS	-----	DWNQLFWIAHPGGPAILDQVEASLNL DPTKL RATRHMSEYGNMSSA	346
Pybbs	FSQFKIS	-----	DWNKLFWVVPHPGGPAILDQVEAKLNL DPTKL IPTRHMSEYGNMSSA	343
Ahsts	FDPLGIS	-----	DYNSIFWIAHLGGRAILDQVEQKVNKPEKMKATRDVLSNYGNMSSA	340
Rpbas	FTPLNIS	-----	DWNSLFWIAHPGGPAILDQVTAKVGLKEEKLKVTRQVLKDYGNMSSA	333
Hmstc	FTPLMDSIDSII		DWNSIFWIAHPGGPAILNQVQAKVGLKEEKL RVSRLSEYGNMSSA	350
Gh2ps	LSPLGIT	-----	DWNSVFMVHPGGPAILDQVERKLNKEDKL RASRHLVSEYGNLISA	345
Rpals	FKPLGIT	-----	DWNSIFWQVHPGGPAILDQVIEEKL LTKDKMRDSRYLSEYGNLISA	341
Hlvps	FTPIGIN	-----	DWNNIFWIAHPGGPAILDQVIEAKLELKEEKL KASREMLSEYGNMSSA	343
Hlchs	FREIGIR	-----	DWNSIFWIAHPGGPAILDQVEAKLRLKKEK MADSRHLVSEYGNMSSA	344
Pnpni	FEGTGIT	-----	DWNDIFIIPHPGGPAILDQVIEQDLKLQPEKLQASRHLVSEYGNMSSA	349
Pnpnl	FDGTGIS	-----	DWNDVFIIPHPGGPAILDQVIEEKLKL VPEKLQASRHLVSEYGNMSSA	345
Mpchs	IEVAGSP	-----	GWNDLFWCVHPGGPAILDQVARTLNLKPEKMEATRDLVLYGNMSSA	342

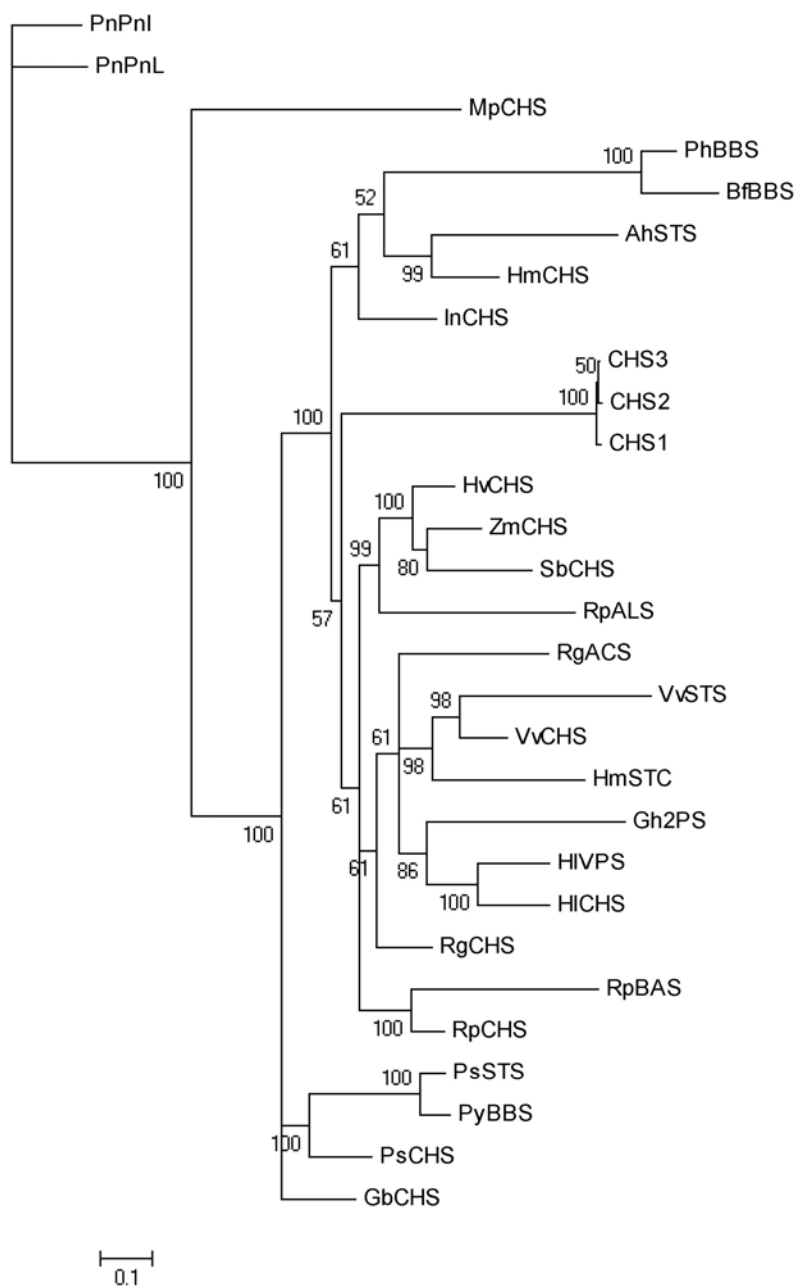
* * * *

CHS1	TVLFILDRMRKQSA	AEHATTGEGLEWGILCGLGPGITLETVVLHS	--VPI	-----	396		
CHS3	TVLFILDRMRKQSA	AEHATTGEGLEWGILCGLGPGITLETVVLHS	--VPI	-----	389		
CHS2	TVLFILDRMRKQSA	AEHATTGEGLEWGILCGLGPGITLETVVLHS	--VPI	-----	396		
Phbbs	CVHFALDEMRKRS	ANEGKATTGEGLEWGVLF	FGFGPGLT	VETVVLRS	--VPL	-----	390
Bfbbs	CVHFALDEMRKRS	NEGKATTGEGLEWGVLF	FGFGPGLT	TIETVVLRS	--VSIS	-----	394
Rgacs	CVLFLVDEMRKNS	LQDGKSTTGEGLDWGVLF	FGFGPGLT	VETVVLRS	--VPVEA	-----	391
Inchs	CVLFLVDEMRKAS	NDGLGTTGEGLEWGVLF	FGFGPGLT	TIETVVLHS	--VPA	-----	388
Hmchs	CVLFIMDEMRKNS	VYEGMTTGEGLEWGVLF	FGFGPGLT	TVETVVLHG	--VST	-----	389
Rgchs	CVLFLVDEMRKNC	AEGRATTGEGLDWGVLF	FGFGPGLT	VETVVLRS	--VPIKA	-----	393
Vvchs	CVLFLVDEMRKKS	IEEGKGTGEGLEWGVLF	FGFGPGLT	VETVVAQPCYTIDSLSHSSTY	--VPVAH	-----	400
Rpchs	CVLFLVDEMRKKS	LENGHATTGEGLDWGVLF	FGFGPGLT	VETVVLHS	--VPITA	-----	392
Hvchs	CVLFLVDEMRKRS	AEHATTGEGMDWGVLF	FGFGPGLT	VETVVLHS	--VPITA	-----	394
Zmchs	CVLFLVDEMRKRP	AEDGQSTTGEGLDWGVLF	FGFGPGLT	VETVVLHS	--VPITTGAPTAA	-----	400
Sbchs	CVLFLVDEMRNRS	AKDGHATTGEGMEWGVLF	FGFGPGLT	VETIVLHS	--VPITTVAA	-----	398
Vvsts	CVLFLVDEMRKKS	SLKGERATTGEGLDWGVLF	FGFGPGLT	TIETVVLHS	--IPMVTN	-----	392
Pschs	CVHFILDEMRKSS	RQNGCSTTGEGLDWGVLF	FGFGPGLT	TIETVVLKS	--VPLQ	-----	395
Gbchs	CVLFLVDEMRKSS	IKNGFLTGEGLDWGVLF	FGFGPGLT	VETVVLRS	--VPCNK	-----	391
Pssts	CVHFILDETRKAS	RQNGCSTSGGFGQMGVLF	FGFGPGLT	VETVVLKS	--IPFP	-----	396
Pybbs	CVHFILDETRKAS	LQNGCSTTGEGLEMGVLF	FGFGPGLT	TIETVVLKS	--VPIQ	-----	393
Ahsts	CVFFIMDLMRKKS	LETGLKTTGEGLDWGVLF	FGFGPGLT	TIETVVLRS	--MAI	-----	389
Rpbas	TVFFIMDEMRKKS	LENGQATTGEGLEWGVLF	FGFGPGIT	VETVVLRS	--VPVIS	-----	384
Hmstc	CVFFIMDEMRKRS	VEEGKGTGEGLEWGVLF	FGFGPGFT	VETIVLHS	--VPI	-----	399
Gh2ps	CVLFIIDEVRKRS	MAEGKSTTGEGLDWGVLF	FGFGPGMT	VETVVLRS	--VRVTAANGN	-----	402
Rpals	CVLFIIDEVRKRS	VEEGKSTTGEGLEWGVLF	FGFGPGMT	VETVVLRS	--VPI	-----	391
Hlvps	SVFFIVDEMRKQS	KEGKSTTGEGLEWGVLF	FGFGPGLT	VETVVLHS	--VPTNV	-----	394
Hlchs	CVFFIMDELKRS	LEEGKSTTGEGLEWGVLF	FGFGPGVT	VETVVLHS	--VANKV	-----	395
Pnpni	TVHFSLDQMRSS	VEEGKSTTGEGYELGILLGLGPGMT	VESIVLKS	--VPTWTVAS	-----	403	
Pnpnl	TVHFILDMRKSS	VEEGKATTGEGYELGILLGLGPGMT	VESIVLKS	--VPIASLLSS	-----	400	
Mpchs	SVLFLVLDQMRSS	AEKRCSTTGEGCEWGLVVGFGPGLT	IEVSVLKA	--IGTGY	-----	393	

CHS1	-----	
CHS3	-----	
CHS2	-----	
Phbbs	-----	
Bfbbs	-----	
Rgacs	-----	
Inchs	-----	
Hmchs	-----	
Rgchs	-----	
Vvchs	NTEGKMGMAAALGTGEDCMSSCANLRSYPSFLCYVLLYFYVLLCPCAFSPFTLK	454
Rpchs	-----	
Hvchs	-----	
Zmchs	-----	
Sbchs	-----	
Vvsts	-----	
Pschs	-----	
Gbchs	-----	
Pssts	-----	
Pybbs	-----	
Ahsts	-----	
Rpbas	-----	
Hmstc	-----	
Gh2ps	-----	
Rpals	-----	
Hlvps	-----	
Hlchs	-----	
Pnpni	-----	
Pnpnl	-----	
Mpchs	-----	

ภาพที่ 8 (ต่อ)

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* และ *CHS-like* ของขมิ้นชันและพืชอื่นทั้งหมด 18 ชนิด รวม 29 ยีน ตามภาพที่ 8 มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยทำ phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MrBayes version 3.0b4 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001) ด้วยโมเดล SYM+I+G, AIC โดยวิเคราะห์ทั้งหมด 1×10^6 ซ้ำ พบว่ายีน *CHS* และ *CHS-like* ของพืชทั้งหมด 18 ชนิดสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ได้แก่ กลุ่มของเฟิร์น ซึ่งเป็นพืชที่ไม่มีเมล็ด (seedless vascular plant, *PnPnI* และ *PnPnL*), ลิเวอร์เวิร์ด ซึ่งเป็นพืชที่ไม่มีท่อลำเลียง (non-vascular plant, *MpCHS*) และกลุ่มพืชมีเมล็ด (seed plant) ซึ่งในกลุ่มนี้สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มย่อย ได้แก่ เป๊ะก้วย (*GbCHS*) กลุ่มของสน (*PsSTS*, *PyBBS* และ *PsCHS*) ซึ่งเป็นพืชเมล็ดเปลือย (gymnosperm) และกลุ่มพืชดอก (angiosperm) ในกลุ่มพืชดอกยังแบ่งเป็นกลุ่มย่อยหลายกลุ่ม โดยส่วนใหญ่ยีน *CHS* และ *CHS-like* ของพืชชนิดเดียวกันหรืออยู่ใน family เดียวกันจัดอยู่ในกลุ่มย่อยเดียวกัน (Ji and Hongya, 2006) ส่วนยีน *CHS-like* ของขมิ้นชันทั้ง 3 ยีนจัดอยู่ในกลุ่มย่อยเดียวกันแยกจากกลุ่มย่อยอื่น



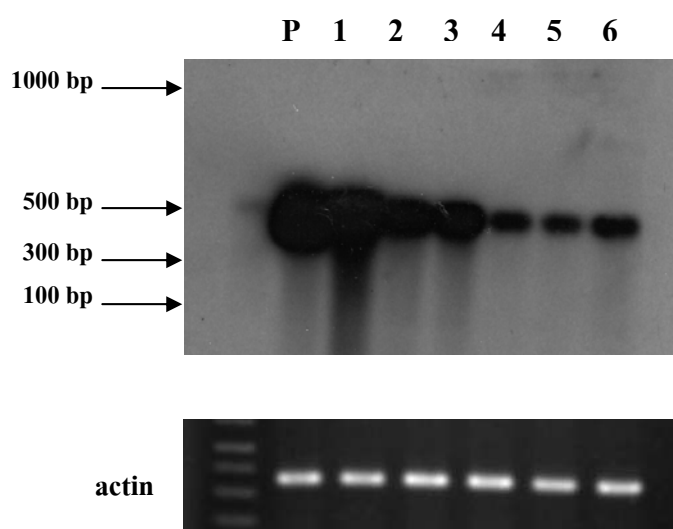
ภาพที่ 9 ผลจากการทำ phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MrBayes version 3.0b4 แอปด้านล่าง แสดงระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ตัวเลขที่อยู่บนกิ่งแสดงค่า Bayesian posterior probability จากการวิเคราะห์ทั้งหมด 1×10^6 ครั้ง

การตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CHS-like*

เมื่อตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CHS-like* ในขมิ้นชันด้วยวิธีกึ่งปริมาณ (semi-quantitative RT-PCR) โดยการนำตัวอย่างแง่มิ้นชันขนาดน้อยกว่า 1 เซนติเมตร, 1-2 เซนติเมตร, 2-3 เซนติเมตร, 3-4 เซนติเมตร, มากกว่า 4 เซนติเมตร และใบขมิ้นชัน มาสกัดอาร์เอ็นเอ เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีนจากอาร์เอ็นเอโดยวิธี RT-PCR ใช้จำนวนรอบ 25 รอบ แล้วนำไปตรวจผลที่ได้ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิสในเจลอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ย้อมด้วยเอทิดียมโบรไมด์ ผลปรากฏว่าไม่พบแถบดีเอ็นเอ จึงนำเจลอะกาโรสไปทำ Southern blot hybridization โพรบที่ใช้ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน *CHS-like* ในบริเวณของเอกซอนที่ 2 ขนาดประมาณ 320 คู่เบสโดยใช้ดีเอ็นเอเป็นต้นแบบ โดยมี positive control คือ ผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในส่วน of ยีน *CHS-like* เมื่อตรวจสอบผลที่ได้ พบแถบดีเอ็นเอขนาดตรงกับที่ต้องการคือ 320 คู่เบส โดยแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างแง่มิ้นชันขนาดต่าง ๆ นั้น มีความเข้มของแถบไม่เท่ากัน แถบดีเอ็นเอที่ได้จากตัวอย่างแง่มิ้นชันขนาดน้อยกว่า 1 และ 1-2 เซนติเมตร มีแถบเข้มที่สุด ในขณะที่ตัวอย่างแง่มิ้นชันขนาด 2-3, 3-4 และ มากกว่า 4 เซนติเมตร มีความเข้มลดลงตามลำดับ (ภาพที่ 10) แสดงให้เห็นว่าในตัวอย่างแง่มิ้นชันที่มีขนาดเล็กพบการแสดงออกของยีน *CHS-like* มากกว่าในตัวอย่างแง่มิ้นชันขนาดใหญ่ โดยมีการเพิ่มปริมาณยีน actin จำนวน 25 รอบเป็นตัวควบคุม นอกจากนี้ยังพบแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างที่ได้จากใบขมิ้นชันด้วย โดยมีความเข้มของแถบดีเอ็นเอใกล้เคียงกับแง่ที่มีขนาดน้อยกว่า 1 และ 1-2 เซนติเมตร จึงสันนิษฐานได้ว่าการแสดงออกของยีน *CHS-like* ในใบของขมิ้นชันด้วย เนื่องจากยีน *CHS-like* เป็น multigene family จึงสามารถพบได้ในทุกส่วนของพืช โดยที่แต่ละยีนในกลุ่มอาจจะทำหน้าที่ต่างกัน (Helariutta *et al.*, 1996) โพรบที่ใช้เป็นส่วนเอกซอนที่ 2 ซึ่งเป็นส่วนอนุรักษ์ของ *CHS* superfamily enzymes (Jinling, 2000) จึงสามารถเพิ่มปริมาณยีนในกลุ่มนี้ได้หลายยีน

เมื่อวัดปริมาณสารเคอร์คูมินอยด์จากตัวอย่างแง่มิ้นชันขนาดน้อยกว่า 1, 1-2, 2-3, 3-4 และ มากกว่า 4 เซนติเมตร ด้วยวิธี HPLC (High Performance Liquid Chromatography) พบสารเคอร์คูมินอยด์ในตัวอย่างแง่มิ้นชัน 6.57%, 6.41%, 7.40, 8.72% และ 9.30% (W/W) ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณสารเคอร์คูมินอยด์มากขึ้นตามขนาดของแง่ที่เพิ่มขึ้น แต่ไม่พบสารเคอร์คูมินอยด์ในตัวอย่างใบ ซึ่งผลที่ได้นี้ไม่สอดคล้องกับการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CHS-like* ด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR โดยการแสดงออกของยีน *CHS-like* ที่พบมากในตัวอย่างแง่มิ้นชันขนาดเล็กและลดลงในแง่ที่มีขนาดยาวขึ้นนั้น อาจเกิดจากอาร์เอ็นเอมีอายุสั้นสลายตัวเร็ว และมีการแปลรหัสเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์สารเคอร์คูมินอยด์ไปแล้วในตัวอย่างแง่มิ้น

ขมื่นชั้นที่มีขนาดยาวขึ้น และมีการสะสมโปรตีนนี้ในตัวอย่างแ่งขมื่นชั้นที่มีขนาดยาวขึ้นเพื่อเตรียมพร้อมและใช้ในการสังเคราะห์สารเคอร์คูมินอยด์ ซึ่งต้องตรวจสอบระดับโปรตีนจึงสามารถบอกผลที่แน่นอนได้ ว่าสารเคอร์คูมินอยด์ที่สังเคราะห์ขึ้นมามีการสะสมจึงเพิ่มปริมาณมากขึ้น หรืออาจเกิดจากผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในระดับอาร์เอ็นเอในครั้งนี้นำมาตรวจสอบจากบริเวณที่เป็นส่วนอนุรักษ์ของยีน *CHS-like* ผลที่ได้จึงมาจากยีนในกลุ่ม *multigene family* ทั้งหมดดังจะพบได้จากผลการแสดงออกของยีน *CHS-like* ที่พบในใบขมื่นชั้น ทั้ง ๆ ที่ไม่มีการสังเคราะห์สารเคอร์คูมินอยด์ในใบ



ภาพที่ 10 ผลจากการทำ semi-quantitative RT-PCR โดย แถวที่ 1 คือ ตัวอย่างใบขมื่นชั้น แถวที่ 2-6 คือตัวอย่างแ่งขมื่นชั้นขนาดยาว น้อยกว่า 1, 1-2, 2-3, 3-4 และมากกว่า 4 เซนติเมตร ตามลำดับ และ P คือ ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณส่วนของยีน *CHS-like* ด้วย คู่ไพรเมอร์ CLF-RNA และ CLR-RNA ภาพด้านล่างเป็นการเพิ่มปริมาณยีน actin จากตัวอย่าง RNA ตัวอย่างเดียวกัน ใช้เป็นตัวควบคุม

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการโคลนยีน *CHS-like* ของขมิ้นชันโดยออกแบบไพรเมอร์จากส่วนอนุรักษ์ของยีน *CHS-like* ของพืชหลายชนิดในฐานข้อมูล และเพิ่มปริมาณยีนที่ต้องการด้วยวิธี nested PCR ทำให้ได้ส่วนของยีน *CHS-like* ซึ่งมีขนาดประมาณ 850 คู่เบส เมื่อนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ไปโคลนในพลาสมิด และตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอจากแต่ละโคลนด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 7 ชนิด ได้แก่ *AluI*, *HinfI*, *MboI*, *RsaI*, *HaeIII*, *HhaI* และ *TaqI* พบว่าเอนไซม์ *AluI*, *HinfI*, *MboI*, *RsaI* เท่านั้นที่สามารถแยกความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอได้ 2, 2, 3, 2 แบบตามลำดับ และพบรูปแบบที่แตกต่างกัน 6 แบบ

จากการทำ Southern blot hybridization พบว่ายีน *CHS-like* ในขมิ้นชันเป็น multigene family มีจำนวนชุดของยีน *CHS-like* อย่างน้อย 5 ชุด

การโคลนยีน *CHS-like* ที่สมบูรณ์ด้วยวิธี TAIL-PCR สามารถโคลนยีนได้ 7 โคลนและจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล พบว่า ตรงกับส่วนของยีน *CHS-like* ของพืชชนิดอื่นที่มีรายงานแล้ว ทั้งนี้เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาทำ multiple alignment สามารถจัดกลุ่มได้ 3 กลุ่ม นั่นคือสามารถโคลนยีน *CHS-like* ที่สมบูรณ์ได้ทั้งหมด 3 ยีน คือ *ClCHS1*, *ClCHS2* และ *ClCHS3* และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์แต่ละกลุ่มมาวิเคราะห์พบว่าประกอบด้วย เอกซอน 2 เอกซอน เอกซอนที่ 1 ประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโน 64 ตัว เอกซอนที่ 2 ประกอบด้วยลำดับกรดอะมิโน 223-330 ตัว และอินทรอน 1 อินทรอน มีขนาด 82-95 คู่เบส หลังจากนั้นจึงทำการเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS-like* ในพืชอื่น พบค่าความเหมือนประมาณ 50-60% เมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่ได้พบบริเวณส่วนอนุรักษ์ของ CHS superfamily enzymes ที่พบในพืชทุกชนิด คือ Cys₁₆₄, His₃₀₃, Asn₃₃₆ และ Phe₂₁₅ พบบริเวณ active site, CoA binding site ของยีน *CHS-like* และพบบริเวณ substrate specificity ของยีน *CHS-like*

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนของยีน *CHS* และ *CHS-like* ของขมิ้นชันและพืชอื่นทั้งหมด 18 ชนิด รวม 29 ยีน มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยทำ phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MrBayes version 3.0b4 พบว่ายีน *ClCHS1*, *ClCHS2* และ *ClCHS3* จัดอยู่ในกลุ่มพืชมีดอกและยีน *CHS-like* ของขมิ้นชันทั้ง 3 ยีนจัดอยู่ในกลุ่มย่อยเดียวกันแยกจากกลุ่มย่อยอื่น

จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *CHS-like* ในขมิ้นชันด้วยวิธี semi-quantitative RT-PCR พบว่า ตัวอย่างขมิ้นชันที่มีขนาดเล็กมีการแสดงออกของยีน *CHS-like* มากกว่าในตัวอย่างขนาดใหญ่ ส่วนการวัดปริมาณสารเคอร์คูมินอยด์จากตัวอย่างขมิ้นชันที่มีขนาดต่าง ๆ กันด้วยวิธี HPLC พบว่ามีปริมาณมากขึ้นตามขนาดของแ่งที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากมีการสะสมของสารเคอร์คูมินอยด์ในแ่งขมิ้นชัน

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์. 2532. โครงการศึกษาวิจัยตลาดพืชสมุนไพรและเครื่องเทศ เล่มที่1.

กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์ กระทรวงพาณิชย์, กรุงเทพฯ.

ชัยพัฒน์ จิระธรรมจารีย์, อารมย์ แสงวนิชย์ และ อุดมลักษณ์ อุ่ณจิตต์วรธนะ. 2535. วิจัยปริมาณ

สารเคอร์คูมินในขมิ้นชัน, น. 20-22. ใน การสัมมนาวิชาการกลุ่มพืชสมุนไพรและเครื่องเทศ. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

เต็ม สมิตินันท์. 2544. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. ครั้งที่ 2. สวนพฤกษศาสตร์ป่าไม้, สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, กรุงเทพฯ.

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2543. ขมิ้น. ใกล้เคียง 24: 59-61.

นันทวรรณ นิยมพลี. 2549. การจำแนกสายพันธุ์ขมิ้นชันในประเทศไทยโดยใช้ Microsatellite markers. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สถาบันวิจัยสมุนไพร. 2544. มาตรฐานสมุนไพรไทย: ขมิ้นชัน. ครั้งที่ 1.

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข โรงพิมพ์ ร.ส.พ., กรุงเทพฯ.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ ปฏิบัติการอาร์เอฟดีและเอฟแอลพี. ครั้งที่ 1. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

องอาจ หาญชาญเลิศ, ฉลองชัย แบบประเสริฐ และยิ่งยง ไพสุขสานติวัฒนา. 2541. การศึกษาการเจริญเติบโตและผลผลิตของขมิ้น: สถาบันวิจัยปากช่อง. เอกสารเผยแพร่โครงการวิจัย KIP 18.36 การวิจัยและพัฒนาพืชสมุนไพรและเครื่องเทศโครงการย่อยที่ 2.1.1 สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต. 2541. ชีวิตเคราะห้แบบคอมบินทอเรียล. ว.เกษตรศาสตร์(วิทย.)

16: 45-54.

- Abe, I., Y. Utsumi, S. Oguro and H. Noguchi. 2004. The first plant type III polyketide synthase that catalyzes formation of aromatic heptaketide. **FEBS Lett.** 562: 171-176.
- Austin, M.B. and J.P. Noel. 2003. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. **Nat. Prod. Rep.** 20: 79-110.
- Agrawal, G.K., R.N. Pandey and V.P. Agrawal. 1992. Isolation of DNA from *Choerospondias asillaris* leaves. **Biotech. Biodiv. Lett.** 2: 19-24.
- Arioli, T., P.A. Howles, J.J. Weinman and B.G. Rolfe. 1994. In *Trifolium subterraneum*, chalcone synthase is encoded by a multigene family. **Gene** 138: 79-86.
- Brand, S., D. Hölscher, A. Schierhorn, A. Svatos, J. Schröder and B. Schneider. 2006. A type III polyketide synthase from *Wachendorfia thyrsiflora* and its role in diarylheptanoid and phenylphenalenone biosynthesis. **Planta** 224: 413-428.
- Chattopadhyay, I., K. Biswas, U. Bandyopadhyay and R.K. Banerjee. 2004. Turmeric and curcumin: biological actions and medicinal applications. **Curr. Sci.** 87: 44-53.
- Chavalittumrong, P. and W. Jirawattanapong. 1992. Variation of active constituents of *Curcuma domestica* rhizomes at different ages. **Thai J. Pharm. Sci.** 16: 165-174.
- Dixon, R.A. 1999. Plant natural products: the molecular genetic basis of biosynthetic diversity. **Curr. Opin. Biotechnol.** 10: 192-197.
- Durbin, M.L., G.H. Learn, G.A. Huttley and M.T. Clegg. 1995. Evolution of the chalcone synthase gene family in the genus *Ipomoea*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 92: 3338-3342.

- Eckermann, S., G. Schröder, J. Schmidt, D. Strack, R.A. Edrada, Y. Helariutta, P. Elomaa, M. Kotilainen, I. Kilpeläinen, P. Proksch, T.H. Teeri and J. Schröder. 1998. New pathway to polyketide in plants. **Nature** 396: 387-390.
- Erk, M.J., E. Teuling, Y. C.M. Staal, S. Huybers, P.J. Bladeren, J. M.M.J.G. Aarts and B.V. Ommen. 2004. Time- and dose-dependent effects of curcumin on gene expression in human colon cancer cells. **J. Carcinogen** 3: 8.
- Farzad, M., D.F. Soria-Hernanz, M. Altura, M.B. Hamilton, M.R. Weiss and H.G. Elmendorf. 2005. Molecular evolution of the chalcone synthase gene family and identification of the expressed copy in flower petal tissue of *Viola cornuta*. **Plant Sci.** 168: 1127–1134.
- Funa, N., Y. Ohinishi, I. Fujii, M. Shibuya, Y. Ebizuka and S. Horinouchi. 1999. A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms. **Nature** 400: 897-899.
- Harashima, S., H. Takano and K. Ono. 2004. Chalcone synthase-like gene in the liverwort, *Marchantia paleacea* var *diptera*. **Plant Cell Rep.** 23: 167-173.
- Hanhineva, K.J. and S.O. Kärenlampi. 2007. Production of transgenic strawberries by temporary immersion bioreactor system and verification by TAIL-PCR. **BMC Biotechnol.** 7: 11-23.
- Helariutta, Y., P. Elomaa, M. Kotilainen, R.J. Griesbach, J. Schröder and T.H. Teeri. 1995. Chalcone synthase-like genes active during corolla development are differentially expressed and encode enzymes with different catalytic properties in *Gerbera hybrida* (Asteraceae). **Plant Mol. Biol.** 28: 47-60.
- Hopwood, D.A. and D.H. Sherman. 1990. Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. **Ann. Rev. Genet.** 24: 37-66.

Huelsenbeck, J.P. and F.R. Ronquist. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny.

Bioinformatics 17: 754-755.

Jain, S.K., J. Rains and K. Jones. 2006. Effect of curcumin on protein glycosylation, lipid peroxidation and oxygen radical generation in human red blood cells exposed to high glucose levels. **Free Rad. Biol. Med.** 41: 92-96.

Jayaprakasha, G.K., L. Jagan, M. Rao and K.K. Sakariah. 2005. Chemistry and biological activities of *C. longa*. **Trends Food Sci. Technol.** 16: 533–548.

Jez, J.M., M.E. Bowman and J.P. Noel. 2002. Expanding the biosynthetic repertoire of plant type III polyketide synthase by altering starter molecule specificity. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 99: 5319-5324.

Ji, Y. and G. Hongya. 2006. Duplication and divergent evolution of the *CHS* and *CHS-like* genes in the chalcone synthase (CHS) superfamily. **Chinese Sci. Bull.** 5: 505-509.

Jinling, W., Q. Lijia, C. Jun, G. Hongya and C. Zhangliang. 2000. Molecular evolution of the exon 2 of *CHS* genes and the possibility of its application to plant phylogenetic analysis. **Chinese Sci. Bull.** 19: 1735-1742.

Keserü, G.M. and M. Nógrádi. 1995. The chemistry of natural diarylheptanoids. **Studies Natur. Prod. Chem.** 17: 357-395.

Koes, R.E., C.E. Spelt, J.N.M. Mol and A.G.M. Gerats. 1987. The chalcone synthase multigene family of *Petunia hybrida* (V30): sequence homology, chromosomal localization and evolutionary aspects. **Plant Mol. Biol.** 10: 375-385.

Liu, Y.G. and R. F. Whittier. 1995. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from PI and YAC clones for chromosome walking. **Genomics** 25: 674-681.

- Lansen, K. 1996. A preliminary checklist of the Zingiberaceae of Thailand. **Thai Forest Bull.** 22: 35-49.
- Lukacin, R., K. Springob, C. Urbanke, C. Ernwein, G. Schröder, J. Schröder and U. Matern. 1999. Native acridone synthases I and II from *Ruta graveolens* L. form homodimers. **FEBS Lett.** 448: 135-140.
- Meng, H., J. Xu, W. Guo, Q. Xu, D. Li and X. Deng. 2005. A protocol for rapid isolation of flanking regions from short known sequence. **Plant Mol. Biol. Rept.** 23: 75a-75g.
- Mazumder, A., K. Raghavan, J. Weinstein, K.W. Kohn and Y. Pommier. 1995. Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 integrase by curcumin. **Biochem. Pharmacol.** 49: 1165-1170.
- Negi, P.S., G.K. Jayaprakasha, L.J.M. Rao and K.K. Sakariah. 1999. Antibacterial activity of turmeric oil: a byproduct from curcumin manufacture. **J. Agric. Food Chem.** 47: 4297-4300.
- Okada, Y. and K. Ito. 2001. Cloning and analysis of valerophenone synthase gene expressed specifically in lupulin gland of hop (*Humulus lupulus* L.). **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 65: 150-155.
- Pang, Y., G. Shen, W. Wu, X. Liu, J. Lin, F. Tan, X. Sun and K. Tang. 2005. Characterization and expression of chalcone synthase gene from *Ginkgo biloba*. **Plant Sci.** 168: 1525-1531.
- Pillai, G.R., A.S. Srivastava, T.I. Hassanein, D.P. Chauhan and E. Carrier. 2004. Induction of apoptosis in human lung cancer cells by curcumin. **Cancer Lett.** 208: 163–170.

- Preisig-Mueller, R., P. Gnau and H. Kindl. 1995. The inducible 9,10-dihydrophenanthrene pathway: characterization and expression of bibenzyl synthase and 5-adenosylhomocysteine hydrolase. **Arch. Biochem. Biophys.** 317: 201-207.
- Ramachandran, K. 1961. Chromosome numbers of genus *Curcuma* Linn. **Curr. Sci.** 30: 194-196.
- Reddy, R.C., P.G. Vatsala, V.G. Keshamouni, G. Padmanaban and P.N. Rangarajan. 2005. Curcumin for malaria therapy. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 326: 472-474.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 2003. **Molecular Cloning : a Laboratory Manual.** 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Schöppner, A. and H. Kindl. 1984. Purification and properties of a stilbene synthase from induced cell suspension cultures of peanut. **J. Biol. Chem.** 259: 6806-6811.
- Schröder, J. 1997. A family of plant-specific polyketide synthase: facts and predictions. **Trends Plant Sci.** 2: 373-378.
- . 1999. Probing plant polyketide biosynthesis. **Nat. Struct. Biol.** 6: 714-716.
- Sharma, R.A., A.J. Gescher and W.P. Steward. 2005. Curcumin: the story so far. **Eur. J. Cancer** 41: 1955-1986.
- Shen, B. 2003. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. **Curr. Opin. Chem. Biol.** 7: 285-295.
- Shen, B. and C.R. Hutchinson. 1993. Enzymatic synthesis of a bacterial polyketide from acetyl and malonyl coenzyme A. **Science** 262: 1535-1540.

- Shi, M., Q. Cai, L. Yao, Y. Mao, Y. Ming and G. Ouyang. 2006. Antiproliferation and apoptosis induced by curcumin in human ovarian cancer cells. **Cell Biol. Int.** 30: 221-226.
- Sommer, H. and H. Saedler. 1986. Structure of the chalcone synthase gene of *Antirrhinum majus*. **Mol. Gen. Genet.** 202: 429-434.
- Suh, D-Y., K. Fukuma, J. Kagami, Y. Yamazaki, M. Shibuya, Y. Ebizuka and Sankawa U. 2000. Identification of amino acid residues important in the cyclization reactions of chalcone and stilbene synthases. **Biochem. J.** 350: 229-235.
- Terauchi, R. and G. Kahl. 2000. Rapid isolation of promoter sequences by TAIL-PCR: the 5' flanking regions of *Pal* and *Pgi* genes from yams (*Dioscorea*). **Mol. Gen. Genet.** 263: 554-560.
- Thamchipenet, A. 1999. Multiple domain substitutions of erythromycin polyketide synthase to produce a combinatorial library. **Actinomycetologica** 13: 113-119.
- Tomita, M., B. Holman, C.P. Santoro and T.J. Santoro. 2005. Astrocyte production of the chemokine macrophage inflammatory protein-2 is inhibited by the spice principle curcumin at the level of gene transcription. **J. Neuroinflam.** 2: 8.
- Tropf, S., T. Lanz, S.A. Rensing, J. Schröder and G. Schröder. 1993. Evidence that stilbene have developed from chalcone synthase several times in the course of evolution. **J. Mol. Evol.** 38: 610-618.
- Weissensteiner, T., H.G. Griffin and A. Griffin. 2004. **PCR Technology Current Innovations.** 2 ed. CRC Press LLC, New York.
- Wu, W.W., M.J. Welsh, P.B. Kaufman and H.H. Zhang. 1997. **Method in Gene Biotechnology.** CRC Press, New York.

ภาคผนวก

ClCHS2	-----CAGCTAGCGCTA-----CAAGTAGCGGTAGATCTCCTC	33
ClCHS3	-----CAGCTAGCGCTA-----CAAGTAGCAGTAGATCTCCTC	33
ClCHS1	CATCCGCTCGCATTGAGAAGAAACAGCTAGCGCTAGCTACAAGTAGCAGTAGATCTCCTC	60
ClCHS2	ATACATAACG----ACGATGAATTCTTTGGCGGCGGCAAGATTGCGGAGCTGCGCGAGG	89
ClCHS3	ATACATAACGTACGACGATGAATTCTTTGGCGGCGAGCAAGGATTGCGGAGCTGCGCGAGG	93
ClCHS1	ATACATAACGT----CGATGAATTCTTTGGCGGCGAGCAAGGATTGCGGAGCTGCGCGAGG	116
ClCHS2	CGCAGCGAGCGACAGGCCCGCCGCTATCTTGCCATCGGCACCGCCAACCCCGTCGGCA	149
ClCHS3	CGCAGCGAGCGACAGGCCCGCCGCTATCTTGCCATCGGCACCGCCAACCCCGTCGGCA	153
ClCHS1	CGCAGCGAGCGACAGGCCCGCCGCTATCTTGCCATCGGCACCGCCAACCCCGTCGGCA	176
ClCHS2	ACTTGTTAGACCAAGAAAGCTTCGCCGACTACTACTTCAAGATCACCAAGAGCGAACACT	209
ClCHS3	ACTTGTTAGACCAAGAAAGCTTCGCCGACTACTACTTCAAGATCACCAAGAGCGAACACT	213
ClCHS1	ACTTGTTAGACCAAGAAAGCTTCGCCGACTACTACTTCAAGATCACCAAGAGCGAACACT	236
ClCHS2	TGCAACCTCTTAAAGAAAACTTAAGATCATATGTGCGCAATTCATATACGATCGATATA	269
ClCHS3	TGCAACCTCTTAAAGAAAACTTAAGATCATATGTGCGCAATTCATATACGATCGATATA	273
ClCHS1	TGCAACCTCTTAAAGAAAACTTAAGATCATATGTGCGCAATTCATATACGATCGATCTA	296
ClCHS2	TCTATCTTTAGCTAGCATTTTATATGCG-----GTAACTAATAATGATAC	316
ClCHS3	TCTATCTATCTTTAGCATTTTATATGTG-----GTAACTAATAATGATAC	320
ClCHS1	TCTATCTATCTTTAGCATTTTATATATGCGTTATTAATTAATTAATAATGATAC	356
ClCHS2	GCATGCAGGTGATCGATCGACTGTGAAGACTCGCTATGCGGCATGACGGAGGAGCTGCT	376
ClCHS3	GCATGCAGGTGATCGATCGACTGTGAAGACTCGCTATGCGCACATGACGGAGGAGCTGCT	380
ClCHS1	GCATGCAGGTGATCGATCGACTGTGAAGACTCGCTATGCGCACATGACGGAGGAGCTGCT	416
ClCHS2	GGAGCAATACCCAGCATACGGAACCCTAACGAGGCCTCCTTGAGGCTCGCCTCGGCGT	436
ClCHS3	GGAGCAATACCCAGCATACGGAACCCTAACGAGGCCTCCTTGAGGCTCGCCTCAGCGT	440
ClCHS1	GGAGCAATACCCAGCATTCGGAACCCTAACGAGGCCTCCTTGAGGCTCGCCTCGGCGT	476
ClCHS2	CATGATCGACTCAGTGCCCGAGCTGGGCAAGGAAGCCGCTCTCAGAGCGCTCAAGGAGTG	496
ClCHS3	CATGATCGACTCAGTGCCCGAGCTGGGCAAGGAAGCCGCTCTCAGGGCGCTCAAGGAGTG	500
ClCHS1	CATGATCGACTCGGTGCCCGAGCTGGGCAAGGAAGCCGCTCTCAGGGCGCTCAAGGAGTG	536
ClCHS2	GGGGCGCCCATGTGAGCATCACCCACGTCGTCTTCTGCGCCGGCGCAGGGGTCGACAT	556
ClCHS3	GGGGCGCCCATGTGAGCATCACCCACGTCGTCTTCTGCGCCGGCGCAGGGGTCGACAT	560
ClCHS1	GGGGCGCCCATGTGAGCATCACCCACGTCGTCTTCTGCGCCGGCGCAGGGGTCGACAT	596
ClCHS2	GCCCGGCGCCGACTACCAGCTGGTCAGGCGCCTCGGGCTGTCCCCCTCCGTCAAACGGGT	616
ClCHS3	GCCCGGCGCCGACTACCAGCTGGTCAGGCGCCTCGGGCTGTCCCCCTCCGTCAAACGGGT	620
ClCHS1	GCCCGGTGCGGACTACCAGCTGGTCAGGCGCCTCGGGCTGTCCCCCTCCGTCAAACGGGT	656
ClCHS2	CATGATGTACCACCTCGGGTGCTACGGCGGCGGACGGTTCTCCGCGTCGCCAAGGACAT	676
ClCHS3	CATGATGTACCACCTCGGGTGCTACGGTGGCGGCGGACGGTTCTCCGCGTCGCCAAGGACAT	680
ClCHS1	CATGATGTACCACCTCGGGTGCTACGGCGGCGGCGGACGGTTCTCCGCGTCGCCAAGGACAT	716
ClCHS2	CGTCGAGAACGACAGGGACGCTCGGGTGCTGACCGTGAACGTGGAGCTCTGCACGTGTCAG	736
ClCHS3	CGTCGAGAACGACAGGGACGCTCGGGTGCTGACCGTGAACGTGGAGCTCTGCACCGTCAG	740
ClCHS1	CGTCGAGAACGATAGGGACGCTCGGGTGCTGACCGTGAACGTGGAGCTCTGCACCGTCAG	776

ภาพผนวกที่ 1 แสดงผลที่ได้จากการทำ multiple alignment ของยีน *ClCHS1*, *ClCHS2* และ *ClCHS3* โดยแถบสีเทาแสดงบริเวณที่แตกต่างกันของยีนทั้งสาม กรอบสี่เหลี่ยมแสดงรหัสเริ่มแปลรหัส (ATG), รหัสหยุดแปลรหัส (TAA) และส่วนอินทอน

ClCHS2	TTCTTTCCGGGGGACGGAGGGAATCTCGCTGGACACGCTCGTCGCCAGGCGCTCTTCGG	796
ClCHS3	TTCTTTCCGGGGGACGGAGGGAATCTCGCTGGACACGCTCGTCGCCAGGCGCTCTTCGG	800
ClCHS1	TTCTTTCCGGGGGACGGAGGGAATCTCGCTGGACACGCTCGTCGCCAGGCGCTCTTCGG	836
ClCHS2	TGACGGCGCCGCCGCGCTGGTCTGTGGGCGCCGACCCCATCGAAGGGGTCGAGAATCCGAT	856
ClCHS3	TGACGGCGCCGCCGCGCTGGTCTGTGGGCGCCGACCCCATCGAAGGGGTCGAGAATCCGAT	860
ClCHS1	TGACGGCGCCGCCGCGCTGGTCTGTGGGCGCCGACCCCATCGAAGGGGTCGAGAATCCGAT	896
ClCHS2	CTTCGAGATGGCGTTTCGCGGCGCAGACCATACTGCCGGAGAGCGAGGGGAAGATACTGGG	916
ClCHS3	CTTCGAGATGGCGTTTCGCGGCGCAGACCATACTGCCGGAGAGCGAGGGGAAGATACTGGG	920
ClCHS1	CTTCGAGATGGCGTTTCGCGGCGCAGACCATACTGCCGGAGAGCGAGGGGAAGATACTGGG	956
ClCHS2	TCAGTTGAAGGAGAACGGTCTGCGCGTCCACTTGGACGGGAGGTTCCCCAGATCGTCGC	976
ClCHS3	TCAGTTGAAGGAGAACGGTCTGCGCGTCCACTTGGACGGGAGGTTCCCCAGATCGTCGC	980
ClCHS1	TCAGTTGAAGGAGAACGGTCTGCGCGTCCACTTGGACGGGAGGTTCCCCAGATCGTCGC	1016
ClCHS2	CGGCAACATCGAGACCAGCTTAGTGACGCTCTGAAGCAGTTTCGGCGTCTCGGACTGGAA	1036
ClCHS3	CGGCAACATCGAGACCAGCTTAGTGACGCTCTGAAGCAGTTTCGGCGTCTCGGACTGGAA	1040
ClCHS1	CGGCAACATCGAGACCAGCTTAGTGACGCTCTGAAGCAGTTTCGGCGTCTCGGACTGGAA	1076
ClCHS2	CTCCATATTCTGGGTGGCGCACCCCGGCGGCCCTGCCATCCTCAACCAAGTGGAGGCCAA	1096
ClCHS3	CTCCATATTCTGGGTGGCGCACCCCGGCGGCCCTGCCATCCTCAACCAAGTGGAGGCCAA	1100
ClCHS1	CTCCATATTCTGGGTGGCGCACCCCGGCGGCCCTGCCATCCTCAACCAAGTGGAGGCCAA	1136
ClCHS2	GCTGCAGCTAAGCCCGAGAAGCTCCGGGCGACGCGGCACGTGCTTCGGGAGTTCGGGAA	1156
ClCHS3	GCTGCAGCTAAGCCCGAGAAGCTCCGGGCGACGCGGCACGTGCTTCGGGAGTTCGGGAA	1160
ClCHS1	GCTGCAGCTAAGCCCGAGAAGCTCCGGGCGACGCGGCACGTGCTTCGGGAGTTCGGGAA	1196
ClCHS2	CATGTCGAGCGCCACCGTGCTCTTCATCCTCGACCGCATGAGGAAACAGTCAGCAGCGGA	1216
ClCHS3	CATGTCGAGCGCCACCGTGCTCTTCATCCTCGACCGCATGAGGAAACAGTCAGCAGCGGA	1220
ClCHS1	CATGTCGAGCGCCACCGTGCTCTTCATCCTCGACCGCATGAGGAAACAGTCAGCAGCGGA	1256
ClCHS2	GGGGCATGCAACCACCGGAGAGGGGCTCGAGTGGGGAATACTCTGCGGCCTTGCCCCGG	1276
ClCHS3	GGGGC-----TCGAGTGGGGAATACTCTGCGGCCTTGCCCCGG	1259
ClCHS1	GGGGCATGCAACCACCGGAGAGGGGCTCGAGTGGGGAATACTCTGCGGCCTTGCCCCGG	1316
ClCHS2	CATCACGCTTGAGACGGTGGTGCTCCACAGCGTGCCGATCTAAGGCATATATCATCCGGA	1336
ClCHS3	CATCACGCTTGAGACGGTGGTGCTCCACAGCGTGCCGATCTAAGGCATATATCATCCGGA	1319
ClCHS1	CATCACGCTTGAGACGGTGGTGCTCCACAGCGTGCCGATCTAAGGCATATATCATCCGGA	1373
ClCHS2	TGATATTATATACATCATTTTCTCTCATATATCACTCAGGGAG-----	1381
ClCHS3	TGATATTATATACATCATTTTCTCTCATATATCACTCAGGGAGAAATGTTATAATATT	1379
ClCHS1	T--TCTTGATGCCCGT-AATTCTGCAACGC-----	1402
ClCHS2	-----	
ClCHS3	ATACATGCATCTAAACCCTAAAATAG	1405
ClCHS1	-----	

ภาพผนวกที่ 1 (ต่อ)

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวศิริรัตน์ วรรณภินพวงศ์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	17 พฤษภาคม 2526
สถานที่เกิด	อุบลราชธานี
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนคุณภาพงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ปี 2550