

การโคลนยีนลิโมนีนในจีนเทสจาก *Mentha cordifolia* Opiz. และ
การแสดงออกของยีนในแบคทีเรีย *Escherichia coli*

CLONING OF LIMONENE SYNTHASE GENE OF
Mentha cordifolia Opiz. AND ITS EXPRESSION
IN *Escherichia coli*

เนตรนภา ปัญญามูต
NETNAPA PUNYAMOON

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัยตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2552

KMITL-2009-SC-M-029-085

การโคลนยีนลิโมนีนซินเทสจาก *Mentha cordifolia* Opiz. และการแสดงออก
ของยีนในแบคทีเรีย *Escherichia coli*

CLONING OF LIMONENE SYNTHASE GENE OF *Mentha cordifolia* Opiz.
AND ITS EXPRESSION IN *Escherichia coli*



เนตรนภา ปัญญามูล
NETNAPA PUNYAMOON

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 105265
วันเดือนปี 17 พ.ย. 2552



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ 2552

KMITL-2009-SC-M-020-035

**CLONING OF LIMONENE SYNTHASE GENE OF *Mentha cordifolia* Opiz.
AND ITS EXPRESSION IN *Escherichia coli***

NETNAPA PUNYAMOON

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2009

KMITL-2009-SC-M-020-035

COPYRIGHT 2009

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การโคลนยีนลิโมนีนซินเทสจาก *Mentha cordifolia* Opiz. และการแสดงออกของยีนใน
แบคทีเรีย *Escherichia coli*
Cloning of Limonene Synthase Gene of *Mentha cordifolia* Opiz. and Its Expression in
Escherichia coli

นักศึกษา นางสาวเนตรนภา ปัญญามูล

รหัสประจำตัว 47063905

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ดร.นงลักษณ์ เกรินทวงศ์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.สรัญญา	พันธุ์พฤกษ์	
ผศ.ดร.พนา	โลหะทรัพย์ทวี	
ดร.นงลักษณ์	เกรินทวงศ์	
ผศ.ดร.กัญจนา	แซ่เดียว	
ผศ.นวรรตน์	ปานเข้ม	

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

วัน / เดือน / ปี ที่สอบ 22 พฤษภาคม 2552 เวลา 13.00 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ อาคารบุณนาค ห้องประชุม 1

คณะวิทยาศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีรวัฒน์ มงคลอัครวัฒน์)

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

วันที่... 28 ...เดือน... พ.ค.พ.ศ. 2552.

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การโคลนยีนลิโมนีนซินเทสจาก <i>Mentha cordifolia</i> Opiz. และการแสดงออกของยีนในแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i>
ชื่อนักศึกษา	นางสาวเนตรนภา ปัญญามูล
รหัสประจำตัว	47063905
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2552
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ทวี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร. นงลักษณ์ เกรินทวงศ์

บทคัดย่อ

การสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบของ *Mentha cordifolia* Opiz. และนำมาวิเคราะห์หาลิโมนีนโดยใช้เทคนิค Gas chromatography-mass spectrum เพื่อยืนยันว่าในน้ำมันหอมระเหยมีลิโมนีนเป็นส่วนประกอบ จากนั้นเพิ่มปริมาณยีนลิโมนีนซินเทสโดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และนำมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์จำนวน 1,803 คู่เบส โดยลำดับนิวคลีโอไทด์มีความเหมือนกับยีนลิโมนีนซินเทสจาก *Mentha spicata* และ *Mentha longifolia* ที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้มากที่สุด คือเท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์ และลำดับกรดอะมิโนของยีนลิโมนีนซินเทสยังมีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของยีนลิโมนีนซินเทสจาก *M. spicata* และ *M. longifolia* มากที่สุด คือเท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์ และยังพบว่ามีโครงสร้างของ RR และ DDXXD motif ที่จะพบในยีนโมโนเทอร์ปีนส์ซินเทสทุกชนิด จากนั้นโคลนยีนลิโมนีนซินเทสโดยใช้เวกเตอร์ pET-32a(+) ภายใต้การควบคุมของ T7 promoter จากนั้นถ่ายโอนยีนเข้าแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE) และชักนำให้เกิดการแสดงออกใน *E. coli* แล้วนำมาวิเคราะห์หาแถบโปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGE และพบว่ารีคอมบิแนนต์โปรตีนที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 70 กิโลดาลตัน

Thesis	Cloning of Limonene Synthase Gene of <i>Mentha cordifolia</i> Opiz. and its Expression in <i>Escherichia coli</i>
Student	Miss Netnapa Punyamoon
Student ID	47063905
Degree	Master of Science
Program	Biotechnology
Year	2009
Thesis Advisor	Assist. Prof. Dr. Pana Lohasupthawee
Thesis Co-Advisor	Dr. Nonglak Parintawong

ABSTRACT

Gas chromatography-mass spectrum analyses confirmed the present of limonene in the leaves extracts of *Mentha cordifolia* Opiz. The limonene synthase gene has been amplified from *M. cordifolia* using a PCR technology. Sequencing of the observed limonene synthase gene contained 1,803 bp and gave a maximum of 98% identity to the published sequence of limonene synthase mRNA from *Mentha spicata* and *Mentha longifolia*. The predicted protein of limonene synthase showed 97% identity to that of limonene synthase from *M. spicata* and *M. longifolia* at the amino acid level and possessed the typical structure of sequence motifs of RR and DDXXD of general monoterpene synthase. The observed limonene synthase gene has been cloned into expression vector pET-32a(+) under the control of T7 promoter. The construct has been transformed into *E. coli* BL21(DE3). After its expression in *E. coli*, the extra protein band of limonene synthase has been observed by SDS-PAGE. Its molecular weight was about 70 kilodaltons.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือจากอาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. พนา โลหะทรัพย์ ทวี และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร.นงลักษณ์ เกรินทวงศ์ ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำชี้แนะช่วย แก้ปัญหาตลอดจนให้ความรู้ที่ดี รวมทั้งตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พุกภัย ผศ. นวรัตน์ ปานแย้ม และ ผศ.ดร. กัญญา แซ่เตียว กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาสละเวลาตรวจสอบให้คำแนะนำ ตลอดจนแก้ไข ให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้

ขอขอบพระคุณ ดร. กัญญา จิระเจริญรัตน์ ดร.อรอุมา รุ่งน้อย ดร.คมแข พิลาสมบัติ และ ผศ.มนทินี ชีรารักษ์ ที่ให้คำปรึกษาและชี้แนะแนวทางการทำวิจัย รวมทั้งได้อนุเคราะห์วัสดุที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณ รศ.ดร. สรัญญา วัชรโรทัย ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ ม. เกษตรศาสตร์ ที่ให้คำปรึกษาและแนะนำเกี่ยวกับชื่อวิทยาศาสตร์ของพืชที่ใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณ โครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณงานพัฒนาส่งเสริมสมุนไพร มูลนิธิโครงการหลวง จังหวัดเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์พืชตัวอย่างสำหรับใช้ในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ให้ความอนุเคราะห์สายพันธุ์แบคทีเรียและเวกเตอร์เพื่อใช้ในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณคุณจำลอง ยิมสุโท คุณอภัสสร ปะลาวัน คุณณัฐกานต์ สุโกมล รวมทั้งพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ทั้งคณะวิทยาศาสตร์ และคณะเทคโนโลยีการเกษตร ที่ช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพ เกษตร สำนักงานพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

สำหรับความอดทนอดกลั้นที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบให้กับบิดา มารดา ซึ่งเป็นที่รักและเคารพยิ่ง

เนตรนภา ปัญญามูล

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	VIII
สารบัญรูป.....	IX
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 สารเทอร์พีนส์และสารอนุพันธ์ของเทอร์พีนส์ (terpene derivatives).....	4
2.2 สารโมโนเทอร์พีนส์ (monoterpene)	7
2.3 กลไกการสังเคราะห์ลิโมนีน (limonene synthesis mechanism).....	9
2.4 สาระแทน.....	11
2.5 การโคลนยีน (gene cloning).....	12
2.5.1 RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction).....	12
2.5.2 ขั้นตอนการโคลนยีน.....	14
2.6 การแสดงออกของยีน (gene expression).....	15
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	19
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	25
3.1 พืชทดลอง.....	25
3.2 เชื้อจุลินทรีย์.....	25
3.3 สารเคมี.....	25
3.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	25

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3.2 ยาปฏิชีวนะ.....	25
3.3.3 เอนไซม์.....	25
3.3.4 ดีเอ็นเอมาตรฐาน.....	26
3.3.5 เวกเตอร์.....	26
3.3.6 เคมีภัณฑ์สำหรับสกัดน้ำมันหอมระเหย.....	26
3.3.7 เคมีภัณฑ์สำหรับศึกษาดีเอ็นเอ.....	26
3.3.8 ชุดทดสอบ (kit).....	27
3.3.9 โพรตีนมาตรฐาน.....	27
3.3.10 เคมีภัณฑ์สำหรับการศึกษาโพรตีน.....	27
3.4 อุปกรณ์.....	28
3.5 สถานที่ทำการวิจัย.....	29
3.6 วิธีการศึกษา.....	30
3.6.1 การวิเคราะห์หาสัดส่วนของลิโมนีนเทียบกับสารเคมีชนิดอื่นที่พบ ในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากใบของ <i>M. cordifolia</i> Opiz.....	30
3.6.2 การสร้าง cDNA จาก mRNA ของ McLMS ด้วยวิธี RT-PCR.....	31
3.6.3 การโคลนยีน McLMS.....	35
3.6.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ยีน McLMS.....	39
3.6.5 การศึกษาการแสดงออกของยีน McLMS ในแบคทีเรีย <i>E. coli</i>	40
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	46
4.1 การวิเคราะห์หาสัดส่วนของลิโมนีนเทียบกับสารเคมีชนิดอื่นที่พบใน น้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากใบของ <i>M. cordifolia</i> Opiz.....	46
4.2 การสร้าง cDNA จาก mRNA ของ McLMS ด้วยวิธี RT-PCR.....	49
4.2.1 การสกัดอาร์เอ็นเอจากใบของ <i>M. cordifolia</i> Opiz.....	49
4.2.2 การเพิ่มปริมาณยีน McLMS โดยใช้ชุด SuperScript III One-Step RT-PCR System ด้วยเอนไซม์ Platinum Taq DNA Polymerase.....	50
4.3. การโคลนยีน McLMS.....	51
4.3.1 การทดสอบพลาสมิดดีเอ็นเอถูกผสมโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส.....	52

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3.2 การทดสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมโดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Not I</i> หรือ <i>Nco I</i>	54
4.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ RT-PCR จากโคลน cMcLMS1, cMcLMS2, cMcLMS3 และ cMcLMS4.....	57
4.5 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน McLMS กับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนลิโมนีนซินเทสในพืชกลุ่ม <i>Mentha</i> spp. ที่ มีรายงานไว้ในธนาคารยีน.....	63
4.6 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ McLMS กับเอนไซม์ในกลุ่มโมโนเทอร์ปีนส์ซินเทสในสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีรายงานไว้ใน ธนาคารยีน.....	67
4.7 การหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (phylogenetic tree).....	75
4.8 การศึกษาการแสดงออกของยีน McLMS ในแบคทีเรีย <i>E. coli</i>	78
4.8.1 การเพิ่มปริมาณยีน McLMS ที่มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ <i>Bam</i> HI และ <i>Not I</i> อยู่ส่วนหัวและท้าย.....	78
4.8.2 การโคลนยีน McLMS.....	78
4.8.3 การทดสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส...78	
4.8.4 การทดสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam</i> HI หรือ <i>Not I</i>	80
4.8.5 การถ่ายโอนยีน (transformation) ลงในแบคทีเรีย <i>E. coli</i> สายพันธุ์ BL21(DE3).....	84
4.8.6 การเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนต์โปรตีน.....	84
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	87
บรรณานุกรม.....	89
ภาคผนวก ก.....	95
ภาคผนวก ข.....	98

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก ค.....	106
ประวัติผู้เขียน.....	108

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 แสดงสถานะที่ใช้ในการแยกองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจาก <i>M. cordifolia</i> Opiz. โดยเครื่อง GC-MS.....	31
3.2 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการกำจัดดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ DNase I.....	32
3.3 ส่วนประกอบในการเพิ่มปริมาณยีน McLMS ด้วยเทคนิค one step RT-PCR	33
3.4 สถานะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน McLMS ด้วยเทคนิค one step RT-PCR.....	34
3.5 องค์ประกอบในการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ RT-PCR เข้ากับดีเอ็นเอพาหะ.....	36
3.6 ส่วนประกอบในการเพิ่มปริมาณยีน McLMS โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	38
3.7 สถานะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน McLMS โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	38
3.8 องค์ประกอบของปฏิกิริยาการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Not I</i> หรือ <i>Nco I</i>	39
3.9 ส่วนประกอบในการเพิ่มปริมาณยีน McLMS โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส.....	40
3.10 องค์ประกอบในการเตรียมผลิตภัณฑ์พีซีอาร์และดีเอ็นเอพาหะให้มีบริเวณจดจำของ เอนไซม์ <i>Bam HI</i> และ <i>Not I</i> บริเวณส่วนหัวท้าย.....	41
3.11 องค์ประกอบในการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เข้ากับดีเอ็นเอพาหะ.....	42
3.12 องค์ประกอบในการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Bam HI</i> หรือ <i>Not I</i>	43
3.13 องค์ประกอบของ stacking gel และ separating gel	45
4.1 แสดงองค์ประกอบของสารเคมีหลักที่พบในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากใบของ <i>M. cordifolia</i> Opiz.....	48
4.2 แสดงการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน McLMS กับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนลิโมนีนซินเทสในพืชกลุ่ม <i>Mentha</i> spp. ที่มีรายงานไว้ใน ธนาคารยีน.....	67
4.3 แสดงการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของยีน McLMS กับลำดับ กรดอะมิโนของยีนเอนไซม์ในกลุ่มโมโนเทอร์ปีนสังเคราะห์.....	75

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 กลไกการสังเคราะห์สารเทอร์ปีนส์และสารอนุพันธ์ของเทอร์ปีนส์.....	5
2.2 สารเทอร์ปีนส์ที่ผลิตจากสารตั้งต้นชนิดต่างๆ.....	6
2.3 ตัวอย่างสาร โมโนเทอร์ปีนส์.....	8
2.4 แสดงสูตร โครงสร้างของลิโมนีน.....	9
2.5 แสดงการสังเคราะห์ลิโมนีนโดยมีเจอร์รานิลไดฟอสเฟตเป็นสารตั้งต้น.....	10
2.6 ต้นสะระแหน่ (<i>Mentha cordifolia</i> Opiz.).....	12
2.7 แสดงแบบจำลอง inducible operon.....	18
4.1 แสดงโครมาโตแกรมจากเครื่อง GC-MS จากการวิเคราะห์ห้องค้ำประกอบของสารเคมี ที่สกัดจากใบของ <i>M. cordifolia</i> Opiz.....	47
4.2 แสดงอาร์เอ็นเอทั้งหมดที่สกัดได้จาก <i>M. cordifolia</i> Opiz. โดยใช้ชุดสกัด Tri reagent.....	49
4.3 แสดงผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน McLMS.....	50
4.4 แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการทดสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลน cIMcLMS1, cIMcLMS2, cIMcLMS3 และ cIMcLMS4.....	53
4.5 แสดงพลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS1, cIMcLMS2, cIMcLMS3 และ cIMcLMS4 ตัดด้วยเอนไซม์ <i>Not</i> I หรือ <i>Nco</i> I เพื่อทดสอบการมีชิ้นส่วนของ ผลิตภัณฑ์ RT-PCR.....	55
4.6 แสดง restriction map ของยีน McLMS ในเวกเตอร์ pGEM-T easy เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ <i>Not</i> I และ <i>Nco</i> I.....	56
4.7 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของผลิตภัณฑ์ RT-PCR จากโคลน cIMcLMS1, cIMcLMS2, cIMcLMS3 และ cIMcLMS4.....	58
4.8 แสดงการวิเคราะห์ multiple alignment ของยีนลิโมนีนซินเทสของพืชในกลุ่ม <i>Mentha</i> spp. กับยีน McLMS.....	63
4.9 แสดงการวิเคราะห์ multiple alignment ของยีนในกลุ่ม โมโนเทอร์ปีนส์ซินเทสกับยีน McLMS	69
4.10 แสดงแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมของเอนไซม์ลิโมนีนซินเทสจากสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ โดย โปรแกรม MEGA4.....	76
4.11 แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการทดสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลน cIMcLMS1/1, cIMcLMS1/2, cIMcLMS1/3 และ cIMcLMS1/41.....	79

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

4.12 แสดงพลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS1/1, cIMcLMS1/2, cIMcLMS1/3 และ cIMcLMS1/4 ตัดด้วยเอนไซม์ <i>Bam</i> HI หรือ <i>Not</i> I เพื่อทดสอบการมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์.....	82
4.13 แสดง restriction map ของยีน McLMS ในเวกเตอร์ pET32a (+).....	83
4.14 แสดงผลการวิเคราะห์โปรตีนก่อนและหลังชักนำให้ผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ ลิโมนีนซินเทสในชั่วโมงที่ 3 และ 6 จากโคลน cIMcLMS1/1-1, cIMcLMS1/2-1 และ cIMcLMS1/4-1.....	86

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ลิโมนีนเป็นสารเคมีชนิดหนึ่งที่พบในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากพืชจัดอยู่ในกลุ่มสารเทอร์พีนส์และสารอนุพันธ์ของเทอร์พีนส์ (terpene derivatives) ถ้าแยกย่อยตามจำนวนของไอโซพรีน [isoprene (C_5H_8) units] ลิโมนีนจัดเป็นโมโนเทอร์พีนส์ชนิดวงแหวนเดียว (monocyclic monoterpene) เนื่องจากมีจำนวนของไอโซพรีน 1 ชุด (Maruyama *et al.*, 2002) การสังเคราะห์ลิโมนีนเกิดที่บริเวณพลาสต์ของ secretory cell โดยอาศัยเอนไซม์ลิโมนีนซินเทส (limonene synthase, LMS) ที่ผลิตในนิวเคลียสโดยอาศัยกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนของสารพันธุกรรม และส่งมาทำหน้าที่ที่พลาสต์ (Greene and Rao, 1998)

การใช้ประโยชน์จากลิโมนีนมีหลายด้าน ส่วนใหญ่นำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น ในอุตสาหกรรมอาหาร ใช้ลิโมนีนเป็นส่วนประกอบที่ใส่เพิ่มลงไปในการเพื่อเพิ่มกลิ่นหอมให้กับผลิตภัณฑ์อาหารนั้นๆ ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางจะผสมลิโมนีนลงไปในการผลิตกลิ่นทำให้ความสะอาดต่างๆ เพื่อให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นหอมน่าใช้ บางอุตสาหกรรมใช้ลิโมนีนเป็นตัวทำละลายเนื่องจากลิโมนีนไม่มีความเป็นพิษ เป็นของเหลวที่ไม่มีขี้ขี้ จึงนำมาใช้แทนตัวทำละลายอื่นๆ ที่เป็นพิษ หรือใช้แทนสารที่ถูกห้ามใช้ เช่น methyl ethyl ketone (MEK), xylene (dimethylbenzene) หรือ chlorofluorocarbons (CFCs) ลิโมนีนสามารถสลายตัวได้ไวกลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ส่วนในด้านการเกษตรใช้ลิโมนีนในการป้องกันไม่ให้แมลงเข้ามากัดกินทำลายพืชผลและยังสามารถนำไปปรับปรุงพันธุ์พืชให้มีการผลิตลิโมนีน เพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับพืชผลทางการเกษตร เช่น การตัดต่อยีนลิโมนีนซินเทสจากพืชที่มีการผลิตลิโมนีน ให้กับพืชที่ไม่มีการผลิตลิโมนีน ในด้านการแพทย์พบว่าลิโมนีนมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านเซลล์มะเร็งในสัตว์ (Sun, 2007) เนื่องจากสัตว์ไม่สามารถผลิตลิโมนีนขึ้นมาได้ ดังนั้นงานวิจัยในอดีตใช้การรับประทานอาหารที่มีลิโมนีนในระดับสูงเข้าไป และวัดอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (Crowell, 1999; Tsuda *et al.*, 2004) แต่ในปัจจุบันมีงานวิจัยที่ใช้เทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรมในการตัดต่อยีนลิโมนีนซินเทสจากพืชที่มีการผลิตลิโมนีนให้กับสัตว์ ทำให้ร่างกายของสัตว์สามารถผลิตลิโมนีนได้เอง (Satomi *et al.*, 2009)

ในงานวิจัยนี้ศึกษาการโคลนและการแสดงออกของยีนลิโมนีนซินเทส เพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างของเอนไซม์ในระดับนิวคลีโอไทด์ การเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์ และการเรียงตัวของกรดอะมิโน ศึกษาการแสดงออกของยีนลิโมนีนซินเทสที่ได้จาก *Mentha cordifolia* Opiz.

(McLMS) ในแบคทีเรีย *Escherichia coli* นอกจากนี้ข้อมูลทางพันธุกรรมของยีนลิโมนินซินเทส จาก *M. cordifolia* Opiz. ที่ได้ยังสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานให้กับนักวิจัยที่ต้องการข้อมูลดังกล่าว ไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น พัฒนาสิ่งมีชีวิตที่ได้รับการตัดต่อยีนลิโมนินซินเทส จาก *M. cordifolia* Opiz. ให้มีการผลิตลิโมนินหรือให้มีการผลิตเพิ่มมากขึ้น เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ ในด้านต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นในด้านอุตสาหกรรม เกษตรกรรม หรือในด้านการแพทย์

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 เพื่อโคลนยีนลิโมนินซินเทสจากส่วนใบของ *M. cordifolia* Opiz. เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนกับเอนไซม์โมโนเทอร์พีนซินเทส ในพืชชนิดอื่นๆ ที่มีรายงานในธนาคารยีน
- 1.2.2 เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนที่เป็นรหัสสำหรับเอนไซม์ลิโมนินซินเทสภายในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli*

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

สกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด (total RNA) โดยใช้ชุดสกัด Tri Reagent จากใบอ่อนของ *M. cordifolia* Opiz. เติมเอนไซม์ DNase ลงในอาร์เอ็นเอทั้งหมด เพื่อย่อยดีเอ็นเอที่อาจปนเปื้อนมากับอาร์เอ็นเอ จากนั้นสังเคราะห์ cDNA โดยเทคนิครีเวอร์ส ทรานสคริปชัน (reverse transcription) ออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนลิโมนินซินเทสจากพืชชนิดอื่นๆ ในตระกูลมินต์ (*Mentha* spp.) ที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ในธนาคารยีน และเพิ่มปริมาณยีนโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมาวิเคราะห์หาขนาดโดยใช้วิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน และตัดเจลบริเวณแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดที่ต้องการ นำไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด RNA purification Kit (Qiagen, Germany) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมาเชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pGEM-T easy และถ่ายลงในคอมพีเทนดเซลล์ของ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 โดยวิธี heat shock เซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนจะถูกเลือกโดยใช้วิธี blue white screening นำเซลล์ที่ได้รับการถ่ายยีนเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ข้ามคืน จากนั้นสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอออกมาและนำไปตรวจสอบโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not I* หรือ *Nco I* และนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้เครื่อง sequencer จากนั้นแปลลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นลำดับกรดอะมิโน และนำไปเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนกับยีนโมโนเทอร์พีนซินเทสจากพืช

ชนิดอื่นๆ ที่มีรายงานในธนาคารยีน และหาบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ที่มีความสำคัญต่อการทำหน้าที่ของเอนไซม์ จากนั้นทำให้เกิดการแสดงออกของยีนลิโมนีนซินเทสในเซลล์ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) โดยใช้ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอไรสที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ *Bam* HI และ *Not* I อยู่ส่วนหัวและท้าย เชื่อมเข้ากับเวกเตอร์ pET-32a (+) ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI และ *Not* I และถ่ายลงในคอมพิเทนต์เซลล์ของ *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) โดยวิธี heat shock คัดเลือกเซลล์โดยใช้ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน จากนั้นเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลว LB และเหนี่ยวนำให้ผลิตรีคอมบีแนนต์โปรตีนโดย isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) และนำรีคอมบีแนนต์โปรตีนที่ได้ไปหาหน้าหนักโมเลกุล เทียบกับโปรตีนมาตรฐาน โดยวิธี SDS-PAGE

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เพื่อให้ได้ยีนลิโมนีนซินเทส จาก *M. cordifolia* Opiz. และทราบบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ซึ่งเป็นตำแหน่งที่สำคัญต่อการทำหน้าที่ของเอนไซม์ เพื่อให้เป็นข้อมูลสำหรับนักวิจัยหรือผู้ที่สนใจที่จะใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการทำงานวิจัยในขั้นสูงต่อไปหรือนำไปใช้อ้างอิงในด้านต่างๆ นอกจากนี้ยังทำให้ทราบว่ายีนลิโมนีนซินเทส สามารถแสดงออกได้ภายในเซลล์แบคทีเรีย สามารถเป็นแนวทางในการพัฒนาการแสดงออกของยีนในเซลล์อื่นๆ เช่น ในพืช สัตว์ และเพื่อพัฒนาสิ่งมีชีวิตที่ได้รับการถ่ายยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตน้ำมันหอมระเหยต่อไป

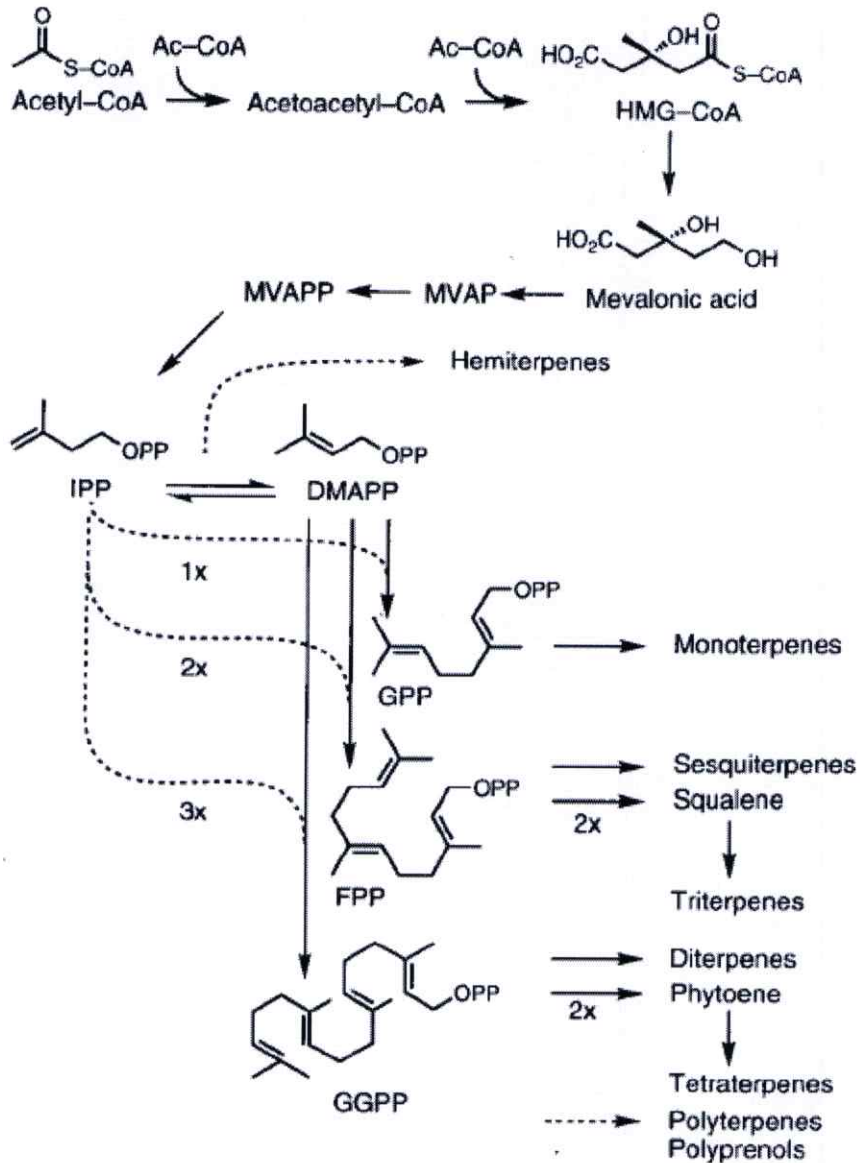
บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สารเทอร์พีนส์และสารอนุพันธ์ของเทอร์พีนส์ (terpenes derivatives)

เทอร์พีนส์เป็นองค์ประกอบของสารหลายกลุ่ม มีสูตรโครงสร้างแตกต่างกัน แต่มีส่วนของโครงสร้างที่เหมือนกันคือมีไอโซพรีนยูนิต [isoprene (C_5H_8) units] สามารถแบ่งออกเป็น 8 กลุ่มตามจำนวนของไอโซพรีนยูนิต คือ เฮมิเทอร์พีนส์ (hemiterpene) มีไอโซพรีนยูนิต 1 ชุด โมโนเทอร์พีนส์ (monoterpene) มีไอโซพรีนยูนิต 2 ชุด เซสควิเทอร์พีนส์ (sesquiterpene) มี ไอโซพรีนยูนิต 3 ชุด ไดเทอร์พีนส์ (diterpene) มีไอโซพรีนยูนิต 4 ชุด เซสเตอร์เทอร์พีนส์ (sesterterpene) มีไอโซพรีนยูนิต 5 ชุด ไตรเทอร์พีนส์ (triterpene) มีไอโซพรีนยูนิต 6 ชุด เตตระเทอร์พีนส์ (tetraterpene) มีไอโซพรีนยูนิต 8 ชุด และโพลีไอโซพรีน (polyisoprene) มีไอโซพรีนยูนิตมากกว่า 8 ชุด (Lawrence, 2006; Starks *et al.*, 1997; Trapp and Croteau, 2001)

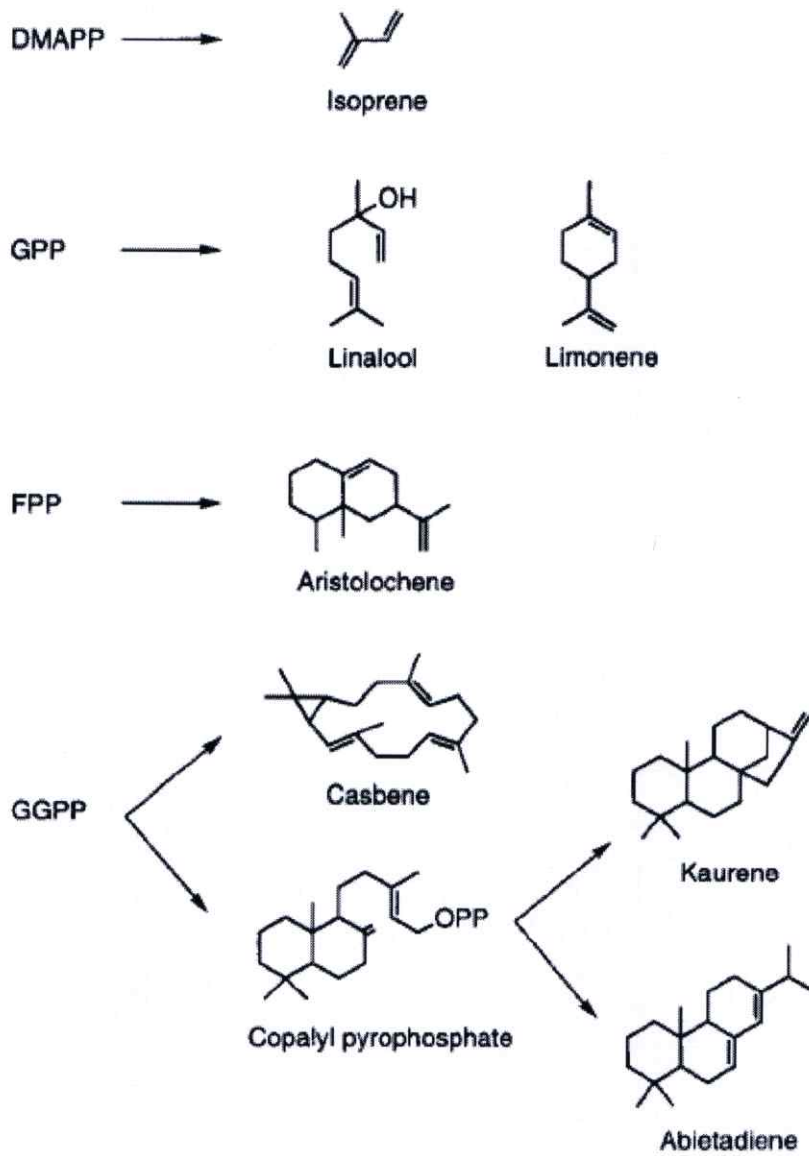
ไอโซพรีนเป็นสารประกอบพื้นฐานในชีวเคมีของสัตว์และพืชใช้ในการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ สเตียรอยด์และน้ำยาง เป็นสารที่เกิดจาก acetyl-CoA ซึ่งมีบทบาทในการสังเคราะห์และออกซิเดชัน (oxidation) ของน้ำตาล (Petroski and McCormick, 1992) กลไกการสังเคราะห์สารเทอร์พีนส์และสารอนุพันธ์ของเทอร์พีนส์ดังแสดงในรูปที่ 2.1 โดยเริ่มจากการรวมกันของ acetyl-CoA 3 โมเลกุล และเปลี่ยนเป็น 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) โดยเอนไซม์ HMG CoA synthase มี Fe^{2+} และควิโนน (quinone) เป็นโคแฟกเตอร์ จากนั้นเอนไซม์ HMG-CoA reductase จะเร่งปฏิกิริยาการเกิดรีดักชัน(reduction) โดยอาศัย NADPH เปลี่ยน HMG-CoA เป็น mevalonic acid จากนั้นเกิดปฏิกิริยาเติมหมู่ฟอสเฟตทำให้ได้ 5-pyrophosphomevalonate และจะถูกเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ pyrophosphomevalonate decarboxylase ในปฏิกิริยาค้องการโลหะประจุสองบวกและพลังงาน ATP เพื่อเปลี่ยนเป็น isopentenyl diphosphate (IPP) แต่ IPP ไม่มีความเสถียรสามารถเปลี่ยนไปเป็น dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP) ซึ่งเป็นไอโซเมอร์ของตัวเองโดยเอนไซม์ IPP isomerase และต้องการโลหะประจุสองบวกในการเร่งปฏิกิริยา จากนั้น IPP 1 ยูนิตสามารถเปลี่ยนเป็นเฮมิเทอร์พีนส์ได้โดยตรง หรือเปลี่ยนเป็นสารตั้งต้นของเทอร์พีนส์ดังนี้ IPP 1 ยูนิตรวมกับ DMAPP 1 ยูนิตจะได้ geranyl diphosphate (GPP) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของโมโนเทอร์พีนส์ IPP 2 ยูนิตรวมกับ DMAPP 1 ยูนิตจะได้ farnesyl diphosphate (FPP) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเซสควิเทอร์พีนส์และไตรเทอร์พีนส์ ส่วน IPP 3 ยูนิตรวมกับ DMAPP 1 ยูนิตจะได้ geranylgeranyl diphosphate (GGPP) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของไดเทอร์พีนส์ และเตตระเทอร์พีนส์



รูปที่ 2.1 กลไกการสังเคราะห์สารเทอร์ปีนส์และสารอนุพันธ์ของเทอร์ปีนส์

ที่มา : Mcgarvey (1995)

สารเทอร์ปีนส์ที่ผลิตจากสารตั้งต้นชนิดต่างๆ ได้แสดงในรูปที่ 2.2 ตัวอย่างเช่น ลินาลูอล (linalool) และลิโมนีน มาจากสารตั้งต้นชนิดเดียวกันคือ GPP อริสโตโลจีน (aristolochene) มาจากสารตั้งต้น FPP ส่วนแคสเบิน (casbene) และโคพาลิลไพโรฟอสเฟต (copalyl pyrophosphate) ก็มาจากสารตั้งต้น GGPP นอกจากนี้โคพาลิลไพโรฟอสเฟตยังสามารถเปลี่ยนเป็นเคารีน (kaurene) และเอบีทาไดอีน (abietadiene)



รูปที่ 2.2 สารเทอร์ปีนส์ที่ผลิตจากสารตั้งต้นชนิดต่างๆ

ที่มา : Mcgarvey (1995)

2.2 สารโมโนเทอร์พีนส์ (monoterpenes) (Oyen and Dung, 1999)

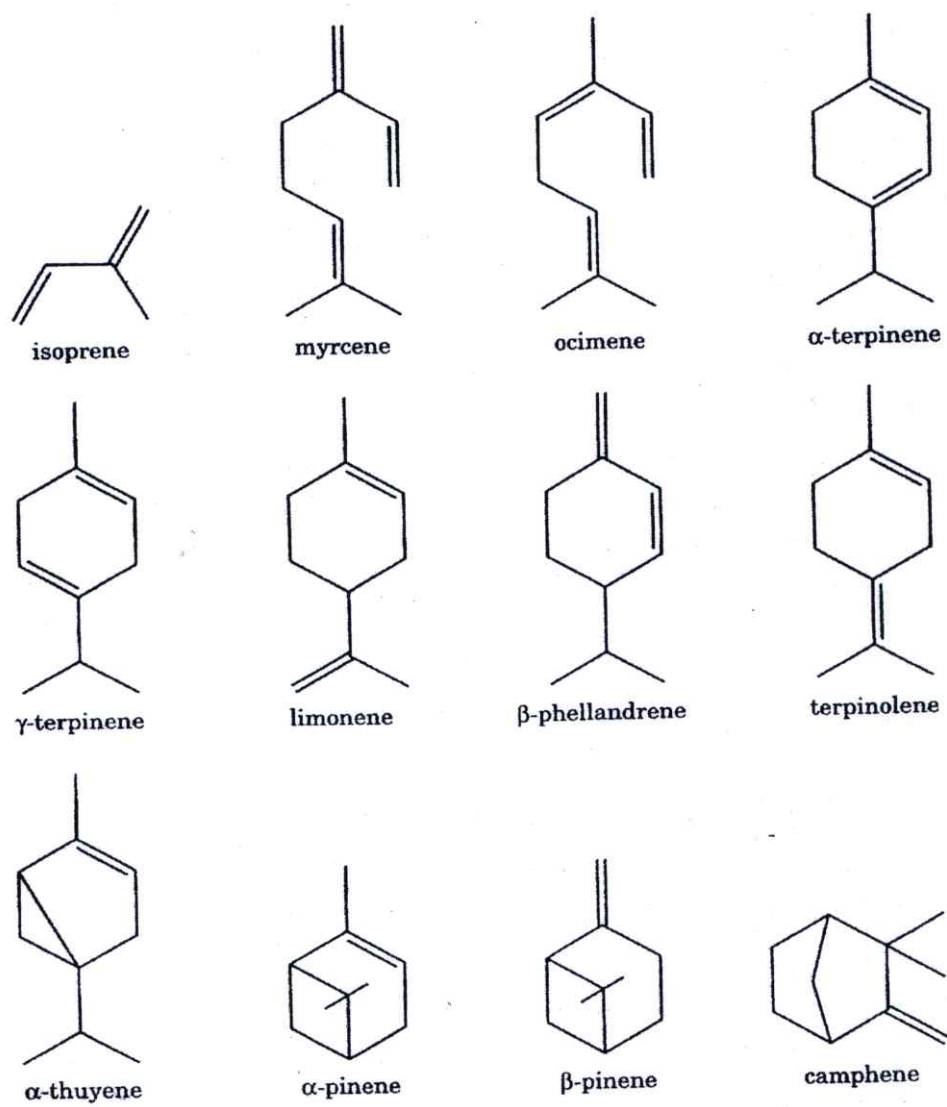
สารโมโนเทอร์พีนส์ (monoterpene) มีสูตรโมเลกุล $C_{10}H_{16}$ อาจอยู่ในรูปโครงสร้างที่ไม่เป็นวงแหวน (acyclic), วงแหวนวงเดียว (monocyclic), วงแหวนคู่ (bicyclic) หรือ วงแหวนสามวง (tricyclic) ซึ่งโมโนเทอร์พีนส์ที่อยู่ในรูปของ tricyclic มีแค่ 2 ชนิด ได้แก่ ไชโคลเฟนซีน (cyclofenchene) และไตรไซคลีน (tricyclene)

สารโมโนเทอร์พีนส์ที่มีโครงสร้างที่ไม่เป็นวงแหวน (acyclic monoterpenes) ก่อนข้างไม่คงตัวและบางชนิดมีกลิ่นแรงเนื่องจากมีสูตรโครงสร้างไม่อิ่มตัว (unsaturated structure) ตัวอย่างของสาร acyclic monoterpenes ได้แก่ ลินาลูออล (linalool) ไมร์ซีน (myrcene) และโอซิมีน (ocimene)

สารโมโนเทอร์พีนส์ที่มีโครงสร้างที่เป็นวงแหวนวงเดียว (monocyclic monoterpenes) ได้แก่ แอลฟา-เทอร์พีนีนส์ (α -terpinene), แกมมา-เทอร์พีนีน (γ -terpinene) หรือ พารา-เมนธาไดอีน (p-menthadiene), ลิโมนีน (limonene), แอลฟา-เฟลแลนดรีน (α -phellandrene), เบต้า-เฟลแลนดรีน (β -phellandrene) และเทอร์พินอลีน (terpinolene)

สารโมโนเทอร์พีนส์ที่มีโครงสร้างที่เป็นวงแหวนคู่ (bicyclic monoterpenes) มีลักษณะ 5 แบบ สารที่เป็นตัวแทนในแต่ละแบบ ได้แก่ ทุนีน (thunene), แครีน (carene), ไพนีน (pinene), แคมฟิน (camphene) และ เฟนซีน (fenchene) สาร bicyclic monoterpenes ที่สำคัญที่สุด ได้แก่ แอลฟา-ไพนีน (α -pinene) และ เบต้า-ไพนีน (β -pinene)

ตัวอย่างของสารโมโนเทอร์พีนส์ ดังรูปที่ 2.3



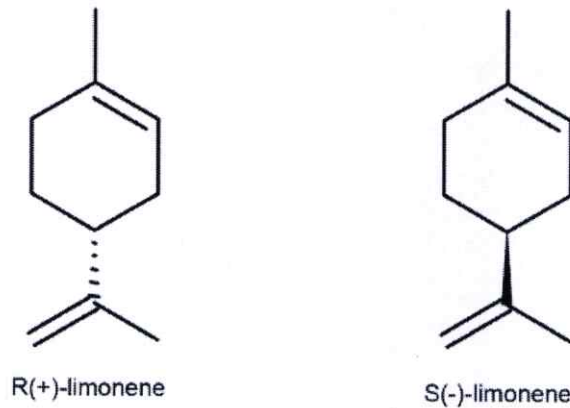
รูปที่ 2.3 ตัวอย่างสารโมโนเทอร์พีนส์

ที่มา : Oyen and Dung (1999)

2.3 กลไกการสังเคราะห์ลิโมนีน (limonene synthesis mechanism)

ลิโมนีนมีชื่อสามัญอื่นๆ ได้แก่ 4-isopropenyl-1-methylcyclohexene, methyl-4-isopropenyl cyclohexene, cajaputene, carvene, dipentene, acintene, cinene, dipanol, unitene และ efchole มีลักษณะเป็นของเหลว มีสีใสหรือสีเหลืองอ่อน ติดไฟได้ง่าย น้ำหนักเบากว่าน้ำ มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{10}H_{16}$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 136.24 กรัม/โมล ความหนาแน่นเท่ากับ 0.8411 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร จุดเดือดเท่ากับ 177 องศาเซลเซียส และจุดหลอมเหลวเท่ากับ -96.9 องศาเซลเซียส มีกลิ่นเฉพาะตัว คำว่า limonene มาจากคำในภาษาอังกฤษคำว่า lemon ที่แปลว่ามะนาว เนื่องจากลิโมนีนจะพบมากที่สุดคือน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากเปลือกของพืชตระกูลมะนาว (Shimada *et al.*, 2004)

ลิโมนีนจัดอยู่ในสาร โมโนเทอร์พีนส์ที่มีโครงสร้างที่เป็นวงแหวนวงเดียว (monocyclic monoterpenes) ที่ซับซ้อนน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับโมโนเทอร์พีนส์ชนิดอื่น ตามธรรมชาติจะพบลิโมนีนที่มีโครงสร้างได้ 2 รูปแบบคือ R หรือ S สูตรโครงสร้างของลิโมนีนดังรูปที่ 2.4

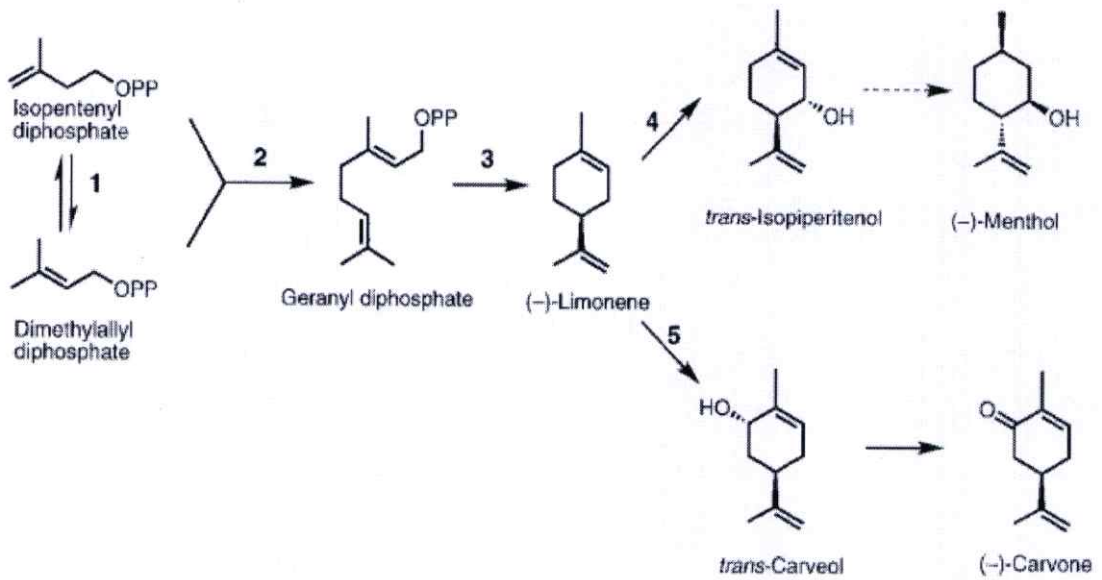


รูปที่ 2.4 แสดงสูตร โครงสร้างของลิโมนีน

ที่มา : Ferrarini *et al.* (2008)

กระบวนการสังเคราะห์ลิโมนีนเริ่มจากเจอร์รานิลไดฟอสเฟต หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า 3-methyl-3-butenyl pyrophosphate ซึ่งเป็นสารตั้งต้นถูกเร่งให้เกิดปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ลิโมนีนซินเทส เกิดการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้าง เกิดปฏิกิริยา isomerization และ cyclization ทำให้เกิดการสูญเสียโปรตอน และเกิดไอโซเมอร์ 2 แบบ ได้ผลผลิตเป็น R หรือ S ลิโมนีน และ ฟอสเฟต 2 โมเลกุล คาร์บอนตัวที่ 4 ของวงแหวนไซโคลเฮกเซน ที่อยู่ในตำแหน่งกลาง ทำให้เกิดไอโซเมอร์ของลิโมนีน 2 แบบ ซึ่งเหมือนเป็นกระจกเงาของกันและกัน (enantiomer) (Croteau *et al.*, 1990) กลไกการสังเคราะห์ลิโมนีน โดยมีเจอร์รานิลไดฟอสเฟตเป็นสารตั้งต้น ดังรูปที่ 2.5 โดย isopentenyl diphosphate ร่วมกับ dimethylallyl diphosphate จากนั้นจะเปลี่ยนแปลงเป็นเจอร์รานิล

ไดฟอสเฟตโดยอาศัยเอนไซม์เจอร์รานิลไดฟอสเฟตซินเทส และเจอร์รานิลไดฟอสเฟตจะเปลี่ยนแปลงเป็นลิโมนีนโดยอาศัยเอนไซม์ลิโมนีนซินเทส การทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ดังกล่าวต้องอาศัยแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) หรือ แมงกานีสไอออน (Mn^{2+}) เป็นโคแฟกเตอร์ (Bohlmann *et al.*, 1998; El Tamer *et al.*, 2003)



รูปที่ 2.5 แสดงการสังเคราะห์ลิโมนีน โดยมีเจอร์รานิลไดฟอสเฟตเป็นสารตั้งต้น

ที่มา : Turner *et al.* (1999)

จากรูปที่ 2.5 พบว่าลิโมนีนยังเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในการสังเคราะห์เมนทอล (menthol) ซึ่งเมนทอลเป็นสารเคมีที่พบมากในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากใบมินต์ และเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์คาร์วอน (carvone) ลิโมนีนมักเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ง่ายเมื่อสัมผัสกับอากาศ และเปลี่ยนเป็นคาร์วีวอล (carveol) และคาร์วอน (carvone)

2.4 สะระแหน่ (วันทนีย์ สว่างอารมณ์, 2542; สมสุข มัจฉาชีพ, 2542)

สะระแหน่ (Kitchen mint) อยู่ในกลุ่มพืชตระกูลมินต์ (*Mentha* spp.) สามารถจัดจำแนก (classification) ได้ดังนี้

Superkingdom : Eukaryota

Kingdom : Plantae

Subkingdom : Tracheobionta

Superdivision : Spermatophyta

Division : Magnoliophyta

Class : Magnoliopsida

Subclass : Asteridae

Order : Lamiales

Family : Lamiaceae

Genus : *Mentha*

Species : *cordifolia*

สะระแหน่มีแหล่งกำเนิดจากแถบยุโรปตอนใต้และแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียนเป็นพืชล้มลุกทอดเลื้อยคลุมดิน ลำต้นสี่เหลี่ยม สีเขียวแกมม่วงน้ำตาล มีกิ่งก้านแตกแขนงออกมากมาย เลื้อยไปตามพื้นดิน ใบเป็นใบเดี่ยวออกเป็นคู่ตรงข้ามกันกว้าง 1.5-2.5 เซนติเมตร ยาว 2-3 เซนติเมตร รูปร่างค่อนข้างกว้าง ผิวใบขน ขอบใบหยักฟันเลื่อยตลอด ปลายใบแหลม มีรูปร่างลักษณะป้อมๆ สีเขียวสด เมื่อโตเต็มที่จะมีความสูงประมาณ 70 - 150 เซนติเมตร มีกลิ่นหอมคล้ายใบมะนาว สามารถเพาะปลูกได้ง่าย ดินที่เหมาะสมในการปลูกคือดินร่วนปนทรายที่ซึ่งน้ำสามารถไหลซึมได้อย่างสะดวก ชอบที่ที่มีแดดเพียงพอแต่ไม่มากจนเกินไปเช่นเดียวกับพืชตระกูลมินต์ชนิดอื่นๆ และเหมาะที่จะปลูกในสภาพอากาศที่แห้งและความชื้นต่ำ จะโตได้ดีที่สุดในที่ร่ม อุณหภูมิไม่เย็นจัดจนเกินไป รูปที่ 2.6 คือรูปของต้นสะระแหน่ที่ใช้ในงานวิจัย (*M. cordifolia* Opiz.)

ในใบของสะระแหน่จะมีน้ำมันมากที่สุด โดยน้ำมันที่สกัดได้พบว่ามี d-carvone, carvone, d-sylvestrene และ citronellal นอกจากนี้ยังพบ α -pinene, β -pinene, limonene, octanol-3, linalool, menthone, methyl acetate, neomenthol, menthol, isomenthol, pulegone และ piperitone ส่วนลำต้นมีน้ำมันเพียงร้อยละ 0.2 ของน้ำหนัก น้ำมันที่สกัดได้จากสะระแหน่ ส่วนใหญ่จะได้ menthol มากที่สุด



รูปที่ 2.6 ต้นสะระแหน่ (*Mentha cordifolia* Opiz.)

2.5 การโคลนยีน (Gene Cloning)

(ชนันท์ อังศุขณะสมบัติ, 2533; วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด, 2536; สุรินทร์ ปิยะโชคธนากุล, 2543; Greene and Rao, 1998)

การโคลนยีนคือการนำยีนใดยีนหนึ่งที่สนใจศึกษา นำมาเพิ่มให้ได้ปริมาณมาก เพื่อนำไปศึกษาในด้านต่างๆ เช่น ศึกษาการควบคุมการแสดงออกของยีน ศึกษาบทบาทและหน้าที่ของยีนต่อสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ฯลฯ หลักการของการโคลนยีนคือการสอดแทรกชิ้นของดีเอ็นเอ ไม่ว่าจะเป็ยดีเอ็นเอจากจีโนมทั้งหมดหรือจาก cDNA ที่สังเคราะห์มาจาก mRNA จากนั้นนำมาเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ซึ่งใช้เป็นพาหะสำหรับเพิ่มโคลนที่สอดแทรกเข้าไป และนำมาถ่ายโอนลงในเซลล์ผู้รับ (host)

2.5.1 RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction)

(เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล, 2545; Brown, 2001; Taylor, 1991)

เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจาก mRNA ที่ประกอบด้วยสองปฏิกิริยา คือ ปฏิกิริยา reverse transcription เป็นการสร้างสายดีเอ็นเอคู่สม (complementary DNA; cDNA) จากแม่พิมพ์อาร์เอ็นเอโดยอาศัยเอนไซม์ reverse transcriptase (RT) และปฏิกิริยา PCR

เอนไซม์ reverse transcriptase เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในงาน RT-PCR ที่ใช้ส่วนใหญ่ ได้มาจาก retrovirus ซึ่งมีคุณสมบัติ RNA และ DNA-dependent DNA polymerase โดยต้องใช้ไพรเมอร์ร่วมในการสร้างสาย cDNA และไม่มีคุณสมบัติ proofreading หรือ 3'-5' exonuclease activity แต่มีคุณสมบัติ RNaseH activity เพื่อย่อยสลายอาร์เอ็นเอในสายผสมระหว่างอาร์เอ็นเอและดีเอ็นเอ ในขณะที่มีการสร้างสาย cDNA

อุณหภูมิก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญในการทำ RT-PCR การใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมจะช่วยขจัดปัญหาการเกิดโครงสร้างทุติยภูมิของแม่พิมพ์อาร์เอ็นเอและช่วยเพิ่มความจำเพาะของไพรเมอร์ในการจับกับแม่พิมพ์

การเลือกชนิดของไพรเมอร์มีผลต่อขนาดและความจำเพาะของสาย cDNA ที่สร้างขึ้นในขั้นตอน reverse transcription ไพรเมอร์ที่ใช้ในการสร้างสาย cDNA มีอยู่ด้วยกัน 3 แบบ แบบแรกคือ random hexamer เป็นไพรเมอร์ที่มักใช้ในกรณีที่แม่พิมพ์อาร์เอ็นเอมีโครงสร้างทุติยภูมิซึ่งทำให้การสร้างสาย cDNA ทำได้ลำบาก แบบที่สองคือ oligo (dT) primer เป็นไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อสายอาร์เอ็นเอที่มี poly(A) ซึ่งมีปริมาณ 1-4 เปอร์เซนต์ ของ eukaryotic RNA ทั้งหมด ปริมาณของ cDNA ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์แบบนี้จะน้อยกว่าการใช้ random hexamer และ cDNA ที่ได้ส่วนใหญ่มีความยาวที่สมบูรณ์ (fulllength cDNA) และแบบที่สามคือ gene specific primer การใช้ไพรเมอร์ชนิดนี้จำเป็นต้องรู้ข้อมูลลำดับเบสของแม่พิมพ์อาร์เอ็นเอที่สนใจอยู่เพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อแม่พิมพ์อาร์เอ็นเอที่สนใจเท่านั้น ซึ่งช่วยให้ความจำเพาะในการทำซีอาร์มีมากขึ้น

ในการศึกษาการแสดงออกของยีนในพวุกยูคาริโอตโดยใช้ RT-PCR มีข้อพึงระวังการเกิดผลบวกเท็จ (false positive) จากการเตรียมตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่ไม่บริสุทธิ์ทำให้มีดีเอ็นเอปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่าง มีวิธีป้องกัน 2 แบบ แบบแรกได้แก่ การใช้เอนไซม์ DNase เพื่อกำจัดดีเอ็นเอในตัวอย่าง แบบที่สอง ได้แก่การออกแบบไพรเมอร์ ซึ่งสามารถแยกได้ว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่สร้างขึ้นมาจากแม่พิมพ์อาร์เอ็นเอหรือดีเอ็นเอ ซึ่งการออกแบบไพรเมอร์มีได้ 2 วิธี คือ ออกแบบไพรเมอร์ให้มีตำแหน่งอยู่ใน exon ที่ต่างกัน เช่นไพรเมอร์เส้นแรกมีตำแหน่งใน exon 1 ไพรเมอร์อีกเส้นมีตำแหน่งอยู่ใน exon 2 การออกแบบไพรเมอร์ในลักษณะนี้จะทำให้สามารถแยกได้ว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มาจากแม่พิมพ์ดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเอ โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากแม่พิมพ์ดีเอ็นเอจะมีขนาดใหญ่กว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่สร้างจากแม่พิมพ์อาร์เอ็นเอ และออกแบบไพรเมอร์ให้มีตำแหน่งคร่อมสอง exon ไพรเมอร์ในลักษณะนี้จะไม่สามารถเพิ่มขยายแม่พิมพ์ที่เป็นดีเอ็นเอได้

รูปแบบการทำ RT-PCR สามารถทำได้ 2 รูปแบบ คือ แบบสองขั้นตอน (two-step RT-PCR) โดยในขั้นตอนแรกเป็นขั้นตอนทำ reverse transcription เพื่อสร้างสาย cDNA และในขั้นตอนที่สอง cDNA ที่ได้จากปฏิกิริยาแรกจะถูกนำมาใช้ในกระบวนการพีซีอาร์ต่อ และแบบที่สองได้แก่แบบขั้นตอนเดียว (one-step RT-PCR) RT-PCR แบบนี้ ทั้งปฏิกิริยา reverse transcription และกระบวนการพีซีอาร์ จะเกิดต่อเนื่องภายในหลอดเดียวกันไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา reverse transcription จะต้องใช้ gene-specific primer เท่านั้น จะใช้ไพรเมอร์ชนิดอื่นไม่ได้

2.5.2 ขั้นตอนการโคลนยีน

ในขั้นตอนแรกเริ่มจากการเตรียมชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ (DNA preparation) ซึ่งดีเอ็นเอที่ต้องการนั้นมีที่มา 3 แหล่ง คือ (1) ดีเอ็นเอที่แยกได้จากเซลล์หรือเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการศึกษา เป็นดีเอ็นเอทั้งหมดในจีโนมของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น (genomic DNA) (2) ดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นจาก mRNA เรียกว่า complementary DNA หรือ cDNA ซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่มาจากยีนที่มีการแสดงออก โดยสร้างอาร์เอ็นเอในอวัยวะหนึ่งในช่วงหนึ่งของชีวิต (3) สังเคราะห์ดีเอ็นเอขึ้นโดยวิธีทางเคมี (DNA synthesis from chemical method) จากนั้นใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ในการตัดสายดีเอ็นเอที่ต้องการก่อนจะนำไปเชื่อมต่อกับพาหะ (vector) ซึ่งเอนไซม์ตัดจำเพาะสามารถแบ่งได้เป็น 3 แบบ แบบที่ 1 (type I) เป็นเอนไซม์ที่มีโมเลกุลซับซ้อน ประกอบด้วยโพลีเพปไทด์ 3 ชนิด สามารถตัดดีเอ็นเอ (nuclease) และเปลี่ยนแปลงโดยเติมหมู่เมทิลเข้าไปที่เบสบางเบส แต่จะตัดสายคู่ของดีเอ็นเอที่ตำแหน่งที่ไม่เจาะจงห่างออกไป 400-7,000 คู่เบส แบบที่ 2 (type II) เป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะที่นิยมใช้กันมากในการตัดต่อยีน เนื่องจากโมเลกุลไม่ซับซ้อน คือประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์เพียง 1 ชนิด มีการตัดที่ตำแหน่งจำเพาะ (restriction site) เมื่อเอนไซม์ตัดเส้นดีเอ็นเอขาดออกจากกันแล้ว ถ้าชิ้นดีเอ็นเอที่ได้นั้นมีปลายทั้งสองยาวเท่ากัน เรียกว่าปลายทู่ (blunt end หรือ flush end) หรือถ้าชิ้นดีเอ็นเอที่ได้นั้นมีปลายทั้งสองยาวไม่เท่ากัน เรียกว่าปลายเหนียว (sticky end หรือ cohesive end) และแบบที่ 3 (type III) ประกอบด้วยโพลีเพปไทด์ 2 ชนิด มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ตัดจำเพาะและเติมหมู่เมทิลในขณะเดียวกัน การตัดดีเอ็นเอจะเกิดห่างจากบริเวณจุดจำประมาณ 25-27 คู่เบส

นำดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ มาเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ (ligation) โดยการเชื่อมต้อมี 3 แบบ คือ (1) เชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายเหนียวที่เกิดจากการตัดโดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (cohesive and ligation) (2) เชื่อมต่อดีเอ็นเอปลายทู่ (blunt end ligation) และ (3) การเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่มีปลายเป็นเบสคู่สมที่เกิดจากการต่อเบสชนิดเดียวกันเข้าไปที่ปลาย 3' ของดีเอ็นเอ โมเลกุลหนึ่ง โดยเอนไซม์ terminal deoxynucleotidyl transferase (homopolymer tailing)

เมื่อได้ดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อกันแล้ว ก็นำไปถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (transformation) การนำเวกเตอร์ลูกผสมเข้าสู่เซลล์สามารถทำได้หลายวิธีขึ้นกับเวกเตอร์ที่ใช้ ถ้าเป็นพลาสมิดจะใช้วิธีใส่ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์โดยตรงเรียกว่า transformation โดยทำเซลล์ผู้รับ (*E. coli*) ให้อยู่ในสภาพที่พร้อมจะรับดีเอ็นเอภายนอก (competent cell) โดยใช้สารบางชนิด เช่น CaCl_2 หรือไอออนบวกอื่นๆ เช่น Mg^{2+} , K^+ , dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นต้น นำเซลล์ที่อยู่ในสภาพที่พร้อมนี้มาใส่รวมกับพลาสมิดที่ตัดต่อดีเอ็นเอเรียบร้อยแล้ว จากนั้นทำให้ส่วนผสมของเซลล์และพลาสมิดเปลี่ยนอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (heat shock) ทำให้ดีเอ็นเอสามารถแทรกสอดเข้าสู่เซลล์ได้ เนื่องจากเมื่อแช่สารผสมที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ดีเอ็นเอจากพลาสมิดจะเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ทนต่อเอนไซม์ DNase ที่ผนังเซลล์ของ *E. coli* และเมื่อนำไปแช่ในอ่างน้ำ

อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส 90 วินาที สารประกอบเชิงซ้อนของดีเอ็นเอนั้นจะแทรกเข้าสู่เซลล์ผู้รับได้

หลังจากใส่ชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการลงไปในเวกเตอร์ แล้วนำเวกเตอร์ดังกล่าวมาถ่ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ในขั้นตอนนี้จำเป็นต้องมีวิธีการตรวจหาโคลนที่ต้องการจากประชากรทั้งหมดของเซลล์เจ้าบ้าน (screening hybrid vector) แล้วคัดเลือกโคลนที่ต้องการนั้นออกมา เพื่อเพิ่มจำนวนต่อไป ซึ่งวิธีการตรวจสอบที่ใช้โดยทั่วไป ได้แก่ การคัดเลือกจากฟีโนไทป์ (phenotypic selection) วิธีนี้เหมาะสำหรับยีนที่ใส่เข้าไปในเวกเตอร์นั้นเป็นยีนที่สามารถแสดงออกได้ในเซลล์เจ้าบ้านได้และเซลล์เจ้าบ้านจะต้องไม่มียีนนั้นอยู่ เช่น ใส่ *Amp^r* และ *trp^A* gene ลงไปใน auxotroph host cell หรือกรณีโปรตีน (gene product) ไม่แสดงฟีโนไทป์ที่ชัดเจนทำให้ไม่สามารถตรวจสอบโดยตรงได้ ดังนั้นจึงต้องใช้ antibody ที่จะเข้าไปเกาะกับ antigen ซึ่งเป็นโปรตีนที่ได้จากยีนที่ใส่เข้าไปในเวกเตอร์

2.6 การแสดงออกของยีน (gene expression)

(สุนันทา ฤทธิญาวัฒน์, 2547; Lehniger, 1975; Mulhardt, 2007; Ritter, 1996)

ยีนคือช่วงลำดับหนึ่งของดีเอ็นเอที่สามารถแสดงออกได้โดยสร้างผลผลิตที่ทำงานได้ในระดับโปรตีนหรือเอนไซม์ เพื่อตอบสนองความต้องการของเซลล์และมีผลต่อการอยู่รอดของสิ่งมีชีวิต ยีนต่างชนิดกันก็จะมีการแสดงออกแตกต่างกัน ในยูคาริโอตและโพรคาริโอตมีการแสดงออกของยีนต่างกัน บางยีนแสดงออกตลอดเวลา เพราะสร้างผลผลิตที่เซลล์จำเป็นต้องใช้ บางยีนถูกควบคุมแสดงออกตามที่ร่างกายต้องการ เช่น แสดงออกเฉพาะชนิดของเนื้อเยื่อ

กลไกควบคุมการแสดงออกของยีน (regulation of gene expression) เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเปิด (turn on) และปิด (turn off) ยีนในระดับการถอดรหัสและการแปลรหัส สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

2.6.1 unregulated enzyme production (constitutive หรือ housekeeping gene) คือ โปรตีน หรือผลผลิตของยีนที่ถูกควบคุมด้วยยีนที่มีการแสดงออกอย่างสม่ำเสมอในขณะที่ยังดำรงชีวิตอยู่ เรียกยีนเหล่านี้ว่า constitutive gene หรือ housekeeping gene ตัวอย่างของยีนเหล่านี้คือ ยีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ ของไรโบโซมและเอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์โปรตีน รวมทั้งเอนไซม์ที่จำเป็นต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของน้ำตาลกลูโคส (glucose) เป็นต้น

2.6.2 regulated enzyme production เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์โปรตีนหรือเอนไซม์เพื่อตอบสนองความต้องการของเซลล์ที่อยู่ในสภาพแวดล้อมหนึ่ง โดยเอนไซม์ดังกล่าวจะทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์ เช่น เอนไซม์ β -galactosidase จะถูกสัง-

เคราะห์ขึ้นมาจากเมื่อภายในเซลล์แบคทีเรียมีน้ำตาลแลคโตส (lactose) เรียกยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์ regulated enzyme ว่า regulated gene โดยเอนไซม์กลุ่มนี้สามารถแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ

2.6.2.1 inducible enzyme เป็นยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการย่อยสลายซับซ้อน (degradation pathway ; catabolism) ซึ่งยีนในกลุ่มนี้จะแสดงออกก็ต่อเมื่อภายในเซลล์มีตัวเหนี่ยวนำ (inducer หรือ substrate) เช่น β -galactosidase จะถูกสังเคราะห์ขึ้นเพื่อย่อยน้ำตาลแลคโตส ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส และกาแลคโตส เป็นต้น

2.6.2.2 repressible enzyme เป็นยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สารที่จำเป็นภายในเซลล์ (biosynthetic pathway ; anabolism) เช่น เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฮิสติดีน และทริปโตเฟน เป็นต้น

ในแบคทีเรียประกอบด้วยยีนหลายชนิดโดยในยีนแต่ละตัวจะทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ที่ต่างชนิดกัน ซึ่งเอนไซม์ในแต่ละชนิดก็จะทำหน้าที่ย่อยน้ำตาลแต่ละชนิดเข้าสู่เซลล์โดยส่งผ่านเข้าสู่กระบวนการเมตาบอลิซึมของน้ำตาลแต่ละชนิด ดังนั้นแบคทีเรียจะกำหนดให้ยีนใดแสดงออกมานั้นขึ้นอยู่กับว่าสภาพแวดล้อมในขณะนั้นว่ามีน้ำตาลชนิดใดอยู่

กลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนในโพรคาริโอตนั้นจะเกี่ยวข้องกับการทำงานของยีนที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ที่เรียกว่า operon โดยในปี 1961 F. Jacob และ J. Monod ได้เสนอแบบจำลองของ operon (operon model) เพื่ออธิบายกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ต่างๆ ซึ่ง operon ก็คือยีนสมบูรณ์หน่วยหนึ่ง ที่ประกอบด้วย

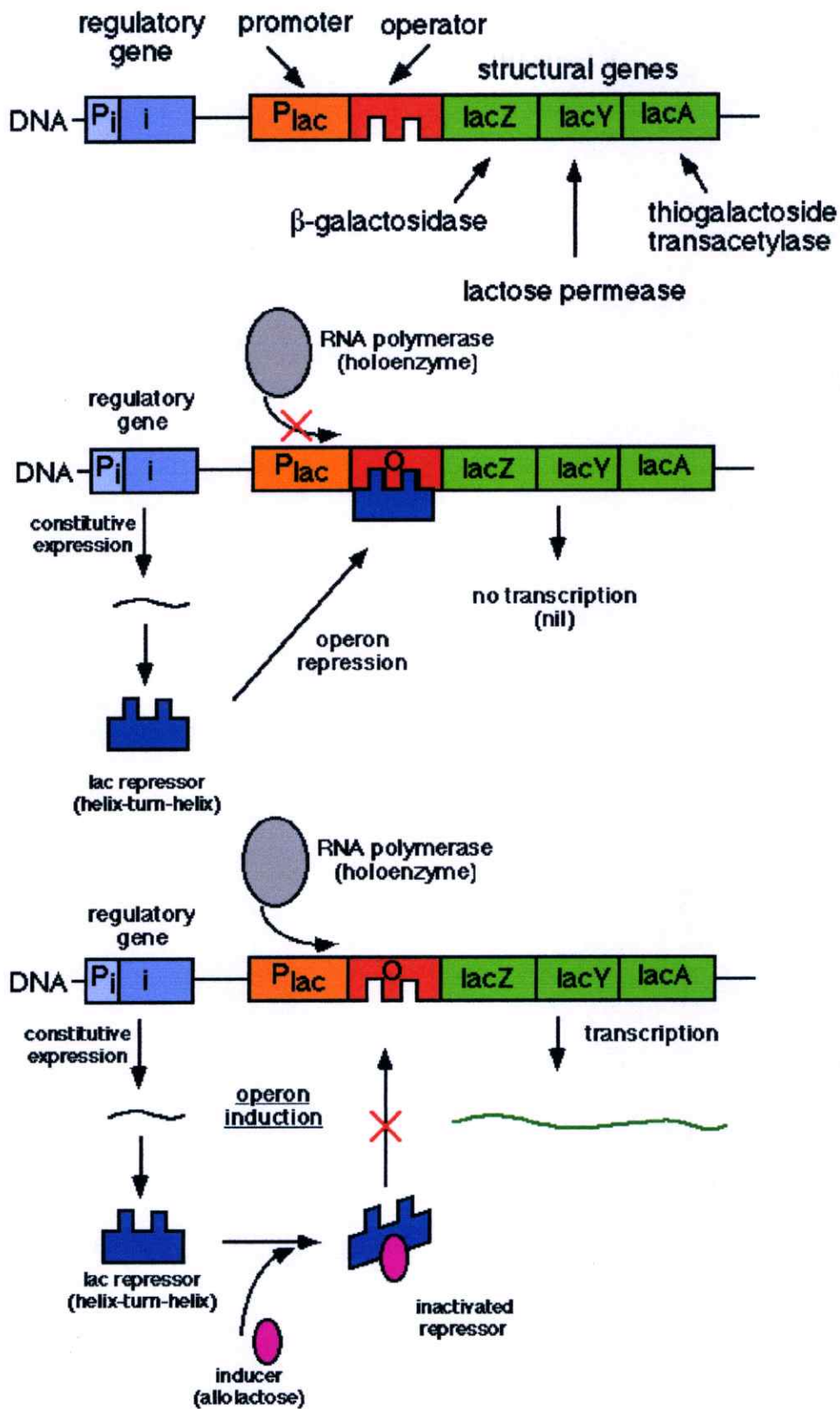
1) ยีนควบคุม (regulator gene ; i) เป็นยีนที่อาจมีตำแหน่งอยู่ใกล้หรือห่างออกไปจากยีนโครงสร้าง ยีนส่งเสริม และยีนดำเนินการ โดยยีน i ทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีนที่เรียกว่า repressor protein ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของยีนส่งเสริม

2) ยีนส่งเสริม (promoter gene ; p) คือยีนที่มีตำแหน่งอยู่ใกล้หรืออาจมีตำแหน่งเหลื่อมซ้อน (overlapping) กับยีนดำเนินการ ซึ่งยีน p มีหน้าที่ควบคุมการทำงานของยีนดำเนินการ โดยลำดับเบสบนยีนส่งเสริมจะเป็นตำแหน่งจดจำการเข้าเกาะของเอนไซม์ RNA polymerase

3) ยีนดำเนินการ (operator gene ; o) เป็นยีนที่มีตำแหน่งอยู่ด้านหน้าติดกับยีนโครงสร้าง ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนโครงสร้าง โดยยีนดำเนินการจะมีตำแหน่งจดจำของ repressor protein เพื่อเข้าจับกับยีนดำเนินการจะมีผลทำให้ยีนโครงสร้างไม่สามารถถอดรหัสออกมาได้ เนื่องจากไปขัดขวางไม่ให้เอนไซม์ RNA polymerase เข้าจับกับตำแหน่งยีนส่งเสริมได้นั่นเอง

4) ยีนโครงสร้าง (structural gene) เป็นยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนหรือเอนไซม์ชนิดต่างๆ ซึ่งยีนโครงสร้างนี้อาจมีเพียงยีนเดียว (monocistronic gene) หรืออาจมีหลายยีน (polycistronic gene) ก็ได้

มีการนำแบบจำลองของ operon มาอธิบายกลไกการควบคุมการแสดงออกของยีนเพื่อสังเคราะห์ inducible enzyme เรียกว่า inducible operon คือแบบจำลองการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์เพื่อใช้ในกระบวนการย่อยสลายซัซสเตรดหรือหมายถึงการควบคุมการแสดงออกของยีน โดยต้องมีซัซสเตรดเป็นตัวกระตุ้นการแสดงออกของยีน โดยมีหลักการคือ กรณีที่ไม่มีซัซสเตรด (no inducer) ในสภาวะแวดล้อม พบว่ายีน i จะสังเคราะห์ repressor protein อีสรระที่อยู่ในสภาพ active ซึ่งสามารถเข้าจับกับยีน o ทำให้ตำแหน่งของยีน p ว่าง (เนื่องจากยีน p มีตำแหน่งเหลื่อมซ้อนกับยีน o) ดังนั้นเอนไซม์ RNA polymerase จึงไม่สามารถเข้าเกาะกับตำแหน่งจำเพาะ (-35 base sequence) ของยีน p ได้ จึงไม่เกิดกระบวนการถอดรหัส (transcription) ของยีน โครงสร้าง แต่กรณีที่มีซัซสเตรด หรือ effector molecule หรือตัวกระตุ้น (inducer) สารเหล่านี้จะไปกระตุ้นให้เกิดการถอดรหัสของยีน โครงสร้างใน operon ได้โดย inducer จะผ่านเข้าไปในเซลล์ แล้วเข้าร่วมกับ repressor protein ทำให้เกิดเป็นโครงสร้างสารประกอบเชิงซ้อนของ inducer-repressor complex ซึ่งทำให้ repressor protein ถูกปลดปล่อยออกจาก o หรือ inducer-repressor complex อยู่ในสภาพ inactive ไม่สามารถเข้าเกาะกับตำแหน่งยีน o ทำให้ตำแหน่งของยีน p ว่าง (เนื่องจากยีน p มีตำแหน่งเหลื่อมซ้อนกับยีน o) ดังนั้นเอนไซม์ RNA polymerase จึงสามารถเข้าเกาะกับตำแหน่งจำเพาะ (-35 base sequence) ของยีน p ได้ จึงเกิดกระบวนการถอดรหัส (transcription) ของยีน โครงสร้าง รูปที่ 2.7 แสดงแบบจำลองของ operon กรณีที่มีตัวเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างโปรตีน



รูปที่ 2.7 แสดงแบบจำลอง inducible operon

ที่มา : Dole (2009)

นอกจากนั้นยังพบว่า galactoside บางชนิด เช่น IPTG เป็น strong inducer ของเอนไซม์ β -galactosidase ทำให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์อยู่ตลอดเวลา แต่ไม่ได้ทำหน้าที่เป็นซับสเตรตของเอนไซม์ β -galactosidase ดังนั้นจึงเรียกสารเหล่านี้ว่า gratuitous inducer หรือ non-metabolization inducer

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Rajaonarivony และคณะ (1992) ศึกษาลักษณะและกลไกการทำงานของเอนไซม์ลิโมนีนซินเทส โดยสกัดเอนไซม์จากส่วนเกล็ดกระจับไทรโคม (glandular trichome) ของต้นเปปเปอร์มินต์ (*Mentha piperita*) พบว่าเอนไซม์ลิโมนีนซินเทส จัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์โมโนเทอร์พีนไซคลาส (monoterpene cyclase) ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการเกิดวงแหวน (cyclization) ของสารตั้งต้นเจอร์รานิลไดฟอสเฟต ให้เปลี่ยนเป็นลิโมนีน ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่สำคัญในการสังเคราะห์ พาราเมนเทน โมโนเทอร์พีน (*p*-menthane monoterpene) ในพืชตระกูลมินต์ โดยพบว่าการทำงานของเอนไซม์ได้ผลิตภัณฑ์ของลิโมนีนมากที่สุด ประมาณ 94 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลืออีก 6 เปอร์เซ็นต์เป็นโมโนเทอร์พีน โอลิฟิน (monoterpene olefin) ชนิดอื่นๆ เอนไซม์ชนิดนี้จะมีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาที่ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) เท่ากับ 6.7 ส่วน isoelectric point (pI) เท่ากับ 4.35 และต้องการโลหะประจุสองบวก อย่าง Mg^{2+} หรือ Mn^{2+} ช่วยในการเร่งปฏิกิริยา โดย Mn^{2+} จะมีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยามากกว่า และมีค่าคงที่ของไมเคิลลิส-เมนเทน (Michaelis-Menten constant- K_m) เท่ากับ 1.8 ไมโครโมลาร์ เอนไซม์ชนิดนี้สามารถถูกยับยั้งได้โดยโซเดียมฟอสเฟต (sodium phosphate) โซเดียมไพโรฟอสเฟต (sodium pyrophosphate) และสารที่สามารถทำลายกรดอะมิโนซิสเตอีน (cysteine) เมทไธโอนีน (methionine) และฮิสติดีน (histidine)

Alonso และคณะ (1992) ศึกษาลักษณะหน้าที่และคุณสมบัติต่างๆ ในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ลิโมนีนซินเทส โดยสกัดเอนไซม์ดังกล่าวจากใบอ่อนของต้นเปปเปอร์มินต์ (*M. piperita*) และต้นสเปียร์มินต์ (*M. spicata*) เริ่มจากการแตก secretory cell โดยวิธี sonication และทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดยวิธี hydrophobic interaction chromatography จากนั้นหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยเทคนิค SDS-PAGE เทียบกับโปรตีนมาตรฐาน พบว่าเอนไซม์ลิโมนีนซินเทส ทั้งจากเปปเปอร์มินต์และสเปียร์มินต์ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 56 กิโลดาลตัน มีกิจกรรมจำเพาะสูงสุด (maximum specific activity) เท่ากับ 19 ไมโครโมลของลิโมนีนต่อชั่วโมงต่อมิลลิกรัมของโปรตีน จำนวนหมุนเวียน (turn over number; K_{cat}) มีค่าต่ำ พบอยู่ในช่วง 0.01-0.3 ต่อวินาที และหาผลผลิตที่ได้จากเอนไซม์โดยมีเจอร์รานิลไดฟอสเฟตเป็นสารตั้งต้น พบว่าได้ลิโมนีนมากกว่า 94 เปอร์เซ็นต์

ที่เหลือเป็นโมโนเทอร์พีน โอลิฟิน (monoterpene olefin) ชนิดอื่นๆ ได้แก่ไมซีน (myrcene) อัลฟา-พินีน (α -pinene) และ เบต้า-พินีน (β -pinene)

Colby และคณะ (1993) ศึกษาลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ เอนไซม์ลิโมนีนซินเทส จากใบอ่อนของต้นสเปียร์มินต์ (*M. spicata*) โดยเริ่มจากสกัดเอนไซม์ ลิโมนีนซินเทส จากต่อมน้ำมันในใบของต้นสเปียร์มินต์ และทำให้บริสุทธิ์ วิเคราะห์หาลำดับการ เรียงตัวของกรดอะมิโน จากนั้นใช้เป็นโพรบ (probe) ในการทำห้องสมุด cDNA (cDNA library) พบว่าได้โคลนทั้งหมด 4 โคลน แต่มีแค่ 3 โคลนที่เป็นยีนลิโมนีนซินเทส จากนั้นนำทั้ง 3 โคลนไป หาลำดับการเรียงตัวของนิวคลีโอไทด์และพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนลิโมนีนซินเทส จากใบ อ่อนของของต้นสเปียร์มินต์ มีส่วนที่เป็น open reading frame (ORF) 1,800 คู่เบส แปลเป็นกรดอะ- มิโนได้ 599 หน่วย

Adam และคณะ (1996) ศึกษาลักษณะและคุณสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์ลิโมนีนซินเทส จากลิเวอร์เวิร์ท (liverwort ;*Ricciocarpos natans*) โดยสกัดเอนไซม์ลิโมนีนซินเทสจากแกมีโต- ไฟส์ของต้นลิเวอร์เวิร์ท และนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี anion exchange และ hydroxylapatite chromatography นำมาหาน้ำหนักโมเลกุลเทียบกับโปรตีนมาตรฐานโดยวิธี SDS-PAGE พบว่ามี น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 51 กิโลดาลตัน ค่าความเป็นกรดต่าง (pI) ที่เหมาะสมเท่ากับ 6.5 ค่า pI เท่ากับ 5.3 และต้องการ Mg^{2+} หรือ Mn^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์ มีค่า K_m ประมาณ 1.25 ไมโครโมลาร์

Yuba และคณะ (1996) โคลนและศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ลิโมนีนซินเทสจาก *P. frutescens* โดยใช้โพรบของเอนไซม์ลิโมนีนซินเทส จากสเปียร์มินต์ ในการทำห้องสมุด cDNA พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน ORF เท่ากับ 1,812 คู่เบส แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 603 หน่วย เมื่อ เทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับยีนลิโมนีนซินเทสจากสเปียร์มินต์ ยีน 5-อีพิ-อริสโตโลชินซินเทส (5-*epi*-aristolochene synthase) จากยาสูบ และยีนคาสบีนซินเทส (casbene synthase) จากต้นละหุ่ง พบว่ามีความเหมือนเท่ากับ 65 เปอร์เซ็นต์ 35 เปอร์เซ็นต์ และ 30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และศึกษา การแสดงออกของยีนที่ได้โดยเชื่อมต่อกับส่วน ORF เข้ากับ expression vector และถ่ายโอนเข้าไปใน แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ XL1-Blue นำรีคอมบิแนนต์โปรตีนที่ได้ไปหาน้ำหนักโมเลกุลเทียบกับ โปรตีนมาตรฐานโดยวิธี SDS-PAGE พบว่าเท่ากับ 70 กิโลดาลตัน และศึกษาการทำงานของรีคอม- บิแนนต์โปรตีนที่ได้โดยให้ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นเจอร์รานิลไดฟอสเฟต จากนั้นวิเคราะห์หา ผลิตภัณฑ์โดยวิธี GC-MS พบว่าได้ผลผลิตคือลิโมนีน

Bohlmann และคณะ (1997) โคลนและศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ลิโมนีนซินเทส จากต้นสน (*Abies grandis*) โดยออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ลิโมนีนซินเทสจากสเปียร์มินต์ เอนไซม์ 5-อีพี-อริสโตโลซินซินเทสจากยาสูบ และเอนไซม์คาสบีนซินเทส จากต้นละหุ่ง พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน ORF เท่ากับ 1,911 คู่เบส แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 636 หน่วย และศึกษาการแสดงออกของยีนที่ได้โดยเชื่อมต่อกับส่วน ORF เข้ากับ expression vector และถ่ายโอนเข้าไปในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ XL0LR นำรีคอมบิแนนต์โปรตีนที่ได้ไปหาหน้าหนักโมเลกุลเทียบกับโปรตีนมาตรฐานโดยวิธี SDS-PAGE พบว่าเท่ากับ 73.5 กิโลดาลตัน และศึกษาการทำงานของรีคอมบิแนนต์โปรตีนที่ได้โดยให้ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นเจอร์รานิลไดฟอสเฟต จากนั้นวิเคราะห์หาผลผลิตโดยวิธี GC-MS พบว่าได้ผลผลิตคือลิโมนีน

Maruyama และคณะ (2001) โคลนและศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ลิโมนีนซินเทส จาก *Schizonepeta tenuifolia* โดยการสกัดอาร์เอ็นเอ และเปลี่ยนเป็น cDNA โดยเทคนิครีเวอร์สทรานสคริปชัน และเพิ่มปริมาณยีนโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ของเอนไซม์เทอร์พีนจากพืชอื่นๆ ที่มีรายงานมาก่อนหน้า เชื่อมต่อผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) เข้ากับ cloning vector และหาลำดับของนิวคลีโอไทด์พบว่าลำดับของนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 2,108 คู่เบส และในส่วน ORF เท่ากับ 1,860 คู่เบส แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 619 หน่วย จากนั้นศึกษาการแสดงออกของยีนโดยเชื่อมส่วน ORF เข้ากับ expression vector จากนั้นให้เกิดการแสดงออกของเอนไซม์ในหลอดทดลองโดยใช้ชุด TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System และนำรีคอมบิแนนต์โปรตีนที่ได้ไปหาหน้าหนักโมเลกุลเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน โดยวิธี SDS-PAGE พบว่าเท่ากับ 64 กิโลดาลตัน จากนั้นนำไปศึกษาปฏิกิริยาของรีคอมบิแนนต์โปรตีน โดยให้ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นเจอร์รานิลไดฟอสเฟต จากนั้นวิเคราะห์หาผลผลิตโดยวิธี GC-MS พบว่าได้ผลผลิตคือลิโมนีน และศึกษาโครงสร้างและความสำคัญของลำดับกรดอะมิโนต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่ามี 2 ส่วนที่มีความสำคัญ ได้แก่บริเวณที่มีลำดับของอาร์จินีน 2 หน่วยติดกัน (RR sequence) เป็นบริเวณที่จับกับสารตั้งต้น อยู่ที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 73 และ 74 และบริเวณ DDXXD motif เป็นบริเวณที่จับกับโลหะไอออนที่ทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ในปฏิกิริยา ซึ่งอยู่ที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 373 ถึง 377

Maruyama และคณะ (2002) โคลนและศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ลิโมนีนซินเทส จาก *Agastache rugosa* โดยการสกัดอาร์เอ็นเอ และเปลี่ยนเป็น cDNA โดยเทคนิครีเวอร์สทรานสคริปชัน และเพิ่มปริมาณยีนโดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณอนุรักษ์ของเอนไซม์เทอร์พีนจากพืชอื่นๆ ที่มีรายงานมาก่อนหน้า เชื่อมต่อผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) เข้ากับ cloning vector และหาลำดับของนิวคลีโอไทด์พบว่าลำดับของนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 2,077 คู่เบส และ

ในส่วน ORF เท่ากับ 1,839 คู่เบส แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 612 หน่วย จากนั้นศึกษาการแสดงออกของยีนโดยเชื่อมส่วน ORF เข้ากับ expression vector จากนั้นให้เกิดการแสดงออกของยีนในหลอดทดลองโดยใช้ชุด TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System และนำรีคอมบิแนนต์โปรตีนที่ได้ไปหาหน้าหนักโมเลกุลเทียบกับโปรตีนมาตรฐานโดยวิธี SDS-PAGE พบว่าเท่ากับ 60 กิโลดาลตัน จากนั้นนำไปศึกษาการทำปฏิกิริยาของรีคอมบิแนนต์โปรตีน โดยให้ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นเจอร์รานิล ไดฟอสเฟต จากนั้นวิเคราะห์หาผลผลิตโดยวิธี GC-MS พบว่าได้ผลผลิตคือลิโมนีน และเมื่อเทียบลำดับกรดอะมิโนกับยีนลิโมนีนซินเทส กับ *Schizonepeta tenuifolia* *Mentha spicata* *Mentha longifolia* *Perilla frutescens* และ *Perilla citriodora* พบว่ามีความเหมือนเท่ากับ 87.3, 70.8, 70.6, 62.8 และ 62.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Lucker และคณะ (2002) โคลนและศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ลิโมนีนซินเทส จากมะนาว (*Citrus limon*) ในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* โดยการสกัดยีนลิโมนีนซินเทสจากมะนาวและเชื่อมเข้ากับ expression vector จากนั้นถ่ายยีนดังกล่าวลงในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* และศึกษาการทำงานของรีคอมบิแนนต์โปรตีนที่ได้โดยให้ทำปฏิกิริยากับ สารตั้งต้นเจอร์รานิล ไดฟอสเฟต จากนั้นวิเคราะห์หาผลผลิตโดยใช้เทคนิค GC-MS และวิเคราะห์หาโครงสร้างทางเคมีของผลผลิตที่ได้โดยวิธี Multi Dimensional Gas Chromatography-Mass Spectrometry (MDGC-MS) พบว่าผลผลิตที่ได้จากการทำปฏิกิริยาคือลิโมนีน เอนไซม์เกิดปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 การเติม Mn^{2+} ทำให้เอนไซม์มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาได้ดีกว่าการเติม Mg^{2+} โดยใช้ความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์ ค่า Km อยู่ในช่วง 0.7 ถึง 3.1 ไมโครโมลาร์

Mazen และคณะ (2003) ศึกษาการถ่ายโอนยีนลิโมนีนซินเทสจากมะนาว (*C. limon*) ลงในต้นยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่กลุ่มพืชที่ไม่มีการถ่ายยีน กลุ่มที่ได้รับเวกเตอร์ที่ไม่มียีน และกลุ่มที่ได้รับการถ่ายยีน เลี้ยงภายใต้สภาวะที่ควบคุม จากนั้นนำใบของต้นยาสูบทั้ง 3 กลุ่ม มาสกัดน้ำมันหอมระเหย และวิเคราะห์หาองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยที่ได้โดยวิธี GC-MS พบว่าใบของต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีนลิโมนีนซินเทสจาก *C. limon* มีการผลิตลิโมนีน ส่วนใบของต้นยาสูบในกลุ่มอื่นๆ ไม่พบลิโมนีน

Ohara และคณะ (2003) ถ่ายโอนยีนลิโมนีนซินเทสจาก *P. frutescens* ลงในต้นยาสูบ (*N. tabacum*) โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* เป็นพาหะ จากนั้นนำใบของต้นยาสูบมาสกัดน้ำมันหอมระเหย และวิเคราะห์หาองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยที่ได้โดยวิธี GC-MS พบว่ายาสูบที่ได้รับการตัดต่อยีนสามารถผลิตลิโมนีน และเมื่อวัดปริมาณลิโมนีนที่ได้มีค่าเท่ากับ 143 นาโนกรัมต่อกรัม ส่วนยาสูบที่ไม่ได้รับการตัดต่อยีน (wild type) ไม่มีการผลิตลิโมนีน

Mahmoud และคณะ (2004) ศึกษาการทำ overexpression ของยีนลิโมนีนซินเทส โดยการโคลนยีนลิโมนีนซินเทสจากสเปียร์มิน (*M. spicata*) และถ่ายยีนลงในต้นเปปเปอร์มินต์ (*Mentha piperita*) โดยใช้ CaMV 35S เป็นโปรโมเตอร์ พบว่ายีนลิโมนีนซินเทส ทั้งจากต้นเปปเปอร์มินต์ที่ได้รับการถ่ายยีนและยีนที่ได้จากสเปียร์มินที่ถ่ายเข้าไปมีการแสดงออกทั้งคู่ แต่เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณและองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยที่ผลิตในส่วน glandular trichome เทียบกับต้นเปปเปอร์มินต์ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ไม่พบความแตกต่างของพืชทั้ง 2 กลุ่ม

Shimada และคณะ (2005) ศึกษาการคัดเลือกและศึกษาลักษณะของยีนลิโมนีนซินเทส จาก *C. unshiu* Marc. โดยสร้างห้องสมุด cDNA และใช้โพรบที่ได้จากส่วน ORF จากโคลน CitMTSE 1 (โคลนของยีนโมโนเทอร์พีนซินเทสจาก *C. unshiu* Marc. โคลนที่ 1) จากที่รายงานมาก่อนหน้านี้ พบว่าได้โคลน CitMTSE 2 (โคลนของยีนโมโนเทอร์พีนซินเทสจาก *C. unshiu* Marc. โคลนที่ 2) มีจำนวนนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 2,116 คู่เบส มีส่วน ORF เท่ากับ 1,821 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของ CitMTSE 2 กับ CitMTSE 1 พบว่ามีความเหมือนกัน 84.2 เปอร์เซ็นต์ แต่ความเหมือนจะลดลงที่ปลาย 3' ของ UTR จากนั้นเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาแปลเป็นรหัสกรดอะมิโนพบว่าที่ตำแหน่ง 56 และ 57 เป็นตำแหน่งที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงเจอร์รานิลไดฟอสเฟตไปเป็นลินาลิลไดฟอสเฟต และยังพบบริเวณ DDXD motif ซึ่งเป็นบริเวณที่มีโคแฟกเตอร์มาจับ เมื่อศึกษาการแสดงออกของรีคอมบิแนนต์โปรตีนพบว่า เป็นโปรตีนที่มีขนาด 70 กิโลดาลตัน และเมื่อนำมาทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นเจอร์รานิลไดฟอสเฟตแล้วนำไปตรวจสอบด้วย GC-MS ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือลิโมนีน

Tan และคณะ (2007) ศึกษาโครงสร้างของยีนเอนไซม์ลิโมนีนซินเทสจาก *Rosmarinus officinalis* พบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนลิโมนีนซินเทสทั้งหมด 1,807 คู่เบส มีส่วนที่เป็น ORF 1,785 คู่เบส แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 594 หน่วย (www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/89574403)

Yamasaki และ Akimitsu (2007) ศึกษาโครงสร้างของยีนเอนไซม์ลิโมนีนซินเทสจาก *C. jambhiri* พบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนลิโมนีนซินเทสทั้งหมด 1,821 คู่เบส ซึ่งเป็นส่วน ORF ทั้งหมด แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 606 หน่วย

Guennewich และคณะ (2007) ศึกษาโครงสร้างของยีนเอนไซม์ลิโมนีนซินเทสจาก *Cannabis sativa* พบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนลิโมนีนซินเทสทั้งหมด 1,869 คู่เบส ซึ่งเป็นส่วน ORF ทั้งหมด แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 622 หน่วย (www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/112790154)

Gupta และคณะ (2007) ศึกษาโครงสร้างของยีนเอ็นไซม์ลิโมนีนซินเทสจาก *M. haplocalyx* var. *piperascens* พบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนลิโมนีนซินเทสทั้งหมด 1,800 คู่เบส ซึ่งเป็นส่วน ORF ทั้งหมด แปลเป็นกรดอะมิโนได้ 599 หน่วย (www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/148887806)

Munoz-Bertomeu และคณะ (2008) ศึกษาผลของการตัดต่อยีนลิโมนีนซินเทสจาก สเปียร์มินต์ในต้นลาเวนเดอร์ (*Lavandula latifolia* Med.) ต่อการผลิตลิโมนีน โดยสกัดน้ำมันหอมระเหยจากลาเวนเดอร์ ในช่วงระยะเวลาต่างๆ มาวิเคราะห์หาปริมาณของลิโมนีน พบว่าลาเวนเดอร์ที่ได้รับการตัดต่อยีนมีการผลิตน้ำมันหอมระเหยในปริมาณมากกว่าลาเวนเดอร์ที่ไม่ได้รับการตัดต่อยีน และพบว่าลิโมนีนจะมีปริมาณมากเมื่อลาเวนเดอร์ยังอยู่ในระยะกำลังเจริญเติบโต และจะมีน้อยลงเมื่อลาเวนเดอร์แก่ เมื่อนำลาเวนเดอร์ที่ได้รับการตัดต่อยีนมาผสมตัวเองพบว่าในลูกรุ่น 1 ยังมีการผลิตลิโมนีนมากกว่าลาเวนเดอร์ปกติ และเมื่อตรวจวิเคราะห์หาลิโมนีนซินเทสในลูกรุ่น 1 พบว่ายังมียีนลิโมนีนซินเทสอยู่

Satomi และคณะ (2009) ศึกษาผลของลิโมนีนต่อการป้องกันการเกิดเซลล์มะเร็ง โดยถ่ายโอนยีนลิโมนีนซินเทส ที่ได้จากต้น Japanese catnip (*Schizonepeta tenuifolia*) ลงในเซลล์ เอ็มบริโอของหนูทดลอง พบว่าหนูทดลองมีการสร้างลิโมนีน และจากการวัดระดับปริมาณ โปรตีน Bcl-2 (B-cell lymphoma protein 2) ซึ่งเป็น โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ apoptosis พบว่ามีปริมาณเพิ่มขึ้น แต่เมื่อวัดระดับปริมาณของ Bad (Bcl-2 antagonist ของ cell death) และ phosphorylated JNK(c-Jun N-terminal kinase) พบว่ามีปริมาณน้อยลง

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 พืชทดลอง

พืชที่ใช้ในการศึกษาคือต้นสะระแหน่ (*Mentha cordifolia* Opiz.) ได้รับความอนุเคราะห์จากงานพัฒนาส่งเสริมสมุนไพร มูลนิธิโครงการหลวง จังหวัดเชียงใหม่

3.2 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา มีดังนี้

3.2.1 *Escherichia coli* สายพันธุ์ JM109 (*endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17*(r_k^- , m_k^+), *relA1, supE44, Δ(lac-proAB)*, [F' *traD36, proAB, laqiZΔM15*]

3.2.2 *Escherichia coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) (F⁻, *ompT, hsdS_B* (r_B^- , m_B^-), *dcm, gal, λ*(DE3), pLysS, Cm^r)

3.3 สารเคมี

3.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

3.3.1.1 Luria-Bertani broth

3.3.1.2 Luria-Bertani agar

3.3.2 ยาปฏิชีวนะ (ภาคผนวก ก)

3.3.2.1 แอมพิซิลลิน (ampicillin)(Sigma, USA)

3.3.3 เอนไซม์

3.3.3.1 เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase (Fermentas, Canada)

3.3.3.2 เอนไซม์ *Pfu* DNA polymerase (Fermentas, Canada)

3.3.3.3 เอนไซม์ T4 DNA ligase (Promega, USA)

3.3.3.4 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nco* I (Fermentas, Canada)

3.3.3.5 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI (Fermentas, Canada)

3.3.3.6 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not* I (Fermentas, Canada)

3.3.3.7 เอนไซม์ DNase I (Fermentas, Canada)

3.3.4 ดีเอ็นเอมาตรฐาน

3.3.4.1 1 kb DNA Ladder (ขนาด 500, 1,000, 1,500, 2,000, 3,000, 4,000, 5,000, 6,000, 8,000 และ 10,000 คู่เบส) (BioLabs, USA)

3.3.5 เวกเตอร์ (ภาคผนวก ก)

3.3.5.1 pGEM-T easy (Promega, USA)

3.3.5.2 pET 32 a(+) (Novagen, Australia)

3.3.6 เคมีภัณฑ์สำหรับสกัดน้ำมันหอมระเหย

3.3.6.1 เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) (Merck, Germany)

3.3.6.2 ปีโตรเลียมอีเธอร์ (petroleum ether) (Merck, Germany)

3.3.7 เคมีภัณฑ์สำหรับศึกษาดีเอ็นเอ

3.3.7.1 ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen)

3.3.7.2 Tri reagent (Merck, Germany)

3.3.7.3 คลอโรฟอร์ม (chloroform) (Lab Scan, Ireland)

3.3.7.4 ไอโซโพรพานอล (isopropanol) (Univar, Australia)

3.3.7.5 เอทานอล (ethanol) (Merck, Germany)

3.3.7.6 DEPC (diethylpyrocarbonate) (USB, USA)

3.3.7.7 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) (Univar, Australia)

3.3.7.8 กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) (Merck, Germany)

3.3.7.9 บัฟเฟอร์ Tris-Acetate-EDTA 40 เท่า (Promega, USA)

3.3.7.10 เจลสตาร์ (gel star) (Lonza, USA)

3.3.7.11 สีย้อมดีเอ็นเอ (loading dye) 10 เท่า (Invitrogen, USA)

3.3.7.12 อะกาโรส (agarose) (Seakem, USA)

3.3.7.13 ดีโออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (deoxynucleotide triphosphate, dNTPs) (Eppendorf, Germany)

3.3.7.14 Tris-HCl (Promega, USA)

- 3.3.7.15 EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) (Univar, Australia)
- 3.3.7.16 กรดบอริก (Univar, Australia)
- 3.3.7.17 แคลเซียมคลอไรด์ (Univar, Australia)
- 3.3.7.18 แมกนีเซียมคลอไรด์ (Univar, Australia)
- 3.3.7.19 กลีเซอรอล (glycerol) (Univar, Australia)
- 3.3.7.20 X-gal (5-bromo-4-chloro-indolyl- β -D-galactoside) (USB, USA)
- 3.3.7.21 IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) (USB, USA)
- 3.3.7.22 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate, SDS) (Aajx, Australia)
- 3.3.7.23 โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) (Merck, Germany)
- 3.3.7.24 ทรีปโตน พาวเดอร์ (tryptone powder) (Bio basic inc., USA)
- 3.3.7.25 สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) (Bio basic inc., USA)
- 3.3.7.26 วุ้น (agar) (USB, USA)

3.3.8 ชุดทดสอบ (kit)

- 3.3.8.1 ชุดทำให้อาร์เอ็นเอบริสุทธิ์ (RNA Purification Kit) (Qiagen, Germany)
- 3.3.8.2 ชุดเพิ่มปริมาณ cDNA แบบขั้นตอนเดียว (SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum *Taq* DNA Polymerase) (Invitrogen, USA)
- 3.3.8.3 ชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล (QIAquick Gel Extraction Kit) (Qiagen, Germany)
- 3.3.8.4 ชุดโคลนผลิตภัณฑ์ PCR (PCR cloning Kit) (Promega, USA)
- 3.3.8.5 ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (QIAprep Spin Miniprep Kit) (Qiagen, Germany)

3.3.9 โปรตีนมาตรฐาน

- 3.3.9.1 PageRulerTM Prestained Protein Ladder (ขนาด 170, 130, 100, 70, 55, 40, 25, 15 และ 10 กิโลดาลตัน) (Fermentas, Canada)

3.3.10 เคมีภัณฑ์สำหรับการศึกษาโปรตีน

- 3.3.10.1 บิส-อะคริลามิด (bis- acrylamide) (SERVA, USA)
- 3.3.10.2 อะคริลามิด (acrylamide) (SERVA, USA)
- 3.3.10.3 ไกลซีน (glycine) (Univar, Australia)

- 3.3.10.4 โบรโมฟีนอลบลู (bromophenol blue) (Aajx, Australia)
- 3.3.10.5 เมทานอล (methanol) (BDH, England)
- 3.3.10.6 กรดอะซิติก (acetic acid) (Merck, Germany)
- 3.3.10.7 สีย้อมโปรตีน (coomassie brilliant blue R-250) (Bio-Rad, USA)
- 3.3.10.8 เบต้า-เมอร์แคปโตเอทานอล (β - mercaptoethanol) (Merck, Germany)
- 3.3.10.9 แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate) (Univar, Australia)
- 3.3.10.10 TEMED (N, N, N', N'-tetramethyl ethylene diamine) (Bio basic inc., USA)

3.4 อุปกรณ์

- 3.4.1 เครื่องชั่งอิเล็กทรอนิกส์ (digital balance) (BP 221 S, Sartorius, Germany)
- 3.4.2 เครื่องกวนสาร (hot plate stirrer) (HS-101, GEM, Thailand)
- 3.4.3 เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมทรี (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) (G2579A, Agilent, USA)
- 3.4.4 เครื่องโฮโมจีไนส์เซอร์ (homogenizer) (T25, IKA, Germany)
- 3.4.5 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) (Ultraspec 1100*pro*, Amersham Biosciences, United Kingdom)
- 3.4.6 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (DNA thermal cycler) (T-gradient, Biometra, Germany)
- 3.4.7 เครื่องระเหยสารแบบสูญญากาศ (rotary evaporator) (R-205, Buchi, Switzerland)
- 3.4.8 เครื่องผลิตน้ำแข็ง (ice maker) (126F, Newton, Thailand)
- 3.4.9 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) (pH 211, Hanna, Thailand)
- 3.4.10 เครื่องผสมสาร (vortex mixer) (Genies II, USA)
- 3.4.11 เครื่องควบคุมอุณหภูมิหลอดทดลองขนาดเล็ก (digital dry bath) (D1100, Labnet, USA)
- 3.4.12 เครื่องเขย่าเป็นวงกลม (orbital shaker) (OR-100, ArmaLab, USA)
- 3.4.13 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifuge) (MIKRO 20, Hettich, Germany)
- 3.4.14 เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) (CR3i, Jouan, France)
- 3.4.15 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (high speed centrifuge) (Avanti J-E, Beckman,

- USA)
- 3.4.16 เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อขนาดเล็ก (incubator shaker) (KBLee 1001, Daiki, Korea)
 - 3.4.17 เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อขนาดใหญ่ (incubator shaker) (VS 8480 SFN, Vision, Korea)
 - 3.4.18 เครื่องถ่ายเจล (dark reader transilluminator) (DR-45M, USA)
 - 3.4.19 ชุดอุปกรณ์ถ่ายภาพอะกาโรสเจล (Gel Photodocumentation System) (Syngene, GeneGenius, Germany)
 - 3.4.20 ชุดอุปกรณ์แยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้า (electrophoresis equipment) (Gelmate 2000, TOYOBO, Japan)
 - 3.4.21 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) (HV-50, Hirayama, Japan)
 - 3.4.22 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (WB14, Memmert, Germany)
 - 3.4.23 ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อ (incubator) (BE400, Memmert, Germany)
 - 3.4.24 ตู้อบแบบอุณหภูมิต่ำ (cooled incubator) (MIR-533, Sanyo, Japan)
 - 3.4.25 ตู้อบแห้ง (hot air oven) (EU2-118, Innovens, France)
 - 3.4.26 เตอบนไมโครเวฟ (MS-2343LQ, LG, Thailand)
 - 3.4.27 ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar flow) (SCV-4A1, ESCO, Australia)
 - 3.4.28 ตู้ดูดอากาศ (fume hood) (Thailand)
 - 3.4.29 ตู้เย็น (SF-C69, Sanyo, Japan)
 - 3.4.30 ตู้แช่อุณหภูมิต่ำ -20 องศาเซลเซียส (MR-F31E-GY, Mitsubishi, Japan)
 - 3.4.31 ตู้แช่อุณหภูมิต่ำ -80 องศาเซลเซียส (deep freezer) (VXE 380, Jouan, France)
 - 3.4.32 ไมโครปิเปต (micropipette) (Gilson, France)
 - 3.4.33 คิวเวต (cuvette) (16.50, Starna, United Kingdom)
 - 3.4.34 เครื่องแก้วต่างๆ (glasswares)

3.5 สถานที่ทำการวิจัย

3.5.1 ห้องปฏิบัติการโครงการย่อยบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.5.2 ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.6 วิธีการศึกษา

3.6.1 การวิเคราะห์หาสัดส่วนของลิโมนีนเทียบกับสารเคมีชนิดอื่นที่พบในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากใบของ *M. cordifolia* Opiz.

ชั่งใบแก่ของ *M. cordifolia* Opiz. 15 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมเอทิลแอลกอฮอล์ ปริมาณ 150 มิลลิลิตร ปั่นให้ละเอียดโดยใช้เครื่องโฮโมจิไนส์เซอร์ ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน แล้วแยกเอาส่วนสารละลายใสเก็บไว้ หลังจากนั้นเติมเอทิลแอลกอฮอล์ ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ลงในส่วนที่เป็นกากของใบ *M. cordifolia* Opiz. ใช้แท่งแก้วคนตลอดเวลานาน 30 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนแล้วจึงแยกเอาเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลายใสออกมารวมกับส่วนที่ได้ครั้งแรก จากนั้นเติมเอทิลแอลกอฮอล์ ลงในส่วนที่เป็นกากของใบ *M. cordifolia* Opiz. อีก 50 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนตลอดเวลานาน 30 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน จึงแยกเอาเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลายใสออกมา รวมกับส่วนที่ได้ในครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บเฉพาะส่วนที่เป็นสารละลายใส จากนั้นนำส่วนที่เป็นสารละลายใสลงใน separatory funnel ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมปิโตรเลียมอีเธอร์ เขย่า และหมุนวาล์วของ separatory funnel เพื่อปล่อยแก๊สเป็นระยะจนกว่าแก๊สในตัวอย่างหมด จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้นแล้วเก็บชั้นปิโตรเลียมอีเธอร์ซึ่งจะมีน้ำมันหอมระเหยละลายอยู่ ทำซ้ำโดยการเติมปิโตรเลียมอีเธอร์ลงใน separatory funnel อีก เขย่าและเก็บส่วนของปิโตรเลียมอีเธอร์แล้วนำไปรวมกัน จากนั้นนำปิโตรเลียมอีเธอร์ที่แยกได้ทั้งหมดไปเข้าเครื่องระเหยสารแบบสูญญากาศ เพื่อให้ปิโตรเลียมอีเธอร์ระเหยออกจากสารละลาย โดยให้เหลือสารละลายประมาณ 2-3 มิลลิลิตร (กรณีระเหยจนสารละลายแห้ง ให้ละลายกลับด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์) จากนั้นนำสารละลายทั้งหมดไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีโดยใช้เครื่อง GC-MS โดยใช้สภาวะในการแยกดังตารางที่ 3.1 ดังนี้

3.6.2 การสร้าง cDNA จาก mRNA ของ McLMS ด้วยวิธี RT-PCR

3.6.2.1 การสกัดอาร์เอ็นเอจากใบของ *M. cordifolia* Opiz.

ชั่งใบอ่อนของ *M. cordifolia* Opiz. 0.3 กรัม ใส่ลงในโถรงบดสาร และเติมไนโตรเจนเหลวลงไปให้ท่วม บดให้ละเอียดเป็นผงอย่างรวดเร็ว ใส่ตัวอย่างลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร เติม Tri reagent ปริมาณ 6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นดูดสารละลายใสใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดเฉพาะส่วนสารละลายใสใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นเติมคลอโรฟอร์มปริมาณ 1.2 มิลลิลิตร เขย่าอย่างรุนแรงเป็นเวลา 15 วินาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ

ตารางที่ 3.1 แสดงสถานะที่ใช้ในการแยกองค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจาก *M. cordifolia* Opiz. โดยเครื่อง GC-MS

ชนิดของคอลัมน์	HP-5
- ความยาวของคอลัมน์	30 เมตร
- เส้นผ่าศูนย์กลางของคอลัมน์	0.25 มิลลิเมตร
injection mode	
- split	50 : 1
- split flow	49.6 มิลลิลิตรต่อนาที
- ปริมาตร	1 ไมโครลิตร
inlet temperature	250 องศาเซลเซียส
oven	70 องศาเซลเซียส หยุดไว้ 5 นาที ถึง 250 องศาเซลเซียส อัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาที หยุดไว้ 10 นาที
เวลาทั้งหมด	30 นาที

12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนสารละลายใส่ส่วนบนสุดใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นเติมไอโซโพรพานอล ปริมาณ 300 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนสารละลายใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร จากนั้นเติมไอโซโพรพานอล ปริมาณ 2.7 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนสารละลายใส่ที่เก็บตะกอน เดิมเอทานอลเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 6 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 7,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนสารละลายใส่ที่เก็บตะกอน ทิ้งตะกอนไว้ให้แห้งประมาณ 5 นาที จากนั้นละลายตะกอนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE (พีเอช 8) เก็บสารละลายอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.6.2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณอาร์เอ็นเอโดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสง

นำสารละลายอาร์เอ็นเอปริมาณ 10 ไมโครลิตรมาเจือจาง 10 เท่า โดยเติมน้ำที่ปราศจากเอนไซม์ RNase ปริมาณ 90 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดสารละลายอาร์เอ็นเอที่เจือจางแล้ว ใส่ในคิวเวตต์ควอซต์ จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (Sambrook และ Russel, 1989) นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาหาปริมาณอาร์เอ็นเอจากสมการ

ปริมาณอาร์เอ็นเอ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = $A_{260} \times 40$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร x อัตราการเจือจาง

3.6.2.3 การกำจัดดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ DNase I

นำสารละลายอาร์เอ็นเอปริมาณ 10 ไมโครกรัม มาทำปฏิกิริยาโดยมีส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการกำจัดดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ DNase I

ส่วนประกอบ	ปริมาณในปฏิกิริยา	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
สารละลายอาร์เอ็นเอ	10 ไมโครกรัม	17.7
สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีแมกนีเซียมคลอไรด์ (10 เท่า)	1 เท่า	10
เอนไซม์ DNase I (1 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	10 ยูนิต	10
DEPC treated water	-	62.3
ปริมาณสุทธิ	-	100

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม EDTA เข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.6.2.4 การทำให้สารละลายอาร์เอ็นเอบริสุทธิ์โดยชุด RNA Purification Kit (Qiagen, Germany)

ผสมบัฟเฟอร์ RLT ปริมาณ 1 มิลลิลิตรกับเบต้า-เมอร์แคปโตเอทานอล ปริมาณ 10 ไมโครลิตร แบ่งสารละลายผสมมา 350 ไมโครลิตร เติมลงในสารละลายอาร์เอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.6.2.2 ผสมให้เข้ากัน เติมเอทานอลปริมาณ 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปต จากนั้นดูดสารละลายผสมทั้งหมดลงในคอลัมน์ ที่อยู่ใน collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นย้ายคอลัมน์ไปใส่ใน collection tube หลอดใหม่ เติมสารละลายบัฟเฟอร์ RPE ปริมาณ 500 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ RPE ปริมาณ 500 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นย้ายคอลัมน์ ไปใส่ใน collection tube หลอดใหม่ เติมน้ำที่ปราศจากเอนไซม์ RNase ปริมาณ 30 ไมโครลิตร ลงบนคอลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บสารละลายอาร์เอ็นเอที่บริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.6.2.5 การเพิ่มปริมาณยีน McLMS โดยใช้ชุด SuperScript III One-Step RT-PCR System ด้วยเอนไซม์ Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, USA)

ใช้ปริมาณอาร์เอ็นเอ 1 ไมโครกรัม และใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ ที่ออกแบบจากส่วน ORF ของยีน LMS จากพืชตระกูลมินต์ (*Mentha spp.*) จำนวน 4 ชนิด ที่มีรายงานในธนาคารยีน ได้แก่ *M. piperita*, *M. spicata*, *M. longifolia* และ *M. haplocalyx* (ภาคผนวก ข)

Forward primer : McLMS1 5'-ATGGCTCTCAAAGTGTTAAGTGTTC-3'

Reverse primer : McLMS2 5'-TCATGCAAAGGGCTCGAATAAGG-3'

ใช้ชุดเพิ่มปริมาณยีน SuperScript III One-Step RT-PCR System ด้วยเอนไซม์ Platinum Taq DNA Polymerase เพื่อเปลี่ยนอาร์เอ็นเอเป็นคอมพลีเมนต์ดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณยีน McLMS ในขั้นตอนเดียว โดยมีองค์ประกอบสำหรับการเกิดปฏิกิริยาดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบในการเพิ่มปริมาณยีน McLMS ด้วยเทคนิค one step RT-PCR

ส่วนประกอบ	ปริมาณในปฏิกิริยา	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
สารละลายบัฟเฟอร์ผสม (2 เท่า)	1 เท่า	25
สารละลายอาร์เอ็นเอ	1 ไมโครกรัม	6.4
ไพรเมอร์ McLMS1 (10 ไมโครโมลาร์)	0.2 ไมโครโมลาร์	1
ไพรเมอร์ McLMS2 (10 ไมโครโมลาร์)	0.2 ไมโครโมลาร์	1
Superscript III RT/Platinum Taq mix	-	2
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อและเอนไซม์ RNase	-	14.6
ปริมาณสุทธิ	-	50

ผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปตและนำไปใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน McLMS ดังตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน McLMS ด้วยเทคนิค one step RT-PCR

ขั้นตอนที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
1	55	30 นาที
2	94	2 นาที
3	94	15 วินาที
	55	30 วินาที
	68	1 นาที
4	68	5 นาที

} 40 รอบ

3.6.2.6 การวิเคราะห์หาขนาดดีเอ็นเอโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

เตรียมอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นหยอดดีเอ็นเอมาตรฐาน ปริมาณ 5 ไมโครลิตร ลงในเจลช่องที่ 1 และสารละลายดีเอ็นเอปริมาณ 9 ไมโครลิตร ที่ผสมสีย้อม (loading dye) 10 เท่า ปริมาณ 1 ไมโครลิตรลงไปในเจลในช่องถัดไป ให้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นนำไปส่องภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เปรียบเทียบกับขนาดของดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder เพื่อหาขนาดของดีเอ็นเอตัวอย่าง

3.6.2.7 การแยกดีเอ็นเอออกจากเจลโดยชุด QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany)

นำเจลจากข้อ 3.6.2.6 มาแยกแถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR ขนาดที่ต้องการด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล โดยชั่งน้ำหนักหลอดทดลองเปล่าขนาด 1.5 มิลลิลิตรจำนวน 1 หลอด ตัดแถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR บริเวณเจลที่ต้องการ โดยใช้มีดที่สะอาด ใส่เจลลงในหลอดทดลองเปล่าที่เตรียมไว้ นำไปชั่งน้ำหนักอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ QC ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล (เจล 100 มิลลิกรัม เท่ากับปริมาตร 100 ไมโครลิตร) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าเจลจะหลอมละลายหมด ระหว่างการบ่มนำไปเขย่าโดยเครื่อง vortex ทุก 2-3 นาที หลังจากเจลละลายหมด จะได้สารละลายสีเหลือง ถ้าได้สารละลายสีส้มหรือสีม่วง ให้เติมโซเดียมอะซิเตท พีเอช 5.0 เข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาณ 10 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมไอโซโพรพานอล ปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากัน คือดตัวอย่างใส่ลงในคอลัมน์ QIAquick spin column ที่อยู่ใน collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งสารละลายที่อยู่ใน collection tube จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งสารละลายที่อยู่ใน collection tube และ

นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้องซ้ำอีกครั้ง จากนั้นย้ายคอลัมน์ไปใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ และเติมสารละลายบัฟเฟอร์ EB ปริมาณ 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บดีเอ็นเอที่แยกได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.6.3 การโคลนยีน McLMS

3.6.3.1 การเตรียม competent cell

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM109 บนอาหารแข็ง LB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นเจี่ยเชื้อจาก 1 โคลนนิ่งในอาหารเหลว LB ที่ไม่มียาปฏิชีวนะ แอมพิซิลลิน ปริมาณ 3 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที ข้ามคืน จากนั้นดูดเซลล์แขวนลอยปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว LB ปริมาณ 50 มิลลิลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 ได้ประมาณ 0.3-0.4 เทเซลล์แขวนลอยใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ 2 หลอดและแช่ลงในน้ำแข็ง 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนสารละลายใส่ทิ้ง และแช่หลอดเซนตริฟิวจ์ที่มีตะกอนในน้ำแข็ง จากนั้นละลายตะกอนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์แมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์แช่เย็นปริมาณ 10 มิลลิลิตร และแช่ในน้ำแข็งอีก 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนสารละลายใส่ทิ้ง จากนั้นละลายตะกอนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์แมกนีเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์แช่เย็นอีกครั้ง ปริมาณ 10 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนสารละลายใส่ทิ้ง และแช่ในน้ำแข็งอีก 10 นาที จากนั้นค่อยๆ เติมน้ำแข็งแช่เย็นปริมาณ 1 มิลลิลิตร ค่อยๆ เทของเหลวในหลอดเซนตริฟิวจ์รวมกัน จากนั้นเติมกลีเซอรอล ปริมาณ 900 ไมโครลิตร ค่อยๆ ผสมให้เข้ากัน แบ่ง competent cell ที่ได้ ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเก็บ competent cell ที่ได้ในตู้แช่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.6.3.2 การเชื่อมผลิตภัณฑ์ RT-PCR เข้ากับดีเอ็นเอพาหะ (ligation)

นำผลิตภัณฑ์ RT-PCR ที่ได้จากข้อ 3.6.2.7 เชื่อมต่อเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ (vector) ซึ่งได้แก่เวกเตอร์ pGEM-T Easy (Promega, USA) (ภาคผนวก ค) สำหรับองค์ประกอบในการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์ RT-PCR เข้ากับดีเอ็นเอพาหะ ดังตารางที่ 3.5

ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกับล้อคไปมาเบาๆ จนสารละลายหนืด และเติมสารละลายบัฟเฟอร์ N3 ปริมาณ 350 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็วโดยการกับล้อคไปมา หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที คูด้ส่วนสารละลายใส่ข้างบนใส่ใน QIAprep spin column และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 50 วินาที ทิ้งของเหลวที่ผ่านคอลัมน์ จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ PB ปริมาณ 500 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 50 วินาที ทิ้งของเหลวที่ผ่านคอลัมน์ จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ PE ปริมาณ 750 ไมโครลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 50 วินาที ทิ้งของเหลวที่ผ่านคอลัมน์ และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเท่าเดิมอีก 1 นาที ทิ้งของเหลวที่ผ่านคอลัมน์อีกครั้ง จากนั้นย้ายคอลัมน์ไปใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์ EB ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ลงบนคอลัมน์ ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที เก็บของเหลวที่ผ่านคอลัมน์ซึ่งจะมีพลาสมิดดีเอ็นเอละลายอยู่ เก็บพลาสมิดดีเอ็นเอที่แยกได้ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.6.3.5 การทดสอบพลาสมิดดีเอ็นเอถูกผสม

3.6.3.5.1 การทดสอบพลาสมิดดีเอ็นเอถูกผสมโดยเทคนิคปฏิกิริยา

ลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction : PCR)

นำพลาสมิดดีเอ็นเอจากข้อ 3.6.3.4 มาเพิ่มปริมาณยีน McLMS

โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยใช้ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอ 10 นาโนกรัม และใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ ดังนี้

Forward primer : McLMS1 5'-ATGGCTCTCAAAGTGTTAAGTGTTC-3'

Reverse primer : McLMS2 5'-TCATGCAAAGGGCTCGAATAAGG-3'

และใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยมีองค์ประกอบในการเกิดปฏิกิริยาดังตารางที่ 3.6

ตารางที่ 3.6 ส่วนประกอบในการเพิ่มปริมาณชิ้น McLMS โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ส่วนประกอบ	ปริมาณในปฏิกิริยา	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
สารละลายบัฟเฟอร์ผสม (10 เท่า)	1 เท่า	5
พลาสมิดดีเอ็นเอ (10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	10 นาโนกรัม	1
ไพรเมอร์ McLMS1 (10 ไมโครโมลาร์)	0.2 ไมโครโมลาร์	1
ไพรเมอร์ McLMS2 (10 ไมโครโมลาร์)	0.2 ไมโครโมลาร์	1
เอนไซม์ <i>Taq</i> DNA polymerase (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	2.5 ยูนิต	0.5
dNTP (10 มิลลิโมลาร์)	0.2 มิลลิโมลาร์	1
MgCl ₂ (25 มิลลิโมลาร์)	2 มิลลิโมลาร์	4
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	-	36.5
ปริมาณสุทธิ	-	50

ผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปตและนำไปใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้น McLMS ดังตารางที่ 3.7

ตารางที่ 3.7 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณชิ้น McLMS โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ขั้นตอนที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
1	94	2 นาที
2	94	15 วินาที
	55	30 วินาที
	68	1 นาที
3	68	5 นาที

} 40 รอบ

จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาวิเคราะห์ขนาดโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสดังวิธีในข้อ 3.6.2.6

3.6.3.6 การทดสอบพลาสมิดดีเอ็นเอถูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

Not I หรือ *Nco I*

นำพลาสมิดดีเอ็นเอจากข้อ 3.6.3.4 มาตัดด้วยเอนไซม์ *Not I*

หรือ *Nco* I เพื่อทดสอบการมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ RT-PCR โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยา ดังตารางที่ 3.8

ตารางที่ 3.8 องค์ประกอบของปฏิกิริยาการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not* I หรือ *Nco* I

องค์ประกอบ	ปริมาณใน ปฏิกิริยา	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
สารละลายบัฟเฟอร์ (10 เท่า)	1 เท่า	2
พลาสมิดดีเอ็นเอ (0.2 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)	0.2 ไมโครกรัม	1
เอนไซม์ <i>Not</i> I หรือ <i>Nco</i> I (1 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1 ยูนิต	1
น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ	-	16
ปริมาณสุทธิ	-	20

ผสมให้เข้ากันโดยการใช้นิโครปิเปต จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาวิเคราะห์ขนาดโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสดังวิธีในข้อ 3.6.2.6

3.6.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน *McLMS*

นำพลาสมิดดีเอ็นเอจากข้อ 3.6.3.4 ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้เครื่อง sequencer (Fermentas, Canada) และใช้ไพรเมอร์ 4 เส้น ดังนี้

SP6	5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3'
T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
McLMS3	5'-GCGAAACCACGCTCGAGTCA-3'
McLMS4	5'-CGACTGCCATGAGTTCTCCAA-3'

จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนลิโมนีนซินเทสในพืชตระกูลมินต์ที่มีรายงานในธนาคารยีน จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *M. piperita*, *M. spicata*, *M. longifolia* และ *M. haplocalyx* แปรรหัสเป็นกรดอะมิโน และเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับยีนโมโนเทอร์พีนส์ซินเทสในสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีนจำนวน 20 ชนิด โดยใช้โปรแกรม ClustalW และหาตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีความสำคัญต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ในกลุ่มโมโนเทอร์พีนส์ จากนั้นหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมจากยีนลิโมนีนซินเทสของพืชชนิดต่างๆ จำนวน 18 ชนิด โดยใช้โปรแกรม MEGA4

3.6.5 การศึกษาการแสดงออกของยีน *McLMS* ในแบคทีเรีย *E. coli*

3.6.5.1 การออกแบบไพรเมอร์ที่มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ *Bam* HI และ *Not* I

อยู่ส่วนหัวและท้ายของยีน *McLMS*

เมื่อทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *McLMS* แล้ว หาชนิดของเอนไซม์ที่ไม่มีตำแหน่งตัดภายในยีน เลือกมา 2 ชนิด ซึ่งได้แก่เอนไซม์ *Bam* HI และ *Not* I จากนั้นออกแบบไพรเมอร์ให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นบริเวณจดจำของเอนไซม์ *Bam* HI และ *Not* I อยู่ส่วนหัวและท้ายของยีน ดังนี้

Forward primer : *McLMS5* 5'-TAGGATCC^{*Bam* HI}ATGGCTCTCAAAGTG-3'

Reverse primer : *McLMS6* 5'-TAGCGGCCG^{*Not* I}TCATGCAAAGGG-3'

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.6.3.4 ปริมาณ 10 นาโนกรัม มาเพิ่มปริมาณยีน *McLMS* โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ข้างต้น และใช้เอนไซม์ *pfu* *Taq* DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา สำหรับองค์ประกอบในการเกิดปฏิกิริยาดังตารางที่ 3.9

ตารางที่ 3.9 ส่วนประกอบในการเพิ่มปริมาณยีน *McLMS* โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ส่วนประกอบ	ปริมาณในปฏิกิริยา	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
สารละลายบัฟเฟอร์ผสม (10 เท่า)	1 เท่า	5
พลาสมิดดีเอ็นเอ (10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร)	10 นาโนกรัม	1
ไพรเมอร์ <i>McLMS5</i> (10 ไมโครโมลาร์)	0.2 ไมโครโมลาร์	1
ไพรเมอร์ <i>McLMS6</i> (10 ไมโครโมลาร์)	0.2 ไมโครโมลาร์	1
เอนไซม์ <i>pfu</i> <i>Taq</i> DNA polymerase (5 ยูนิต/ไมโครลิตร)	2.5 ยูนิต	0.5
dNTP (10 มิลลิโมลาร์)	0.2 มิลลิโมลาร์	1
MgSO ₄ (25 มิลลิโมลาร์)	2 มิลลิโมลาร์	4
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	-	36.5
ปริมาตรสุทธิ	-	50

ผสมให้เข้ากันเบาๆ โดยใช้ไมโครปิเปต และนำไปใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน *McLMS* ดังตารางที่ 3.7 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่

ได้มาวิเคราะห์ขนาดโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสและนำมาแยกแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ขนาดที่ต้องการด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลตามข้อ 3.6.2.7

3.6.5.2 การเตรียมผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ และดีเอ็นเอพาหะให้มีบริเวณจดจำของ เอนไซม์ *Bam* HI และ *Not* I บริเวณส่วนหัวท้าย

นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากข้อ 3.6.5.1 และพลาสมิดของดีเอ็นเอพาหะ เวกเตอร์ pET-32a(+) (Novagen, Australia) (ภาคผนวก ก) มาตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI และ *Not* I องค์กรประกอบในการเกิดปฏิกิริยาดังตารางที่ 3.10

ตารางที่ 3.10 องค์กรประกอบในการเตรียมผลิตภัณฑ์พีซีอาร์และดีเอ็นเอพาหะให้มีบริเวณจดจำของ เอนไซม์ *Bam* HI และ *Not* I บริเวณส่วนหัวท้าย

องค์กรประกอบ	ปริมาณใน ปฏิกิริยา	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
สารละลายบัฟเฟอร์ (10 เท่า)	1 เท่า	2
ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์หรือพลาสมิดดีเอ็นเอพาหะ (0.2 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)	0.2 ไมโครกรัม	1
เอนไซม์ <i>Bam</i> HI (1 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1 ยูนิต	1
เอนไซม์ <i>Not</i> I (1 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	2 ยูนิต	2
น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ	-	14
ปริมาณรวม	-	20

ผสมให้เข้ากันโดยการใช้ไมโครปิเปต จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาวิเคราะห์ขนาดโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส ดังวิธีในข้อ 3.6.2.6

3.6.5.3 การเชื่อมผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เข้ากับดีเอ็นเอพาหะ (ligation)

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากข้อ 3.6.5.2 มาแยกแถบผลิตภัณฑ์ขนาดที่ต้องการด้วยชุดแยกดีเอ็นเอออกจากเจล ตามข้อ 3.6.2.7 และนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะ สำหรับองค์กรประกอบในการเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอพาหะดังตารางที่ 3.11

ตารางที่ 3.11 องค์ประกอบในการเชื่อมต่อผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เข้ากับดีเอ็นเอพาหะ

องค์ประกอบ	ปริมาณในปฏิกิริยา	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
สารละลายบัฟเฟอร์ Rapid Ligation (2 เท่า)	1 เท่า	5
เวกเตอร์ pET-32a(+)	50 นาโนกรัม	1
ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์	50 นาโนกรัม	3
เอนไซม์ T4 DNA ligase (3 ยูนิตต่อ ไมโครลิตร)	3 ยูนิต	1
ปริมาณรวม	-	10

ผสมให้เข้ากันโดยการใช้ไมโครปิเปต จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

3.6.5.4 การถ่ายโอนยีน (transformation) ลงในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM109

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการ ligation จากข้อ 3.6.5.3 ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ใส่ลงใน competent cell ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ที่เตรียมได้จากข้อ 3.6.3.1 โดยวิธี heat shock ตามข้อที่ 3.6.3.3 และนำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เลี้ยงไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำโคโลนีที่ได้มาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอตามข้อ 3.6.3.4

3.6.5.5 การทดสอบพลาสมิดดีเอ็นเอถูกผสมที่ได้รับการตัดต่อยีน

3.6.5.5.1 การทดสอบพลาสมิดดีเอ็นเอถูกผสมโดยเทคนิคปฏิกิริยา

ดูทโซ่พอลิเมอร์เรส

ใช้พลาสมิดดีเอ็นเอจากข้อ 3.6.5.4 ปริมาณ 10 นาโนกรัม โดยมีองค์ประกอบสำหรับการเกิดปฏิกิริยาเหมือนดังตารางที่ 3.6 และสภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนเหมือนดังตารางที่ 3.7 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาวิเคราะห์ขนาดโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสดังวิธีในข้อ 3.6.2.6

3.6.5.5.2 การทดสอบพลาสมิดดีเอ็นเอถูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

Bam HI หรือ *Not* I

นำพลาสมิดดีเอ็นเอจากข้อ 3.6.5.4 มาตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI หรือ *Not* I เพื่อทดสอบการมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ สำหรับองค์ประกอบในการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ *Bam* HI หรือ *Not* I ดังตารางที่ 3.12

ตารางที่ 3.12 องค์ประกอบในการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI หรือ *Not* I

องค์ประกอบ	ปริมาณในปฏิกิริยา	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
สารละลายบัฟเฟอร์ (10 เท่า)	1 เท่า	2
พลาสมิดดีเอ็นเอ (0.2 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร)	0.2 ไมโครกรัม	1
เอนไซม์ <i>Bam</i> HI หรือ เอนไซม์ <i>Not</i> I (1 ยูนิตต่อไมโครลิตร)	1 ยูนิต	1
น้ำกลั่นผ่านการฆ่าเชื้อ	-	16
ปริมาณรวม	-	20

ผสมให้เข้ากันโดยการใช้ไมโครปิเปต จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาวิเคราะห์ขนาดโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสดังวิธีในข้อ 3.6.2.6

3.6.5.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *McLMS*

นำพลาสมิดดีเอ็นเอจากข้อ 3.6.5.4 มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้เครื่อง sequencer (Fermentas, Canada) และใช้ไพรเมอร์ 4 เส้น ดังนี้

T7 promoter 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'

T7 terminator 5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3'

McLMS3 5'-GCGAAACCACGCTCGAGTCA-3'

McLMS4 5'-CGACTGCCATGAGTTCTCCAA-3'

3.6.5.7 การถ่ายโอนยีน (transformation) ลงในแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)

นำพลาสมิดดีเอ็นเอจากข้อ 3.6.5.4 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใส่ลงใน

competent cell ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ที่เตรียมได้จากข้อ 3.6.3.1 โดยวิธี heat shock ตามข้อที่ 3.6.3.3 และนำมาเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม เลี้ยงไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.6.5.8 การเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนต์โปรตีน

1) การวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของรีคอมบิแนนต์โปรตีนด้วยเทคนิค

โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

นำโคโลนีที่ได้จากข้อ 3.6.5.7 เลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 ชั่วโมง จากนั้นดูดเซลล์แขวนลอย ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว LB ปริมาณ 100 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ได้ประมาณ 0.5 จากนั้นดูดเซลล์แขวนลอยลงในหลอดเซนตริฟิวส์ขนาด 50 มิลลิลิตรจำนวน 2 หลอด หลอดละ 9,900 ไมโครลิตร หลอดแรกเติม IPTG ปริมาณ 100 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายของ IPTG เท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์) หลอดที่ 2 เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อ 100 ไมโครลิตร เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนกระทั่งครบ 3 ชั่วโมง และ 6 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างปริมาณ 80 ไมโครลิตร แล้วเติม sample buffer (ภาคผนวก ก) เข้มข้น 5 เท่า ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที และนำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้กระแสไฟฟ้า 80 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

เตรียม stacking gel เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ และ separating gel เข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ สำหรับองค์ประกอบในการเตรียมเจล ดังตารางที่ 3.13

ตารางที่ 3.13 องค์ประกอบของ stacking gel และ separating gel

องค์ประกอบ	ปริมาณ (มิลลิลิตร)	
	stacking Gel (4%)	separating Gel (12%)
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	3.05	3.4
1.5 M Tris HCl pH 8.8	-	2.5
0.5 M Tris HCl pH 6.8	1.25	-
30% Acrylamide/Bis-acrylamide	0.65	4.0
10% (w/v) SDS	0.05	0.1
10% (w/v) Ammonium persulphate	25 ไมโครลิตร	50 ไมโครลิตร
TEMED	5 ไมโครลิตร	10 ไมโครลิตร

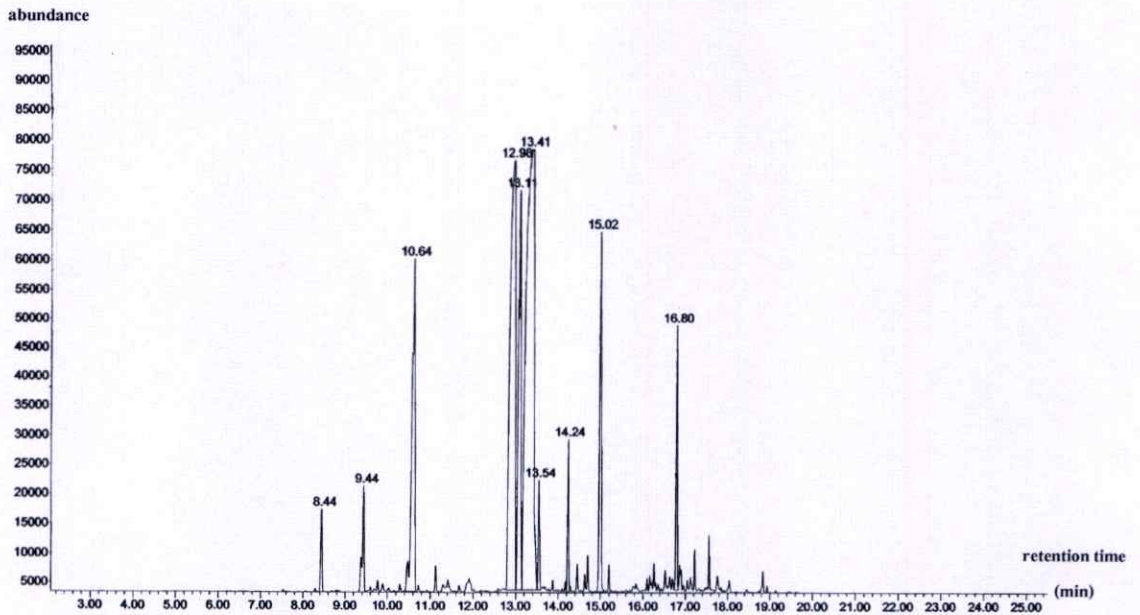
บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการโคลนยีนลิโมนีนซินเทสจาก *M. cordifolia* Opiz. (McLMS) และศึกษาการแสดงออกของยีนดังกล่าวในแบคทีเรีย *E. coli* โดยเริ่มจากการศึกษาองค์ประกอบของสารเคมีที่พบในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากใบของ *M. cordifolia* Opiz. เพื่อวิเคราะห์หาสัดส่วนของลิโมนีนที่สกัดได้เทียบกับสารเคมีชนิดอื่นที่พบในน้ำมันหอมระเหย จากนั้นศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน McLMS ที่ถอดและแปลรหัสเป็นเอนไซม์ที่ผลิตลิโมนีน เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนที่ได้กับลำดับกรดอะมิโนของยีน โมโนเทอร์พีนซินเทสจากพืชชนิดอื่นที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูลของธนาคารยีนและหาตำแหน่งบริเวณอนุรักษ์ที่มีความสำคัญต่อการทำหน้าที่ของเอนไซม์ นอกจากนี้ ยังได้ศึกษาการแสดงออกของยีนลิโมนีนซินเทสในเซลล์ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) โดยเหนี่ยวนำให้ผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนโดย IPTG และนำรีคอมบิแนนต์โปรตีนที่ได้ไปหาหน้าหนักโมเลกุล เทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

4.1 การวิเคราะห์หาสัดส่วนของลิโมนีนเทียบกับสารเคมีชนิดอื่นที่พบในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากใบของ *M. cordifolia* Opiz.

จากการนำใบแก่ของ *M. cordifolia* Opiz. มาสกัดน้ำมันหอมระเหยตามวิธีในข้อ 3.6.1 จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบโดยใช้เครื่อง GC-MS สภาวะการวิเคราะห์ตามตารางที่ 3.1 โดยให้เครื่องวิเคราะห์ตั้งแต่นาทีที่ 0 ถึงนาทีที่ 25 พบว่าในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากใบของ *M. cordifolia* Opiz. ประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิดดังโครมาโตแกรมในรูปที่ 4.1 ซึ่งโครมาโตแกรมที่ได้จากเครื่อง GC-MS แสดงพีคต่างๆ จำนวนมาก ซึ่งแต่ละพีคก็แสดงถึงสารเคมีชนิดใดชนิดหนึ่ง โดยพื้นที่ใต้กราฟของแต่ละพีคจะแสดงถึงปริมาณของสารเคมีชนิดนั้นๆ ซึ่งสารใดที่มีพื้นที่ใต้กราฟของพีคมาก แสดงว่ามีปริมาณของสารในตัวอย่างนั้นมากตามไปด้วย ในทางตรงกันข้ามถ้าสารใดมีพื้นที่ใต้กราฟของพีคต่ำแสดงว่ามีปริมาณของสารนั้นในตัวอย่างน้อย โดยสารแต่ละชนิดจะถูกแยกออกมาที่เวลาต่างกัน (retention time)



รูปที่ 4.1 แสดงโครมาโตแกรมจากเครื่อง GC-MS จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารเคมีที่สกัดจากใบของ *M. cordifolia* Opiz.

จากรูปที่ 4.1 พบว่าจากการสกัดน้ำมันหอมระเหยจากใบของ *M. cordifolia* Opiz. สารเคมีที่พบมากที่สุดคือเมนทอล ที่ retention time 13.41 นาที มีประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ 1-menthone, L-menthone, limonene, menthyl acetate และ trans-caryophyllene, มีประมาณ 22, 10, 9, 7, 3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วน β -pinene และ pulegone มีสัดส่วนเท่ากันคือมีประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ ส่วน α -pinene และ cyclohexanol มีประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ และสารอื่นๆ มีประมาณ 8 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.1 แสดงองค์ประกอบของสารเคมีหลักที่พบในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากใบของ *M. cordifolia* Opiz.

ตารางที่ 4.1 แสดงองค์ประกอบของสารเคมีหลักที่พบในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดจากใบของ *M. cordifolia* Opiz.

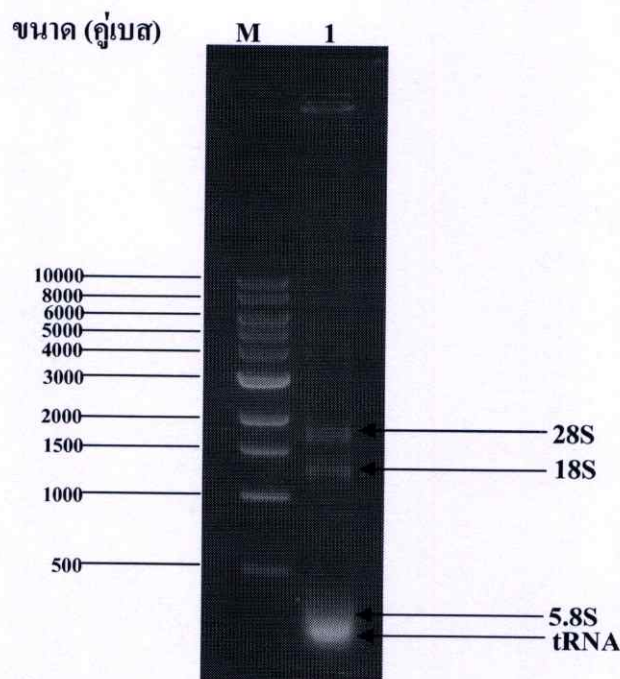
สารเคมี	retention time (นาที)	ปริมาณ (เปอร์เซ็นต์)
α -pinene	8.44	1
β - pinene	9.44	2
limonene	10.64	9
l-menthone	12.98	22
L-menthone	13.11	10
menthol	13.41	35
cyclohexanol	13.54	1
pulegone	14.24	2
menthyl acetate	15.02	7
trans-caryophyllene	16.80	3
อื่นๆ	-	8

จากตารางที่ 4.1 พบว่าที่ retention time 10.64 นาที ลิโมนีนจะถูกแยกออกมาและมีปริมาณเพียง 9 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณสารเคมีทั้งหมด จากรายงานของ Schwab และคณะ (2001) ที่ได้ศึกษา กลไกการสังเคราะห์โมโนเทอร์พีนส์หลายชนิดพบว่าหลังจากที่สารตั้งต้น GPP ถูกเปลี่ยนเป็นสารตัวกลาง linalyl diphosphate แล้วไม่เพียงจะเปลี่ยนเป็นลิโมนีนเท่านั้น ยังสามารถจะเปลี่ยนไปเป็นสารเคมีชนิดอื่นได้อีก เช่น α -pinene, β - pinene, α -terpeniol, camphene, bornyl diphosphate และจากรายงานของ Turner และคณะ (1999) พบว่าหลังจากที่สารตั้งต้น GPP ถูกเปลี่ยนเป็นลิโมนีนโดยเอนไซม์ลิโมนีนซินเทสแล้ว ลิโมนีนยังสามารถจะเปลี่ยนไปได้ 2 แบบ แบบแรกเปลี่ยนเป็น trans-isopiperitenol ซึ่งเป็นสารตัวกลางของเมนทอลโดยอาศัยเอนไซม์ limonene-3-hydroxylase และแบบที่สองเปลี่ยนไปเป็น trans-carveol โดยอาศัยเอนไซม์ limonene-6-hydroxylase ซึ่งเป็นสารตัวกลางของคาร์ไวอน แต่ในพืชตระกูลมินต์มักจะพบการเปลี่ยนแปลงของลิโมนีนเป็นแบบแรกมากกว่าแบบที่สอง (McConkey และคณะ, 2000) เพราะฉะนั้นจากตารางที่ 4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำมันหอมระเหยจาก *M. cordifolia* Opiz. จึงพบว่ามีเมนทอลอยู่มากที่สุด

4.2 การสร้าง cDNA จาก mRNA ของ McLMS ด้วยวิธี RT-PCR

4.2.1 การสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด (total RNA) จากใบของ *M. cordifolia* Opiz.

จากการนำใบอ่อนของ *M. cordifolia* Opiz. 0.3 กรัม มาบดให้ละเอียดเป็นผงในไนโตรเจนเหลวเพื่อให้เซลล์แตก แล้วนำมาสกัดอาร์เอ็นเอทั้งหมด (total RNA) โดยใช้ชุดสกัด Tri reagent (Merck, Germany) จากนั้น นำไปวิเคราะห์หาปริมาณและความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร พบว่าอาร์เอ็นเอทั้งหมดที่ได้มีความเข้มข้น 0.56 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และนำไปหาความสมบูรณ์ของอาร์เอ็นเอโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส ได้ผลดังรูปที่ 4.2 พบว่าปรากฏแถบที่เป็น rRNA ทั้ง 3 ขนาดได้แก่ 28S 18S และ 5.8S ค่อนข้างชัด รวมถึง tRNA เนื่องจากอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จะเป็นอาร์เอ็นเอทั้งหมดในเซลล์ และอาร์เอ็นเอที่มีปริมาณมากที่สุดคือ rRNA มีประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ tRNA มีประมาณ 20-25 เปอร์เซ็นต์ ส่วน mRNA จะมีปริมาณน้อยประมาณ 1-5 เปอร์เซ็นต์



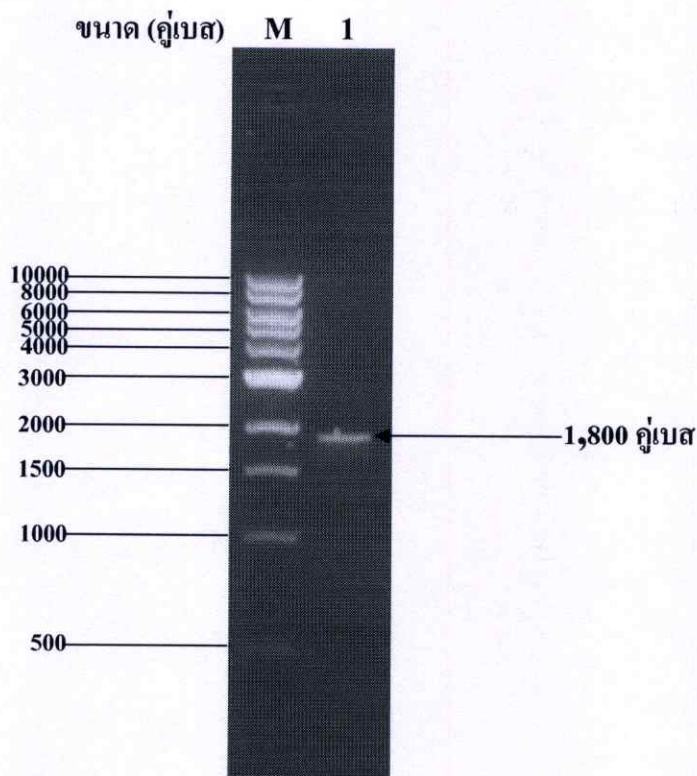
รูปที่ 4.2 แสดงอาร์เอ็นเอทั้งหมดที่สกัดได้จาก *M. cordifolia* Opiz. โดยใช้ชุดสกัด Tri reagent (Merck, Germany)

M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder

1 อาร์เอ็นเอทั้งหมดที่สกัดได้จาก *M. cordifolia* Opiz.

4.2.2 การเพิ่มปริมาณยีน McLMS โดยใช้ชุด SuperScript III One-Step RT-PCR System ด้วยเอนไซม์ Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, USA)

หลังจากได้อาร์เอ็นเอทั้งหมด ใช้ปริมาณอาร์เอ็นเอ 1 ไมโครกรัม และใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ ที่ออกแบบจากส่วน ORF ของยีน LMS จากพืชตระกูลมินต์ (*Mentha* spp.) ที่มีรายงานในธนาคารยีน ได้แก่ *M. piperita*, *M. spicata*, *M. longifolia* และ *M. haplocalyx* เปลี่ยนเป็น cDNA และทำ RT-PCR ในขั้นตอนเดียว โดยมีองค์ประกอบสำหรับการเกิดปฏิกิริยาดังตารางที่ 3.3 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน McLMS ดังตารางที่ 3.4 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์จาก RT-PCR ไปวิเคราะห์โดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส ซึ่งได้ผลดังรูปที่ 4.3 โดยพบว่าในช่องที่ 1 ปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์จาก RT-PCR จำนวน 1 แถบ เมื่อเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์ RT-PCR กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder พบว่าผลิตภัณฑ์ RT-PCR มีขนาดประมาณ 1,800 คู่เบส ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นยีน McLMS จากนั้นตัดแถบผลิตภัณฑ์ RT-PCR บริเวณที่ต้องการจากเจล และสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลตามวิธีข้อ 3.6.2.7 และนำผลิตภัณฑ์ RT-PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ไปใช้ในการโคลนยีน McLMS ต่อไป



รูปที่ 4.3 แสดงผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน McLMS

M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder

1 ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน McLMS

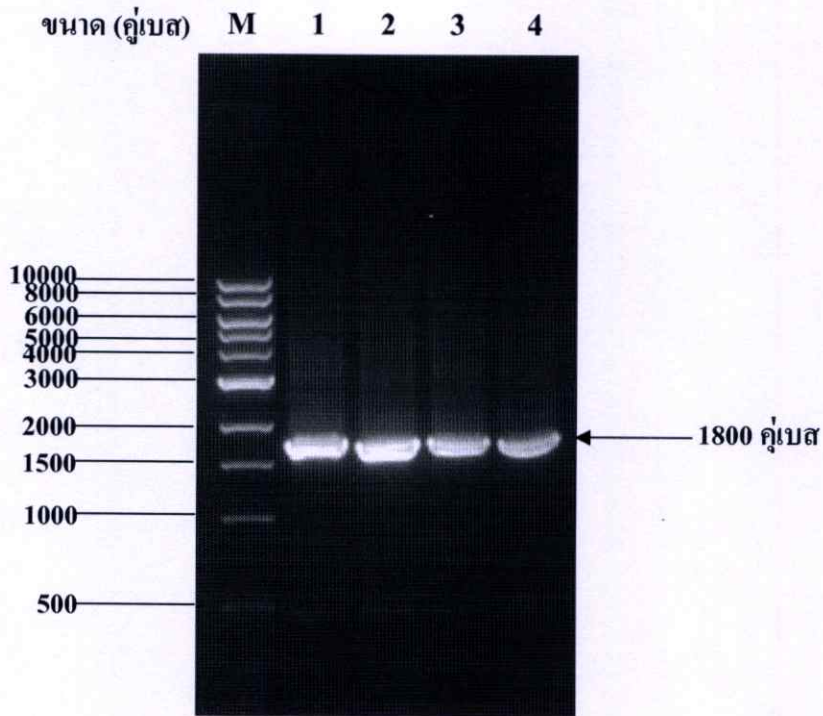
4.3 การโคลนยีน McLMS

จากการนำผลิตภัณฑ์ RT-PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากข้อ 4.2.2 เชื่อมต่อเข้ากับดีเอ็นเอพาหะซึ่งได้แก่เวกเตอร์ pGEM-T Easy (Promega, USA) ซึ่งมีขนาด 3,015 คู่เบส (แผนที่ของเวกเตอร์ในภาคผนวก ก) การทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ Platinum *Taq* DNA Polymerase ในขั้นตอนการทำ RT-PCR ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ RT-PCR ที่มีการเติมเบสอะดีนีน(adenine) ตรงส่วนปลาย ทำให้สามารถจับกับเวกเตอร์ pGEM-T Easy ซึ่งมีเบสไทมีน (thymine) อยู่บริเวณส่วนปลายเปิดของเวกเตอร์ การเชื่อมต่ออาศัยเอนไซม์ T4 DNA ligase จากนั้นจึงถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM109 โดยวิธี heat shock และเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินความเข้มข้นสุดท้าย 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, X-gal เข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ IPTG เข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซ้ำคืน พบว่าได้โคโลนีสีขาวและสีฟ้าเป็นจำนวนมาก โคโลนีที่พบบนจานเพาะเชื้อเป็นเซลล์ที่ได้รับพลาสมิด pGEM-T Easy เนื่องจากในเวกเตอร์ดังกล่าวมียีนต้านทานยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (Amp^r) ซึ่งเซลล์ที่ไม่ได้รับพลาสมิดจะไม่สามารถเจริญได้ในจานเพาะเชื้อ และเวกเตอร์ pGEM-T Easy ยังมียีนที่เป็นรหัสสำหรับสร้างเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดส เรียกว่ายีน *lacZ* ซึ่งในยีนนี้มีบริเวณที่เรียกว่า multiple cloning site เป็นบริเวณที่ผลิตภัณฑ์ RT-PCR จะเข้ามาเชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ ในกรณีที่เวกเตอร์ไม่มีผลิตภัณฑ์ RT-PCR มาเชื่อมต่อ ทำให้ยีน *lacZ* เชื่อมต่อกันและสามารถสร้างเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดส โดยมี IPTG เป็นตัวเหนี่ยวนำ และเอนไซม์ดังกล่าวจะเข้าย่อยสลาย X-gal เกิดเป็นโคโลนีสีฟ้า เพราะฉะนั้นโคโลนีสีฟ้าที่เกิดขึ้นจึงเป็นโคโลนีของเซลล์ที่ได้รับเวกเตอร์ที่ไม่มีการเชื่อมต่อกับผลิตภัณฑ์ RT-PCR และในกรณีที่มีการเชื่อมต่อของผลิตภัณฑ์ RT-PCR กับเวกเตอร์ ทำให้ยีน *lacZ* แยกขาดจากกัน ไม่สามารถสร้างเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดสได้ ถึงแม้จะมี IPTG เป็นตัวเหนี่ยวนำ ทำให้เกิดโคโลนีสีขาว เพราะฉะนั้นโคโลนีสีขาวที่เกิดขึ้นจึงเป็นโคโลนีของเซลล์ที่ได้รับเวกเตอร์ที่มีการเชื่อมต่อกับผลิตภัณฑ์ RT-PCR ดังนั้นจึงสุ่มคัดเลือกโคโลนีสีขาวจำนวน 4 โคโลนีจากโคโลนีทั้งหมด โดยตั้งชื่อโคลนที่ 1, 2, 3, และ 4 ดังนี้ cIMcLMS1, cIMcLMS2, cIMcLMS3 และ cIMcLMS4 ตามลำดับ

4.3.1 การทดสอบพลาสมิดดีเอ็นเอถูกผสมโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์

(Polymerase Chain Reaction : PCR)

นำพลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS1, cIMcLMS2, cIMcLMS3 และ cIMcLMS4 มาเพิ่มปริมาณยีน McLMS โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ โดยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase และใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ คือ ไพรเมอร์ forward McLMS1 และ ไพรเมอร์ reverse McLMS2 (ในวิธีการข้อ 3.6.3.5.1) สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน McLMS ดังตาราง 3.7 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาวิเคราะห์ขนาดโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ได้ผลดังรูปที่ 4.4 โดยพบว่าในช่องที่ 1, 2, 3 และ 4 ซึ่งมีผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากพลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS1, cIMcLMS2, cIMcLMS3 และ cIMcLMS4 ตามลำดับ ปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder พบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีขนาดชัดเจนและมีปริมาณมากที่สุดมีขนาดประมาณ 1800 คู่เบส ซึ่งคาดว่าเป็นขนาดของยีน McLMS ที่ต้องการ



รูปที่ 4.4 แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการทดสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลน cIMcLMS1, cIMcLMS2, cIMcLMS3 และ cIMcLMS4

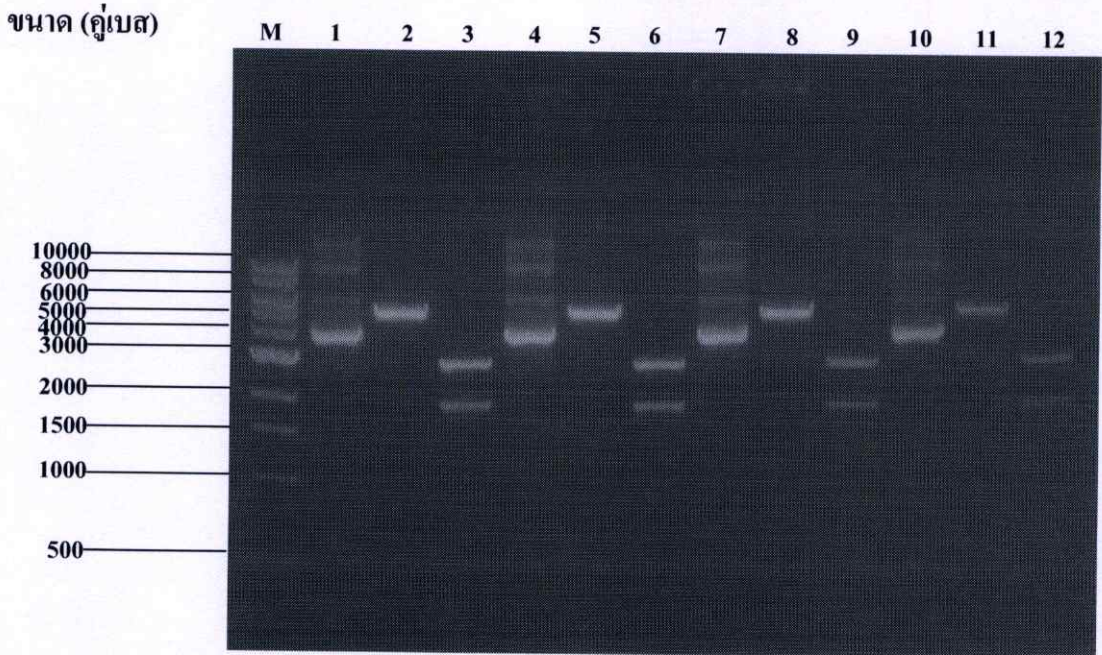
M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder

- 1 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการทดสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลน cIMcLMS1
- 2 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการทดสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลน cIMcLMS2
- 3 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการทดสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลน cIMcLMS3
- 4 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการทดสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลน cIMcLMS4

4.3.2 การทดสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมโดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not I* หรือ *Nco I*

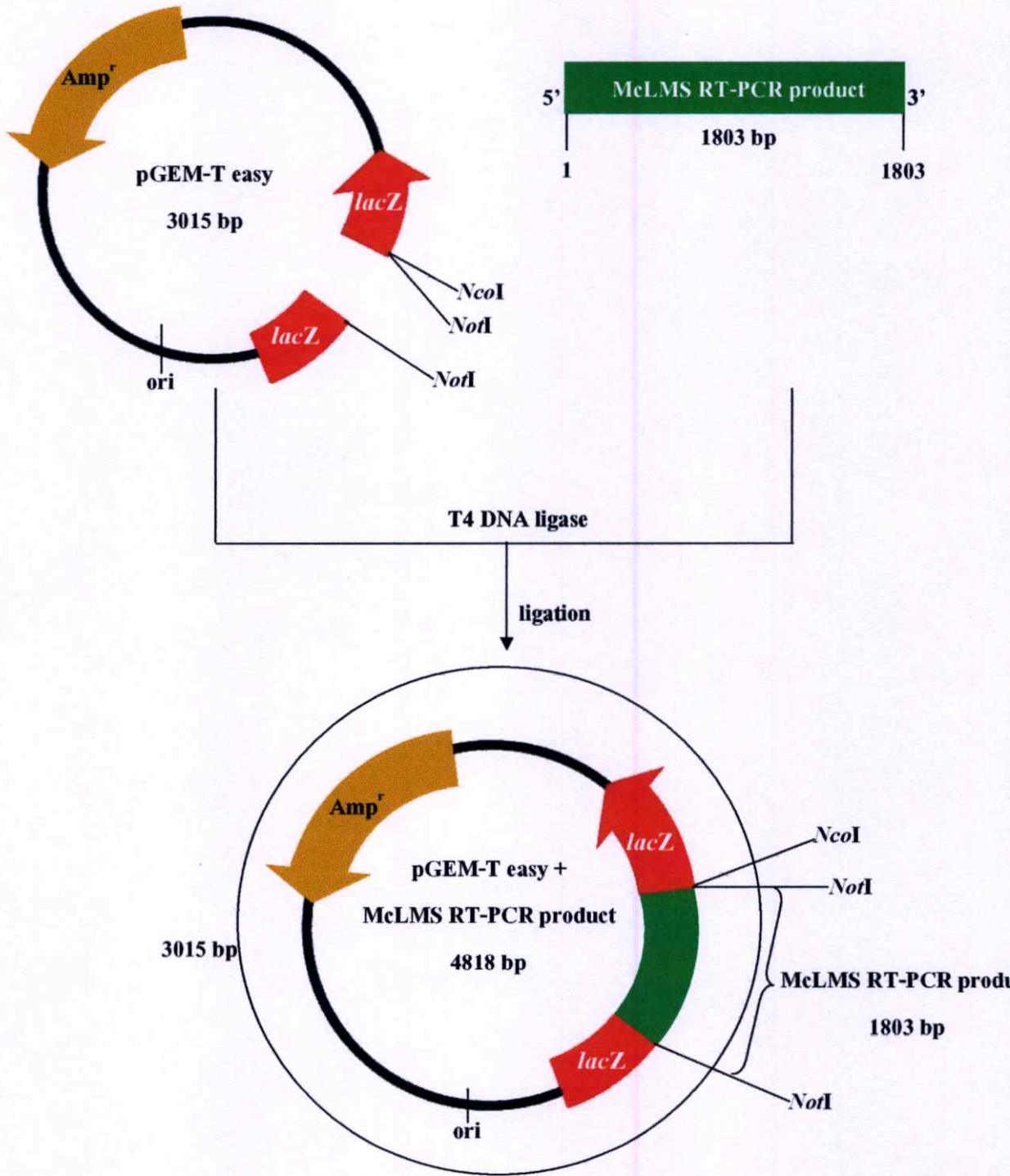
นำพลาสมิดดีเอ็นเอจากจากโคลน cIMcLMS1, cIMcLMS2, cIMcLMS3 และ cIMcLMS4 ตัดด้วยเอนไซม์ *Nco I* หรือ *Not I* เพื่อทดสอบการมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ในเวกเตอร์ pGEM-T easy จากนั้นนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์แล้ว มาวิเคราะห์ขนาดโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส ได้ผลดังรูปที่ 4.5 โดยพบว่าในช่องที่ 1, 4, 7 และ 10 เป็นพลาสมิดดีเอ็นเอที่ไม่ถูกตัดโดยเอนไซม์ จากโคลน cIMcLMS1, cIMcLMS2, cIMcLMS3 และ cIMcLMS4 ตามลำดับ เพื่อใช้เปรียบเทียบกับพลาสมิดดีเอ็นเอที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ และในช่องที่ 2, 5, 8, และ 11 เป็นพลาสมิดดีเอ็นเอที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ *Nco I* จากโคลน cIMcLMS1, cIMcLMS2, cIMcLMS3 และ cIMcLMS4 ตามลำดับ พบว่าปรากฏแถบของดีเอ็นเอจำนวน 1 แถบเหมือนกันทุกช่องเมื่อเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดประมาณ 4,800 คู่เบส เนื่องจากในเวกเตอร์ pGEM-T easy นั้น มีบริเวณ multiple cloning site ที่เป็นบริเวณจดจำของเอนไซม์ *Nco I* เพียงตำแหน่งเดียว เพราะฉะนั้นขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จึงเป็นขนาดเวกเตอร์ 3,015 คู่เบส รวมกับขนาดของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ประมาณ 1,800 คู่เบส ส่วนในช่องที่ 3, 6, 9, และ 12 เป็นพลาสมิดดีเอ็นเอที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ *Not I* จากโคลน cIMcLMS1, cIMcLMS2, cIMcLMS3 และ cIMcLMS4 ตามลำดับ พบว่า ปรากฏแถบของดีเอ็นเอจำนวน 2 แถบเหมือนกันทุกช่อง เมื่อเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดประมาณ 3,000 คู่เบส และ 1,800 คู่เบส เนื่องจากในเวกเตอร์ pGEM-T easy นั้น มีบริเวณ multiple cloning site ที่เป็นบริเวณจดจำของเอนไซม์ *Not I* ถึง 2 ตำแหน่ง ดังนั้นเอนไซม์ *Not I* จึงสามารถตัดพลาสมิดได้ถึง 2 ตำแหน่ง เพราะฉะนั้นขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จำนวน 2 แถบ แถบแรกคาดว่าจะจะเป็นแถบดีเอ็นเอของเวกเตอร์ซึ่งมีขนาด 3,015 คู่เบส และอีกแถบคาดว่าจะจะเป็นแถบดีเอ็นเอของยีน McLMS ซึ่งมีขนาดประมาณ 1,800 คู่เบส รูปที่ 4.6 แสดง restriction map ของยีน McLMS ในเวกเตอร์ pGEM-T easy โดยนำยีน McLMS (สีเขียว) ซึ่งมีขนาด 1,803 คู่เบส เชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ pGEM-T easy ซึ่งมีขนาด 3,015 คู่เบส ทำให้ได้พลาสมิดลูกผสมที่มีขนาด 4,818 คู่เบส ในเวกเตอร์ pGEM-T easy มียีนต้านทานยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (สีเหลือง) เพื่อใช้ในการคัดเลือกโคลนที่ได้รับเวกเตอร์ และมียีน *lac Z* (สีแดง) ซึ่งมีบริเวณ multiple cloning site ที่เป็นบริเวณจดจำของเอนไซม์ *Not I* 2 ตำแหน่ง และ *Nco I* 1 ตำแหน่ง เมื่อตัดพลาสมิดลูกผสมด้วย เอนไซม์ *Not I* ทำให้ได้ส่วนของพลาสมิด 2 ส่วน ส่วนแรกเป็นส่วนของเวกเตอร์ pGEM-T easy ซึ่งมีขนาด 3,015 คู่เบส และส่วนที่สองเป็นส่วนของยีน McLMS (สีเขียว) ซึ่งมีขนาด 1,803 คู่เบส แต่เมื่อตัดด้วยเอนไซม์

Nco I ได้ส่วนของพลาสมิดเพียงส่วนเดียวแต่มีขนาดใหญ่เท่ากับ 4,818 คู่เบส ซึ่งเป็นส่วนของเวกเตอร์ pGEM-T easy ขนาด 3,015 คู่เบส รวมกับส่วนของยีน McLMS (สีเขียว) ขนาด 1,803 คู่เบส



รูปที่ 4.5 แสดงพลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS1, cIMcLMS2, cIMcLMS3 และ cIMcLMS4 ตัดด้วยเอนไซม์ *Not* I หรือ *Nco* I เพื่อทดสอบการมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ RT-PCR

- | | |
|----|--|
| M | ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder |
| 1 | พลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS1 |
| 2 | พลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS1 ที่ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Nco</i> I |
| 3 | พลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS1 ที่ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Not</i> I |
| 4 | พลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS2 |
| 5 | พลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS2 ที่ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Nco</i> I |
| 6 | พลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS2 ที่ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Not</i> I |
| 7 | พลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS3 |
| 8 | พลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS3 ที่ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Nco</i> I |
| 9 | พลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS3 ที่ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Not</i> I |
| 10 | พลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS4 |
| 11 | พลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS4 ที่ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Nco</i> I |
| 12 | พลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS4 ที่ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>Not</i> I |



รูปที่ 4.6 แสดง restriction map ของชิ้น McLMS ในเวกเตอร์ pGEM-T easy เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ Not I และ Nco I

4.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ RT-PCR จากโคลน cIMcLMS1, cIMcLMS2, cIMcLMS3 และ cIMcLMS4

นำพลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS1, cIMcLMS2, cIMcLMS3 และ cIMcLMS4 มาวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้เครื่อง sequencer (Fermentas, Canada) และใช้ไพรเมอร์ 4 เส้น เส้นที่ 1 ใช้ไพรเมอร์สากล SP6 เส้นที่ 2 ไพรเมอร์สากล T7 เส้นที่ 3 และ 4 ออกแบบจากกลางยีน เพื่อให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์เต็มยีน จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาแปลเป็นลำดับกรดอะมิโน ดังรูปที่ 4.7 พบว่าทั้งลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนจากโคลน cIMcLMS1, cIMcLMS2, cIMcLMS3 และ cIMcLMS4 มีความเหมือนกันหมด โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 1,803 คู่เบส แปลเป็นกรดอะมิโนได้ทั้งหมด 600 หน่วย และมีตำแหน่งหยุดการสังเคราะห์โปรตีนที่รหัส TGA จากนั้นนำลำดับกรดอะมิโนเปรียบเทียบกับยีน โมโนเทอร์พินส์ซินเทสในสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีน

1	ATG GCT CTC AAA GTG TTA AGT GTT GCA	ACT CAA ATG GCG ATT CCT AGC AAG CTA ACG ACT	60
1	Met Ala Leu Lys Val Leu Ser Val Ala Thr Gln Met Ala Ile Pro Ser Lys Leu Thr Thr		20
61	TGT CTT CAA CCC TCA CAC TTG AAA TCT TCT CCA AAA TTG TTC TCT AGC ACT AAC AAG TGT		120
21	Cys Leu Gln Pro Ser His Leu Lys Ser Ser Pro Lys Leu Phe Ser Ser Thr Asn Lys Cys		40
121	AGT GGT CGG TCT CGC CTC CGT GTG TAT TGC TCC TCG CAA CTC ACC ACT GAA AGA CGA		180
41	Ser Gly Arg Ser Arg Leu Arg Val Tyr Cys Ser Ser Gln Leu Thr Thr Glu Arg Arg		60
181	TCC GGA AAC TAC AAC CCT TCT CGT TGG GAT GTC GAA TTC ATC CAA TCC CTC CAC AGT GAT		240
61	Ser Gly Asn Tyr Asn Pro Ser Arg Trp Asp Val Glu Phe Ile Gln Ser Leu His Ser Asp		80
241	TAT AAG AAG GAC AAA CAC GCG ATT AGG GCT TCT GAG CTG GTC ACT TTG GTG AAG ATG GAA		300
81	Tyr Lys Lys Asp Lys His Ala Ile Arg Ala Ser Glu Leu Val Thr Leu Val Lys Met Glu		100
301	CTG GAG AAA GAA ACG GAT CAA ATT CGA CAA CTT GAG TTG ATC GAT GAC CTG CAG AGG ATG		360
101	Leu Glu Lys Glu Thr Asp Gln Ile Arg Gln Leu Glu Leu Ile Asp Asp Leu Gln Arg Met		120

รูปที่ 4.7 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของผลิตภัณฑ์ RT-PCR จากโคลน cIMcLMS1, cIMcLMS2, cIMcLMS3 และ cIMcLMS4
กรอบสี่เหลี่ยมแสดงไพรเมอร์ forward McLMS1 และ ไพรเมอร์ reverse McLMS2

361 GGG CTG TCC GAT CAT TTC CAA AAT GAG TTC AAA GAA ATC TTG TCC TCT ATA TAT CTC GAC 420
 121 Gly Leu Ser Asp His Phe Gln Asn Glu Phe Lys Glu Ile Leu Ser Ser Ile Tyr Leu Asp 140
 421 CAT CAC TAT TAC AAG AAC CCT TTT CCA AAA GAA GAA AGG GAT CTC TAC TCC ACA TCT CTT 480
 141 His His Tyr Tyr Lys Asn Pro Phe Pro Lys Glu Glu Arg Asp Leu Tyr Ser Thr Ser Leu 160
 481 GCA TTT AGG CTC CTC AGA GAA CAT GGT TTT CAA GTC GCA CAA GAG GTA TTC GAC AGT TTC 540
 161 Ala Phe Arg Leu Arg Glu His Gly Phe Gln Val Ala Gln Glu Val Phe Asp Ser Phe 180
 541 AAG AAC GAA GAG GGT GAG TTC AGA GAG AGC CTT AGC GAC ACC AGA GGA TTG TTG CAA 600
 181 Lys Asn Glu Glu Gly Glu Phe Arg Glu Ser Leu Ser Asp Thr Arg Gly Leu Leu Gln 200
 601 CTG TAT GAA GCT TCC TTT CTG TTG ACG GAA ACC ACG CTC GAG TCA GCG AGG GAA 660
 201 Leu Tyr Glu Ala Ser Phe Leu Leu Thr Glu Gly Glu Thr Thr Leu Glu Ser Ala Arg Glu 220
 661 TTC GCC ACC AAA TTT TTG GAG GAA AGA GTG AAC GAG GGT GGT GAT GGC GAC CTT TTA 720
 221 Phe Ala Thr Lys Phe Leu Glu Glu Arg Val Asn Glu Gly Gly Asp Gly Asp Leu Leu 240
 721 ACA AGA ATC GCA TAT TCT TTG GAC ATC CCA CTT CAT TGG AGG ATT AAA AGG CCA AAT GCA 760
 241 Thr Arg Ile Ala Tyr Ser Leu Asp Ile Pro Leu His Trp Arg Ile Lys Arg Pro Asn Ala 260

761 CCT GTG TGG ATC GAA TGG TAT AGG AAG AGG CCC GAC ATG AAT CCA GCA GTG TTG GAG CTT 820
 261 Pro Val Trp Ile Glu Trp Tyr Arg Lys Arg Pro Asp Met Asn Pro Ala Val Leu Glu Leu 280

 821 GCC ATA CTC GAC TTA AAT ATT GTT CAA GCA CAA TTT CAA GAA GAG CTC AAA GAA TCC TTC 900
 281 Ala Ile Leu Asp Leu Asn Ile Val Gln Ala Gln Phe Gln Glu Leu Lys Glu Ser Phe 300

 901 AGG TGG TGG AGA AAT ACT GGG TTT GTT GAG AAG CTG CCC TTC GCA AGG GAT AGA CTG GTG 960
 301 Arg Trp Trp Arg Asn Thr Gly Phe Val Glu Lys Leu Pro Phe Ala Arg Asp Arg Leu Val 320

 961 GAA TGC TAC TTT TGG AAT ACT GGG ATC ATC GAG CCA CGT CAG CAT GCA AGT GCA AGG ATA 960
 321 Glu Cys Tyr Phe Trp Asn Thr Gly Ile Ile Glu Pro Arg Gln His Ala Ser Ala Arg Ile 340

 961 ATG ATG GGC AAA GTC AAC GCT CTG ATC ACG GTG ATC GAT GAT ATT TAT GAT GTC TAT GGC 1080
 341 Met Met Gly Lys Val Asn Ala Leu Ile Thr Val Ile Asp Asp Ile Tyr Asp Val Tyr Gly 360

 1081 ACC TTG GAA GAA CTC GAA CAA TTC ACT GAC CTC ATT CGA AGG TGG GAT ATA AAC TCA ATC 1140
 361 Thr Leu Glu Glu Leu Glu Gln Phe Thr Asp Leu Ile Arg Arg Trp Asp Ile Asn Ser Ile 380

 1141 GAC CAA CTT CCC GAT TAC ATG CAA CTG TGC TTT CTT GCA CTC AAC AAC TTC GTC GAT GAT 1200
 381 Asp Gln Leu Pro Asp Tyr Met Gln Leu Cys Phe Leu Ala Leu Asn Asn Phe Val Asp Asp 400

1201 ACA TCG TAC GAT GTT ATG AAG GAG AAA GGC GTC AAC GTT ATA CCC TAC CTG CGG CAA TCG 1260
 401 Thr Ser Tyr Asp Val Met Lys Glu Lys Gly Val Asn Val Ile Pro Tyr Leu Arg Gln Ser 420
 1261 TGG GTG GAT TTG GCG GAT AAG TAT ATG GTA GAG GCA CGG TGG TTC TAC GGC GGG CAC AAA 1320
 421 Trp Val Asp Leu Ala Asp Lys Tyr Met Val Glu Ala Arg Trp Phe Tyr Gly Gly His Lys 440
 1321 CCG AGT TTG GAA GAG TAT TTG GAG AAC TCA TGG CAG TCG ATA AGT GGG CCC TGT ATG TTA 1380
 441 Pro Ser Leu Glu Glu Tyr Leu Glu Asn Ser Trp Gln Ser Ile Ser Gly Pro Cys Met Leu 460
 1381 ACG CAC ATA TTC TTC CGA GTA ACA GAT TCG TTC ACA AAG GAG ACC GTC GAC AGC TTG TAC 1440
 461 Thr His Ile Phe Phe Arg Val Thr Asp Ser Phe Thr Lys Glu Thr Val Asp Ser Leu Tyr 480
 1441 AAA TAC CAC GAT TTA GTT CGC TGG TCA TCC TTC GTT CTG CGG CTT GCT GAT GAT TTG GGA 1500
 481 Lys Tyr His Asp Leu Val Arg Trp Ser Ser Phe Val Leu Arg Leu Ala Asp Asp Leu Gly 500
 1501 ACC TCG GTG GAA GAG GTG AGC AGA GGG GAT GTG CCG AAA TCA CTT CAG TGC TAC ATG AGT 1560
 501 Thr Ser Val Glu Glu Val Ser Arg Gly Asp Val Pro Lys Ser Leu Gln Cys Tyr Met Ser 520
 1561 GAC TAC AAT GCA TCG GAG GCG GAG GCG CGG AAG CAC GTG AAA TGG CTG ATA GCG GAG GTG 1620
 521 Asp Tyr Asn Ala Ser Glu Ala Glu Ala Arg Lys His Val Lys Trp Leu Ile Ala Glu Val 540

1621 TGG AAG AAG ATG AAT GCG GAG AGG GTG TCG AAG GAT TCT CCA TTC GGC AAA GAT TTT ATA 1680
 541 Trp Lys Lys Met Asn Ala Glu Arg Val Ser Lys Asp Ser Pro Phe Gly Lys Asp Phe Ile 560
 1681 GGA TGT GCA GTT GAT TTA GGA AGG ATG GCG CAG TTG ATG TAC CAT AAT GGA GAT GGG CAC 1740
 561 Gly Cys Ala Val Asp Leu Gly Arg Met Ala Gln Leu Met Tyr His Asn Gly Asp Gly His 580
 1741 GGC ACA CAA CAT CCT ATT ATA CAT CAA CAA ATG ACC AGA ACC TTA TTC GAG CCC TTT GCA 1800
 581 Gly Thr Gln His Pro Ile Ile His Gln Gln Met Thr Arg Thr Leu Phe Glu Pro Phe Ala 600

1801 TGA 1803

601 End

รูปที่ 4.7 (ต่อ)

4.5 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ McLMS กับเอนไซม์ ลิโมนีนซินเทสในพืชตระกูลมินต์ (*Mentha* spp.)

เมื่อทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ McLMS จากนั้นนำมาเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน LMS ในพืชตระกูลมินต์ (*Mentha* spp.) ที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีนจำนวน 4 ชนิด ได้ผลดังรูปที่ 4.8

1	ATGGCTCTCAAAGTGTAAAGTGTGCAACTCAAATGGCGATTCTAGCAAGCTAACGACT	60
2	ATGGCTCTCAAAGTGTAAAGTGTGCAACTCAAATGGCGATTCTAGCAAGCTAACGAGA	60
3	ATGGCTCTCAAAGTGTAAAGTGTGCAACTCAAATGGCGATTCTAGCAAGCTAACGAGA	60
4	ATGGCTCTCAAAGTGTAAAGTGTGCAACTCAAATGGCGATTCTAGCAAGCTAACGACC	60
5	ATGGCTCTCAAAGTGTAAAGTGTGCAACTCAAATGGCGATTCTAGCAAGCTAACGACA *****	60
1	TGTCTTCAACCCTCACACTTGAATCTTCTCCAAAATTGTTCTCTAGCACTAACAAAGTGT	120
2	TGTCTTCAACCCTCACACTTGAATCTTCTCCAAAATTGTTATCTAGCACTAACAA---GT	117
3	TGTCTTCAACCCTCACACTTGAATCTTCTCCAAAATTGTTATCTAGCACTAACAA---GT	117
4	TATCTTCAACCCTCACACTTGAATCTTCTCCTAAATTGCTCTCTAACACTAAGG---GT	117
5	TGTCTTCAACCCTCACACTTGAATCTTCTCCAAAATTGTTATCTAGCACTAACAA---GT * ***** *	117
1	AGTGGTCGGTCTCGCCTCCGTGTGATTGCTCCTCCTCGCAACTCACCCTGAAAGACGA	180
2	AGTAGTCGGTCTCGCCTCCGTGTGATTGCTCCTCCTCGCAACTCACTACTGAGAGACGA	177
3	AGTAGTCGGTCTCGCCTCCGTGTGATTGCTCCTCCTCGCAACTCACTACTGAGAGACGA	177
4	ACTAGTCGATCTCGCCTCCGTGTGATTGCTCCTCCTCGCAACTCACTACCGAAAGACGA	177
5	AGTAGTCGGTCTCGCCTCCGTGTGATTGCTCCTCCTCGCAACTCACTACTGAAAGACGA *	177
1	TCCGGAAACTACAACCCTTCTCGTTGGGATGTCGAATTCATCCAATCCCTCCACAGTGAT	240
2	TCCGGAAACTACAACCCTTCTCGTTGGGATGTCGAATTCATCCAATCCCTCCACAGTGAT	237
3	TCCGGAAACTACAACCCTTCTCGTTGGGATGTCGAATTCATCCAATCCCTCCACAGTGAT	237
4	TCCGGAAACTACAACCCTTCTCGTTGGGATGTCGACTTATCCAAACGCTCCACAGTGAT	237
5	TCCGGAAACTACAACCCTTCTCGTTGGGATGTCGAATTCATCCAATCGCTTCTCAGTGAC ***** *	237
1	TATAAGAAGGACAAACACGCGATTAGGGCTTCTGAGCTGGTCACCTTGGTGAAGATGGAA	300
2	TATGAGGAGGACAAACATGCGATTAGGGCTTCTGAGCTGGTCACCTTGGTGAAGATGGAA	297
3	TATGAGGAGGACAAACACGCGATTAGGGCTTCTGAGCTGGTCACCTTGGTGAAGATGGAA	297
4	TATAAGGACGAGAAGCATGCGAGAAGGGCTTCTGAGCTGGTCACCTTGGTGAAGATGGAA	297
5	TATAAGGAGGACAAACACGCGATTAGGGCTTCTGAGCTGGTCACCTTGGTGAAGATGGAA *** *	297

รูปที่ 4.8 แสดงการวิเคราะห์ multiple alignment ของยีนลิโมนีนซินเทสของพืชในกลุ่ม *Mentha* spp.

กับยีน McLMS

- 1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ McLMS (สีแดง)
- 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ limonene synthase จาก *Mentha haplocalyx*
- 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ limonene synthase จาก *Mentha longifolia*
- 4 ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ limonene synthase จาก *Mentha piperita*
- 5 ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ limonene synthase จาก *Mentha spicata*

1	CTGGAGAAAGAAACGGATCAAATTCGACAACCTTGAGTTGATCGATGACCTGCAGAGGATG	360
2	TTGGAGAAAGAAACGGATCATATTCGACAACCTTGAGTTGATCGATGACTTGCAGAGGATG	357
3	TTGGAGAAAGAAACGGATCATATTCGACAACCTTGAGTTGATCGATGACTTGCAGAGGATG	357
4	TTGGAGAAAGAAACGGATCAAATTCGACAGCTTGAATTGATTGATGACTTGCAGAGGATG	357
5	CTGGAGAAAGAAACGGATCAAATTCGACAACCTTGAGTTGATCGATGACTTGCAGAGGATG	357

1	GGGCTGTCCGATCATTTCAAAATGAGTTCAAAGAAATCTTGTCTCTATATATCTCGAC	420
2	GGGCTGTCCGATCATTTCAGAAATGAGTTCAAAGAAATCTTGTCTCTATATATCTCGAC	417
3	GGGCTGTCCGATCATTTCAGAAATGAGTTCAAAGAAATCTTGTCTCTATATATCTCGAC	417
4	GGGCTGTCCGATCATTTCAGAACGAGTTCAAAGAAATCTTGTCTCTGTATATCTCGAC	417
5	GGGCTGTCCGATCATTTCAAAATGAGTTCAAAGAAATCTTGTCTCTATATATCTCGAC	417

1	CATCACTATTACAAGAACCCTTTTCCAAAAGAAGAAA-GGGATCTCTACTCCACATCTCT	479
2	CATCACTATTACAAGAACCCTTTTCCAGAAGAAGAAAAGGGATCTCTACTC-ACATCTCT	476
3	CATCACTATTACAAGAACCCTTTTCCAAAAGAAGAAA-GGGATCTCTACTCCACATCTCT	476
4	CATGGCTATTACAAGAATCCTGATCCAAAAGAAGAAA-GGGATCTATACTCCACATCTCT	476
5	CATCACTATTACAAGAACCCTTTTCCAAAAGAAGAAA-GGGATCTCTACTCCACATCTCT	476
	*** *****	
1	TGCATTTAGGCTCCTCAGAGAACATGGTTTTCAAGTCGCACAAGAGGTATTTCGACAGTTT	539
2	TGCATTTAGGCTCCTCAGAGAACATGGTTTTCAAGTCGCACAAGAGGTATTTCGACAGTTT	536
3	TGCATTTAGGCTCCTCAGAGAACATGGTTTTCAAGTCGCACAAGAGGTATTTCGACAGTTT	536
4	TGCATTTAGGCTCCTTCGAGAACATGGTTTTCAAGTTGCTCAAGAGGTATTTCGACAGTTT	536
5	TGCATTTAGGCTCCTCAGAGAACATGGTTTTCAAGTCGCACAAGAGGTATTTCGATAGTTT	536

1	CAAGAACGAAGAGGGTGAGTTCAGAGAGAGCCTTAGCGACGACACCAGAGGATTGTTGCA	599
2	CAAGAACGAGGAGGGTGAGTTCAAAGAAAGCCTTAGCGACGACACTAGAGGATTGTTGCG	596
3	CAAGAACGAGGAGGGTGAGTTCAAAGAAAGCCTTAGCGACGACACCAGAGGATTGTTGCA	596
4	CAAGAACGAGGAGGGTGAGTTCAAAGAAAGCCTTAGCGACGACACCAGAGGATTGTTGCA	596
5	CAAGAACGAGGAGGGTGAGTTCAAAGAAAGCCTTAGCGACGACACCAGAGGATTGTTGCA	596

1	ACTGTATGAAGCTTCCTTTCTGTTGACGGAAGGCGAAACCACGCTCGAGTCAGCGAGGGA	659
2	ACTGTATGAAGCTTCCTTTCTGTTGACGGAAGGCGAAACCACGCTCGAGTCAGCGAGGGA	656
3	ACTGTATGAAGCTTCCTTTCTGTTGACGGAAGGCGAAACCACGCTCGAGTCAGCGAGGGA	656
4	ACTGTACGAAGCTTCCTTTCTGTTGACGGAAGGCGAAACCACGCTCGAGTCAGCGAGGGA	656
5	ACTGTATGAAGCTTCCTTTCTGTTGACGGAAGGCGAAACCACGCTCGAGTCAGCGAGGGA	656

1	ATTCGCCACCAAATTTTTGGAGGAAAGAGTGAACGAGGGTGGTGGTGTATGGCGACCTTTT	719
2	ATTCGCCACCAAATTTTTGGAGGAAAGAGTGAACGAGGGTGGTGGTGTATGGCGACCTTTT	716
3	ATTCGCCACCAAATTTTTGGAGGAAAGAGTGAACGAGGGTGGTGGTGTATGGCGACCTTTT	716
4	ATTCGCCACCAAATTTTTGGAGGAAAGAGTGAATGAGGGTGGTGGTGTATGAAAACCTTTT	716
5	ATTCGCCACCAAATTTTTGGAGGAAAGAGTGAACGAGGGTGGTGGTGTATGGCGACCTTTT	716

1	AACAAGAATCGCATATTTCTTTGGACATCCCACTTCATTGGAGGATTAAGGCCAAATGC	779
2	AACAAGAATCGCATATTTCTTTGGACATCCCACTTCATTGGAGGATTAAGGCCAAATGC	776
3	AACAAGAATCGCATATTTCTTTGGACATCCCACTTCATTGGAGGATTAAGGCCAAATGC	776
4	AACAAGAATCGCATATTTCTTTAGAAATCCCACTTCATTGGAGGATTAAGGCCAAATGC	776
5	AACAAGAATCGCATATTTCTTTGGACATCCCTCTTATTGGAGGATTAAGGCCAAATGC	776

1	ACCTGTGTGGATCGAATGGTATAGGAAGAGGCCCGACATGAATCCAGTAGTGTGGAGCT	839
2	ACCTACGTGGATCGAATGGTATAGGAAGAGGCCCGACATGAATCCAGTAGTGTGGAGCT	836
3	ACCTGCGTGGATCGAATGGTATAGGAAGAGGCCCGACATGAATCCAGTAGTGTGGAGCT	836
4	ACCTGTGTGGATCGAATTCGTATAGGAAGAGGCCCAACATGAATCCAGTAGTGTGGAGCT	836
5	ACCTGTGTGGATCGAATGGTATAGGAAGAGGCCCGACATGAATCCAGTAGTGTGGAGCT	836
	**** *****	

รูปที่ 4.8 (ต่อ)

1	TGCCATACTCGACTTAAATATTGTTCAAGCACAAATTTCAAGAAGAGCTCAAAGAATCCTT	899
2	TGCCATACTCGACTTAGATATTGTTCAAGCACAAATTTCAAGAAGAGCTCAAAGAATCCTT	896
3	TGCCATACTCGACTTAAATATTGTTCAAGCACAGTTTCAAGAAGAGCTTAAAGAATCCTT	896
4	TGCCATACTCGACTTAAATATTGTTCAAGCTCATTTTCAACAAGAACTCAAAGAATCCTT	896
5	TGCCATACTCGACTTAAATATTGTTCAAGCACAAATTTCAAGAAGAGCTCAAAGAATCCTT *****	896
1	CAGGTGGTGGAGAAATACTGGGTTTGTGAGAAGCTGCCCTTCGCAAGGGATAGACTGGT	959
2	CAGGTGGTGGAGAAATACTGGTTTTGTGAGAAGCTGCCCTTCGCAAGGGATAGATTGGT	956
3	CAGGTGGTGGAGAAATACTGGGTTTGTGAGAAGCTGCCCTTCGCAAGGGATAGACTGGT	956
4	CCGTGGTGGAGAAATACTGGGTTTGTGAGAAGCTGCCCTTCGCAAGGGATAGACTGGT	956
5	CAGGTGGTGGAGAAATACTGGGTTTGTGAGAAGCTGCCCTTCGCAAGGGATAGACTGGT * *****	956
1	GGAATGCTACTTTTGAATACTGGGATCATCGAGCCACGTGAGCATGCAAGTGAAGGAT	1019
2	GGAATGCTACTTTTGAATACTGGGATCATCGAGCCACGTGAGCATGCAAGTGAAGGAT	1016
3	GGAATGCTACTTTTGAATACTGGGATCATCGAGCCACGTGAGCATGCAAGTGAAGGAT	1016
4	GGAATGCTACTTTTGAATACTGGGATCATCGAGCCACGTGAGCATGCAAGTGAAGGAT	1016
5	GGAATGCTACTTTTGAATACTGGGATCATCGAGCCACGTGAGCATGCAAGTGAAGGAT *****	1016
1	AATGATGGGCAAAGTCAACGCTCTGATCACGGTGATCGATGATATTTATGATGTCTATGG	1079
2	AATGATGGGCAAAGTCAACGCTCTGATTACGGTGATCGATGATATTTATGATGTCTACGG	1076
3	AATGATGGGCAAAGTCAACGCTCTGATTACGGTGATCGATGATATTTATGATGTCTATGG	1076
4	AATGATGGGCAAAGTCAACGCTCTGATTACGGTGATCGATGATATTTATGATGTCTATGG	1076
5	AATGATGGGCAAAGTCAACGCTCTGATTACGGTGATCGATGATATTTATGATGTCTATGG *****	1076
1	CACCTTGAAGAAGTCAACAATTCACCTGACCTCATTCGAAGTGGGATATAAACTCAAT	1139
2	CACCTTAGAAGAAGTCAACAATTCACAGAAGTCAATTCGGAGATGGGATATAAACTCAAT	1136
3	CACCTTAGAAGAAGTCAACAATTCACCTGACCTCATTCGAAGTGGGATATAAACTCAAT	1136
4	TACCTTAGAAGAAGTCAACAATTCACAGACCTCATTCGGAGATGGGATATAAACTCAAT	1136
5	CACCTTAGAAGAAGTCAACAATTCACCTGACCTCATTCGAAGTGGGATATAAACTCAAT *****	1136
1	CGACCAACTTCCCGATTACATGCAACTGTGCTTCTTGCACCTCAACAACCTTCGTCGATGA	1199
2	CGACCAACTTCCCGATTACATGCAACTGTGCTTCTTGCACCTCAACAACCTTCGTCGATGA	1196
3	CGACCAACTTCCCGATTACATGCAACTGTGCTTCTTGCACCTCAACAACCTTCGTCGATGA	1196
4	CGACCAACTTCCCGATTACATGCAACTGTGCTTCTTGCACCTCAACAACCTTCGTCGATGA	1196
5	CGACCAACTTCCCGATTACATGCAACTGTGCTTCTTGCACCTCAACAACCTTCGTCGATGA *****	1196
1	TACATCGTACGATGTTATGAAGGAGAAAGGCGTCAACGTTATACCCTACCTGCGGCAATC	1259
2	TACATCGTACGATGTTATGAAGGAGAAAGGCGTCAACGTTATACCCTACCTGCGGCAATC	1256
3	TACATCGTACGATGTTATGAAGGAGAAAGGCGTCAACGTTATACCCTACCTGCGGCAATC	1256
4	AACATCCTACGATGTTATGAAGGAGAAAGGCGTCAACGTTATACCCTATCTTCGACAATC	1256
5	TACATCGTACGATGTTATGAAGGAGAAAGGCGTCAACGTTATACCCTACCTGCGGCAATC *****	1256
1	GTGGGTGGATTTGGCGGATAAGTATATGGTAGAGGCACGGTGGTCTACGGCGGGCACAA	1319
2	GTGGGTGGATTTGGCGGATAAGTATATGGTAGAGGCACGGTGGTCTACGGCGGGCACAA	1316
3	GTGGGTGGATTTGGCGGATAAGTATATGGTAGAGGCACGGTGGTCTACGGCGGGCACAA	1316
4	GTGGGTGGATTTGGCGGATAAGTACATGGTAGAGGCACGGTGGTCTACGGCGGGCACAA	1316
5	GTGGGTGGATTTGGCGGATAAGTATATGGTAGAGGCACGGTGGTCTACGGCGGGCACAA *****	1316
1	ACCGAGTTTGAAGAGTATTTGGAGAAGTCAATGGCAGTCGATAAGTGGGCCCTGTATGTT	1379
2	ACCAAGTTTGAAGAGTATTTGGAGAAGTCAATGGCAGTCGATAAGTGGGCCCTGTATGTT	1376
3	ACCAAGTTTGAAGAGTATTTGGAGAAGTCAATGGCAGTCGATAAGTGGGCCCTGTATGTT	1376
4	ACCAAGTTTGAAGAGTATTTGGAAAAGTCAATGGATGTGCGATAAGTGGGCCCTGTATGTT	1376
5	ACCAAGTTTGAAGAGTATTTGGAGAAGTCAATGGCAGTCGATAAGTGGGCCCTGTATGTT *** *****	1376

รูปที่ 4.8 (ต่อ)

1	AACGCACATATTCTCCGAGTAAACAGATTCGTTACAAAAGGAGACCGTCGACAGCTTGTA	1439
2	AACGCACATATTCTCCGAGTAAACAGATTCGTTACAAAAGGAGACCGTCGACAGCTTGTA	1436
3	AACGCACATATTCTCCGAGTAAACAGATTCGTTACAAAAGGAGACCGTCGACAGCTTGTA	1436
4	GACACACATATTTTCCGAGTAAACAGATTCGTTACAAAAGGAGACTGTCGACAGCTTGTA	1436
5	AACGCACATATTCTCCGAGTAAACAGATTCGTTACAAAAGGAGACCGTCGACAGCTTGTA	1436

1	CAAATACCACGATTTAGTTCGTTGGTCATCCTTCGTTCTGCGGCTTGCTGATGATTTGGG	1499
2	CAAATACCACGATTTAGTTCGTTGGTCATCCTTCGTTCTGCGGCTTGCTGATGATTTGGG	1496
3	CAAATACCACGATTTAGTTCGTTGGTCATCCTTCGTTCTGCGGCTTGCTGATGATTTGGG	1496
4	CAAGTACCACGATTTAGTTCGTTGGTCATCCTTCGTTCTGCGACTTGCTGATGATTTGGG	1496
5	CAAATACCACGATTTAGTTCGTTGGTCATCCTTCGTTCTGCGGCTTGCTGATGATTTGGG	1496

1	AACCTCGGTGGAAGAGGTGAGCAGAGGGGATGTGCCGAAATCACTTCAGTGCTACATGAG	1559
2	AACCTCGGTGGAAGAGGTGAGCAGAGGGGATGTGCCGAAATCACTTCAGTGCTACATGAG	1556
3	AACCTCGGTGGAAGAGGTGAGCAGAGGGGATGTGCCGAAATCACTTCAGTGCTACATGAG	1556
4	AACCTCAGTGGAAGAGGTGAGCAGAGGGGATGTGCCGAAATCACTTCAGTGCTACATGAG	1556
5	AACCTCGGTGGAAGAGGTGAGCAGAGGGGATGTGCCGAAATCACTTCAGTGCTACATGAG	1556

1	TGACTACAATGCATCGGAGGCGGAGGCGCGGAAGCACGTGAAATGGCTGATAGCGGAGGT	1619
2	TGACTACAATGCATCGGAGGCGGAGGCGCGGAAGCACGTGAAATGGCTGATAGCGGAGGT	1616
3	TGACTACAATGCATCGGAGGCGGAGGCGCGGAAGCACGTGAAATGGCTGATAGCGGAGGT	1616
4	TGACTACAATGCGTTCGGAGGCGGAGGCGCGGAAGCACGTGAAATGGCTGATAGCAGAGGT	1616
5	TGACTACAATGCATCGGAGGCGGAGGCGCGGAAGCACGTGAAATGGCTGATAGCGGAGGT	1616

1	GTGGAAGAAGATGAATGCGGAGAGGGTGTGCAAGGATTCTCCATTTCGGCAAAGATTTTAT	1679
2	GTGGAAGAAGATGAATGCGGAGAGGGTGTGCAAGGATTCTCCATTTCGGCAAAGATTTTAT	1676
3	GTGGAAGAAGATGAATGCGGAGAGGGTGTGCAAGGATTCTCCATTTCGGCAAAGATTTTAT	1676
4	GTGGAAGAAGATGAATGCGAGAGGGTGTGCAAGGATTCTCCATTTCGGCAAAGATTTTAT	1676
5	GTGGAAGAAGATGAATGCGGAGAGGGTGTGCAAGGATTCTCCATTTCGGCAAAGATTTTAT	1676

1	AGGATGTGCAGTTGATTTAGGAAGGATGGCGCAGTTGATGTACCATAATGGAGATGGGCA	1739
2	AGGATGTGCAGCTGATTTAGGAAGGATGGCGCAGTTGATGTACCATAATGGAGATGGGCA	1736
3	AGGATGTGCAGCTGATTTAGGAAGGATGGCGCAGTTGATGTACCATAATGGAGATGGGCA	1736
4	AGGATGTGCAGTTGATTTAGGAAGGATGGCGCAGTTGATGTACCATAATGGAGATGGGCA	1736
5	AGGATGTGCAGTTGATTTAGGAAGGATGGCGCAGTTGATGTACCATAATGGAGATGGGCA	1736

1	CGGCACACAACATCCTATTATACATCAACAAATGACCAGAACCTTATTCGAGCCCTTTGC	1799
2	CGGCACACAACATCCTATAATACATCAACAAATGACCAGAACCTTATTCGAGCCCTTTGC	1796
3	CGGCACACAACATCCTATAATACATCAACAAATGACCAGAACCTTATTCGAGCCCTTTGC	1796
4	TGGCACACAACATCCTATAATACATCAACAAATGACCGAACCTTATTCGAGCCCTTTGC	1796
5	CGGCACACAACACCCTATTATACATCAACAAATGACCAGAACCTTATTCGAGCCCTTTGC	1796

1	ATGA 1803	
2	ATGA 1800	
3	ATGA 1800	
4	ATGA 1800	
5	ATGA 1800	

รูปที่ 4.8 (ต่อ)

ตารางที่ 4.2 แสดงการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน McLMS กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนลิโมนีนซินเทสในพืชกลุ่ม *Mentha* spp. ที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีน

ชนิดของพืช	ชนิดของยีน	ความเหมือน (เปอร์เซ็นต์)
<i>Mentha cordifolia</i> Opiz.	limonene synthase	100
<i>Mentha longifolia</i>	limonene synthase	98
<i>Mentha spicata</i>	limonene synthase	98
<i>Mentha haplocalyx</i>	limonene synthase	97
<i>Mentha piperita</i>	limonene synthase	93

จากตารางที่ 4.2 แสดงเปอร์เซ็นต์ความเหมือนลำดับนิวคลีโอไทด์ของ McLMS กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ลิโมนีนซินเทสในพืชกลุ่ม *Mentha* spp. ที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีนจำนวน 4 ชนิด พบว่ายีน McLMS มีความเหมือนกับยีน LMS จาก *M. longifolia* และ *M. spicata* มากที่สุด คือ 98 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *M. haplocalyx* var. *piperascens* และ *M. piperita* มีความเหมือน 97 เปอร์เซ็นต์ และ 93 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จะเห็นว่ายีน LMS จากพืชกลุ่ม *Mentha* spp. ทุกชนิดมีความเหมือนในระดับนิวคลีโอไทด์กับยีน McLMS ค่อนข้างมาก (มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์) เนื่องจากเป็นเอนไซม์ชนิดเดียวกัน และเป็นพืชที่มีความใกล้ชิดกันมากอยู่ใน genus เดียวกัน จากงานวิจัยของ Yuba และคณะ (1996) โคลนยีน LMS จาก *P. frutescens* และนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบความเหมือนกับยีน LMS จากสเปียร์มินต์ (*M. spicata*) พบว่ามีความเหมือนกันเพียง 65 เปอร์เซ็นต์ แต่ยีน LMS จาก *M. spicata* มีความเหมือนกับยีน McLMS ถึง 98 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจาก *P. frutescens* ถึงแม้จะอยู่ในวงศ์เดียวกับ *M. Spicata* แต่ genus ต่างกัน เมื่อเทียบกับยีน LMS จาก *M. cordifolia* Opiz. จะมีความใกล้ชิดกันมากกว่า เนื่องจากอยู่ใน genus เดียวกัน

4.6 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ McLMS กับเอนไซม์ในกลุ่มโมโนเทอร์พีนส์ซินเทสในสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีน

จากนั้นนำลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ McLMS มาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของยีนในกลุ่มโมโนเทอร์พีนส์ซินเทสในพืชชนิดอื่นที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีน โดยเลือกยีนตัวแทนของโมโนเทอร์พีนส์ซินเทสแต่ละประเภทมาจำนวน 20 ชนิด โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่ม

กลุ่มแรกเป็นยีนโมโนเทอร์พีนส์ซินเทสที่มีโครงสร้างเป็นแบบโซ่ตรง (acyclic monoterpene synthase) ได้แก่ myrcene synthase จาก *Perilla frutescens*, linalool synthase จาก *Mentha citrata*, geraniol synthase จาก *Perilla citriodora* และ myrcene synthase จาก *Picea abies*

กลุ่มที่สองเป็นยีนโมโนเทอร์พีนส์ซินเทสที่มีโครงสร้างเป็นแบบวงแหวนเดียว (monocyclic monoterpene synthase) ได้แก่ limonene synthase จาก *M. Cordifolia* Opiz. (McLMS), limonene synthase จาก *Mentha longifolia*, limonene synthase จาก *Mentha spicata*, limonene synthase จาก *Mentha haplocalyx*, limonene synthase จาก *Mentha piperita*, limonene synthase จาก *Agastache rugosa*, limonene synthase จาก *Citrus unshiu*, limonene synthase จาก *Toona sinensis*, 1,8-cineol synthase จาก *Nicotiana suaveolens*, terpinolene synthase จาก *Abies grandis*, และ β -phellandrene synthase จาก *Abies grandis*

กลุ่มที่สามเป็นยีนโมโนเทอร์พีนส์ซินเทสที่มีโครงสร้างเป็นแบบวงแหวนสองวง (bicyclic monoterpene synthase) ได้แก่ (+)-sabinene synthase จาก *Salvia officinalis*, (-)-camphene synthase จาก *Abies grandis*, (-)-beta-pinene synthase จาก *Citrus limon*, 3-carene synthase จาก *Salvia stenophylla* และ (+)-alpha-pinene synthase จาก *Pinus taeda*

โดยใช้โปรแกรม ClustalW ได้ผลดังรูปที่ 4.9

1	-MALKVLSVATQMAIPSKLTTCLQPShLKSSPKLFS-----STNKCSGRSRLRVYCSSS	53
2	-MALKVFSVATQMAIPSKLTRCLQPShLKSSPKLLS-----STNSSS-RSRLRVYCSSS	52
3	-MALKVLSVATQMAIPSNLTTCLQPShFKSSPKLLS-----STNSSS-RSRLRVYCSSS	52
4	-MALKVLSVATQMAIPSKLTRCLQPShLKSSPKLLS-----STNSSS-RSRLRVYCSSS	52
5	-MALKVFSGAMQMPIPSKLTYYLQPShLNSSPKLLS-----NTKGT- RSRLRVSCSSS	52
6	-MALKMTSVVMQMAIPTKLANFVHNSDNNKSLKLVN-VSTTCTSAATPRLRLPVCCSSS	58
7	-----MYTGVMNMAFPMKpanyLHNSGSSNSKLCG--VSSTSTRAATARLRLRLRCMQ	53
8	-----MSSISINIAMPLN-----SLHNFERKPSK-----AWSTCTAPAARLRASSLQ	44
9	-----MSSISQKVVIgLNKAAANNLQNLDRRGFK-----TRCVSSSKAASCLRASCSLQ	50
10	--MCTIISVNHVAILSKPKVLFHTKNKRSASIN---LPWLSLSPSSAASRPISCSIS	55
11	MNHHLIITPIFHLQIMLPVATLKRPPPAATCSIYSF-SRGTPSLVSKARLSTAAVGGMK	59
12	MSSCINPS-----TLATSVNGFKCLPLATNR-----AAIRIMAKNKPQCLVSTK-	45
13	MALNLLSS-----IPAACNFTRLSLPLSSKVN-----GFVPPITR--VQYHVAAS-	44
14	-----MAFPRNPTKLLHKPHNKSS-KLIS-----NSRISS-YGHLPLRCSSQ	40
15	MASHVLAS-----LRSASARISTRLQSRSCIL-----ATATSFNGFVSASLVQSM-	46
16	MALVSSAP---KSLHKSLIRSTHHEKPLRRTIPTLGMCRRGKSF-PSVMSLTTAVS	56
17	MSPVSVISLPSHLCLPTSFIDRSGRELNLHHLITIPNVAMRRQGLMTGASMSMNLRTAVS	60
18	MALLSITPLVSRSCLS-----SSHEIKALRRTIPTLGCIRPGKVA-HSINMCLTSVAS	53
19	MSPVSVVPLACKLCLCRSMTSST-DELKPLPTTIPTRGMCGRMSVT-PSMSMLNTVVS	58
20	MALVSIPLPLSSKSVLHKSIVST-YEHKAI SRTIPNLGLRGRGKSVT-HSLRMSLSTAVS	58

รูปที่ 4.9 แสดงการวิเคราะห์ multiple alignment ของยีนในกลุ่มโมโนเทอร์ปีนสังเคราะห์กับยีน McLMS

- 1 ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ McLMS (สีแดง)
- 2 ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ limonene synthase จาก *Mentha longifolia*
- 3 ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ limonene synthase จาก *Mentha spicata*
- 4 ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ limonene synthase จาก *Mentha haplocalyx*
- 5 ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ limonene synthase จาก *Mentha piperita*
- 6 ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ limonene synthase จาก *Agastache rugosa*
- 7 ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ myrcene synthase จาก *Perilla frutescens*
- 8 ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ (+)-sabinene synthase จาก *Salvia officinalis*
- 9 ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ geraniol synthase จาก *Perilla citriodora*
- 10 ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ linalool synthase จาก *Mentha citrata*
- 11 ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ 1,8-cineol synthase จาก *Nicotiana suaveolens*
- 12 ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ limonene synthase จาก *Citrus unshiu*
- 13 ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ (-)-beta-pinene synthase จาก *Citrus limon*
- 14 ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ 3-carene synthase จาก *Salvia stenophylla*
- 15 ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ limonene synthase จาก *Toona sinensis*
- 16 ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ beta-phellandrene synthase จาก *Abies grandis*
- 17 ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ (-)-alpha-pinene synthase จาก *Pinus tabuliformis*
- 18 ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ (-)-camphene synthase จาก *Abies grandis*
- 19 ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ myrcene synthase จาก *Picea abies*
- 20 ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ terpinolene synthase จาก *Abies grandis*

1	Q-----LTTERRSGNYNPSRWDVEFIQSLHSD-YKKDKHAIRAS-ELVTLV	97
2	Q-----LTTERRSGNYNPSRWDVEFIQSLHSD-YEEDKHAIRAS-ELVTLV	96
3	Q-----LTTERRSGNYNPSRWDVNFIQSLHSD-YKEDKHVIRAS-ELVTLV	96
4	Q-----LTTERRSGNYNPSRWDVEFIQSLHSD-YEEDKHAIRAS-ELVTLV	96
5	Q-----LTTERRSGNYNPSRWDVFIQTLHSD-YQEERHTRRAS-ELITQV	96
6	SSSSSQ-----LPTIERRSGNYSPSRWDVFIQSLNSD-YKDEKHARRAS-ELITQV	108
7	L-----SDQRRSGNYSPSFWNTDYILSLNCD-YEDERRMRGAAGELVEQV	97
8	QEQP-----HQIRRSGDYQPSLWDFNYIQSLNTP-YKEQRHFNRQA-ELIMQV	90
9	LDVKPV-----QEGRRSGNYQPSIWDFNYVQSLNTP-YKEERYLTRHA-ELIVQV	98
10	SKLYTIS-----SAQEETRRSGNYHPSVWDFDIQSLDTHYKEEKQLEREE-ELIMEV	108
11	NEPSPNHYSDISSDLNLTRRSGNYGPTMDFEYIQSIHND-YTEKMYNRLN-KLKEEM	117
12	-----YDNLTVDRRSANYQPSIWDHDFIQSLNSN-YTDETYKRAE-ELKGV	91
13	-----TPIKPVDTIIRRSADYGPTIWSFDYIQSLDSK-YKGESYARQLE-KLKEQV	94
14	Q-LPTD-----EFQVERRSGNYSPSKWDVYIQSLHSD-YKEERHTRRAS-ELIMEV	89
15	-----STTTQCDESVARRSANYEPIWTYDYVQSLRNP-YAGGSYAKRIE-KLKGDV	96
16	D-----DGLQRRIGDYHSNLWDDDFIQSLST-PYGEPSYRERAE-KLIGEV	100
17	D-----DAVIRRRGDFHNSNLWDDDLIQSLSS-PYGEPSYRERAE-RLIGEV	104
18	T-----DSVQRRVGNYSNLWDDDFIQSLISTPYGAPDYRERAD-RLIGEV	98
19	DN-----DAVQRRIGDYHSNLWDDDFIQSLTT-PYGAPSYIERAD-GLISEV	103
20	DD-----HGVQRRIVEFHSNLWDDDFIQSLST-PYGAPSYRERAD-RLIVEV	103
	* * * * *	
1	KMELE-----KET-DQIRQLELIDDLQRMGLSDHFQNEFKEILSSIYLDHHYYK	145
2	KMELE-----KET-DHIRQLELIDDLQRMGLSDHFQNEFKEILSSIYLDHHYYK	144
3	KMELE-----KET-DQIRQLELIDDLQRMGLSDHFQNEFKEILSSIYLDHHYYK	144
4	KMELE-----KET-DHIRQLELIDDLQRMGLSDHFQNEFKEILSSIYLDHHYYK	144
5	KMELE-----KET-DQIRQLELIDDLQRMGLSDHFQNEFKEILSSVYLDHGYYK	144
6	KMLME-----KETTDPQIRQLELIDDLQRLGLSDHFQNEFKEILNTIYLDNKYYN	157
7	KMLME-----KET-DPIVQLELIDVLQKLALSHHFEKEFEGILFNISTIYDDKN	145
8	RMLLK-----VKM-EAQQLELIDDLQYLGLSYFFQDEIKQILSSIHNEPRYFH	138
9	KPLLE-----KKM-EPAQLELIDDLNNGLSYFFQDRIQILSFIYDENQCFH	146
10	KKLLG-----AKM-EATKQLELIDDLQNLGLSYFFRDEIKNILNSIYKIQNNN	156
11	KKMIM-----AEGSQELEKLELIDNLQRLGVSYHFKEIMQILSSIKQHSTPAD	166
12	KTAIK-----DVTEPLDQLELIDNLQRLGLAYHFEPEIRNIRNIHNNKDYN	139
13	SAMLQQDN-----KVVDLDTLHQLELIDNLHRLGVSYHFDEIKRTLDRIHKNKNTNK-	146
14	KKLLE-----KEP-NPTRQLELIDDLQKLGLSDHFNNEFKEILNSVYLDNKYYR	137
15	RVMLQ-----KLVLDLPHQLEFIDTLQRLGVSYHYQEGIKGILDTVYNNYMQKQ	146
16	KE-MFNMPSEDGESMSPLNDLIERLWVDSVERLIGIDRHFKKEIKSALDYVYSWNEKG	159
17	KN-SFNSTSNEDGESITPLDDLIQRFVWVDSVERLIGIDRHFKKEIKSALDHVYRYWSEKG	163
18	KDIMFNFKSLEDGG-----NDLLQRLLLVDDVERLIGIDRHFKKEIKTALDYVNSYWNEKG	153
19	KE-MFNRMCMEDGELMSPLNDLIQRLWTVDSVERLIGIDRHFKKXIKASLDYVYSWNEKG	162
20	KG-IFTSISAEDGELITPLNDLIQRLMLVDNVERLIGIDRHFKNEIKAALDYVYSWNEKG	162
	* * * * *	
1	NPPFKEE--RDLYSTSLAFRLLREHGFQVAQ-EVFDSEFKNEEG-EFRESLS-----DDT	195
2	NPPFKEE--RDLYSTSLAFRLLREHGFQVAQ-EVFDSEFKNEEG-EFKESLS-----DDT	194
3	NPPFKEE--RDLYSTSLAFRLLREHGFQVAQ-EVFDSEFKNEEG-EFKESLS-----DDT	194
4	NPPFEEEE--KGSLLTSLAFRLLREHGFQVAQ-EVFDSEFKNEEG-EFKESLS-----DDT	194
5	NPDPKEE--RDLYSTSLAFRLLREHGFQVAQ-EVFDSEFKNEEG-EFKESLS-----DDT	194
6	INIMREES--RDLYSTALAFRLLREHGFQVAQ-EVFECFKNEEG-DFKASLI-----DDT	208
7	-----RE--RDLYSTTLAFRLLRQHGYQVPQ-ELFECFKNDKG-EFKESLS-----DDT	190
8	N-----NDLYFTALGFRI LRQHGFNVSE-DVFDCKIEKCSDFNANLA-----QDT	183
9	SNINDQAEKRDLYFTALGFRI LRQHGFVDSQ-EVFDCKNDNGSDFKASLS-----DNT	199
10	S-----TKVGD LHFTSLGFRI LRQHGFNVSQ-GVFDCKNEHGSDFEKTLLIG-----EDT	205
11	-----SLYATA LKFR LFREYGFHISQ-EIFGGLSET-----HT-----EDT	201
12	WRK-----ENLYATSLEFRI LRQHGYVVSQ-EVFSGFKDDKV-G-----FIC-----DDF	182
13	-----SLYATA LKFR LRQYGYNTPVKETF SRFMDEKG-SFKSSSHS-----DDC	190
14	NGAMKEVE--RDLYSTALAFRLLRQHGFQVAQ-DVLECFKNTKG-EFEP SLS-----DDT	188
15	E-----SLYAVALGFRI LRQHGYHIPA-DIFSSFRDDKG-NLKS-CLG-----DDC	189
16	IGCGRDSVFPDVNSTASGFRTLR LHGYSVSS-EVLKVFQDQN---GQFAFSP-STKERDI	214
17	IGCGRESVVTDLNSTALGLRTLR LHGYDVSA-DVLNHFKNQG---GQFACTL-KRTEDQI	218
18	IGCGRESVVTDLNSTALGLRTLR LHGYTVSS-DVLNVFKDKN---GQFSSTANIQIEGEI	209
19	IGCGRTSVVTDLNSTALGAXILR LHGYTVSS-EVLKVFEEEN---GQFACSP-SQTEGEI	217
20	IGSGSDSGVADLNSTALGFRI LR LHGYSVSS-DVLEHFKEEKE-KGQFVCSA-IQTEEEI	219

1	RGLLQLYEASFLLTEGE--TTLESAREFATKFLEERVNE----GGGDGDLLTRIAYS LDIP	250
2	RGLLQLYEASFLLTEGE--TTLESAREFATKFLEERVNE----GGVDGDLLTRIAYS LDIP	249
3	RGLLQLYEASFLLTEGE--TTLESAREFATKFLEEKVNE----GGVDGDLLTRIAYS LDIP	249
4	RGLLRLYEASFLLTEGE--TTLESAREFATKFLEERVNE----GGVDGDLLTRIAYS LDIP	249
5	RGLLQLYEASFLLTEGE--TTLESAREFATKFLEERVNE----GGGDENLLTRIAYS LEIP	249
6	RGLLQLYEASFLFKEGE--NTLEIAREFTTKILQEKLKG----DEIDNLLSSIRYSLEIP	263
7	KGLLQLYEASFLLTEGE--TTLELAREFATKFLEKEKLNID--DDDDTNLISCVRHSLDMP	248
8	KGMLQLYEASFLREGE--DTLELARRFSTRSLREKFDE--GG--DEIDEDLSSWIRHSLDLP	240
9	KGLLQLYEASFLVREGE--DTLEQARQFATKFLRRKLDE--ID--D---NHLLSCIHHSLEIP	253
10	KGVLQLYEASFLREGE--DTLEVARKFSTEFLEEKLKA--GI--D---GDNLSSSIGHLSLEIP	260
11	KGMLLYEASFLTEGE--SELEKARNWTEKHLREYLENKND----DQNVAVELVHHALELP	256
12	KGILSLHEASYSLEGE--SIMEEAWQFTSKHLKEMMITSNS--KEEDVFVAEQAKRALELP	240
13	KGMLALYEAAVLLVEEESI FRDAKSFTTAYLKEWVIEHDNNKHDDHEHLCTLVNHALELP	250
14	RGLLQLYEASFLLTEGE--NTLELARDFTTKILEEKL RN--D--EIDDINLVTVIRHLSLEIP	244
15	RGILALYEAAHLLVEEERDI FYEIVNFTTAYLKEY--VKHDN----DEYLSALVNHSLEIP	244
16	RTVLNLYRASFIAPFGE--KVMEEAEI FSSRYLKEAVQK----IPVSS--LSQEIDY TLEYG	268
17	RTVLNLYRASLIAPFGE--KVMDEAETF SVKYLEEALQK----IPVSS--LSREIEDVLEYG	272
18	RGVLNLFASLIAPFGE--KVMDEAETF STKYLRREALQK----IPASSILSREIADVLEYG	264
19	RSFLNLYRASLIAPFGE--KVMEEAQI FSSRYLKEAVQK----IPVSS--LSREIGDVLEYG	271
20	KSVLNLFRASLIAPFGE--KVMEEAEI FSKIYLKEALQN----IAVSS--LSREIEYVLEDG	273
	* * * * *	
1	LHWR--IKRPNAPVWIEWYRKRPD-----MNPVLELAI LDNLIVQAQFQEELKE	298
2	LHWR--IKRPNAPAWIEWYRKRPD-----MNPVLELAI LDNLIVQAQFQEELKE	297
3	LHWR--IKRPNAPVWIEWYRKRPD-----MNPVLELAI LDNLIVQAQFQEELKE	297
4	LHWR--IKRPNAPTWIEWYRKRPD-----MNPVLELAI LDLDIVQAQFQEELKE	297
5	LHWR--IKRPNAPVWIDSYRKRPN-----MNPVLDLAI LDNLIVQAHFQOELKE	297
6	NYWS--VVRPNVSVWIDEYRKRSD-----MNPVLELAI LDANIVQAQLQELKE	311
7	IYWR--IQRPNARWWIHAYNRRTH-----INPLVLELSKLD FNI IQAQQOELKQ	296
8	LHWR--VQGLEARWFLDAYARRPD-----MNPLIFKLAKLNFNI VQATYQEELKD	288
9	LHWR--IQRLEARWFLDAYATRHD-----MNPVILELAKLDFNI IQATHQEELKD	301
10	LHWR--IQRLEERWFLDAYSRRKD-----MNPVILELAKLDFNI IQATQQEELKD	308
11	LHWR--MLRIEARWFINFYKQKQD-----MNPVILELAKLDFNI IQAAHIEDLKY	304
12	LHWKVKPMLEARWFIHVEYKRED-----KNHLLLELAKLEFNTLQAI YQEELKD	289
13	LHWR--MPRLEARWFI DVYENGPH-----MNPVILELAKVDFNI VQAVHQENLKY	298
14	IHWR--IDRVNTSVWIDVYKRRPD-----MNPVILELAVLDSNI VQAQYQEELKL	292
15	LHWR--VLRLEARWFIGAYERAPN-----THPILLEFAKLDFNDVQATHQEELKF	292
16	WHTN--MPRLETRNYLDVFGHPTS PWLKKKRTQYLDSEKLELAKLEFNI FHSLQOQELQY	327
17	RHTY--LPRLEARNYMDVFGQDT-----ENSKSYMKTEKLELAMEFNI FHALQKRELEY	326
18	WHTN--LPRLEARNYMDVFGQHT-----KNKN---AAEKLELAKLEFNI FHSLQERELKH	315
19	WHTN--LPRWEARNYMDVFGQDTNTPFNKNKMQYMTEKILQLAKLEFNI FHSLQOQRELQC	330
20	WQTN--MPRLETRNYIDVLGEND-----RDETLYMNMEKLEIAKLEFNI FHSLQOQRELKD	327
	* * * * *	
1	SFRWWRNTGFV--EKLPFARDRLVECYFWNTGII EPRQHASARIMMGKVNALITV I DDIYD	357
2	SFRWWRNTGFV--EKLPFARDRLVECYFWNTGII EPRQHASARIMMGKVNALITV I DDIYD	356
3	SFRWWRNTGFV--EKLPFARDRLVECYFWNTGII EPRQHASARIMMGKVNALITV I DDIYD	356
4	SFRWWRNTGFV--EKLPFARDRLVECYFWNTGII EPRQHASARIMMGKVNALITV I DDIYD	356
5	SFRWWRNTGFV--EKLPFARDRLVECYFWNTGII EPRQHASARIMMGKVNALITV I DDIYD	356
6	SLRWWRNTCFV--EKLPFARDRLIESYFWSTGMVEPRQHANARI IMAKVIALITVM DDIYD	370
7	DLRWWRNTCIA--EKLPFARDRLVESYFWSTGII IQPRQHENARIMMAKALALITVI DDIYD	355
8	ISRWWNSSCLA--EKLPFVRDRIVECFWAI AAFEPHQYSYQRKMAAVI ITFITI I DDIYD	347
9	VSRWQNRTRA--EKLPFVRDRILVESYFWAIALFEPHQYGYQRRVAAKI ITLATS I DDIYD	360
10	LSRWWDSSLP--EKLPFVRDRILVESYFWALGLFEAHKFGYERKTAAKI ITLITAI DDIYD	367
11	VARWVKETCLA--ENLPFARDRLVENFFWTIGVNF LPQYGYFRRIETKVNALVTI I DDIYD	363
12	ISGWKDTGLG--EKLSFARNRLVASFLWSMGIAFEPQFAYCRRVLTISIALITVI DDIYD	348
13	ASRWKKTGLG--ENLNFVRDRIVENFMWTVGEKFE PQFGYFRMSTMVNALITAV DDIYD	357
14	DLQWWRNTCLA--EKLPFARDRLVESYFWGVGVVQPRQHG IARMAVDRSIALITVI DDIYD	351
15	MSRWKNTGLDREKMN FARDRIVQNVLSLGI I FE PQFAYCRMSVKAAYAFITLI DDIYD	352
16	LSRWVIHSGLP--ELTFGRHRHVEY YTLSSCIATEPKHS AFRLGFAKCHLITVI DDIYD	385
17	LVRWVKGTSSP--QMTFCRHRHVEY YTLASCIATEPQHS GFRLGFAKACHI ITV I DDIYD	384
18	VSRWVKDSGSP--EMTFCRHRHVEY YALASCIATEPQHS GFRLGFTKMSHLITVI DDIYD	373
19	LLRWVKESGLP--QLTFARHRHVEY YTLASCIATEPQHS AFRLGFAKCHLITVI DDIYD	388
20	LSRWVKDSGFS--HLTFARHRHVEY YALASCIATEPQHS GFRLGFAKCHLITVI DDIYD	385
	** * * * *	

1	VYGTLEELEQFTDLIRRWDIN-SIDQLPDYMQLCFLALNNFVDDTSYDVMKEKGVNVIP-	415
2	VYGTLEELEQFTDLIRRWDIN-SIDQLPDYMQLCFLALNNFVDDTSYDVMKEKGVNVIP-	414
3	VYGTLEELEQFTDLIRRWDIN-SIDQLPDYMQLCFLALNNFVDDTSYDVMKEKGVNVIP-	414
4	VYGTLEELEQFTDLIRRWDIN-SIDQLPDYMQLCFLALNNFVDDTSYDVMKEKGVNVIP-	414
5	VYGTLEELEQFTDLIRRWDID-SIDQLPDYMQLCFLALNNFVDETSYDVMKEKGVNVIP-	414
6	VYGTLEELEQFTEAFRRWDVS-SIDQLPTYMQLCFLAINNFVDDTAYNVLKESGVNVMT-	428
7	VYGTLEELELFIEAIRRWEIS-SIDQLPNYMQLCFLTINNFVDDTAYDVMKEKDINIIP-	413
8	VYGTIEELELLTDMIRRWDNK-SISQLPYYMQVCYLALYNFVSERAYDILKDQHFN SIP-	405
9	IYGTLEDELQFLTDFRRWDTE-SLGRLPYMQLFYMVHNFVSELAYEILKEKGFIVIP-	418
10	IYGTLEDELQFLTHVIRRWDTE-SATQLPYYLQLFYFVLYNFVSEVAYHILKEEGFISIP-	425
11	VFGTMDELQCFTHAFQRWNID-ELDNLPDNMKMCFALDNFINEVAGDAFEEHRVPILS-	421
12	VYGTLELEIFTDVAWRWDIN YALKHLPGYMKMCFALYNFVNEFAYYVLRQQDFDMLL-	407
13	VYGTLEELEIFTDVAWRWDAT-AVEQLPHYMKLCFHALRNSINEMTFDALRDQGVDIVIS	416
14	VYGTLEELEQFTEAIRRWDIS-SIDQLPSYMQLCFLALDNFINDIAYDLKEQG FNIP-	409
15	VYGTLELELFTDAVDRWDAT-AIEKLPDYMKPIFRITLYTSINDMALDARKDRGVDRP-	410
16	TFGTMEIELEFNEAVRRWNPS-EKERLPEYMKIYMALYEALDMAREAEKTQGRD TLN-	443
17	TFGTLELELFTSAIKRWDPDS-ATECLPEYMKGVYVIYNTVNEMSQEVDKAQGRGTLN-	442
18	VFGTVDELELFTATIKRWDPDS-AMECLPEYMKGVMMVYHTVNEMARVAEKAQGRD TLN-	431
19	TFGKMELELFTA AVKRWDLS-ETERLPEYMKGLYVVFETVNELAQEA EKTQGRNTLN-	446
20	TFGTMELELFTA AFKRWDPS-ATDLLPEYMKGLYVVYETVNEIAREADKSQGRETLN-	443
	* * * * *	
1	YLRQSWVDLADKYMVEARWFYGGHKPSLEEYLENSWQSI SGPCMLTHIFFRVTD SFTKET	475
2	YLRQSWVDLADKYMVEARWFYGGHKPSLEEYLENSWQSI SGPCMLTHIFFRVTD SFTKET	474
3	YLRQSWVDLADKYMVEARWFYGGHKPSLEEYLENSWQSI SGPCMLTHIFFRVTD SFTKET	474
4	YLRQSWVDLADKYMVEARWFYGGHKPSLEEYLENSWQSI SGPCMLTHIFFRVTD SFTKET	474
5	YLRQSWVDLADKYMVEARWFYGGHKPSLEEYLENSWMSI SGPCMLTHIFFRVTD SFTKET	474
6	YLRKSWVDQAENYLMESKWYSGHKPSLEEYLENSWISVSGPCVLT HEFFGVTD SLAKDT	488
7	YLRKSWVDLAEAYLVEAKWFYGGYKPNLEEYLNNGWISVSGPAI LCHVFFGVTD SITMET	473
8	YLQRSWVSLVEGYLKEAYWYNGYKPSLEEYLNNAKISISAPTIISQLYFTLANSIDETA	465
9	YLQRSWVDLAE SFLKEANWYSGYTPSLEEYIDNGSISIGAVAVLSQVYFTLANSIEKPK	478
10	FLHRAWVDLVEGYLQEAkWYTKYPTMEEYLNYSITIGAPAVISQIYFMLAKSKEKPV	485
11	YLRNAWTDLCKAYLREAKWYFSKYIPTMEEYMDNAWISISAPVILVHAYFLVANPVNKEV	481
12	SIKHAWLGLIQAYLVEAKWYHSKYTPKLEEYLENGLVSITGPLIITISYLSGTNPIIKKE	467
13	YLTKAWADICKAYLVEAKWYNSGYI PPLQEYMENAWISIGATVILVHANTFTANPIKTEG	476
14	YLRKSWTDMIEGFLLEAKWYHNGHKPKLEEYLENGWRSIGSTVVLTHAFFGVTHSLTKEN	469
15	FLHKAWSTLFNYLMEAKWFSNGYMPYKEYMDIAWFSVGGPVMIVHSYCAIANPATKEN	470
16	YARKAWEVYLD SYTQEA KWIASGYLPTFEEYLENAKVS SGHRAAALTPLLTLDVPLPDDV	503
17	YCRQAWEEYIDAYMQEA KWIASGEVPTFEEYYENGVSSGHRVSALQPILTTDIPFPEHV	502
18	YARQAWAEACFDSYMQEA KWIATGYLPTFEEYLENGKVS SAHRPCALQPILTLDIPFPDHI	491
19	YVRKAWAEAYFDSYMQEA EWI STGYLPTFEEYXENGVSSAYRVAALQPILTLDVQLPDDI	506
20	DARRAWAEAYLDSYMQEA EWISSGYLPTFEEYMETSKV SFGYRIFALQPILTMVPLTHHI	503
	* * * * *	
1	VDSLKYKHDLVRWSSFVLR LADDLGTSVEEVS RGDVPKSLQCYMSDYN-ASEAEARKHVK	534
2	VDSLKYKHDLVRWSSFVLR LADDLGTSVEEVS RGDVPKSLQCYMSDYN-ASEAEARKHVK	533
3	VDSLKYKHDLVRWSSFVLR LADDLGTSVEEVS RGDVPKSLQCYMSDYN-ASEAEARKHVK	533
4	VDSLKYKHDLVRWSSFVLR LADDLGTSVEEVS RGDVPKSLQCYMSDYN-ASEAEARKHVK	533
5	VDSLKYKHDLVRWSSFVLR LADDLGTSVEEVS RGDVPKSLQCYMSDYN-ASEAEARKHVK	533
6	LDSL YEYHDI VRWSSYLLRLADDLGTSVEEVS RGDVPKSIQCYMHDND-ASEEEARQH IK	547
7	VESLFKYHDLIRCSSTLVRLADDLGTSVEEVS RGDVPKSIQCYMNDNN-ASEEEARLHVR	532
8	IESLYQYHNILYLSGTLIRLADDLGTSQHELERGDVPKAIQCYMNDTN-ASEREAVEHVK	524
9	IESMYKYHHILRLSGLVLR LHDDLGTSLFEKRRGDVPKAVEICMKERN-VTEEEAEHVK	537
10	IESFYEYDEIIRLSGMLVRLPDDLGTLPFEMKRGDVAKSIQIYMQEQN-ATREEAEHV R	544
11	LHYLENYHDIIRWSALILRLANDLGTSSSEELKRGDVPKSIQCYMNEKK-VSEEEARQH IR	540
12	LEFLESNPDI VHWSSKIFRLQDDLTSSDEIQRGDVPKSIQCYMHETG-ASEEVAREHIK	526
13	LEFVKDYPNIRWSSMILRFADDLGTSSDELKRGDVHKS IQCYMHEAG-VSEGEAREHIN	535
14	IDQFFGYHEIVRLSSMLLRLADDLGTSTDEVSRGDVPKAIQCYMNDNIGASEAEAREHVK	529
15	MEFFQEYDIIRLCSTILRFKDDMGTSDELKRGDNPKSIQCYMHESG-VSEKEARQHLG	529
16	LKGI DFP SRFN DLASSFLRLRGDTRCYKADRDRGEEASSISCYMKDNPGLTEEDALNHIN	563
17	LKEVDIPSKLNDLASAILRLRGDTRCYQADRARGE EASCTSCYMKDNPGLTEEDALNHIN	562
18	LKEVDIPSKLNDLICILRLRGDTRCYKADRARGE EASSISCYMKDNPGLTEEDALNHIN	551
19	LKGI DFP SRFN DLASSFLRLRGDTRCYXADRARGE EASCTSCYMKDNPGLTEEDAVNHIN	566
20	LQEIDFP LRFNDLICILRLKNDTRCYKADRARGE EASCTSCYMKENPGSTEEDAINHIN	563
	* * * * *	

1	WLIAEVWKKMNAERVSKDSPFGKDFIGCAVDLGRMAQLMYHNGDGHGT--QHPIIHQQMT	592
2	WLIAEVWKKMNAERVSKDSPFGKDFIGCAADLGRMAQLMYHNGDGHGT--QHPIIHQQMT	591
3	WLIAEVWKKMNAERVSKDSPFGKDFIGCAVDLGRMAQLMYHNGDGHGT--QHPIIHQQMT	591
4	WLIAEVWKKMNAERVPKDSPFGKDFIGCAADLGRMAQLMYHNGDGHGT--QHPIIHQQMT	591
5	WLIAEVWKKMNAERVSKDSPFGKDFIGCAVDLGRMAQLMYHNGDGHGT--QHPIIHQQMT	591
6	GLIREMWKKMNVERVSEDSPFCDRDFIRCCEDLGRMAQFMYHYGDGHGT--QHPKIHQQIA	605
7	WLIAETWKEMNVEMVSADSPFCDFIACAADMGRMAQYMYHNGDGHGM--QNSQIHQQMT	590
8	FLIREAWKEMNTVTTASDCPFTDDLVAANLARAQQFYLDGDGHGV--QHSEIHQQMG	582
9	YLIREAWKEMNTATTAAGCFMDELNVAAANLGRAAQFVYLDGDGHGV--QHSEIHQQMG	595
10	FMIREAWKEMN--TTMAANSDLRGDVMMAANLGRDAQFMYLDGDGN-----HSQLQHRIA	598
11	LLISETWKKLNEAHNVAHPFKMFVKCAMNLARMAQCMYQHGDGHGHGDLNSETTNHIM	600
12	DMMRQMWKKVNAYTADKDSPLTRTTAEFLNLVLRMSHFMYLHGDGHG--VQNQETIDVGF	584
13	DLIAQTWMMKNRDRFGNPHFVSDVFGIAMNLARMSQCMYQFGDGHG--GAQETIKARVL	594
14	WCIWETWKKMNKVRVARDTPFSQDFIVCAMGMGRMGQYMYHYGDGHGI--QHSIIHQMS	587
15	NLI TETWMMKNRAENPHLS--DVYMGIAINMARMALCMYQFGDGH---AVEAHSKDRVL	585
16	AMINDI IKELNELLKPDNSNIPMTARKHAYEITRAFHQYKYRDRGFSV--ATQETKSLVR	621
17	AMISDVVKGLENWELLKPNSSVPI SAKKHAFDISRAFHYKYRDRGYSV--ASIEKSLVK	620
18	FMIRDARELNWELLKPDNSVPI TSKKHAFDISRVWHHGYRYRDRGYSV--ANVETKSLVM	609
19	AMINDI IRELNWELFKPDNSNIPMPARKHAFDITRALHLLYIYRDRGFSV--ASKETKNLVE	624
20	AMVNNLIKEVNWELLRQDGAHIACKKHAFDILKGS LHGYKYRDRGFSV--ANKETKNVWR	621
	* * *	
1	RTLFEPPFA----- 600	
2	RTLFEPPFA----- 599	
3	RTLFEPPFA----- 599	
4	RTLFEPPFA----- 599	
5	ATLFEPPFA----- 599	
6	ACLFQPPFA----- 613	
7	DFLFQKLAVRDRASTARN----- 608	
8	GLLFQPYV----- 590	
9	GLMFEPYV----- 603	
10	NLLFKPYV----- 606	
11	ALLFESIPPA----- 610	
12	TLLFQPIPLEDKDMAFTASPGTKG 608	
13	SLFFDPIA----- 602	
14	TCLFHPSSN----- 597	
15	SLLINPIPCP----- 595	
16	RTVLEPVPL----- 630	
17	RTVIDPVTL----- 629	
18	RTVIEPVPL----- 618	
19	KALLEAVLF----- 633	
20	RTVLESVPL----- 630	

รูปที่ 4.9 (ต่อ)

จากรูปที่ 4.9 พบว่ายีนในกลุ่ม โมโนเทอร์พีนส์ซินเทสทุกกลุ่มจะมีบริเวณอนุรักษ์อยู่ 2 ส่วน (กรอบสี่เหลี่ยม) ได้แก่ ส่วนแรกเป็นบริเวณที่มีลำดับของอาร์จินีน 2 หน่วยติดกัน (RR sequence) ซึ่งเป็นบริเวณที่จับกับสารตั้งต้น และส่วนที่ 2 บริเวณ DDXXD motif เป็นบริเวณที่จับกับโลหะไอออนที่ทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ในปฏิกิริยา (Chappell, 1995 ; Maruyama *et al.*, 2001) สำหรับยีน McLMS พบว่ามีลำดับของอาร์จินีน 2 หน่วยติดกัน อยู่ที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 59 ถึง 60 และพบบริเวณ DDXXD motif อยู่ที่กรดอะมิโน ตำแหน่งที่ 353 ถึง 357

ตารางที่ 4.3 แสดงเปอร์เซ็นต์ความเหมือนลำดับกรดอะมิโนของ McLMS กับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ในกลุ่มโมโนเทอร์ปีนส์ชนิดจำนวน 20 ชนิด พบว่ายีน McLMS มีความเหมือนกับยีน LMS จาก *M. longifolia* และ *M. spicata* มากที่สุด คือ 97 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *M. haplocalyx* var. *piperascens* และ *M. piperita* มีความเหมือน 96 เปอร์เซ็นต์ และ 93 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จะเห็นว่ายีน LMS จากพืชกลุ่ม *Mentha* spp. ทุกชนิดมีความเหมือนทั้งในระดับนิวคลีโอไทด์และระดับกรดอะมิโนกับยีน McLMS ค่อนข้างมาก (มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์) เนื่องจากนอกจากจะเป็นเอนไซม์ชนิดเดียวกันแล้ว ยังเป็นพืชที่มีความใกล้ชิดกันมากเนื่องจากอยู่ในกลุ่ม *Mentha* spp. เหมือนกัน แต่ถ้าเป็นพืชในกลุ่มเดียวกันแต่เอนไซม์ต่างชนิดกัน เช่น ในกรณีเปรียบเทียบกับเอนไซม์ linalool synthase จาก *M. citrata* พบว่ามีความเหมือนของกรดอะมิโนเพียง 43 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น แต่ถ้าเป็นเอนไซม์ชนิดเดียวกันแต่พืชต่างชนิดกัน เช่น ในกรณีเปรียบเทียบกับเอนไซม์ LMS จาก *Agastache rugosa*, *Citrus unshiu* และ *Toona sinensis* ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับเอนไซม์ McLMS 71, 41 และ 36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จะเห็นได้ว่ายีน LMS จาก *Agastache rugosa* จะมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนมากกว่ายีน LMS จาก *Citrus unshiu* และ *Toona sinensis* เนื่องจากมีความใกล้ชิดทางสายพันธุ์กับ *M. cordifolia* มากกว่า เพราะเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Lamiaceae เหมือนกัน จากรายงานของ Maruyama และคณะ (2002) โคลนยีน LMS จาก *Agastache rugosa* และนำลำดับกรดอะมิโนมาเปรียบเทียบกับยีน LMS จาก *Schizonepeta tenuifolia* *M. spicata* *M. longifolia* *Perilla frutescens* และ *Perilla citriodora* พบว่ามีความเหมือนเท่ากับ 87.3, 70.8, 70.6, 62.8 และ 62.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เนื่องจาก *Agastache rugosa* มีความใกล้ชิดทางสายพันธุ์กับ *Schizonepeta tenuifolia* มากที่สุดเพราะมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าเทียบกับพืชในตระกูลมินต์อย่าง *M. spicata* *M. longifolia* พบว่ามีความเหมือนใกล้เคียงกัน ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้น Shimada และคณะ (2005) โคลนยีน LMS จาก *C. unshiu* Marc. ได้โคลน CitMTSE 2 เมื่อเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของโคลน CitMTSE 2 กับโคลน CitMTSE 1 ที่พบก่อนหน้านี้ พบว่ามีความเหมือนกัน 84.2 เปอร์เซ็นต์ แต่ความเหมือนจะลดลงที่ปลาย 3' ของ UTR ซึ่งทั้ง 2 โคลนเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับเอนไซม์โมโนเทอร์ปีนส์ พบว่ามีความเหมือนกับเอนไซม์ LMS มากที่สุด แสดงว่าทั้ง 2 โคลนน่าจะเป็นโคลนของเอนไซม์ LMS ซึ่งเอนไซม์ LMS ในพืชกลุ่มเดียวกันอย่างในกรณีของพืชในตระกูลมินต์ มักจะมีความเหมือนกันเฉพาะในส่วน ORF และจะยิ่งแตกต่างกันมากขึ้นในส่วนปลาย 5' และ 3' ของ UTR (Lawrence, 2006)

ตารางที่ 4.3 แสดงการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของยีน McLMS กับลำดับกรดอะมิโนของยีนเอนไซม์ในกลุ่มโมโนเทอร์พีนส์ซินเทส

ชนิดของพืช	ชนิดของยีน	ความเหมือน (เปอร์เซ็นต์)
<i>Mentha cordifolia</i> Opiz.	limonene synthase	100
<i>Mentha longifolia</i>	limonene synthase	97
<i>Mentha spicata</i>	limonene synthase	97
<i>Mentha haplocalyx</i>	limonene synthase	96
<i>Mentha piperita</i>	limonene synthase	93
<i>Agastache rugosa</i>	limonene synthase	71
<i>Perilla frutescens</i>	myrcene synthase	63
<i>Salvia officinalis</i>	(+)-sabinene synthase	49
<i>Perilla citriodora</i>	geraniol synthase	47
<i>Mentha citrata</i>	linalool synthase	43
<i>Nicotiana suaveolens</i>	1,8-cineol synthase	43
<i>Citrus unshiu</i>	limonene synthase	41
<i>Citrus limon</i>	(-)-beta-pinene synthase	39
<i>Salvia stenophylla</i>	3-carene synthase	39
<i>Toona sinensis</i>	limonene synthase	36
<i>Abies grandis</i>	beta-phellandrene synthase	28
<i>Pinus tabuliformis</i>	(-)-alpha-pinene synthase	28
<i>Abies grandis</i>	camphene synthase	27
<i>Picea abies</i>	myrcene synthase	27
<i>Abies grandis</i>	terpinolene synthase	26

4.7 การหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (phylogenetic tree)

หาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมโดยนำลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ McLMS และลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ LMS จากพืชชนิดต่างๆ จำนวน 17 ชนิด ที่มี

รายงานไว้ในธนาคารยีนมาสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม MEGA4 (Kumar *et al*, 2008) โดยวิธี Distance matrix และใช้ Algorithm แบบ Neighbor-Joining (NJ) method เพื่อหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ดังรูปที่ 4.9 พบว่าสามารถแบ่งพืชออกเป็น 6 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 ได้แก่ *M. longifolia*, *M. spicata*, *M. haplocalyx*, *M. piperita*, *M. cordifolia*

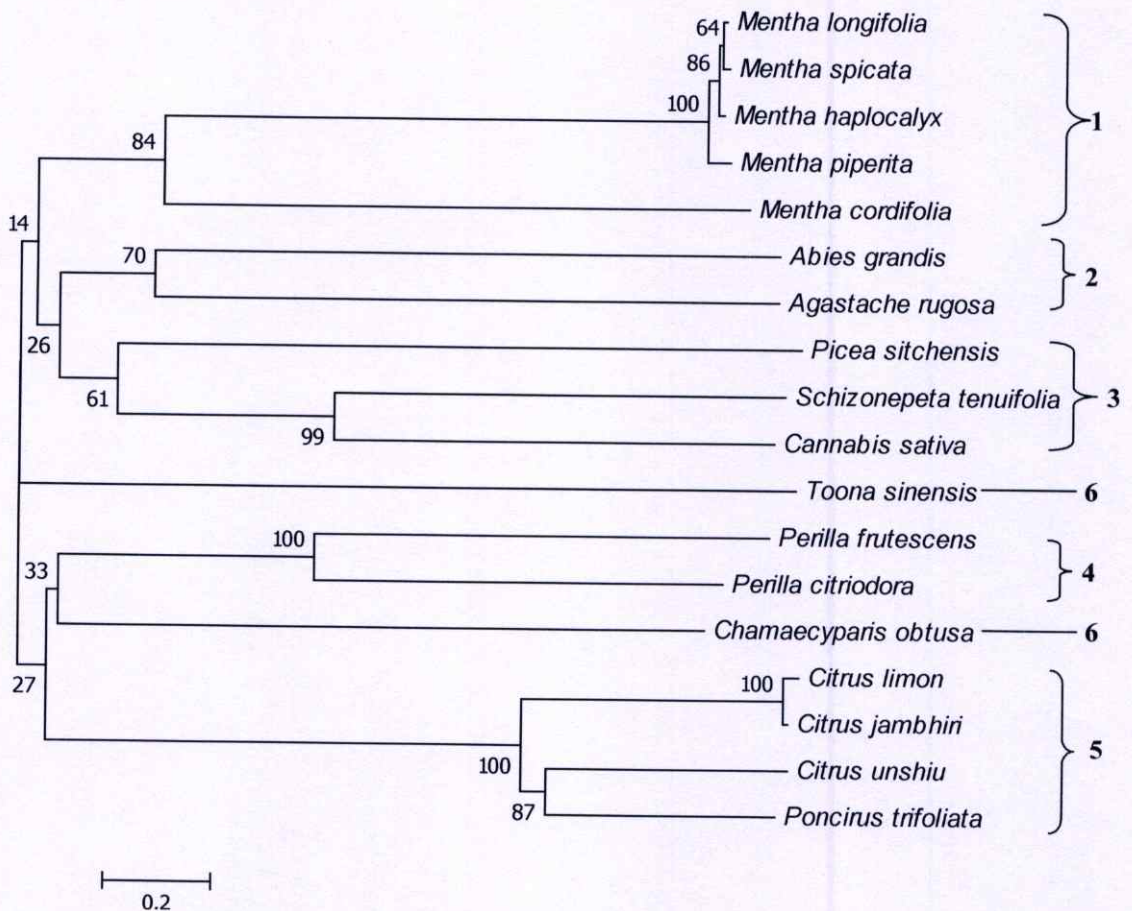
กลุ่มที่ 2 ได้แก่ *Abies grandis*, *Agastache rugosa*

กลุ่มที่ 3 ได้แก่ *Picea sitchensis*, *Schizonepeta tenuifolia*, *Cannabis sativa*

กลุ่มที่ 4 ได้แก่ *Perilla frutescens*, *Perilla citriodora*

กลุ่มที่ 5 ได้แก่ *Citrus limon*, *Citrus jambhiri*, *Citrus unshiu*, *Poncirus trifoliata*

กลุ่มที่ 6 ไม่สามารถเข้ากลุ่มใดได้ คือ *Toona sinensis* และ *Chamaecyparis obtusa*



รูปที่ 4.10 แสดงแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมของเอนไซม์ลิโมนีนซินเทสจากสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ โดยโปรแกรม MEGA4

จากรายงานของ Maruyama และคณะ (2002) หาคความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากแผนภูมิ ต้นไม้พันธุกรรมจากลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ LMS จาก *A. grandis*, *A. rugosa*, *S. tenuifolia*, *M. spicata*, *M. longifolia*, *P. citriodora* และ *P. frutescens* พบว่าสามารถแบ่งพืชออกเป็น 3 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 ได้แก่ *S. tenuifolia*, *A. rugosa*

กลุ่มที่ 2 ได้แก่ *M. spicata*, *M. longifolia*

กลุ่มที่ 3 ได้แก่ *P. frutescens*, *P. citriodora*

กลุ่มที่ 4 ไม่สามารถเข้ากลุ่มใดได้ คือ *A. grandis*

จะเห็นว่าในกลุ่มที่ 1 *S. tenuifolia* อยู่ในกลุ่มเดียวกับ *A. rugosa* แต่ในงานวิจัยนี้พืชทั้ง 2 ชนิด อยู่คนละกลุ่มกัน โดย *S. tenuifolia* อยู่ในกลุ่มที่ 3 ซึ่งมี *Picea sitchensis* และ *Cannabis sativa* ส่วน *A. rugosa* อยู่ในกลุ่มที่ 2 ซึ่งมี *Abies grandis* เนื่องจากในงานวิจัยของ Maruyama และคณะ ได้นำส่วนที่เป็น ส่วน 5' UTR และ 3' UTR มาเปรียบเทียบกับ ไม่ได้เทียบเฉพาะส่วนที่เป็น ORF และในงานวิจัยของ Maruyama และคณะ ใช้จำนวนพืชที่นำมาเปรียบเทียบน้อยกว่าด้วย

จากรายงานของ shimada และคณะ (2005) หาคความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากแผนภูมิ ต้นไม้พันธุกรรมจากลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์เทอร์ปีนซินเทสจากพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ เอนไซม์ (-)-beta-pinene synthase จาก *C. limon* เอนไซม์ beta-pinene synthase จาก *C. unshiu* เอนไซม์ gamma-terpinene synthase 1 จาก *C. unshiu* เอนไซม์ gamma-terpinene synthase 2 จาก *C. unshiu* เอนไซม์ gamma-terpinene synthase จาก *C. limon* เอนไซม์ limonene synthase 1 จาก *C. limon* เอนไซม์ limonene synthase 2 จาก *C. limon* เอนไซม์ limonene synthase จาก *C. unshiu* เอนไซม์ beta-ocimene synthase จาก *Arabidopsis thaliana* เอนไซม์ limonene synthase จาก *Arabidopsis thaliana* เอนไซม์ 1,8-cineole synthase จาก *Salvia officinalis* เอนไซม์ limonene synthase จาก *M. spicata* เอนไซม์ (+)-bornyl diphosphate synthase จาก *Salvia officinalis* เอนไซม์ (+)-sabinene synthase จาก *Salvia officinalis* เอนไซม์ (+)-delta-cadinene synthase จาก *Gossypium arboreum* เอนไซม์ beta-farnesene synthase จาก *Citrus junos* เอนไซม์ 5-epi-aristolochene synthase จาก *Nicotiana tabacum* พบว่ากลุ่มที่ 1 แบ่งเป็น เอนไซม์ (-)-beta-pinene synthase จาก *C. limon* เอนไซม์ beta-pinene synthase จาก *C. unshiu* เอนไซม์ gamma-terpinene synthase 1 จาก *C. unshiu* gamma-terpinene synthase 2 จาก *C. unshiu* เอนไซม์ gamma-terpinene synthase จาก *C. limon* กลุ่มที่ 2 แบ่งเป็น เอนไซม์ limonene synthase 1 จาก *C. limon* เอนไซม์ limonene synthase 2 จาก *C. limon* และเอนไซม์ limonene synthase จาก *C. unshiu* จะเห็นว่าเอนไซม์ชนิดเดียวกัน และอยู่ใน genus เดียวกัน จะมีความใกล้ชิดทาง พันธุกรรมมากกว่ากลุ่มอื่น

4.8 การศึกษาการแสดงออกของยีน McLMS ในแบคทีเรีย *E. coli*

4.8.1 การเพิ่มปริมาณยีน McLMS ที่มีบริเวณจดจำของเอนไซม์ *Bam* HI และ *Not* I อยู่ ส่วนหัวและท้าย

ออกแบบไพรเมอร์ให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นบริเวณจดจำของเอนไซม์ *Bam* HI และ *Not* I อยู่ส่วนหัวและท้าย (ภาคผนวก ข) จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ใช้พลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดจากโคลน cIMcLMS1 10 นาโนกรัม โดยเอนไซม์ *pfu* *Taq* DNA polymerase และใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ ได้แก่ ไพรเมอร์ forward McLMS5 และ ไพรเมอร์ reverse McLMS6 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังตาราง 3.7 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปวิเคราะห์โดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบแถบของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จำนวน 1 แถบ เมื่อเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder พบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มีขนาดประมาณ 1,800 คู่เบส จากนั้นตัดแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์บริเวณที่ต้องการจากเจลและสกัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ออกจากเจลตามวิธีข้อ 3.6.2.7

4.8.2 การโคลนยีน McLMS

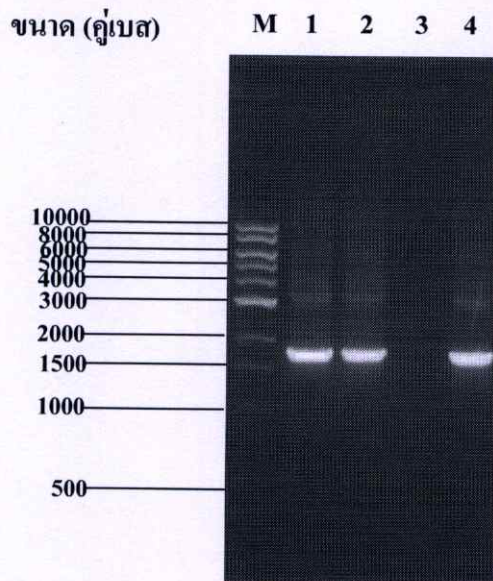
นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากข้อ 4.8.1 และพลาสมิดดีเอ็นเอพาหะ pET-32a(+) (Novagen, Australia) (ภาคผนวก ค) มาตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI และ *Not* I องค์กรประกอบในการเกิดปฏิกิริยาดังตารางที่ 3.10 นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์โดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการจากเจลตามวิธีข้อ 3.6.2.7 นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์และดีเอ็นเอพาหะ pET-32a(+) ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วไปเชื่อมต่อกันโดยเอนไซม์ T4 DNA ligase จากนั้นจึงถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ JM109 โดยวิธี heat shock และเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน พบว่าได้โคโลนีจำนวนมาก แต่เลือกมาเพียง 4 โคโลนี ตั้งชื่อโคลนที่ 1, 2, 3, และ 4 ดังนี้ cIMcLMS1/1, cIMcLMS1/2, cIMcLMS1/3 และ cIMcLMS1/4 ตามลำดับ

4.8.3 การทดสอบพลาสมิดดีเอ็นเอถูกผสมโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

(Polymerase Chain Reaction : PCR)

นำพลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS1/1, cIMcLMS1/2, cIMcLMS1/3 และ cIMcLMS1/4 มาเพิ่มปริมาณยีน McLMS โดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส โดยเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase และใช้ไพรเมอร์ 1 คู่ คือ ไพรเมอร์ forward McLMS1 และ ไพรเมอร์ reverse McLMS2 (การออกแบบไพรเมอร์ ภาคผนวก ข) สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน McLMS ดังตาราง

3.7 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาวิเคราะห์ขนาดโดยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส ได้ผลดังรูปที่ 4.11 โดยพบว่าในช่องที่ 1, 2, 4 ซึ่งเป็นช่องที่หยอดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากพลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS1/1, cIMcLMS1/2 และ cIMcLMS1/4 ตามลำดับ ปรากฏแถบของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ เมื่อเปรียบเทียบขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder พบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีขนาดชัดเจนและมีปริมาณมากที่สุดมีขนาดประมาณ 1,800 คู่เบส ซึ่งคาดว่าเป็นขนาดของยีน McLMS ที่ต้องการ ส่วนในช่องที่ 3 ซึ่งเป็นช่องที่หยอดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากโคลน cIMcLMS1/3 ไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการ แสดงว่าโคลน cIMcLMS1/3 เป็นเซลล์ของ *E. coli* ที่ไม่มีพลาสมิดลูกผสมของยีน McLMS เนื่องจากการทำ PCR ใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากส่วนหัวและท้ายยีน ดังนั้นโคลนที่คาดว่าน่าจะมีส่วนของยีน McLMS ที่ต้องการควรจะเป็นโคลน cIMcLMS1/1, cIMcLMS1/2 และ cIMcLMS1/4 เท่านั้น



รูปที่ 4.11 แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการทดสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลน cIMcLMS1/1, cIMcLMS1/2, cIMcLMS1/3 และ cIMcLMS1/4

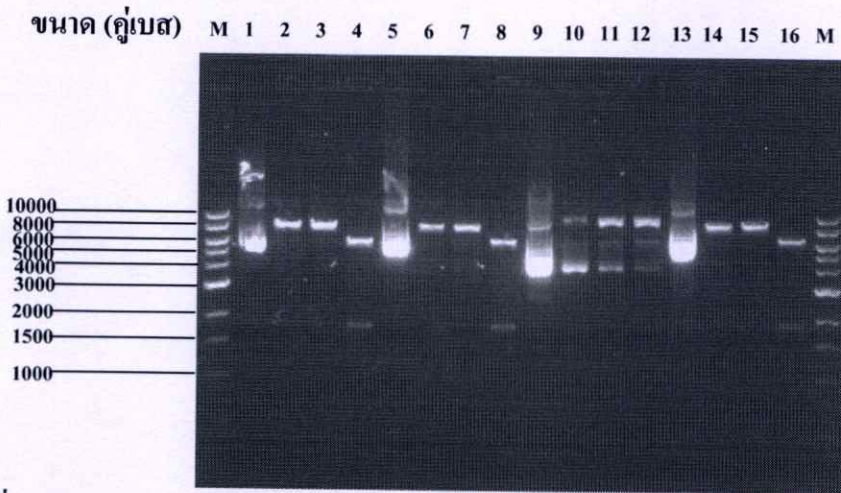
M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder

- 1 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการทดสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลน cIMcLMS1/1
- 2 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการทดสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลน cIMcLMS1/2
- 3 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการทดสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลน cIMcLMS1/3
- 4 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการทดสอบพลาสมิดดีเอ็นเอลูกผสมจากโคลน cIMcLMS1/4

4.8.4 การทดสอบพลาสมิดดีเอ็นเอถูกผสมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI หรือ *Not* I

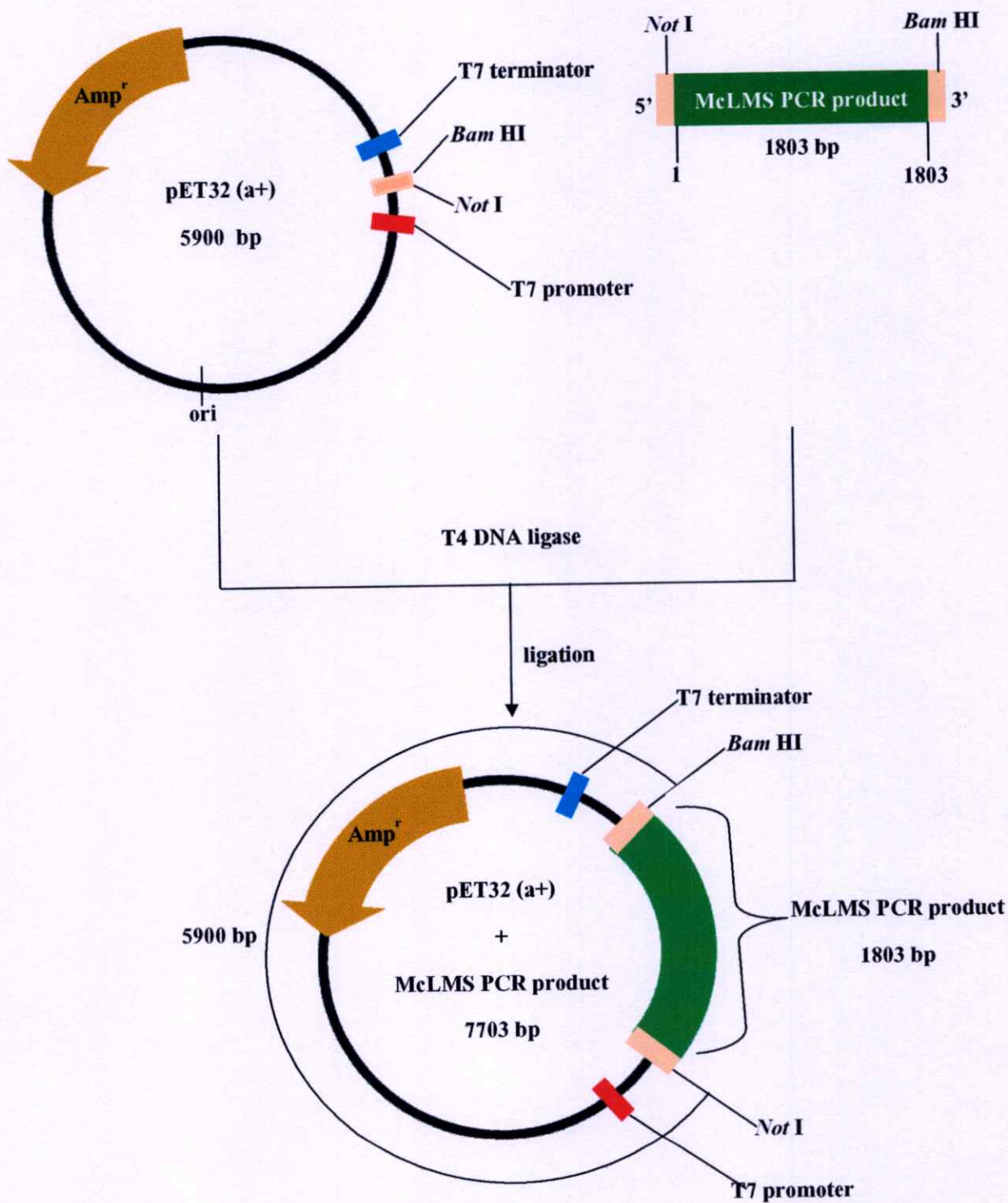
นำพลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS1/1, cIMcLMS1/2, cIMcLMS1/3 และ cIMcLMS1/4 มาตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI หรือ *Not* I เพื่อทดสอบการมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ จากนั้นนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์แล้วมาวิเคราะห์ขนาดโดยเทคนิคอะกาโรสเจล เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ได้ผลดังรูปที่ 4.12 โดยพบว่าในช่องที่ 1, 5, 9 และ 13 เป็นพลาสมิดดีเอ็นเอที่ไม่ถูกตัดโดยเอนไซม์ จากโคลน cIMcLMS1/1, cIMcLMS1/2, cIMcLMS1/3 และ cIMcLMS1/4 ตามลำดับ เพื่อใช้เปรียบเทียบกับพลาสมิดดีเอ็นเอที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ ในช่องที่ 2, 6, 10 และ 14 เป็นพลาสมิดดีเอ็นเอที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ *Bam*HI จากโคลน cIMcLMS1/1, cIMcLMS1/2, cIMcLMS1/3 และ cIMcLMS1/4 ตามลำดับ พบว่าเลนที่ 2, 6 และ 14 ปรากฏแถบของดีเอ็นเอจำนวน 1 แถบเหมือนกันทุกช่อง เมื่อเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดประมาณ 8,000 คู่เบส เนื่องจากในดีเอ็นเอพาหะ pET-32a(+) นั้น มีบริเวณ multiple cloning site ตำแหน่งที่ 198 ที่เป็นบริเวณจดจำของเอนไซม์ *Bam* HI ดังนั้นเอนไซม์ *Bam* HI จึงสามารถตัดได้เพียงตำแหน่งเดียว เพราะฉะนั้นขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จึงเป็นขนาดของดีเอ็นเอพาหะ pET-32a(+) 5,900 คู่เบส รวมกับขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ประมาณ 1,800 คู่เบส ส่วนในช่องที่ 3, 7, 11, และ 15 เป็นพลาสมิดดีเอ็นเอที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ *Not* I จากโคลน cIMcLMS1/1, cIMcLMS1/2, cIMcLMS1/3 และ cIMcLMS1/4 ตามลำดับ พบว่าช่องที่ 3, 7, และ 15 ได้ผลเหมือนกับการใช้เอนไซม์ *Bam* HI ตัด คือปรากฏแถบของดีเอ็นเอจำนวน 1 แถบเหมือนกันทุกช่อง เมื่อเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดประมาณ 8,000 คู่เบส เนื่องจากในดีเอ็นเอพาหะ pET-32a(+) นั้น มีบริเวณ multiple cloning site ตำแหน่งที่ 166 ที่เป็นบริเวณจดจำของเอนไซม์ *Not* I ดังนั้นเอนไซม์ *Not* I จึงสามารถตัดได้เพียงตำแหน่งเดียว เพราะฉะนั้นขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จึงเป็นขนาดของดีเอ็นเอพาหะ pET-32a(+) 5,900 คู่เบส รวมกับขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ประมาณ 1,800 คู่เบส ส่วนในช่องที่ 4, 8, 12 และ 16 ซึ่งเป็นพลาสมิดดีเอ็นเอที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ *Bam*HI ร่วมกับเอนไซม์ *Not* I จากโคลน cIMcLMS1/1, cIMcLMS1/2, cIMcLMS1/3 และ cIMcLMS1/4 ตามลำดับ พบว่าในช่องที่ 4, 8 และ 16 ปรากฏแถบของดีเอ็นเอจำนวน 2 แถบเหมือนกันทุกช่อง เมื่อเปรียบเทียบขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดประมาณ 6,000 คู่เบส และ 1,800 คู่เบส เนื่องจากเอนไซม์ *Bam* HI จะเข้าไปตัดที่ตำแหน่ง 198 ของเวกเตอร์ pET-32a(+) ส่วนเอนไซม์ *Not* I จะเข้าไปตัดที่ตำแหน่ง 166 ของเวกเตอร์ pET-32a(+) เพราะฉะนั้นขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ได้จำนวน 2 แถบ แถบแรกคาดว่าน่าจะเป็นแถบดีเอ็นเอของเวกเตอร์ซึ่งมีขนาด 5,900 คู่เบส และ อีกแถบคาดว่า

น่าจะเป็นแถบดีเอ็นเอของยีน *McLMS* ซึ่งมีขนาดประมาณ 1,800 คู่เบส ดังแสดงใน restriction map (รูปที่ 4.13) โดยนำยีน *McLMS* (สีเขียว) ซึ่งมีขนาด 1,803 คู่เบส เชื่อมต่อเข้ากับเวกเตอร์ pET-32a(+) ซึ่งมีขนาด 5,900 คู่เบส ทำให้ได้พลาสมิดลูกผสมที่มีขนาด 7,703 คู่เบส ในเวกเตอร์ pET-32a(+) มียีนต้านทานยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (สีเขียว) เพื่อใช้ในการคัดเลือกโคลนที่ได้รับเวกเตอร์ และมีบริเวณ multiple cloning site ที่เป็นบริเวณจดจำของเอนไซม์ *Bam* HI และ *Not* I 1 ตำแหน่ง เมื่อตัดพลาสมิดลูกผสมด้วย เอนไซม์ *Bam* HI และ *Not* I ทำให้ได้ส่วนของพลาสมิด 2 ส่วน ส่วนแรกเป็นส่วนของเวกเตอร์ pET-32a(+) ซึ่งมีขนาด 5,900 คู่เบส และส่วนที่สองเป็นส่วนของยีน *McLMS* (สีเขียว) ซึ่งมีขนาด 1,803 คู่เบส ส่วนในช่องที่ 10, 11, 12 ซึ่งเป็นช่องที่หยุดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากโคลน c*McLMS*1/3 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI อย่างเดียว, *Not* I อย่างเดียว และ ทั้ง *Bam* HI และ *Not* I ได้แถบดีเอ็นเอเหมือนกันแต่ไม่ใช่ขนาดที่ต้องการ แสดงว่าโคลน c*McLMS*1/3 เป็นเซลล์ของ *E. coli* ที่ไม่มีพลาสมิดลูกผสมของยีน *McLMS* และไม่ได้รับพลาสมิดเวกเตอร์ pET-32a(+) ด้วย เพราะไม่ว่าจะตัดด้วย *Bam* HI หรือ *Not* I ก็ไม่ได้ดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการ เพราะฉะนั้นโคลน c*McLMS*1/3 อาจเป็นเซลล์ของ *E. coli* ที่ปนเปื้อนมาในงานเพาะเชื้อ ดังนั้นโคลนที่คาดว่าจะมีส่วนของยีน *McLMS* ที่ต้องการควรจะเป็นโคลน c*McLMS*1/1, c*McLMS*1/2 และ c*McLMS*1/4 เท่านั้น จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน c*McLMS*1/1, c*McLMS*1/2 และ c*McLMS*1/4 และนำมาวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์อีกครั้งโดยใช้เครื่อง sequencer และใช้ไพรเมอร์ 4 เส้น ได้แก่ T7 promoter, T7 terminator, *McLMS*3 และ *McLMS*4 พบว่าได้ลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.12 แสดงพลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS1/1, cIMcLMS1/2, cIMcLMS1/3 และ cIMcLMS1/4 ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI หรือ *Not* I เพื่อทดสอบการมีชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์

- M ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA Ladder
- 1 พลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS1/1
- 2 พลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS1/1 ที่ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI
- 3 พลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS1/1 ที่ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not* I
- 4 พลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS1/1 ที่ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI และ *Not* I
- 5 พลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS1/2
- 6 พลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS1/2 ที่ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI
- 7 พลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS1/2 ที่ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not* I
- 8 พลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS1/2 ที่ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI และ *Not* I
- 9 พลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS1/3
- 10 พลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS1/3 ที่ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI
- 11 พลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS1/3 ที่ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not* I
- 12 พลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS1/3 ที่ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI และ *Not* I
- 13 พลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS1/4
- 14 พลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS1/4 ที่ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI
- 15 พลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS1/4 ที่ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Not* I
- 16 พลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS1/4 ที่ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam* HI และ *Not* I



รูปที่ 4.13 แสดง restriction map ของยีน McLMS ในเวกเตอร์ pET 32 (a+) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI และ *Not* I

4.8.5 การถ่ายโอนยีน (transformation) ลงในแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3)

นำพลาสมิดดีเอ็นเอจากโคลน cIMcLMS1/1, cIMcLMS1/2 และ cIMcLMS1/4 ถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ BL21(DE3) โดยวิธี heat shock และเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลินเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน พบว่าได้โคโลนีสีขาว จากนั้นคัดเลือกโคโลนีสีขาวที่ได้จากแต่ละโคลน ตั้งชื่อโคลนที่ 1, 2 และ 3 ดังนี้ cIMcLMS1/1-1, cIMcLMS1/2-1 และ cIMcLMS1/4-1 ตามลำดับ

4.8.6 การเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของรีคอมบิแนนต์โปรตีน

4.8.6.1 การคาดคะเนน้ำหนักโมเลกุลของรีคอมบิแนนต์โปรตีนด้วยโปรแกรม

Blast2Fasta

นำลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ McLMS มาคำนวณน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยใช้โปรแกรม Blast2Fasta พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ McLMS มีขนาด 69.97 กิโลดาลตัน

4.8.6.2 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของรีคอมบิแนนต์โปรตีนด้วยเทคนิคโซเดียม

โดเดซิลซัลเฟต โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)

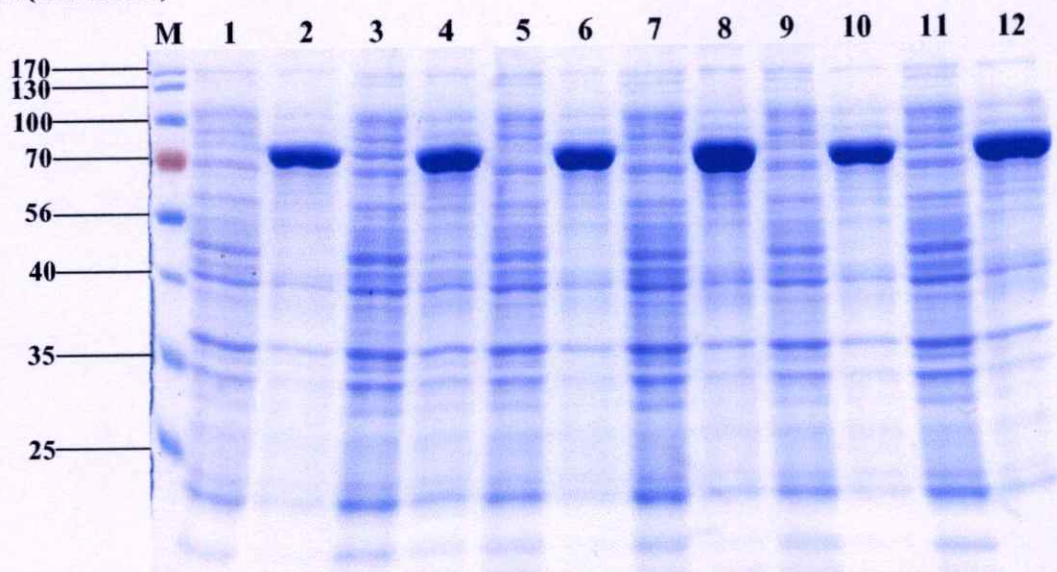
จากการชักนำให้ผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีน McLMS โดย IPTG และนำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยในแต่ละช่องหยอดสารละลายโปรตีน 10 ไมโครลิตร แยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ กระแสไฟฟ้า 80 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้ stacking gel เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ และ separating gel เข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ ได้ผลดังรูปที่ 4.14 พบว่าในช่องที่ 1, 5 และ 9 ซึ่งเป็นช่องที่หยอดสารละลายโปรตีนที่ไม่มีการชักนำโดย IPTG เมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง ของโคลน cIMcLMS1/1-1, cIMcLMS1/2-1 และ cIMcLMS1/4-1 ตามลำดับ และในช่องที่ 3, 7, 11 ซึ่งเป็นช่องที่หยอดสารละลายโปรตีนที่ไม่มีการชักนำโดย IPTG เมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง ของโคลน cIMcLMS1/1-1, cIMcLMS1/2-1 และ cIMcLMS1/4-1 ตามลำดับ พบแถบโปรตีนหลายแถบเหมือนกันทุกช่อง แต่ไม่มีแถบใดที่มีความเข้มและน่าจะเป็นแถบโปรตีนที่มีการแสดงออก แต่ในเลนที่ 2, 6 และ 10 ซึ่งเป็นช่องที่หยอดสารละลายโปรตีนที่มีการชักนำโดย IPTG เมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง ของโคลน cIMcLMS1/1-1, cIMcLMS1/2-1 และ cIMcLMS1/4-1 ตามลำดับ และในช่องที่ 4, 8, 12 ซึ่งเป็นช่องที่หยอดสารละลายโปรตีนที่มีการชักนำโดย IPTG เมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง ของโคลน cIMcLMS1/1-1, cIMcLMS1/2-1 และ cIMcLMS1/4-1 ตามลำดับ พบแถบโปรตีนหลายแถบเหมือนกันทุกช่อง แต่มีแถบโปรตีน 1 แถบ ที่มีความเข้มและน่าจะเป็นแถบโปรตีนที่ต้องการ เมื่อเปรียบเทียบขนาดของแถบโปรตีน ที่ได้กับแถบ

โปรตีนมาตรฐาน PageRuler™ Prestained Protein Ladder พบว่าแถบโปรตีนที่มีขนาดชัดเจนและมีปริมาณมากที่สุดมีขนาดประมาณ 70 กิโลดาลตัน ซึ่งคาดว่าเป็นขนาดของโปรตีน McLMS ที่ต้องการ เนื่องจากมีขนาดเท่ากับการคาดคะเนโดยใช้โปรแกรม Blast2Fasta จากรายงานของ Bohlmann และคณะ (1998) พบว่ายีนในกลุ่มของเทอร์พีนส์ซินเทสจะมีขนาดของกรดอะมิโน 550 ถึง 850 หน่วย และมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 50 ถึง 100 กิโลดาลตัน จากงานวิจัยหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ ลิโมนีนซินเทสจากพืชชนิดต่างๆ ที่มีรายงานมาก่อนดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ลิโมนีนจากพืชชนิดต่างๆ ที่มีรายงานมาก่อน

ชนิดของพืช	น้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน)	Reference
<i>M. piperita</i> และ <i>M. spicata</i>	56	Alonso และคณะ (1992)
<i>P. frutescens</i>	70	Yuba และคณะ (1996)
<i>A. grandis</i>	73.5	Bohlmann และคณะ (1997)
<i>S. tenuifolia</i>	64	Maruyama และคณะ (2001)
<i>Ae rugosa</i>	60	Maruyama และคณะ (2002)
<i>C. unshiu</i> Marc.	70	Shimada และคณะ (2005)

ขนาด (กิโลดาลตัน)



รูปที่ 4.14 แสดงผลการวิเคราะห์โปรตีนก่อนและหลังชักนำด้วย IPTG ให้ผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์
 ลิโมนีนซินเทสในชั่วโมงที่ 3 และ 6 จากโคลน cIMcLMS1/1-1, cIMcLMS1/2-1 และ
 cIMcLMS1/4-1

- M โปรตีนมาตรฐาน PageRuler™ Prestained Protein Ladder
- 1 แล็บ โปรตีนที่ไม่มีการชักนำเมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง ของโคลน cIMcLMS1/1-1
- 2 แล็บ โปรตีนที่มีการชักนำเมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง ของโคลน cIMcLMS1/1-1
- 3 แล็บ โปรตีนที่ไม่มีการชักนำเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง ของโคลน cIMcLMS1/1-1
- 4 แล็บ โปรตีนที่มีการชักนำเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง ของโคลน cIMcLMS1/1-1
- 5 แล็บ โปรตีนที่ไม่มีการชักนำเมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง ของโคลน cIMcLMS1/2-1
- 6 แล็บ โปรตีนที่มีการชักนำเมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง ของโคลน cIMcLMS1/2-1
- 7 แล็บ โปรตีนที่ไม่มีการชักนำเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง ของโคลน cIMcLMS1/2-1
- 8 แล็บ โปรตีนที่มีการชักนำเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง ของโคลน cIMcLMS1/2-1
- 9 แล็บ โปรตีนที่ไม่มีการชักนำเมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง ของโคลน cIMcLMS1/4-1
- 10 แล็บ โปรตีนที่มีการชักนำเมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง ของโคลน cIMcLMS1/4-1
- 11 แล็บ โปรตีนที่ไม่มีการชักนำเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง ของโคลน cIMcLMS1/4-1
- 12 แล็บ โปรตีนที่มีการชักนำเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง ของโคลน cIMcLMS1/4-1

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการวิเคราะห์หาสัดส่วนของลิโมนีนเทียบกับสารเคมีชนิดอื่นที่พบในน้ำมันหอมระเหยที่สกัดได้จากใบของ *M. cordifolia* Opiz. โดยใช้เครื่อง GC-MS พบว่าน้ำมันหอมระเหยจากใบของ *M. cordifolia* Opiz. ประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิด สารเคมีที่พบมากที่สุดได้แก่ เมนทอล พบประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ และที่ retention time 10.64 นาที ลิโมนีนจะถูกแยกออกมาและมีปริมาณเพียง 9 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณสารสกัดที่ได้จากใบของ *M. cordifolia* Opiz. ปริมาณ 15 กรัม

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ RT-PCR ของยีน McLMS โดยการนำผลิตภัณฑ์ RT-PCR มาทำให้บริสุทธิ์และโคลนเข้าสู่เวกเตอร์ pGEM-T Easy ได้โคลนนี้จำนวนมาก แต่เลือกมาเพียง 4 โคลน ตั้งชื่อว่า cIMcLMS1, cIMcLMS2, cIMcLMS3 และ cIMcLMS4 นำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าทั้ง 4 โคลนมีขนาด 1,803 คู่เบส แปลเป็นกรดอะมิโนได้ทั้งหมด 600 หน่วย และมีตำแหน่งหยุดการสังเคราะห์โปรตีนที่รหัส TGA

จากการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ McLMS กับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ในกลุ่มโมโนเทอร์ปีนสังเคราะห์จำนวน 19 ชนิด ที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีน โดยใช้โปรแกรม ClustalW พบว่ายีน McLMS มีความเหมือนกับยีน limonene synthase จาก *Mentha longifolia*, limonene synthase จาก *Mentha spicata*, limonene synthase จาก *Mentha haplocalyx*, limonene synthase จาก *Mentha piperita*, limonene synthase จาก *Agastache rugosa*, myrcene synthase จาก *Perilla frutescens*, (+)-sabinene synthase จาก *Salvia officinalis*, geraniol synthase จาก *Perilla citriodora*, linalool synthase จาก *Mentha citrata*, 1,8-cineol synthase จาก *Nicotiana suaveolens*, limonene synthase จาก *Citrus unshiu*, (-)-beta-pinene synthase จาก *Citrus limon*, 3-carene synthase จาก *Salvia stenophylla*, limonene synthase จาก *Toona sinensis*, beta-phellandrene synthase จาก *Abies grandis*, (-)-alpha-pinene synthase จาก *Pinus tabuliformis*, camphene synthase จาก *Abies grandis*, myrcene synthase จาก *Picea abies*, terpinolene synthase และจาก *Abies grandis* เท่ากับ 97, 97, 96, 93, 71, 63, 49, 47, 43, 43, 41, 39, 39, 36, 28, 28, 27, 27 และ 26 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบว่า เอนไซม์ McLMS มีบริเวณอนุรักษ์อยู่ 2 ส่วน ได้แก่ ส่วนแรกเป็นบริเวณที่มีลำดับของอาร์จินีน 2 หน่วยติดกัน (RR sequence) อยู่ที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 59 และ 60 และส่วนที่ 2 บริเวณ DDXXD motif อยู่ที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 353 ถึง 357

จากการหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรม (phylogenetic tree) โดยนำลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ McLMS และลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ LMS จากพืช

ชนิดต่างๆ จำนวน 17 ชนิด ที่มีรายงานไว้ในธนาคารยีนมาสร้างแผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม MEGA4 พบว่าสามารถแบ่งพืชออกเป็น 6 กลุ่ม โดยเอนไซม์ McLMS อยู่ในกลุ่มเดียวกับ *M. longifolia*, *M. spicata*, *M. haplocalx* และ *M. piperita*

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน McLMS โดยชักนำให้ผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีน McLMS ด้วย IPTG พบว่ารีคอมบิแนนต์เอนไซม์ McLMS มีขนาดประมาณ 70 กิโลดาลตัน

ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาการทำหน้าที่ของรีคอมบิแนนต์โปรตีน McLMS จากแบคทีเรีย *E. coli*

จากผลการศึกษาทำให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีน McLMS และทราบว่ายีน McLMS สามารถแสดงออกได้ในแบคทีเรีย *E. coli* แต่ยังไม่ทราบว่ารีคอมบิแนนต์โปรตีน McLMS จากแบคทีเรียนี้จะสามารถทำหน้าที่ได้เหมือนเอนไซม์ McLMS ในพืชได้หรือไม่ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำงานวิจัยต่อไปโดยจะต้องนำรีคอมบิแนนต์โปรตีน McLMS ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว นำมาทำปฏิกิริยากับเจอร์รานิลไดฟอสเฟต ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของลิโมนีน จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น โดยเทคนิค GC-MS ถ้ามีลิโมนีนเกิดขึ้น แสดงว่ารีคอมบิแนนต์โปรตีน McLMS สามารถทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนเจอร์รานิลไดฟอสเฟตเป็นลิโมนีน จากนั้นควรหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่เอนไซม์สามารถผลิตลิโมนีนได้มากที่สุด

2. ศึกษาการแสดงออกและการทำหน้าที่ของยีน McLMS ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงอื่นๆ

เมื่อทราบแล้วว่ายีน McLMS สามารถแสดงออกและทำหน้าที่ได้ในแบคทีเรีย *E. coli* แล้ว จากนั้นจึงควรทดสอบถ่ายโอนยีน McLMS ลงในสิ่งมีชีวิตชั้นสูงชนิดอื่นๆ เช่น ในเซลล์พืช เซลล์สัตว์ เพื่อทดสอบว่ามีการแสดงออกและทำหน้าที่ได้หรือไม่ สำหรับนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น

- ด้านการเกษตร นำไปปรับปรุงพันธุ์พืชที่ในธรรมชาติไม่มีการผลิตลิโมนีนให้มีการผลิตลิโมนีน พัฒนาพืชที่สามารถผลิตลิโมนีนได้ให้มีการผลิตเพิ่มมากขึ้น หรือใช้เป็นสารป้องกันแมลงศัตรูพืช
- ด้านอุตสาหกรรม นำลิโมนีนไปใช้ในอุตสาหกรรมด้านต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง
- ด้านการแพทย์ ผลิตลิโมนีนเพื่อใช้ในการด้านเซลล์มะเร็ง

บรรณานุกรม

- ชนันท์ อังสุรณะสมบัติ. 2533. การนำพลาสมิดเข้าสู่แบคทีเรีย. หน้า 51-68. ในสุมาลี ตั้งประดับกุล. คู่มือปฏิบัติการทางพันธุวิศวกรรม การขยายยีนและการตัดต่อยีนจากโครโมโซม. กรุงเทพฯ : โครงการอนุพันธุศาสตร์-พันธุวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 119 หน้า.
- เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2545. เทคนิค **Polymerase Chain Reaction (PCR)**. หน้า 4-25. ในเพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร. ขอนแก่น : มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 84 หน้า.
- วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด. 2536. การนำรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน. หน้า 14.1-14.5 ในวัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด และ สรวง อุดมวรภัณฑ์. เทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรม **หนังสือปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ**. กรุงเทพฯ : สมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย. 369 หน้า.
- วันทนี สว่างอารมณ์. 2542. **พืชเครื่องเทศและสมุนไพร**. เอกสารคำสอนรายวิชาพืชเครื่องเทศและสมุนไพร. กรุงเทพฯ : สถาบันราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา. 341 หน้า.
- สมสุข มัจฉาชีพ. 2542. **พืชสมุนไพร**. เล่มที่ 2. กรุงเทพฯ : แพร์พิทยา. 317 หน้า.
- สุนันทา ภิณูวัชรน์. 2544. **ชีวเคมี**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง. พิมพ์ครั้งที่ 7. กรุงเทพฯ. 428 หน้า.
- สุรินทร์ ปิยะโชคธนากุล. 2543. **พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น**. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 272 หน้า.
- Adam, K.P., Crock, J. and Croteau, R. 1996. "Partial purification and characterization of a monoterpene cyclase, limonene synthase, from the liverwort, *Ricciocarpos natans*." **Archives of biochemistry and biophysics**. 332(2) : 352-356.
- Alonso, W.R., Rajaonarivony, J.J., Gershenzon, J. and Croteau R. 1992. "Purification of 4S-limonene synthase, a monoterpene cyclase from the glandular trichomes of peppermint (*Mentha piperita*) and spearmint (*Mentha spicata*)." **The Journal of biological chemistry**. 267(11) : 7582 -7587.
- Blast2Fasta. 2006. [Online]. Available : <http://www.expasy.org>
- Bohlmann, J., Steele, C.L. and Croteau, R. 1997. "cDNA isolation, characterization and functional expression of myrcene synthase (-)-(4S)-limonene synthase and (-)-(1S, 5S)-pinene synthase. 1997. **The Journal of biological chemistry**. 272(35) : 21784-21792.

- Bohlmann, J., Meyer-Gauen, G. and Croteau, R. 1998. "Plant terpenoid synthases : molecular biology and phylogenetic analysis." **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 95 : 4126 -4133.
- Bouwmeester, H.J., Jonathan, G., Maurice. C.J.M.K. and Rodney, C. 1998. "Biosynthesis of the monoterpenes limonene and cavone in fruit of caraway." **Plant Physiology**. 117 : 901-912.
- Brown, T.A. 2001. The Polymerase Chain Reaction. 187-208. *In* Brown, T.A. **Essential Molecular Biology**. Vol. 2. 2nd ed. Oxford : Oxford University Press. 472 p.
- Chappell, J. 1995. "The biochemistry and molecular biology of isoprenoid metabolism." **Plant Physiology**. 107 : 1-6.
- ClustalW**. 2006. [Online]. Available : <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>
- Colby, S.M., Alonso, W.R., Katahira, E.J., McGarvy, D.J. and Croteau, R. 1993. "cDNA isolation, characterization and bacterial expression of the catalytically active monoterpene cyclase." **The Journal of biological chemistry**. 268(31) : 23016-23024.
- Croteau, R., Gershenzon, J., Wheeler, C., Satterwhite, D.M. 1990. "Biosynthesis of Monoterpene : stereochemistry of the coupled isomerization and cyclization of geranyl pyrophosphate to camphene and isocamphene monoterpene." **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 277(2) : 374-381.
- Crowell, P.L. 1999. "Prevention and therapy of cancer by dietary monoterpenes." **Journal of Nutrition**. 129(3) ; 775S-778S)
- Dole, E. 2009. "lac operon." [Online]. Available : www.life.uiuc.edu/bio100/lectures/s97lects/16GeneControl/lac_page.html
- El Tamer, M.K., Lücker, J., Bosch, D., Verhoeven, H.A., Verstappen, F.W.A., Schwab, W., van Tuner, A.J., Voragen, A.G.J., de Maagd, R.A. and Bouwmeester, H.J. 2003. "Domain swapping of *Citrus limon* monoterpene synthase : impact on enzymatic activity and product specificity." **Archives of biochemistry and biophysics**. 411 : 196-203.
- Ferrarini, S.R., Graebin, C.S., Limberger, J., Canto, R.F.S., Dias, D.O., Rosa, R.G. Da., Madeira, M. de. F.M. and Eifler-Lima, V.L. 2008. "Synthesis of limonene β -amino alcohol derivatives in support of new antileishmanial therapies." **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 103(8). 773 -777.
- GenBank**. 1988. [Online]. Available : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

- Greene, J.J., and Rao, V.B., 1998. **Recombinant DNA principles and methodologies**. USA : The catholic university of America. 750 p.
- Hall, T. 1997. **Bioedit**. [Online]. Available : <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>.
- Kumar, S., Dudley, J., Nei, M. and Tamura, K. 2008. "MEGA4." [Online]. Available : www.megasoftware.net
- Lange, B.M., Wildung, M.R., Stauber, E.J., Sanchez, C., Pouchnik, D. and Croteau, R. 1999. "Probing essential oil biosynthesis and secretion by functional evaluation of expressed sequence tags from mint glandular trichomes." **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. (97)6 : 2934-2939.
- Lawrence, B.M., 2006. **Mint : The genus Mentha**. CRC Press. 556 p.
- Lehninger, A. 1975. **Biochemistry : the molecular basis of cell structure and function**. 2nd ed. Worth : New York. 1104 p.
- Lucker, J., El Tamer, M.K., Schwab, W., Verstappen, F.W., van der Plas, L.H., Bouwmeester, H. J. and Verhoeven, H.A. 2002. "Monoterpene biosynthesis in lemon (*Citrus limon*) cDNA isolation and functional analysis of four monoterpene synthases." **European journal of biochemistry**. 269(13) : 3160 -3171.
- Mahmoud, S.S., Williams, M., Croteau, R. 2004. "Cosuppression of limonene-3-hydroxylase in peppermint promotes accumulation of limonene in the essential oil." **Phytochemistry**. 65 : 547-554.
- Maruyama, T., Ito, M., Kirchi, F. and Honda, G. 2001. "Molecular cloning, functional expression and characterization of *d*-limonene synthase from *Schizonepeta tenuifolia*." **Biological and pharmaceutical bulletin**. 24(4) : 373 -377.
- Maruyama, T., Saeki, D., Ito, M. and Honda, G. 2002. "Molecular cloning and functional expression and characterization of *d*-limonene synthase from *Agastache rugosa*." **Biological and pharmaceutical bulletin**. 25(5) : 661-665.
- Mazen, K., El Tamer, M.K., Smeets, M., Holthuysen, N., Lucker, J., Tang, A., Roozen, J., Bouwmeester, H.J. , Voragen, A.G.J. 2003. "The influence of monoterpene synthesis transformation on the odour of tobacco." **Journal of biotechnology**. 106 : 15-21.
- Mcconkey, M.E., Jonathan, G. and Rodney, B.C. 2000. "Developmental regulation of

- monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of peppermint.” **Plant Physiology**. 122 : 215 -223.
- Mcgarvey, D.J. 1995. Terpenoid metabolism. **Plant cell**. 7 : 1015-1026.
- Mulhardt, C. 2007. **Molecular biology and genomics**. Translated by Beese, E.W. 2nd ed. Amsterdam : Elsevier. 257 p.
- Munoz-Bertomeu, J., Ros, R., Arrillaga, I. and Segura, J. 2008. “Expression of spearmint limonene synthase in transgenic spike lavender results in an altered monoterpene composition in developing leaves.” **Metabolic engineering**. 10. 166 -177.
- Ohara, K., Ujihara, T., Endo, T., Sato, F. and Yazaki, K. 2003. “Limonene production in tobacco with *Perilla* limonene synthase cDNA.” **Journal of experimental botany**. 54(393) : 2635-2642.
- Oyen, L.P.A. and Dung, N.X. 1999. ทรัพยากรพืชในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ลำดับที่ 19. แปลจาก **PROSEA 19 : Essencial oil plants** โดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.). พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สหมิตรพรีนติ้ง. 369 หน้า.
- Petroski, R.J. and McCormick, S.P. 1992. **Secondary-metabolite biosynthesis and metabolism**. Springer. 383 p.
- Rajaonarivony, J.I., Gershenzon, J. and Croteau, R. 1992. Characterization and mechanism of (4S)-limonene synthase, a monoterpene cyclase from the glandular trichomes of peppermint (*Mentha x piperita*). **Archives of biochemistry and biophysics**. 296(1) : 49 - 57.
- Ritter, P. 1996. **Biochemistry : a foundation**. Pacific grove. USA. 822 p.
- Sambrook, J. and Russel, D.W. 1989. **Molecular cloning. A lab manual**. Cold spring harbor laboratory press. USA. 545 p.
- Satomi, Y., Ohara, K., Yazaki, K., Ito, M., Honda, G. and Nishino, H. 2009. “Production of the monoterpene limonene and modulation of apoptosis-related proteins in embryonic-mouse NIH 3T3 fibroblast cells by introduction of the limonene synthase gene isolated from Japanese catnip (*Schizonepeta tenifolia*).” **Biotechnology and applied biochemistry**. 52 : 185-190.
- Schwab, W., Williams, D.C., Davis, E.M. and Croteau, R. 2001. “Mechanism of monoterpene

- cyclization : stereochemical aspects of the transformation of noncyclizable substrate analogs by recombinant (-)-limonene synthase, (+)-bornyl diphosphate synthase, and (-)-pinene synthase.” **Archives of biochemistry and biophysics**. 392 : 123-136.
- Shimada, T., Endo, T., Fujii, H., Hara, M. 2004. “Molecular cloning and functional characterization of four monoterpene synthase genes from *Citrus unshiu* Marc.” **Plant Science**. 166 : 49 -58.
- Shimada, T., Endo, T., Fujii, H. and Omura, M. 2005. “Isolation and characterization of a new d-limonene synthase gene with a different expression pattern in *Citrus unshiu* Marc.” **Scientia horticulturae**. 105 : 507-512.
- Starks, C.M., Back, K., Chappell, J., Noel, J.P. 1997. “Structure basis for cyclic terpene biosynthesis by tobacco 5-epi aristolochene synthase.” **Science**. 277 : 1818-1820.
- Sun, J., 2007. “D-limonene : safety and chemical application. ” **Alternative medicine review**. 12(3) : 259 -264.
- Tavera-Loza, H. 1999. **Monoterpenes in essential oils : biosynthesis and properties**, in : Shahidi (Ed.), *Chemicals via Higher Plant Bioengineering*, Kluwer Academic Publishers, Plenum Press, New York. 409 p.
- Trapp, S.C and Croteau, R.B. 2001. “Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implication.” **Genetics**. 158 : 811-832.
- Tsuda, H., Ohshima, Y. and Nomoto, H. 2004. “Cancer prevention by natural compounds.” **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**. 19(4) : 245-263.
- Turner, G., Gershenzon, J., Nielson, E.E., Froehlich, J.E. and Croteau R. 1999. “Limonene synthase the enzyme responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint, it localized to leucoplasts of oil gland secretory cells.” **Plant physiology**. 120 : 879 -886.
- Taylor, G.R. 1991. **Polymerase Chain Reaction : Basic Principles and Automation**. 1-14. in McPherson, M.J.*et al.* *PCR a Practical Approach*. Vol. 1. 1st ed. New York : Oxford University Press. 526 p.
- Williams, D.C., Mcgarvy, D.J., Katahiva, E.J. and Croteau, R. 1998. “Truncation of limonene synthase preprotein provides a fully active pseudomature form of this monoterpene cyclase and reveals the function of the animal-terminal arginine pair.” **Biochemistry**. 37 : 12213-12220.
- Yamasaki, Y. and Akimitsu, K. 2007. “*In situ* localization of gene transcriptions for monoterpene

synthesis in irregular parenchymic cells surrounding the secretory cavities in rough lemon (*Citrus jambhiri*)” **Journal of plant physiology**. 164(11):1436 -48.

Yuba, A., Yazaki, K., Tabata, M., Honda, G. and Croteau, R. 1996. “cDNA cloning, characterization and functional expression of 4S(-)-limonene synthase from *Perilla frutescens*. **Archives of biochemistry and biophysics**. 332(21) : 280 -287.

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร **Luria-Bertani** (Sambrook, J. and Russel, D.W. 1989)

LB broth

ส่วนประกอบ

แบคโตทริปโตน (Bacto-tryptone)	10	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด (Yeast extract)	5	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10	กรัมต่อลิตร

ละลายส่วนประกอบต่างๆ ในน้ำกลั่น ปรับพีเอชเป็น 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

LB agar

ส่วนประกอบ

แบคโตทริปโตน (Bacto-tryptone)	10	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด (Yeast extract)	5	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	10	กรัมต่อลิตร
วุ้น (Agar)	15	กรัมต่อลิตร

ละลายส่วนประกอบต่างๆ ในน้ำกลั่น ปรับพีเอชเป็น 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

สารละลายบัฟเฟอร์

1. Sample buffer (5X) 50 มิลลิลิตร (สำหรับวิเคราะห์โปรตีน)

ส่วนประกอบ

กลีเซอรอล 100 เปอร์เซ็นต์	20	มิลลิลิตร
Tris 1 โมลาร์ pH 6.8	12.5	มิลลิลิตร
เบต้า-เมอร์แคปโตเอทานอล	6.25	มิลลิลิตร
SDS	5	กรัม
โบรโมฟินอล บลู 10 เปอร์เซ็นต์	500	ไมโครลิตร

(โบรโมฟินอล บลู 50 มิลลิกรัม, น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 500 ไมโครลิตร)

ผสมส่วนประกอบต่างๆ ให้เข้ากัน ปรับพีเอชเป็น 6.8 และปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ

2. TBE buffer (10X) 1 ลิตร

ส่วนประกอบ

กรดบอริก	55	กรัม
Tris	108	กรัม
EDTA 0.5 โมลาร์ pH 8.0	40	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบต่างๆ ในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. TAE buffer (1X)

ส่วนประกอบ

กรดอะซิติก

Tris

EDTA 0.5 โมลาร์ pH 8.0

เติมสารละลายบัฟเฟอร์ TAE 40X ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที 975 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

4. TE buffer

ส่วนประกอบ

Tris 1 โมลาร์ pH 8	1	มิลลิลิตร
EDTA 0.5 โมลาร์	0.2	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบต่างๆในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ยาปฏิชีวนะ

1. ยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ชั่งแอมพิซิลลิน 100 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร กรองผ่าน sterilize filter เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารเคมีอื่นๆ

1. IPTG 0.1 โมลาร์

ชั่ง IPTG 120 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร กรองผ่าน sterilize filter เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

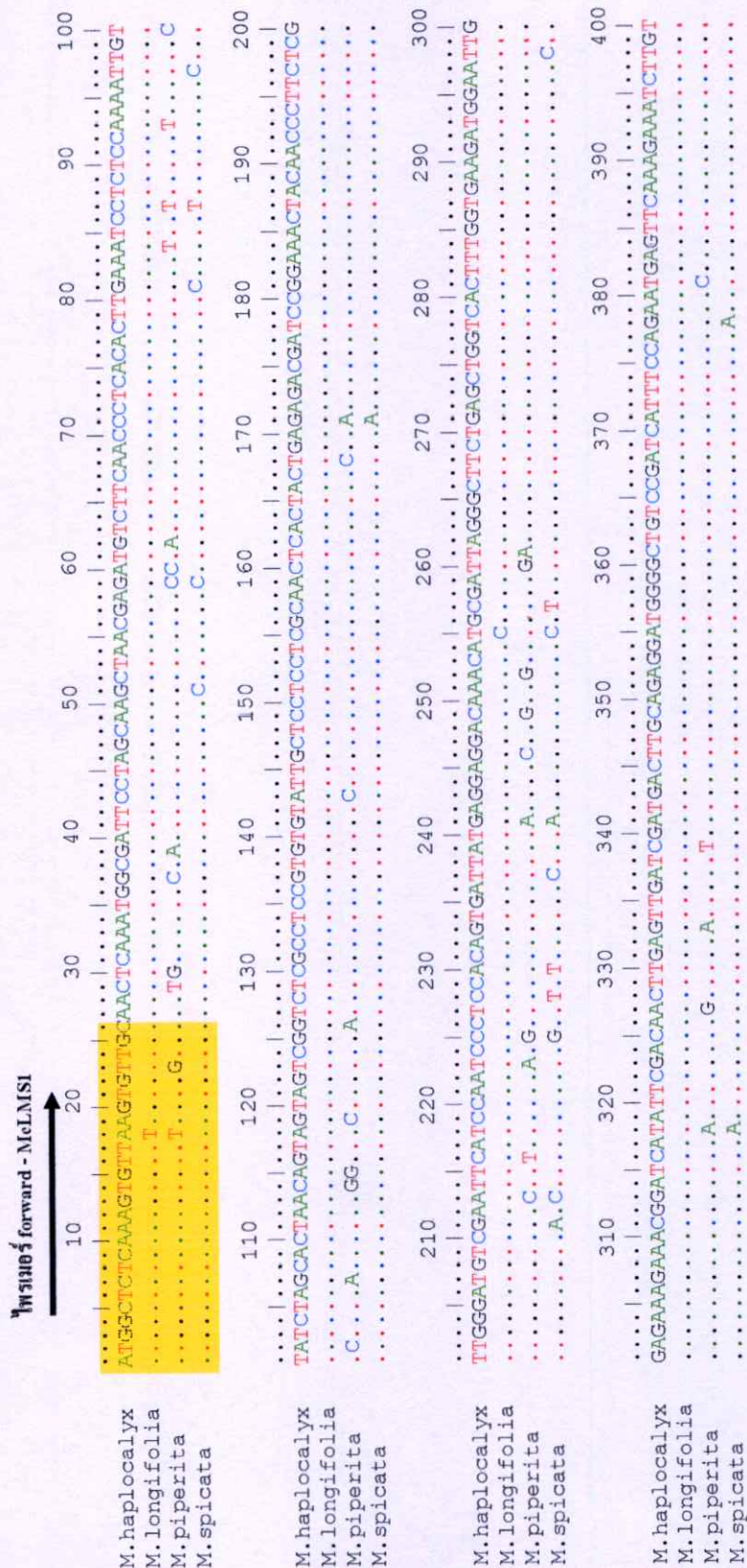
2. X-Gal 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

ชั่ง X-Gal 100 มิลลิกรัม ละลายใน N,N-dimethyl-formamide ปริมาตร 2 มิลลิลิตร กรองผ่าน sterilize filter หุ้มด้วย aluminium foil เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ข

1. การออกแบบไพรเมอร์ McLMS1 และ McLMS2 จากพืชตระกูลมินต์ (*Mentha* spp.) จำนวน 4 ชนิด ที่มีรายงานในธนาคารยีน

ที่ได้แก่ *M. piperita*, *M. spicata*, *M. longifolia* และ *M. haplocalyx*



	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
M.haplocalalyx
M.longifolia
M.piperita
M.spicata
	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
M.haplocalalyx
M.longifolia
M.piperita
M.spicata
	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
M.haplocalalyx
M.longifolia
M.piperita
M.spicata
	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
M.haplocalalyx
M.longifolia
M.piperita
M.spicata
	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
M.haplocalalyx
M.longifolia
M.piperita
M.spicata
	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
M.haplocalalyx
M.longifolia
M.piperita
M.spicata

1100

 CATGCAAGTGC AAGGATAATGATGGSCAAAGTCAACGGCTCTGATACGGTTCGATCGATGATATTTATGATGCTTACGGCACCTTAGAAGAAGACTCGAACAAT

 M.haplocalyx
 M.longifolia
 M.piperita
 M.spicata

1110

 TCACAGAACTCATTCGGAGATGGGATATAANAACATAACCGACTCCCGATACATGCAACTGTGCTTTCTTGCATCAACAACCTCGTTCGATGATAC

 T.C.....A
 C.....G.....
 T.C.....A
 M.haplocalyx
 M.longifolia
 M.piperita
 M.spicata

1210

 ATCGTACGATGTTATGAAGGAGAAAGGGCTCAACGTTATACCCTACCTGCGGCAATCGTGGGTGGATTTGGCGGATAAGTATAITGGTAGAGGCACGGTGG

 C.....A.....
 T.T.A.....
 T.....
 M.haplocalyx
 M.longifolia
 M.piperita
 M.spicata

1310

 TTCTACGGCGGGCACAAACCAAGTTTGGAAAGATTTGGAGAGATTTGGAGAACTCATGGCAGTCGATAAGTGGCCCTGTATGTTAACGCACATATTTCCGAGTAA

 A.....
 C.....A.....
 A.T.....
 C.G.A.....
 T.....
 M.haplocalyx
 M.longifolia
 M.piperita
 M.spicata

1410

 CAGATTCGTTCAACAAGGAGACCGTCGACAGCTTGACAAATACCACGATTTAGTTTCGTTGGTTCCTTCGTTCTGGGGCTTGTCTGATGATTTGGGAAAC

 G.....A.....
 T.....
 T.....G.....
 A.....
 T.....
 A.....
 M.haplocalyx
 M.longifolia
 M.piperita
 M.spicata

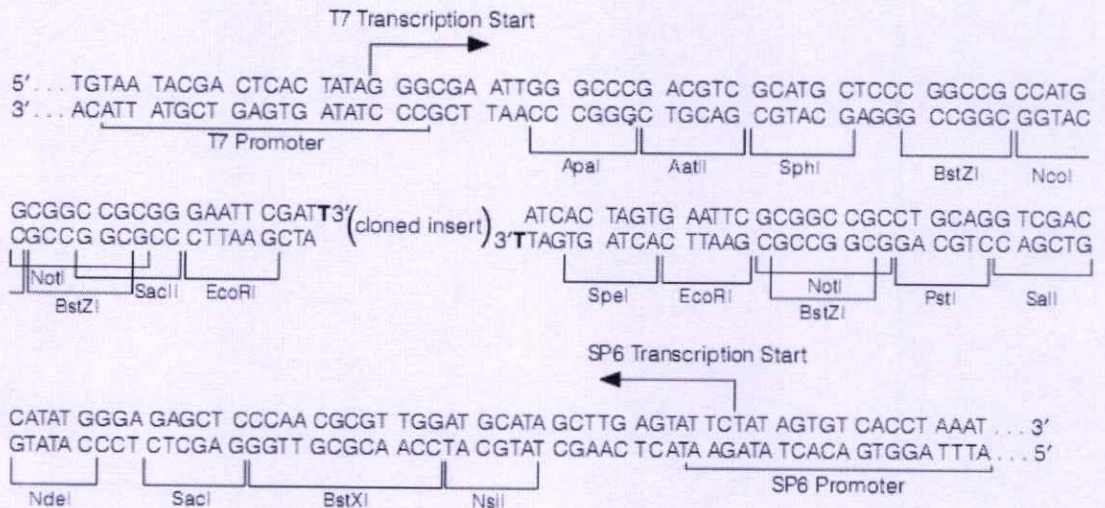
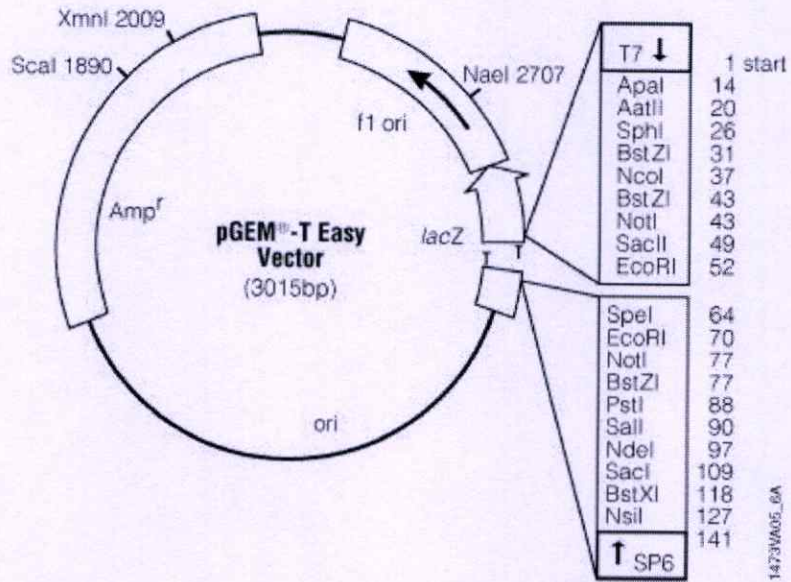
1510

 CTGGTGGAAAGAGGTGAGCAGAGGGCGATGTCGGAAAATCACTTCAGTGTACATGAGTGAAGTCACTCGGAGGGGAGCGGGGAGCAAGTGA

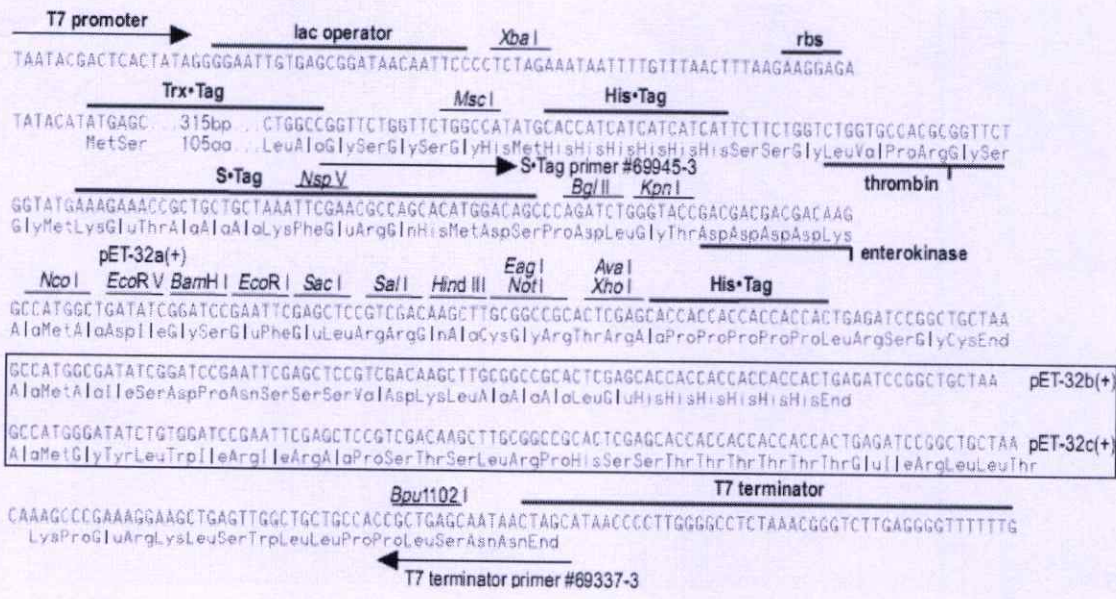
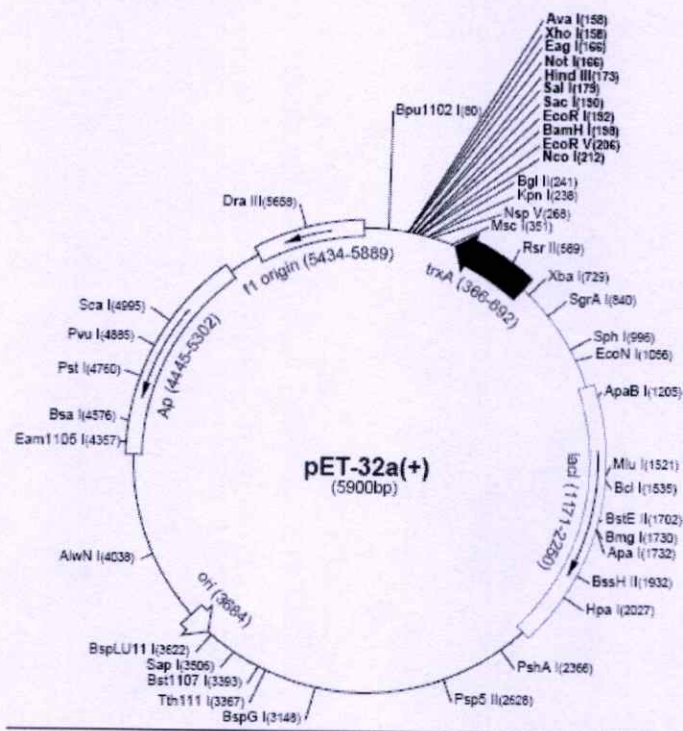
 A.....C.....
 G.....
 G.....
 A.....
 M.haplocalyx
 M.longifolia
 M.piperita
 M.spicata

ภาคผนวก ค

1. แผนที่ยีนของพลาสมิด pGEM-T easy (Promega, USA)



2. แผนที่ยีนของพลาสมิด pET 32a(+)



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวเนตรนภา ปัญญามูล
วัน เดือน ปีเกิด	13 กรกฎาคม 2521
ภูมิลำเนา	จังหวัดเชียงใหม่
ที่อยู่ปัจจุบัน	382/4 ซ.ลาดกระบัง 52 ถ.อ่อนนุช-ลาดกระบัง แขวงลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมีและชีวเคมีเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่