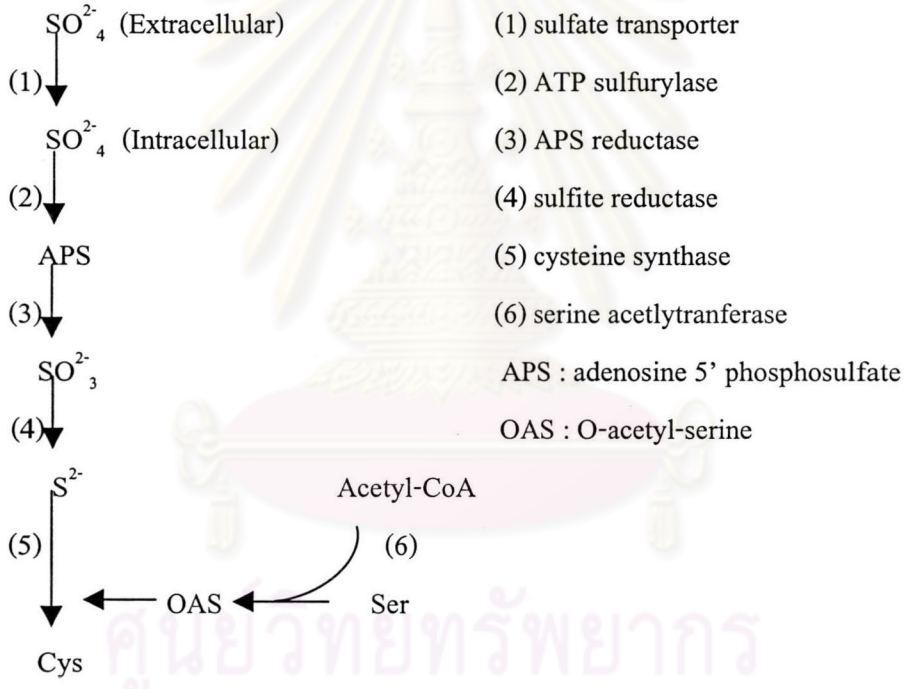
บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

พืชสามารถสังเคราะห์สารอินทรีย์ที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบจากซัลเฟตที่ดูดซับได้จากภายนอกเซลล์ โดยพืชนำซัลเฟตจากภายนอกเซลล์ที่ได้มาสังเคราะห์เป็นกรดอะมิโนซิสเตอีน จากนั้นกรดอะมิโนซิสเตอีนจึงจะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดอะมิโนชนิดอื่นที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบคือเมไธโอนิน และสารเมตาโบไลต์ อื่นๆ ต่อไป เช่น กลูตาไธโอน เป็นต้น

วิถีการนำซัลเฟตมาสังเคราะห์เป็นกรดอะมิโนซิสเตอีนในพืช ดังแสดงในภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 วิถีการนำซัลเฟตมาสังเคราะห์เป็นกรดอะมิโนซิสเตอีนและเอนไซม์ควบคุมการทำงานแต่ละขั้นตอนในพืช (Saito, 2000)

ซิสเตอีนซินเตส (cysteine synthase) หรือโอ-อะซิติล-แอล-เซอรีน (ไธออล)-ไลเอส (O-acetyl-L-serine (thiol) lyase) หรือ โอ-อะซิติล-แอล-เซอรีนอะซิเตท-ไลเอส (O-acetyl-L-serine acetate-lyase)หรือโอ-อะซิติลเซอรีน ซัลไฮไดรเลส (O-acetylserine sulhydrylase) เป็นเอนไซม์สุดท้ายของกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีน ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีนจากโอ-อะซิติลเซอรีนและสารประกอบซัลไฟด์ ดังสมการ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

$$\text{O-acetyl-L-serine} + \text{sulfide} \xrightarrow{\text{cysteine synthase}} \text{L-cysteine} + \text{acetate}$$

ซิสเตอีนซินเตสมีลักษณะเป็นโฮโมไดเมอร์ (homodimer) ขนาด 60-70 กิโลดาลตัน มีไพริดอกซอล 5'-ฟอสเฟต (pyridoxal 5'- phosphate) เป็นโคแฟกเตอร์ (cofacter) ซิสเตอีนซินเตสเป็นเอนไซม์ที่พบได้ทั้งในส่วนของพืชที่มีสีเขียว เช่น ใบ ลำต้น และในส่วนของพืชที่ไม่มีสีเขียว เช่น ราก ดอก นอกจากนี้ยังมีหลายไอโซฟอร์ม (Youssefian และคณะ, 1993)

Lunn และคณะ (1990) รายงานว่า *Spinacia oleracea* L. มีซิสเตอีนซินเตส 3 ไอโซฟอร์ม คือ CSaseA , CSaseB , CSaseC อยู่ในไซโตพลาสซึม คลอโรพลาสต์ และไมโตคอนเดรีย ตามลำดับ Saito และคณะ(1992) สามารถโคลนคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ (cDNA) ซึ่งประมวลรหัส CSaseA และรายงานว่า *CSaseA* แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 325 ตัว ถอดรหัสที่ใบและราก Saito และคณะ (1993) สามารถโคลนคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอซึ่งประมวลรหัส CSaseB และรายงานว่า *CSaseB* แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 383 ตัว เป็นกรดอะมิโนที่เป็นทรานซิตเปปไทด์ (transit peptide) 52 ตัว ถอดรหัสที่ใบ Saito และคณะ (1994a) สามารถโคลนคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอซึ่งประมวลรหัส CSaseC และรายงานว่า *CSaseC* แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 368 ตัว เป็นกรดอะมิโนที่เป็นทรานซิตเปปไทด์ 30-40 ตัว ถอดรหัสในส่วนของพืชที่มีสีเขียวและในต้นอ่อนที่เจริญโดยไม่ได้รับแสง

Saito และคณะ (1997) รายงานว่าซิสเตอีนซินเตสทั้ง 3 ไอโซฟอร์มของ *S. oleracea* L. มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายกัน (homology) 60-75 % ตำแหน่งกรดอะมิโนไลซิน (lysine) ที่บริเวณยึดเกาะของโคแฟกเตอร์ไพรีดอกซอล 5'- ฟอสเฟตมีความเป็นอนุรักษ์สูง CSaseA ไม่มีทรานซิตเปปไทด์ *CSaseA* และ*CSaseC* ถอดรหัสทั้งในส่วนของพืชที่มีสีเขียวและในส่วนของพืชที่ไม่มีสีเขียวแต่ *CSaseB* ถอดรหัสเฉพาะในส่วนของพืชที่มีสีเขียวนอกจากนั้น Saito และคณะ (1997) พบว่า mRNA ของ *CSaseA* , *CSaseB* เพิ่มสูงขึ้น 1.5 เท่าภายใน 24 ชั่วโมงในภาวะที่ขาดแคลนกำมะถันและไนโตรเจน และพบว่า mRNA ของ *CSaseC* เพิ่มขึ้น 5 เท่าภายในเวลา 24 ชั่วโมงในภาวะที่ขาดแคลนไนโตรเจนหรือภาวะขาดแคลนไนโตรเจนร่วมกับกำมะถัน

Saito และคณะ (1992) รายงานการคัดแยกและลักษณะของคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอที่ประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสของต้นผักขม (*Spinacia oleracea* L.) โดยนำสายเปปไทด์ที่แปลรหัสยีนซิสเตอีนซินเตสมาตัดด้วย V8 protease ซึ่งได้มาจาก *Staphylococcus aureus* เพื่อหาลำดับกรด

อะมิโน จากข้อมูลลำดับกรดอะมิโนที่ได้นำมาสังเคราะห์โอลิโกเปปไทด์ 2 เส้น เรียก V812 และ V822 เพื่อใช้เป็นตัวติดตามตรวจสอบห้องสมุดคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอชนิด λgt10 (λgt10 library) ซึ่งได้มาจากอาร์เอ็นเอที่แยกได้จากใบอ่อนของต้นผักขม จำนวน 2×10^5 โคลน พบว่าเพียง 19 โคลนที่สามารถให้สัญญาณไฮบริไดเซชันกับ V812 และ V822 คัดเลือก 2 โคลนจาก 19 โคลนที่ได้มาศึกษาลักษณะต่างๆ ของยีน พบว่าทั้ง 2 โคลน สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 325 ตัว ขนาด 34 กิโลดาลตัน ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับซิสเตอีนซินเตสของ *Escherichia coli* และ *Salmonella typhimurium* 53% คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอแสดงออกใน *E. coli* ที่ไม่มีซิสเตอีนซินเตส ผลการศึกษาโดยวิธี immuno bloting และวิธีการหากิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสพบว่ามีการสะสมของซิสเตอีนซินเตสในรูปที่สามารถทำงานได้ใน *E. coli* การศึกษาโดยวิธี Southern hybridization พบว่าในต้นผักขมนี้มีจำนวนชุดของยีนเท่ากับ 2-3 ชุด และการศึกษาโดยวิธี RNA hybridization พบว่าเอนไซม์นี้แสดงออกที่ใบและที่ราก

Saito และคณะ (1994b) ได้สร้างพลาสมิด 3 ชนิด ซึ่งบริเวณ T-DNA มียีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตส (*CSase* A) ชนิดที่อยู่ในไซโตพลาสซึมจากคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอของต้นผักขม (*Spinacia oleracea*) ซึ่งลักษณะต่างกัน ดังนี้ พลาสมิด pCSK3F ทิศทางการเรียงตัวของยีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสและของโปรโมเตอร์ชนิด Cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S RNA เหมือนกัน พลาสมิด pCSK3R ทิศทางการเรียงตัวของยีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสตรงข้ามกับของโปรโมเตอร์ชนิด CaMV 35S พลาสมิด pCSK4F ยีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสเชื่อมต่อกับทรานซิตเปปไทด์ที่แสดงออกในคลอโรพลาสต์ ซึ่งได้มาจากหน่วยย่อยของ ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (RUBISCO) ในต้นถั่ว ทิศทางการเรียงตัวของยีนไปทางเดียวกับโปรโมเตอร์ชนิด CaMV 35S ทำการถ่ายโอนรีคอมบิแนนท์พลาสมิด ทั้ง 3 ชนิดเข้าต้นยาสูบ โดยวิธีการใช้ *Agrobacterium* ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ในสารสกัดจากเซลล์ พบว่าต้นยาสูบที่มีพลาสมิด pCSK3F และ pCSK4F มีกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสมากกว่าต้นยาสูบพันธุ์เดิมและต้นยาสูบที่มีพลาสมิด pCSK3R 2 –3 เท่า ต้นยาสูบที่มีพลาสมิด pCSK4F มีกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสในคลอโรพลาสต์มากกว่าต้นยาสูบพันธุ์เดิม และต้นยาสูบที่มีพลาสมิด pCSK3F หลายเท่า แสดงว่าซิสเตอีนซินเตสได้ถูกขนส่งและไปสะสมในรูปที่สามารถทำงานได้ในคลอโรพลาสต์ เมื่อเติมโอ-อะซิติล-แอล-เซอรีนและสารประกอบซัลเฟอร์ ที่คลอโรพลาสต์ของต้นยาสูบที่มีพลาสมิด pCSK4F มีการสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีนได้มากกว่าที่คลอโรพลาสต์ของต้นยาสูบพันธุ์เดิม ทั้งนี้เป็นเพราะกระบวนการ photoreduction ซัลไฟต์ของพืชเกิดที่คลอโรพลาสต์ การศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการทนต่อสารพิษของต้นยาสูบ โดยการนำชิ้นส่วนใบ (leaf discs) ของต้นยาสูบพันธุ์เดิมและต้นยาสูบทรานสฟอร์แมนท์มาเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมสารประกอบซัลเฟอร์ชนิดต่างๆ พบว่าต้นยาสูบที่มีพลาสมิด pCSK4F สามารถทนต่อความเป็นพิษ

ของซัลไฟต์ได้สูงขึ้นและสามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีนได้มากขึ้นด้วย แสดงว่าต้นยาสูบที่มีพลาสมิด pCSK4F สามารถลดความเป็นพิษของซัลไฟต์ได้ โดยนำซัลไฟต์ไปเป็นสับสเตรทในกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีน

Noji และคณะ (2001) ได้ทำการผสมต้นยาสูบข้ามสายพันธุ์ (Cross – fertilization) ระหว่างต้นยาสูบซึ่งมีคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอของต้นผักขม ที่แปลรหัสเป็นซิสเตอีนซินเตสในส่วนไซโตพลาสซึม (Saito และคณะ, 1992) และต้นยาสูบซึ่งมียีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสจากต้นผักขมเชื่อมต่อกับทรานซิตเปปไทด์ที่แสดงออกในคลอโรพลาสต์จากหน่วยย่อยของ ribose –1,5-bisphosphate carboxylase (RUBISCO) ของต้นถั่ว (Saito และคณะ, 1994) พบว่า F1 มีความสามารถในการทนต่อความเป็นพิษของซัลเฟอร์ไดออกไซด์และซัลไฟต์สูงขึ้น การทดลองรมด้วยก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ 0.1 ไมโครลิตรต่อลิตร ทำให้มีปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีน และกลูตาไธโอนซึ่งเป็นสารเมตาโบไลต์ในใบของ F1 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการตรวจหากิจกรรมของซิสเตอีนซินเตส ของ F1 พบว่าสูงกว่าของต้นยาสูบพันธุ์เดิมประมาณ 5 เท่า โดยกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสที่เพิ่มขึ้นนี้ เพิ่มขึ้นในส่วนของไซโตพลาสซึมและคลอโรพลาสต์

Hesse และคณะ (1997) โคลนคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอซึ่งประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสทั้ง 3 ไอโซฟอร์มของ *Arabidopsis thaliana* คือ ASL-A , ASL-B และ ASL-C ซึ่งเป็นซิสเตอีนซินเตสในไซโตพลาสซึม คลอโรพลาสต์ และไมโตคอนเดรีย ตามลำดับ และรายงานว่ายีน *ASL-A* ยาว 1,275 เบส แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน 324 ตัว ยีน *ASL-B* ยาว 1,421 เบส แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน 392 ตัว ยีน *ASL-C* ยาว 1,569 เบส แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน 430 ตัว ยีนทั้ง 3 นี้ถอดรหัสอย่างจำเพาะที่ส่วนต่างๆของพืช ยีน *ASL-A* ถอดรหัสที่ใบและราก ยีน *ASL-B* ถอดรหัสที่ใบ ยีน *ASL-C* ถอดรหัสทั้งที่ใบและราก แต่ถอดรหัสที่รากมากกว่าที่ใบ

Yamaguchi และคณะ (1999) รายงานว่าการนำซัลเฟตมาใช้ในกระบวนการ sulfate assimilation ของ *A. thaliana* ถูกควบคุมในระดับของการถอดรหัสโดยภาวะขาดแคลนกำมะถัน ปริมาณ mRNA ซึ่งถอดรหัสจากยีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสไอโซฟอร์มคลอโรพลาสต์จะคงที่ถ้าได้รับแสง แต่จะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในที่มืด ปริมาณ mRNA ซึ่งถอดรหัสจากยีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสไอโซฟอร์มไซโตพลาสซึมจะเพิ่มขึ้น 2.5 เท่าถ้าได้รับแสง และจะเพิ่มขึ้น 2 เท่าในที่มืด ขณะที่ภาวะขาดแคลนกำมะถันและการได้รับแสงหรือไม่ได้รับแสงไม่มีผลใดๆต่อปริมาณ mRNA ซึ่งถอดรหัสจากยีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสไอโซฟอร์มไมโตคอนเดรีย นอกจากนั้นคณะผู้วิจัยยังรายงานว่าการตอบสนองของยีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสต่อภาวะขาดแคลนกำมะถันจะเกิดเฉพาะในภาวะที่มีไนโตรเจนเท่านั้น ผลการวิจัยที่ได้สอดคล้องกับผลการวิจัยของ Reuveny และ

คณะ (1980) ที่รายงานว่ากระบวนการนำซัลเฟตมาใช้ในกระบวนการ sulfate assimilation และกระบวนการนำไนโตรเจนมาใช้ในกระบวนการ nitrate assimilation ของพืชนั้นเกี่ยวข้องกัน

Yamaguchi และคณะ (2000) ได้ทำการแยกคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ 3 ชนิดคือ *AtcysC*1 , *AtcysD*1 และ *AtcysD*2 ซึ่งเป็นยีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสของ *A. thaliana* ผลการวิเคราะห์โดยวิธี Southern hybridization พบว่าในจีโนมของ *A. thaliana* มียีนเหล่านี้อย่างละ 1 ชุด หรือมากที่สุดเพียง 2 ชุด ผลการศึกษา complementation analysis ใน *E. coli* ยืนยันว่ายีนทั้ง 3 นี้ประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสและโปรตีนซึ่งแปลรหัสจากยีนทั้ง 3 ใน *E. coli* มีกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตส และพบว่า *AtcysC*1 มีกิจกรรมของบีต้า-ไซยาโนอะลานินซินเตส (β-cyanoalanine synthase) ผลการศึกษา kinetic analysis พบว่า *AtcysC*1 ทำหน้าที่เป็นบีต้า-ไซยาโนอะลานินซินเตสมากกว่าซิสเตอีนซินเตส ผลการวิเคราะห์ molecular phylogenic ด้วยโปรแกรม Clustal X (Thompson และคณะ ,1994) พบว่า *AtcysD*1 และ *AtcysD*2 จัดอยู่ในกลุ่มไอโซฟอร์มที่พบในไซโตพลาสซึม ส่วน *AtcysC*1 จัดอยู่ในกลุ่มไอโซฟอร์มที่พบในไมโตคอนเดรีย ผลการตรวจหา organ specificity ของกระบวนการถอดรหัสของแต่ละยีนพบว่า *AtcysC*1 ถอดรหัสมากในใบที่เจริญเต็มที่ *AtcysD*1 ถอดรหัสในดอกและ *AtcysD*2 ถอดรหัสในส่วนใบและดอก และพบว่าการเพาะเลี้ยง *A. thaliana* ในสภาพที่ไม่มีแสงหรือในสภาวะที่ขาดสารอาหารไม่ทำให้การถอดรหัสของยีนทั้ง 3 เปลี่ยนแปลง

Youssefian และคณะ (1993) แยกคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอซึ่งแปลรหัสเป็นซิสเตอีนซินเตสของข้าวสาลี (*Triticum aesrivum* L.) เรียกยีนที่แยกได้ว่ายีน *cys*1 พบว่าลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากยีน *cys*1 เหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของซิสเตอีนซินเตสของ *E. coli* และ *Salmonella typhimurium* 53% ยีน *cys*1 แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน 325 ตัว ซิสเตอีนซินเตสที่ได้ขนาด 34.1 กิโลดาลตัน มีไพริดอกซอล 5' ฟอสเฟต เป็นโคแฟกเตอร์จัดเป็นกลุ่มที่พบในคลอโรพลาสต์ ยีน *cys*1 สามารถแสดงออกใน *E. coli* สายพันธุ์กลายซึ่งยีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสไม่สามารถแสดงออก ผลการวิเคราะห์โดยวิธี Northern hybridization พบว่ายีน *cys*1 แสดงออกมากในส่วนที่มีสีเขียวและเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ ใบ และราก ผลการวิเคราะห์โดยวิธี Southern hybridization พบว่ามียีน *cys*1 จำนวน 1 ชุด ผลการศึกษาต้นยาสูบที่มียีน *cys*1 ซึ่งมีทิศทางการเรียงตัวของยีนในทิศทางเดียวกันกับโปรโมเตอร์ชนิด CaMV 35S และในทิศทางตรงกันข้ามกับโปรโมเตอร์ชนิด CaMV 35S พบว่าต้นยาสูบที่มียีน *cys*1 ซึ่งเรียงตัวในทิศทางเดียวกับโปรโมเตอร์ถอดรหัสในปริมาณสูง และมีกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสมากกว่าต้นยาสูบพันธุ์เดิม 3 – 5 เท่า ในขณะที่ต้นยาสูบที่มียีน *cys*1 ซึ่งมีทิศทางการเรียงตัวของยีนตรงกันข้ามกับโปรโมเตอร์จะพบว่าปริมาณการถอดรหัสและกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสไม่แตกต่างจากต้นยาสูบพันธุ์เดิม ผลการทดลองรม

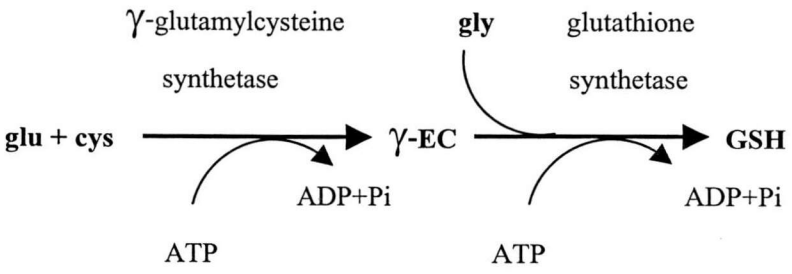
ด้วยก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ด้วยปริมาณที่มีความเป็นพิษต่อต้นยาสูบ พบว่าต้นยาสูบที่มียีน *cys*1 ที่มีทิศทางการเรียงตัวไปทางเดียวกับโปรโมเตอร์สามารถทนได้แต่ต้นยาสูบพันธุ์เดิม และต้นยาสูบที่มียีน *cys*1 ซึ่งมีทิศทางการเรียงตัวตรงกันข้ามกับโปรโมเตอร์ไม่สามารถทนได้

Nakamura และคณะ (1999) โคลนคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นรหัสของซีสเตอีนซินเตส 4 ไอโซฟอร์มจากข้าวชนิด *Oryza sativa* cv. Nipponbare คือ *rcs1, rcs2 , rcs3* และ *rcs4* จากลำดับกรดอะมิโนที่ทำนายจากลำดับนิวคลีโอไทด์ พบบริเวณอนุรักษ์คือ PXXSVKDR ซึ่งเป็นลำดับกรดอะมิโนเฉพาะของซีสเตอีนซินเตส โดยกลุ่ม ε amine ของไลซีนตำแหน่งที่ 6 ในบริเวณอนุรักษ์ดังกล่าวข้างต้นสามารถสร้างพันธะ imine กับกลุ่มแอลดีไฮด์ของ ไพรีดอกซอล 5'- ฟอสเฟตซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์นำไปสู่ปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีนจากโอ-อะซิติลเซอรีนและสารประกอบซัลไฟด์ ผลการวิเคราะห์ Molecular phylogenic พบว่า RCS1 และ RCS3 จัดอยู่ในกลุ่มไอโซฟอร์มที่พบในไซโตพลาสซึม ส่วน RCS2 และ RCS4 มีทรานซิตเปปไทด์ชนิดใหม่ที่แตกต่างจากทรานซิตเปปไทด์สำหรับไอโซฟอร์มที่พบในคลอโรพลาสต์หรือไมโตคอนเดรีย ดังนั้น Nakamura และคณะ (1999) เสนอว่า RCS2 และ RCS4 อาจเป็นไอโซฟอร์มกลุ่มใหม่ ผลการตรวจหา organ specificity ของกระบวนการถอดรหัสของแต่ละยีน และการตอบสนองต่อการขาดแคลนกำมะถัน ไนโตรเจน และแสง พบว่ายีน *rcs1* ถอดรหัสในทุกส่วนของต้นข้าว การถอดรหัสของยีน *rcs1* ทั้งที่ต้นและรากถูกเหนี่ยวนำได้โดยภาวะการขาดกำมะถันแต่มีไนโตรเจน ยีน *rcs2* ถอดรหัสที่ต้นเฉพาะเมื่อเจริญในที่ที่มีแสงเท่านั้นยีน *rcs3* ถอดรหัสที่รากได้มากกว่าที่ต้น การถอดรหัสจะลดลงในที่มืด ในภาวะที่ขาดกำมะถันร่วมกับไนโตรเจน แทบจะไม่พบการถอดรหัสของยีน *rcs4* ในทุกส่วนของต้นข้าว ผลการทดลองที่ได้แสดงว่ายีนเหล่านี้ประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสต่างไอโซฟอร์ม และต่างถูกควบคุมโดยปริมาณกำมะถัน ไนโตรเจน และแสง

Urano และคณะ (2000) รายงานผลการโคลนคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอ ซึ่งประมวลรหัสเซอรีนอะซิติลทรานเฟอเรส และซิสเตอีนซินเตส จากต้น *Allium tuberosum* (Chinese chive) ซึ่งพืชในสกุล *Allium* นี้มีความสามารถในการสะสมสารเมตาโบไลต์ซึ่งมีสารประกอบซัลเฟอร์ที่สังเคราะห์มาจากกรดอะมิโนซิสเตอีนในปริมาณสูง คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอซึ่งประมวลรหัสเซอรีนอะซิติลทรานเฟอเรสแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 289 ตัว สามารถแสดงออกใน *E. coli* สายพันธุ์กลายซึ่งยีน *cys*E ซึ่งประมวลรหัสเซอรีนอะซิติลทรานเฟอเรสไม่สามารถแสดงออก ส่วนคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอซึ่งประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 325 ตัว สามารถแสดงออกใน *E. coli* สายพันธุ์กลายที่ยีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสไม่สามารถแสดงออก โดยทำให้ *E. coli* สายพันธุ์กลายข้างต้นสามารถเจริญบนอาหารที่ไม่เติมกรดอะมิโนซิสเตอีนได้ จากข้อมูลลำดับกรดอะมิโนที่ทำนายจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอพบว่าเป็นไอ

โซฟอร์มที่อยู่ในไซโตพลาสซึม ผลการวิเคราะห์โดยวิธี Northern hybridization พบว่ายีนทั้งคู่ถอดรหัสในปริมาณที่เกือบเท่ากันในใบ ราก และต้นกล้าของ *A. tuberosum* กิจกรรมของเซอรีนอะซิติลทรานเฟอเรสซึ่งแปลรหัสจากคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอที่โคลนได้ถูกยับยั้งโดย แอล-ซิสเตอีน แต่ความไวต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับพืชอื่น ๆ ที่เคยมีผู้รายงานไว้ กล่าวคือ แอล-ซิสเตอีน 48.7 ไมโครโมลาร์ จึงจะสามารถยับยั้ง 50 % ของกิจกรรมของเซอรีนอะซิติลทรานเฟอเรสของ *A. tuberosum* (IC_{50} เท่ากับ 48.7 ไมโครโมลาร์) ในขณะที่พืชชนิดอื่นๆ มีค่า IC_{50} ประมาณ 5 ไมโครโมลาร์เท่านั้น กิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสไม่ถูกยับยั้งโดยกรดอะมิโนซิสเตอีนแม้ว่าจะมีปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนมากกว่า 100 ไมโครโมลาร์ ผู้วิจัยสรุปว่าการที่เซลล์ของ *A. tuberosum* มีปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนมากกว่าในเซลล์ของ *A. thaliana* และต้นยาสูบหลายเท่านั้นเป็นเพราะเซอรีนอะซิติลทรานเฟอเรสของ *A. tuberosum* มีความไวต่ำต่อการถูกยับยั้งกิจกรรมโดยกรดอะมิโนซิสเตอีน ปริมาณกลูตาไธโอนในเซลล์ของ *A. tuberosum* ไม่แตกต่างจากของ *A. thaliana* และต้นยาสูบ

กลูตาไธโอน (Glutathione) เป็นเปปไทด์ประกอบด้วยกรดอะมิโน 3 ชนิดคือกลูตาเมต-ซิสเตอีน-ไกลซิน (γ-L-glutamate –L-cysteine-L-glycine [GSH]) พบกลูตาไธโอนในเซลล์ของ พืช สัตว์ และแบคทีเรีย (Noctor และ Foyer, 1998) ปฏิกิริยาการสังเคราะห์กลูตาไธโอนจากกลูตาเมต ซิสเตอีน และไกลซีนมี 2 ขั้นตอนเป็นปฏิกิริยาที่ขึ้นกับ ATP เร่งปฏิกิริยาโดยแกมมา-กลูตามิวซิสเตอีน (แกมมา-อีซี) ซินเทเตส (γ-glutamylcysteine (γ-EC) synthetase (γ-ECS : EC 6.3.2.2) และ กลูตาไธโอนซินเทเตส (glutathione synthetase (GS : EC 6.3.2.3)) ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 1.2 พืชสังเคราะห์กลูตาไธโอนในไซโตพลาสซึมและในคลอโรพลาสต์ (Greissen , 1999) การสังเคราะห์กลูตาไธโอนนั้น กลูตาเมตและซิสเตอีนได้มาจากกระบวนการ Nitrogen assimilation และ Sulfate assimilation ตามลำดับ ขณะที่ไกลซีนได้มาจากกระบวนการโฟโตเรสไพเรชัน (photorespiration) กลูตาไธโอนในพืชทำหน้าที่ป้องกันกลุ่ม sulhydryl ของเอนไซม์ถูกออกซิไดส์ ทำหน้าที่เป็นตัวให้รีดิวส์ซัลเฟอร์แก่สารอื่น และทำหน้าที่เป็นสับสเตรทของกลูตาไธโอน เอส-ทรานเฟอเรส (GSH S-transferase) หรือเป็นสารตั้งต้น (precursor) ของกระบวนการสังเคราะห์ phytochelatins ปัจจุบันนี้มีความพยายามที่จะผลิตกลูตาไธโอนให้ได้ปริมาณมากเพื่อที่จะนำไปใช้ในด้านเภสัชกรรม เช่น ใช้เป็นสารต้านมะเร็ง (anti-carcinogenic agent) และใช้ในด้านอุตสาหกรรมอาหาร เป็นสารเพิ่มรสชาติ (flavor enhancer) (Noctor และ Foyer, 1998)



ภาพที่ 2.2 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์กลูตาไธโอน (Noctor และ Foyer, 1996)

การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีทางพันธุวิศวกรรมอาจทำโดยการถ่ายโอนยีนโดยตรงเช่น วิธีอิเลคโทรพอริชัน (electroporation) วิธีการใช้เข็มฉีด (Microinjection) หรือวิธีการใช้เครื่องยิง (Microprojectile bombardment) และทำการถ่ายโอนยีนโดยวิธีการใช้ *Agrobacterium* ซึ่งวิธีการใช้ *Agrobacterium* นี้ใช้ได้ผลดีกับพืชใบเลี้ยงคู่ (dicotyledons) และเป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุด *Agrobacterium tumefaciens* เป็นแบคทีเรียแกรมลบอาศัยอยู่ในดิน สามารถเข้าสู่เซลล์พืชได้ทางบาดแผล ทำให้พืชมีลักษณะเป็นปุ่มปม เรียกว่า Crown gall disease (Sahi และคณะ, 1994) ทั้งนี้เพราะ *A. tumerfaciens* สามารถถ่ายโอนยีนส่วน T-DNA จากพลาสมิดชนิดไบนารีเข้าสู่โครโมโซมของพืช ยีนส่วน T-DNA มียีนประมวลรหัสฮอร์โมนพืชชนิดออกซิน (auxins) และไซโตไคนิน (cytokinins) จึงทำให้เซลล์พืชแบ่งตัวรวดเร็วและไม่จำกัด เกิดเป็นปุ่มปมหรือก้อนเนื้องอก หลักการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์พืชโดยวิธีการใช้ *Agrobacterium* ทำโดยการขจัดยีนประมวลรหัสฮอร์โมนพืชออกจากยีนส่วน T-DNA แล้วนำยีนที่ต้องการถ่ายโอนเข้ามาสอดแทรกแทน เมื่อยีนส่วน T-DNA สอดแทรกเข้าไปในโครโมโซมของพืช ยีนที่ต้องการถ่ายโอนก็จะถูกนำเข้าไปด้วย James และคณะ (1993) รายงานว่าอะซิโตไซริงโอน (acetosyringone) สามารถเร่งการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์พืชโดยวิธีการใช้ *A. tumefaciens*

Akaracharanya และคณะ (2001) ทำการศึกษาการงอกใหม่ของต้นอ่อน (shoot regeneration) ของผักบุ้ง พบว่าใบเลี้ยงบริเวณโคนใบพร้อมก้านใบสามารถงอกเป็นต้นใหม่ได้ในปริมาณสูงถึง 75 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ต้นอ่อนอายุ 7 วัน และใช้ไธเดียซูรอน (Thidiazuron) ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ในการเร่งการพัฒนาเป็นต้นอ่อน ต้นอ่อนของผักบุ้งที่ได้สามารถงอกรากได้เองโดยไม่จำเป็นต้องใช้สารเร่งการงอกราก ดังนั้นงานวิจัยนี้จะใช้ *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101 ถ่ายโอนยีนเข้า cotyledon

Hood และคณะ (1986) ได้สร้างพลาสมิดพาหะชนิดไบนารี ประกอบด้วย พลาสมิดสำหรับสร้างเป็นรีคอมบิแนนต์พลาสมิด ซึ่งมียีนส่วน T-DNA และในบริเวณยีนส่วน T-DNA มียีนต้านต่อสารปฏิชีวนะ และพลาสมิดดัดแปลง Ti ซึ่งมีกลุ่มยีน *vir* เรียกพลาสมิดชนิดนี้ว่า pEHA101 และเรียก *A. tumefaciens* ที่มีพลาสมิด pEHA101 นี้ว่า *A. tumefaciens* EHA101 ต่อมา Kimura และคณะ (1993) ได้สร้างพลาสมิด pBIH1-IG ซึ่งเป็นพลาสมิดพาหะชนิดไบนารีชนิดที่มียีนส่วน T-DNA และมียีนต้านสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินและกานามัยซินอยู่ในบริเวณ T–DNA รีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่สร้างจาก pBIH1-IG เมื่อนำมาทรานสฟอร์มเข้าสู่ *A. tumefaciens* EHA101 พบว่าทรานสฟอร์แมนท์ *A. tumefaciens* EHA101 ที่ได้มีประสิทธิภาพในการถ่ายโอนยีนสอดแทรกบนรีคอมบิแนนต์พลาสมิดเข้าสู่โครโมโซมของ *A. thaliana* และข้าวสูง (Hiei และคณะ, 1994)

รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBIH1-IG-RCS1 เป็นพลาสมิดที่มียีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสของข้าว (ยีน *rcs*1) สอดแทรกอยู่ที่ตำแหน่งเรสทริกชัน *Xba*I และ *Sac*I ของพลาสมิดพาหะ pBIH1-IG ซึ่งเป็นการสอดแทรกเข้าไปแทนที่ยีนประมวลรหัสบีต้ากลูคูโรนิเดสในพลาสมิดพาหะ pBIH1-IG ซึ่งเป็นพลาสมิดพาหะชนิดไบนารี ได้รับมาจาก Dr. Nakamura Tatsuo, Research and Education Center for Genetic Information, Ikoma, Nara, Japan. รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBIH1-IG-RCS1 นี้มียีนต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินและกานามัยซินอยู่ในบริเวณ T-DNA ยีน *rcs*1 ได้มาจากการโคลนคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอของข้าว (*Oryza sativa* cv. Nipponbare) มีขนาด 1,290 เบส แปลรหัสเป็นกรดอะมิโน 321 ตัวโปรตีน RCS1 เป็นไอโซฟอร์มที่อยู่ในไซโตพลาสซึม (Nakamura และคณะ, 1999)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย