ชื่อวิทยานิพนธ์	ยีนสำหรับเอนไซม์ในช่วงต้นของวิถีนอนเมวาโลเนทที่นำไปสู่การสังเคราะห์ไอโซพรีนอยด์ในปาล์มน้ำมัน
ผู้เขียน	นางสาวสาวิตรี เขมวงศ์
สาขาวิชา	ชีวเคมี
ปีการศึกษา	2546

บทคัดย่อ

พืชชั้นสูงสังเคราะห์ไอโซพรีนอยด์ได้ 2 วิถีคือ วิถี acetate/mevalonate (MVA) และวิถี methyl-D-erythritol-4-phosphate (MEP) ปฏิกิริยาขั้นแรกของวิถี MEP เกิดจากการรวมตัวกันของ pyruvate กับ glyceraldehyde-3-phosphate ได้เป็น 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate (DXP) โดยมีเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาคือ 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DXS) ซึ่งถูกควบคุมโดยยีน *dxs* ขั้นถัดมา DXP จะเปลี่ยนเป็น MEP โดยเอนไซม์ 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR) ควบคุมโดยยีน *dxr*

ในการศึกษาครั้งนี้ได้โคลนส่วนของยีน *dxs* และ *dxr* จากใบและผลปาล์มน้ำมันสายพันธุ์เทเนอรา ด้วยวิธี RT-PCR แบบขั้นตอนเดียว ทำให้พบว่ามียีน *dxs* ในปาล์มน้ำมันซึ่งเป็นรหัสสำหรับเอนไซม์ DXS อย่างน้อย 2 ยีน ที่แตกต่างกันและทำงานในเนื้อเยื่อต่างชนิดกัน โดย *dxs1* ทำงานที่ใบและ *dxs2* ทำงานในผลปาล์มน้ำมัน ส่วนยีน *dxr* มีลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนเหมือนกันทั้งในใบและผล เมื่อทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของยีน *dxs1* ด้วยวิธี RLM-RACE พบว่ามีขนาด 2,301 คู่เบส แปลรหัสเป็นเอนไซม์ DXS ขนาด 707 กรดอะมิโน มวลโมเลกุล 76.4 kDa และมีค่า Isoelectric point 7.0 ปลาย N ของเอนไซม์นี้มีลำดับกรดอะมิโนที่นำโปรตีนจากไซโทพลาสมเข้าสู่คลอโรพลาสต์และมีบริเวณที่จับกับ Thiamine diphosphate ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ DXS มีความใกล้เคียงกันมากในพืชชั้นสูงโดยในปาล์มน้ำมันมีความเหมือนกับพริกหยวกและมะเขือเทศ ถึง 86 และ 85% ตามลำดับ

การศึกษาการแสดงออกของยีน *dxs2* และ *dxr* ในผลปาลม์น้ำมันระยะต่างๆ โดยวิธี semiquantitative RT-PCR พบว่าการแสดงออกของยีน *dxs2* จะแปรผันตามระยะการพัฒนาของผลปาล์มน้ำมัน และสูงสุดหลังการผสมพันธุ์ 18 สัปดาห์ สอดคล้องกับปริมาณ β-carotene ที่เพิ่มขึ้น ขณะที่ยีน *dxr* มีการแสดงออกคงที่ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าการแสดงออกของยีน *dxs2* มีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ผ่านวิถี MEP

Thesis Title	Genes for Enzymes in Early Steps of Non-mevalonate Pathway Leading to Isoprenoids Biosynthesis in *Elaeis quineensis* Jacq.
Author	Miss Sawitri Khemvong
Major Program	Biochemistry
Academic Year	2003

Abstract

In higher plants, there are two pathways leading to the formation of isoprenoids: the acetate/mevalonate (MVA) pathway and the recently discovered methyl-D-erythritol-4-phosphate (MEP) pathway. The initial step of MEP pathway involves a condensation of pyruvate and glyceraldehyde-3-phosphate to yield 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate (DXP). This reaction is catalyzed by 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DXS), encoded by *dxs* gene. In the second step, DXP is converted to MEP by the enzyme 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR), encoded by *dxr* gene.

In this study, parts of *dxs* and *dxr* have been cloned from young leaves and mesocarp of oil palm (*Elaeis quineensis* Jacq., Tenera) using one step RT-PCR. The results show surprisingly that there are at least two *dxs* genes encoding DXS in different organs of oil palm, *dxs1* in the leaf and *dxs2* in the fruit while *dxr* showed the same nucleotide and amino acid sequences in both tissues. Cloning of full length cDNA encoding *dxs1* by RLM-RACE (RNA ligase-mediated rapid amplification of $5'$ and $3'$ cDNA ends) demonstrated that the cDNA contained an open reading frame of 2,301 base pairs encoding a deduced peptide of 707 amino acid residues with a predicted molecular mass of 76.4 kDa and Isoelectric point of 7.0. The protein presents N-terminus amino acids with characteristics of chloroplast transit peptides and a thiamine diphosphate-binding domain. The deduced amino acid sequence shares high homology with amino acid sequences of DXS from other higher plants especially pepper (*Capsicum annuum*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*), with 86 and 85% identity, respectively.

Expression of *dxs* and *dxr* mRNA levels in oil palm fruit from each developmental stage were analysed by a semiquantitative RT-PCR method. The level of dxs transcript increases with the time after anthesis and reaches the maximum at 18 weeks after anthesis while the expression of *dxr* is unchanged. The levels of *dxs* transcripts correlate with β-carotene contents suggested that *dxs* play a regulation role in carotenoid biosynthesis by MEP pathway.