บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RSA5880044

ชื่อโครงการ : การโคลนยีนและการศึกษาคุณสมบัติสตริ๊กโตซิดีนเบต้ากลูโคซิเดสจากพืชกระท่อมและการสร้างพืชต้นแบบเพื่อการศึกษาชีวสังเคราะห์สารมิตรากัยนีน

ชื่อนักวิจัย : รศ.ดร.จุไรทิพย์ หวังสินทวีกุล
คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

E-mail address: juraithip.w@psu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี (มิ.ย. 2558- ก.ค. 2561) (ขอขยายเวลาถึง ธันวาคม 2561)

พืชกระท่อม จัดอยู่ในยาเสพติดให้โทษประเภทที่ ๕ ตามพระราชบัญญัติยาเสพติดให้โทษ พ.ศ. ๒๕๒๒ และปรับปรุงใน พ.ศ. ๒๕๖๒ แต่คุณค่าของพืชกระท่อมในทางยาก็ยังเป็นที่ยอมรับของวงวิชาการในการเป็นยาในกลุ่มแก้ปวดออปิออยด์ วิถีชีวสังเคราะห์ของสารมิตรากัยนีนที่สร้างจากสตริ๊กโตซิดีนยังมีประเด็นที่ต้องศึกษาเนื่องจากยังไม่มีรายงานมาก่อน การศึกษานี้ได้พยายามโคลนยีนสตริ๊กโตซิดีนเบต้า-กลูโคซิเดส เอนไซม์ในชีวสังเคราะห์ของมิตรากัยนีน การโคลนแบ่งเป็นส่วนแกนกลางและส่วนปลายทั้งสองด้านของยีน ขั้นแรกในการโคลนยีนส่วนแกนกลางได้ชิ้นส่วนขนาด 773 นิวคลีโอไทด์ (โค๊ดกรดอะมิโนขนาด 257 หน่วย) เมื่อเปรียบเทียบชิ้นส่วนแกนกลางกับยีนอื่น ๆ ในพืชชั้นสูง พบว่ามีความเหมือนอยู่ในช่วง 55-60% เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมพบลักษณะสำคัญของยีนในกลุ่มไกลโคซิลไฮโดรเลส จากนั้นนำชิ้นส่วนแกนกลางมาออกแบบไพรเมอร์เพื่อการโคลนส่วนปลาย 5′- และ 3′- ผลพบว่ายังไม่ประสบความสำเร็จในการโคลนยีนส่วนปลาย แม้จะปรับชนิดของไพรเมอร์และสภาวะการทดลองที่เกี่ยวข้องแล้วก็ตาม เกี่ยวกับการสร้างพืชต้นแบบกระท่อมเพื่อศึกษาชีวสังเคราะห์ของสารมิตรากัยนีนและแอลคาลอยด์อื่น ๆ ในการทดลองได้พืชที่เลี้ยงในสภาวะทดลอง, ยอดเพาะเลี้ยง, รากเพาะเลี้ยง, แคลลัส และเซลล์เพาะเลี้ยง โดยพืชต้นแบบทั้ง 5 ชนิดได้ถูกนำมาศึกษาและประเมินการสร้างสารทุติยภูมิ สำหรับพืชเพาะเลี้ยงที่มีลักษณะครบถ้วนเหมือนพืชที่ปลูกในธรรมชาติ (แต่เลี้ยงอยู่ในสภาวะควบคุม) ใช้เทคนิคอิลิซิเตชั่นมากระตุ้นและประเมินการสร้างสาร พบว่าเมื่อกระตุ้นพืชด้วยสารโซเดียม ไนโตรพลัสไซด์ (SNP) สามารถกระตุ้นการสร้างสารเซโคโลกานิน สาร SNP จะปลดปล่อยก๊าซไนตริกออกไซด์ (NO) และกระตุ้นการสร้างสารดังกล่าว ในการทดลองค้นพบว่าผลการสร้างสารเกิดขึ้นผ่านช่องแคลเซียมในระดับเซลล์ และก่อให้เกิดการกระตุ้นยีนที่เกี่ยวข้องในชีวสังเคราะห์เป็นผลให้มีการสร้างสารเซโคโลกานิน สาเหตุที่ได้เห็นความแตกต่างระหว่างการสร้างมิตรากัยนีนของพืชที่ไม่ถูกกระตุ้นและถูกกระตุ้นด้วย SNP คาดว่าเนื่องจากปริมาณกรดอะมิโนทริปตามีนที่อยู่ในเซลล์อาจไม่เพียงพอ และเข้าทำปฏิกิริยาในระดับเซลล์ของการสังเคราะห์มิตรากัยนีน ในการทดลองได้ศึกษาผลของแสงสีแดง สีฟ้า สีขาว และที่มืด ต่อการสร้างแอลคาลอยด์ (มิตรากัยนีน, เพย์แนนเทอีน, สเปซิโอกัยนีน) ในพืชกระท่อม ผลการทดลองพบว่าแสดงสีฟ้ากระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชและสร้างสารแอลคาลอยด์ได้ดีที่สุด ในขณะที่แสงสีแดงกระตุ้นการสร้างสารได้ดี และยับยั้งการเจริญเติบโต จากพืชในหลอดทดลองในนำชิ้นส่วนมาเหนี่ยวนำให้เกิดแคลลัสพบว่าส่วนของลำต้นเป็นชิ้นส่วนที่ให้เปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสดีที่สุด และเกิดในอาหารชนิด WPM ที่เสริมด้วยฮอร์โมน 2,4-D ขนาด 1 มก./ลิตร หลังจากการเปลี่ยนอาหารหลาย ๆ ครั้ง ทำให้ได้เซลล์ร่วน มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน และเจริญเติบโตได้ดี แต่เมื่อประเมินการสร้างสารกลับไม่พบการสร้างแอลคาลอยด์เลย เมื่อออกแบบชนิดของอาหารโดยการใช้ Plackett-Burman Design ก็ไม่พบการสร้างสารมิตรากัยนีน จากนั้นได้พยายามเปลี่ยนชนิดของฮอร์โมน เนื่องจาก 2,4-D อาจมีผลยับยั้งการสร้างสารทุติยภูมิ โดยการปรับให้เป็น NAA และผสมกับ BA หรือ TDZ ในความเข้มข้น 1 มก./ลิตร ผลการทดลองพบว่าเฉพาะแคลลัสที่เลี้ยงใน WPM ที่เสริมด้วย NAA และ TDZ อย่างละ 1 มก/ลิตร แคลลัสที่ได้มีสีเขียว แต่ก็ยังไม่สร้างมิตรากัยนีน แคลลัสทั้งสองสูตร ได้ถูกนำมาเหนี่ยวนำให้เกิดเซลล์เพาะเลี้ยง เมื่อประเมินการสร้างสารในเซลล์เพาะเลี้ยงพบเพียงกรดเออโซลิก (เช่นเดียวกับที่พบในรากเพาะเลี้ยง) การกระตุ้นด้วยเมทิลแจสโมเนท และสารสกัดยีสต์ พบว่าสามารถกระตุ้นการสร้างกรดเออโซลิกในเซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารทั้งสองชนิด น่าสนใจที่เมื่อกระตุ้นด้วยสารสกัดยีสต์พบว่าเซลล์มีการหลั่งสารสีน้ำตาลออกมาสู่อาหารเพาะเลี้ยง จากการตรวจสอบเบื้องต้นด้วย LC-MS/MS พบว่ามีแนวโน้มการสร้างสารมิตรากัยนแต่มีปริมาณน้อยมาก ซึ่งต้องปรับสภาวะการทดลองในลำดับต่อไป ส่วนการทดลองในยอดเพาะเลี้ยง มีการกระตุ้นด้วยกรดแจสโมนิก กรดแอบซิสซิก และกรดซาลิไซลิก ออกแบบโดย RSM-CDD พบว่าสารทั้งสามชนิดสามารถกระตุ้นการสร้างสารมิตรากัยนีนได้ นอกจากนี้การกระตุ้นด้วยเมทิลแจสโมแนท กรดซาลิไซลิก และไคโตซาน ก็สามารถกระตุ้นการสร้างมิตรากัยนีนได้เช่นกัน จากผลการทดลองที่กล่าวมา แสดงให้เห็นว่าเนื้อเยื่อและเซลล์เพาะเลี้ยงที่เหนี่ยวนำมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ศึกษาชีวสังเคราะห์สารมิตรากัยนีนในระดับโมเลกุลได้

คำหลัก : *Mitragyna speciosa*, mitragynine, strictosidine glucosidase, plant tissue cultures, Kratom

Abstract

Project Code: RSA5880044
Project Title: Molecular cloning of strictosidine glucosidase from kratom and establishment of plant models for mitragynine biosynthetic study
Investigator: Juraithip Wungsintaweekul, Dr.rer.nat., Associate Professor
Faculty of Pharmaceutical Sciences Prince of Songkla University
E-mail address: juraithip.w@psu.ac.th
Project Period: 3 years (June 2015-July 2018) (extended until December 2018)

Medicinal value of *Mitragyna speciosa* (Korth.) Havil or Kratom has been reported for an alternative opioid analgesic. It is classified as a member of narcotic plant level 5 according to the Narcotic Board Control, Ministry of Health of Thailand. From biosynthetic point of view, the distance between strictosidine and mitragynine is still unknown. The present study, we attempted to clone the cDNA encoding strictosidine-β-glucosidase (SGD). The internal sequence of SGD contains 773 nucleotides, encoded for 257 amino acids residues. The alignment of the deduced amino acid to known plant SGD revealed that kratom SGD shared the homology ranging 55-60% identity. Functional analysis of internal sequence found the catalytic motif belonging to glycosyl hydrolases family. In addition, the glutamate catalytic residue also was found in the kratom SGD when compared to *Rauvolfia serpentina* SGD. Unsuccessful cloning of the 5′- and 3′- ends of SGD was tasked. New primers were designed and again cloned using RACE technique as well as optimization of PCR reaction. The resulting fragments of 5′- and 3′- ends of SGD was not obtained.

This study was successful to establish the callus and suspension culture besides of plant, root and shoot cultures. Five different types of tissue cultures were evaluated and manipulated for secondary metabolite production. Plant culture was being a model for complete kratom alkaloid production. The elicited kratom with sodium nitroprusside (SNP) as nitric oxide donor, could stimulate the secologanin production. This result suggested that NO was play an important role in mitragynine biosynthesis. Treatment with 1 mM nifedipine (a calcium channel blocker) together with 1 mM SNP blocked secologanin formation to 2.42±0.44 mg/g dry weight. This result indicated that calcium channel involved in the mitragynine biosynthesis and related to NO response in *M. speciosa* plant culture. Following the mRNA expressions of genes involved in mitragynine biosynthesis revealed that the mRNA levels were increased after treatment with 1 mM SNP for 48 h and reduced when CPTIO or nifedipine was added. Treatment with different wavelength of lights found that blue light enhance growth and kratom alkaloid production while red light stimulated kratom alkaloid production but reduced the growth. In vitro plant was used for inducing the callus culture. Callus culture was obtained from stem and on WPM supplemented with 2,4-D. After several passage, homogenous and friable cells were obtained. Nevertheless, medium manipulation by Plackett-Burman design could not make callus cells to produce mitragynine, albeit phenolic compounds. Changing auxin to NAA and combine with either BA and TDZ was investigated. Callus culture maintained in WPM plus 1 mg/L NAA and 1 mg/L TDZ could survive. Green callus culture was obtained but still no alkaloid was produced. Attempts to use methyl jasmonate and yeast extract as elicitors could only enhance ursolic acid (triterpenoid). We tried to treat the callus culture with yeast extract for 3 days, revealed the production of mitragynine after detection with high-resolution LC-MS/MS, albeit very tiny amount. Shoot culture was established and maintained on WPM plus 2 mg/L TDZ and 1 mg/L BA. Response surface methodology and central composite design suggested the optimal concentration of plant-growth regulator like compounds such as jasmonic acid, abscisic acid and salicylic acid that increased mitragynine production in shoot culture. Point-to-point design also found that chitosan also stimulate mitragynine production. This study illustrated that the differentiate and non-differentiate cell cultures inform us the suitable cultures for mitragynine production. The results obtained from this study would give more insights of an alternative source of mitragynine, molecular regulation in mitragynine biosynthesis.

Keywords: *Mitragyna speciosa*, mitragynine, strictosidine beta-glucosidase, plant tissue cultures, Kratom