

Pengklonan dan Pencirian Klon CUKMCS yang Mengekodkan Kapsaisin sintase (Cs)

(Cloning and Characterisation of CUKMCS
Clone Encoding Capsaicin Synthase)

NURULHIKMA MD ISA, ISMANIZAN ISMAIL & ZAMRI ZAINAL*

ABSTRAK

Kapsaisinoid merupakan alkaloid yang memberikan ciri kepedasan pada cili serta khusus pada genus Capsicum. Sebatian kapsaisinoid terdiri daripada dua komponen utama iaitu kapsaisin dan dihidrokapsaisin. Dalam kajian ini, pengklonan cDNA Kapsaisin sintase (Cs) telah berjaya dilakukan menerusi kaedah transkripsi berbalik PCR (RT-PCR) dan klon cDNA tersebut dinamakan CUKMCS yang bersaiz 981 pb. Pencarian homologi menggunakan program blastx dan blastp yang terdapat pada pangkalan data NCBI mendapati CUKMCS mempunyai persamaan yang sangat tinggi terhadap Cs pada Capsicum frutescens, Capsicum annuum dan Capsicum chacoense. Saiz ramalan protein CUKMCS dianggarkan sekitar 36 kDa. Penentuan pengekspresan transkrip Cs pada 5 tisu yang berbeza mendapati transkrip dikesan pada tisu plasenta, mesokarp dan biji manakala tiada transkrip Cs dikesan pada daun dan akar.

Kata kunci: Kapsaisin sintase Cs; capsicum frutescens; kapsaisinoid; transkrip mRNA; Capsicum RT-PCR

ABSTRACT

Capsaicinoid, the main alkaloid compound that gives pungent taste to peppers is restricted to the genus of Capsicum. It consists of two major components which are capsaicin and dihydrocapsaicin. Here we reported the isolation of capsaicin synthase (Cs) cDNA via RT-PCR method and the resulting cloned was named as CUKMCS with the expected size of 981 bp. Homology search via the blastx and blastp program from the NCBI database showed that CUKMCS has a high homology to the Cs in Capsicum frutescens, Capsicum annuum and Capsicum chacoense. The predicted size of CUKMCS protein is around 36 kDa. Transcripts expression in 5 different tissues revealed that Cs transcripts were detected in the placental tissue, mesocarp and seed while no corresponding expression was detected in the leaf and root.

Keywords: Capsaicin synthase Cs; capsaicinoid; mRNA transcript; Capsicum frutescens

PENGENALAN

Cili (*Capsicum* sp.) merupakan antara tanaman yang mempunyai nilai ekonomi yang tinggi disebabkan kandungan kepedasan serta pigmen karotenoidnya. Ciri kepedasan ini adalah disebabkan oleh penghasilan sebatian kapsaisinoid yang terdiri daripada dua komponen utama iaitu kapsaisin dan dihidrokapsaisin. Komponen kapsaisin didapati berbeza pada setiap spesies dan varieti. Jumlah pengumpulan sebatian ini adalah dipengaruhi oleh keadaan persekitaran (Claver et al. 2006; Estrada et al. 1999; Sung et al. 2004).

Selain daripada memberikan ciri kepedasan, sebatian kapsaisin mempunyai potensi yang tinggi dalam bidang perubatan dan farmaseutikal sebagai agen anti-kanser, anti-arthritis dan analgesik di samping turut mempunyai nilai komersil dalam industri makanan sebagai perisa dan sos (Mori et al. 2006; Ramachandra & Ravishankar 2002; Satyanarayana 2006; Vanisree et al. 2004). Pendedahan kepada sebatian kapsaisinoid ini boleh mencetus kepada tindakbalas fisiologi yang mana antaranya menyebabkan alahan pada kulit dan gangguan penglihatan sementara (Hyder 1996). Keadaan ini telah dieksploitasikan sebagai

agen pertahanan diri dalam bentuk semburan (Christopher et al. 2003).

Secara teorinya, sebatian kapsaisinoid ini mula dihasilkan dan terkumpul dengan banyaknya selepas 20 hari anthesis berlaku serta seiring dengan perkembangan buah tersebut. Lokasi di mana proses sintesis serta pengumpulan sebatian ini berlaku adalah dikatakan pada bahagian sel epidermal plasenta (Aluru et al. 2003; Curry et al. 1999; Stewart et al. 2005). Selain daripada itu, sintesis serta pengumpulan kapsaisinoid ini juga telah dikaji terdapat pada bahagian vakuol (Suzuki et al. 1980). Namun begitu, kajian lepas mendapati bahawa sebatian ini terdapat pada bahagian plasenta di mana ianya telah dirembeskan ke dalam sel pada bahagian 'receptacle' iaitu di antara lapisan kutikel serta lapisan epidermal plasenta. Ini juga menyebabkan bahagian 'receptacle' yang terdapat pada plasenta cili yang mempunyai tahap kepedasan yang tinggi kelihatan berwarna kuning cair ke warna oren (Curry et al. 1999).

Menerusi model tapak jalan biosintesis kapsaisinoid yang telah dikenalpasti, didapati bahawa sebatian yang terhasil di akhir tapak jalan ini telah disintesis melalui tindak balas kondensasi di antara dua substrat

daripada dua tapak jalan yang berbeza iaitu tapak jalan phenylpropanoid dan asid lemak. Bagi memangkinkan tindak balas kondensasi di antara dua substrat ini iaitu vanillilamina dan asid 8-metil-6-nonenoid, satu enzim yang dikenalpasti sebagai Kapsaisin sintase telah dikatakan berperanan dalam memangkinkan tindak balas tersebut dan cDNA yang mengkodkan Kapsaisin sintase (no. akses DQ349224) telah diklonkan oleh Prasad et al. (2006), daripada *Capsicum frutescens*.

Berdasarkan kepada maklumat mengenai jujukan cDNA capsaicin synthase yang diperolehi dari pangkalan data NCBI, sepasang primer telah direkabentuk bagi mengklonkan cDNA capsaicin synthase daripada spesies *Capsicum frutescens*. Analisis jujukan DNA juga telah dilakukan ke atas klon cDNA CUKMCS menggunakan beberapa perisian bioinformatik. Pencirian transkrip Kapsaisin sintase pula dilakukan melalui kaedah RT-PCR pada lima tisu yang berbeza iaitu daun, plasenta, biji, mesokarp dan akar. Maklumat yang diperolehi daripada kajian ini dapat digunakan bagi memahami pengaturan penghasilan sebatian kapsaisin dan seterusnya dapat digunakan dalam manipulasi tapak jalan tersebut melalui transformasi genetik bagi menghasilkan cili yang mempunyai tahap kepedasan yang berbeza.

BAHAN DAN KAEDAH

SUMBER CILI

Capsicum frutescens diperolehi daripada Sungai Lui Hulu Langat Selangor. Buah cili yang matang dipetik dari ladang dan dibersihkan dengan air paip yang mengalir. Buah cili dibelah dua dan bahagian plasentanya diambil dan dimasukkan ke dalam cecair nitrogen. Selepas itu sampel disimpan di dalam peti sejukbeku -80°C sehingga diperlukan.

PEMENCILAN RNA DARIPADA TISU PLASENTA CILI SERTA TINDAK BALAS RT-PCR

Tisu plasenta telah dihancurkan sehingga menjadi serbuk dengan menggunakan nitrogen cecair. Kesemua alat radas yang digunakan telah direndam di dalam air rawatan DEPC (0.1%) sebelum diautoklaf untuk mengelakkan kontaminasi RNase. Pemencilan RNA daripada plasenta buah cili *Capsicum frutescens* telah dilakukan dengan menggunakan kit RNeasy daripada QIAGEN. Tindak balas sintesis bebenang pertama cDNA dilakukan dengan menggunakan kit cloned AMV-RT daripada Invitrogen. Tindak balas berantai polimerase telah dilakukan dengan menggunakan pencetus kehadapan dan kebelakang yang direka mengikut Prasad et al. (2006). Pencetus degenerat kehadapan telah direka berdasarkan kepada terminal N jujukan asid amino MIFILTVN 5'-ATGATHTTYATHYT-3' dan pencetus kebelakang telah direka berdasarkan kepada acyl-transferase putatif klon SB2-66 daripada *Capsicum* 5'-TTGACCGTAAACTTCCGTTG-3'.

PENGLONAN CDNA CUKMCS YANG MENKODKAN KAPSAISIN SINTASE

Tindak balas ligasi hasil amplifikasi PCR telah dilakukan ke dalam vektor pGEM@-T Easy. Analisis klon rekombinan yang dijangka membawa selitan cDNA Kapsaisin sintase, telah dilakukan melalui pencernaan plasmid rekombinan dengan enzim penyekat *NotI* dan telah dihantar untuk penjujukan ke Research Biolabs Singapore.

ANALISIS BIOINFORMATIK KE ATAS JUJUKAN CUKMCS

Pencarian persamaan telah dilakukan dengan menggunakan program blastx dan blastp pada pangkalan data NCBI beralamat (www.ncbi.com.my). Pencarian topologi klon cDNA CUKMCS telah dilakukan dengan menggunakan beberapa program seperti TMHMM, SMART, InterProScan, HMMTOP dan TopPred (Kyte Doolittle/ Golman Endgement Steiz). Pensejajaran jujukan berganda telah dilakukan dengan menggunakan program T-Coffee pada pangkalan data EMBL-EBI. Pencarian motif pula dilakukan dengan menggunakan perisian InterPro, SMART dan pfam.

ANALISIS PEMBLOTAN SOUTHERN

Pemencilan DNA genom *Capsicum frutescens* telah dilakukan seperti kaedah Doyle & Doyle. DNA genom telah dicernakan dengan menggunakan enzim penyekat *XhoI* dan pindahkan ke atas membran hybond-N (Amersham). Pengesanan bilangan salinan gen Cs terhadap genom cili telah dilakukan dengan menggunakan kit DIG Roche.

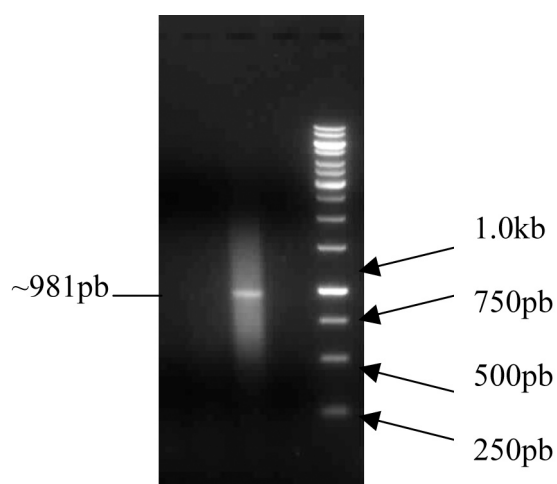
CORAK PENGEKSPRESAN CS DI DALAM 5 TISU YANG BERBEZA PADA *CAPSICUM FRUTESCENS*

Pemencilan RNA daripada tisu plasenta, biji, mesokarp, daun serta akar telah dilakukan dengan menggunakan kit pemencilan RNA (Qiagen). Tindak balas sintesis bebenang cDNA pertama serta tindak balas berantai polimerase telah dilakukan dengan menggunakan kit cloned AMV-RT Invitrogen. Tindak balas berantai polimerase telah dilakukan dengan menggunakan pencetus khusus ke atas gen Cs iaitu pencetus ke hadapan 5'-ATGATHTTYATHYT-3' dan pencetus kebelakang 5'-TTGACCGTAAACTTCCGTTG-3'. Hasil yang telah diperolehi telah dianalisis melalui elektroforesis gel agaros 1.0%.

HASIL

PENGLONAN CDNA DAN ANALISIS BIOINFORMATIK JUJUKAN CUKMCS YANG MENKODKAN KAPSAISIN SINTASE

Pengklonan cDNA CUKMCS telah dilakukan melalui kaedah RT-PCR (Rajah 1). Melalui RT-PCR satu jalur tunggal yang bersaiz 981 pb telah berjaya diampifikasikan menggunakan pencetus yang direkabentuk berdasarkan kajian yang dilakukan oleh Prasad et al. (2006). Produk



RAJAH 1. Elektroforesis gel agaros 1.0% menunjukkan hasil tindak balas transkripsi berbalik PCR dengan satu jalur terang bersaiz lebih kurang 981pb. M merupakan penanda tetangga 1 kb (fermentas)

PCR bersaiz dalam lingkungan 981pb telah diklonkan ke dalam vektor pGEM-T Easy dan dihantar ke Research Biolabs Singapore untuk penjujukan. Anotasi jujukan secara Blastx mendapati jujukan mempunyai persamaan yang tinggi dengan jujukan Kapsaisin sintase bagi tiga jenis spesies *Capsicum* iaitu *Capsicum frutescens*, *Capsicum chacoense* dan *Capsicum annuum*. Klon ini telah dinamakan sebagai CUKMCS (no. aksesori FJ517664) yang mengkodkan Kapsaisin sintase (Cs). Hasil daripada analisis menggunakan perisian ProtParam meramalkan saiz protein CUKMCS adalah sekitar 36 kDa manakala nilai anggaran bagi pI adalah 8.02. Melalui algoritma bagi model neural network (NN) dan hidden markov model (HMM) yang terdapat dalam perisian SignalP didapati bahawa CUKMCS tidak mempunyai tapak pemotongan peptida isyarat (SignalP) (Bendtsen et al. 2004). Walau bagaimanapun, terdapat lebih kurang 20 anggaran ikatan dwisulfida yang terhasil daripada asid amino cysteine melalui perisian PredictProtein (Cerroni et al. 2006). Analisis topologi CUKMCS menerusi TMHMM, HMMTOP, TopPred, InterProScan dan SMART menunjukkan bahawa terdapat satu transmembran heliks diramalkan pada jujukan asid amino ke 57 hingga 79 iaitu GTCRCLSCFLLIFLTIVFPAKF (Rajah 2). Manakala menerusi program InterPro dan ScanProsite, didapati bahawa terdapat satu motif pada jujukan 402-410 (CAAAGCTTC) CUKMCS yang mana merupakan '2Fe-2S ferredoxin-type iron-sulfur binding region' (Rajah 2).

Pensejajaran jujukan berganda CUKMS dengan menggunakan perisian T-Coffee daripada EMBL-EBI terhadap jujukan gen bagi ketiga-tiga spesies *Capsicum* ini termasuk jujukan genom Cs pada *C. frutescens* telah menunjukkan persamaan yang sangat tinggi serta jujukan asid aminonya adalah sangat terpelihara (Rajah 2)

ANALISIS PEMBLOTAN SOUTHERN SERTA CORAK PENGEKSPRESAN CUKMCS PADA 5 TISU YANG BERBEZA PADA *CAPSICUM FRUTESCENS*

Bagi penentuan bilangan salinan Cs yang wujud dalam genom cili, analisis pemblotan southern terhadap DNA genom cili yang telah dicernakan dengan enzim penyekat *XhoI* dilakukan. Hasil menunjukkan terdapat satu sahaja bilangan salinan gen Cs di dalam genom (Rajah 3). Ini berkemungkinan gen Cs ini hadir dalam salinan tunggal atau bersalinan rendah didalam genomnya. Penentuan corak pengeksprekan gen Cs dicerap melalui tindak balas RT-PCR terhadap lima tisu yang berbeza. Hasil mendapati bahawa transkrip Cs bukan sahaja dikesan di dalam tisu plasenta, tetapi turut dapat dikesan di dalam tisu mesokarp serta biji dengan kehadiran jalur bersaiz 981 pb hasil daripada tindak balas RT-PCR yang mana merupakan saiz bagi cDNA Cs. Namun begitu pada tisu daun dan akar, kehadiran transkrip tidak dikesan (Rajah 4a & b). Ini dapat membuktikan bahawa penghasilan sebatian kapsaisinoid hanya berlaku pada organ buah cili sahaja dan tidak pada organ yang lain.

PERBINCANGAN

Tumbuhan merupakan sumber utama kepada produk semulajadi bagi kegunaan farmaseutikal, agrokimia, perasa, bahan pewangi, bahan tambahan dalam makanan serta racun serangga perosak. Kebanyakan bahan fitokimia ini hadir pada tumbuhan dalam bentuk metabolik sekunder bagi tumbuhan tersebut (Leena & Jaindra 2003; Vanisree et al. 2003). Kapsaisinoid merupakan salah satu daripada bahan metabolik sekunder tumbuhan yang spesifik kepada buah cili dan bertanggungjawab dalam memberikan rasa pedas pada cili. Sebatian molekul bioaktif ini mempunyai potensi yang tinggi dalam bidang perubatan dan farmaseutikal sebagai agen anti-kanser, anti-arthritis dan analgesik manakala dalam industri makanan kapsaisin penting sebagai bahan perasa dalam makanan sama ada dalam bentuk kering, serbuk atau cecair seperti sos.

Pemahaman mengenai gen-gen yang terlibat dalam tapak jalan biosintesis kapsaisinoid telah banyak dikaji namun begitu, hanya baru-baru ini gen yang penting dalam memangkinkan tindak balas kondensasi di antara vanilillamina dan asid 8-metil-6- nonenoik telah pun ditemui jujukannya oleh Prasad et al. (2006). Dalam kajian ini, tindak balas RT-PCR telah berjaya mengamplifikasi cDNA Kapsaisin sintase dengan saiz 981pb dan klon tersebut telah dinamakan sebagai CUKMCS setelah didapati mempunyai kesepadanan yang tinggi dengan jujukan Cs pada pangkalan data NCBI juga mempunyai jujukan yang sangat terpelihara berdasarkan kepada analisis pensejajaran jujukan berganda.

Pencarian tapak pemotongan peptida isyarat (SignalP) telah dilakukan dengan menggunakan program SignalP dan mendapati bahawa tiada tapak pemotongan

Pensejajaran jujukan berganda

```

CUKMCS [C. frut]      MIFILTVNFRWRYLILLICKSLMLLEISCPVKYPERFLGVCDTLIFRQTCLQEIFRGTCR
DNA [DQ349226]       MIFILTVNFRWRYLILLICKSLMLLEISCPVKYPERFLGVCDTLIFRQTCLQEIFRGTCR
cDNA [DQ349224]      MIFILTVNFRWRYLILLICKSLMLLEISCPVKYPERFLGVCDTLIFRQTCLQEIFRGTCR
cDNA [DQ349227]      MIFILTVNFRWRYLILLICKSLMLLEISCPVKYPERFLGVCDTLIFRQTCLQEIFRGTCR
cDNA [DQ349223]      MIFILTVNFRWRYLILLICKSLMLLEISCPVKYPERFLGVCDTLIFRQTCLQEIFRGTCR
*****

CUKMCS [C. frut]      ICLSCFLLIFLTIVFPAKFRRLVGFSSFSTFGSRIMTWLELCLRQLLTVRRWFIECLRK
DNA [DQ349226]       ICLSCFLLIFLTIVFPAKFRRLVGFSSFSTFGSRIMTWLELCLRQLLTVRRWFIECLRK
cDNA [DQ349224]      ICLSCFLLIFLTIVFPAKFRRLVGFSSFSTFGSRIMTWLELCLRQLLTVRRWFIECLRK
cDNA [DQ349227]      ICLSCFLLIFLTIVFPAKFRRLVGFSSFSTFGSRIMTWLELCLRQLLTVRRWFIECLRK
cDNA [DQ349223]      ICLSCFLLIFLTIVFPAKFRRLVGFSSFSTFGSRIMTWLELCLRQLLTVRRWFIECLRK
*****

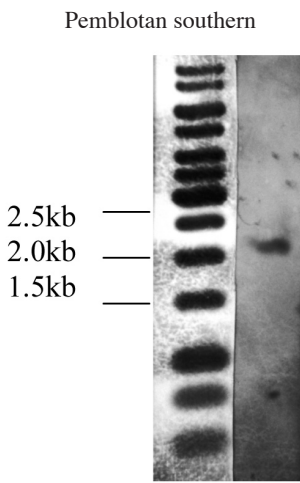
CUKMCS [C. frut]      CYSRCYSSGNCCFTKASGDIFITYYSVWFFASFIVLQCFDLSSFPWDCSVGFQWVYGYCQ
DNA [DQ349226]       CYSRCYSSGNCCFTKASGDIFITYYSVWFFASFIVLQCFDLSSFPWDCSVGFQWVYGYCQ
cDNA [DQ349224]      CYSRCYSSGNCCFTKASGDIFITYYSVWFFASFIVLQCFDLSSFPWDCSVGFQWVYGYCQ
cDNA [DQ349227]      CYSRCYSSGNCCFTKASGDIFITYYSVWFFASFIVLQCFDLSSFPWDCSVGFQWVYGYCQ
cDNA [DQ349223]      CYSRCYSSGNCCFTKASGDIFITYYSVWFFASFIVLQCFDLSSFPWDCSVGFQWVYGYCQ
*****

CUKMCS [C. frut]      ARVSKMFYFLANFGSSTQPNTWCVSFDFDEQFCIDVVGRIEFLWENPKCHWELVEIGV
DNA [DQ349226]       ARVSKMFYFLANFGSSTQPNTWCVSFDFDEQFCIDVVGRIEFLWENPKCHWELVEIGV
cDNA [DQ349224]      ARVSKMFYFLANFGSSTQPNTWCVSFDFDEQFCIDVVGRIEFLWENPKCHWELVEIGV
cDNA [DQ349227]      ARVSKMFYFLANFGSSTQPNTWCVSFDFDEQFCIDVVGRIEFLWENPKCHWELVEIGV
cDNA [DQ349223]      ARVSKMFYFLANFGSSTQPNTWCVSFDFDEQFCIDVVGRIEFLWENPKCHWELVEIGV
*****

CUKMCS [C. frut]      TENGKQFIDRWSPVFDYELVQLEGSCSIRENEGENSNVFRLSQKLEDIITGKKSVEGFH
DNA [DQ349226]       TENGKQFIDRWSPVFDYELVQLEGSCSIRENEGENSNVFRLSQKLEDIITGKKSVEGFH
cDNA [DQ349224]      TENGKQFIDRWSPVFDYELVQLEGSCSIRENEGENSNVFRLSQKLEDIITGKKSVEGFH
cDNA [DQ349227]      TENGKQFIDRWSPVFDYELVQLEGSCSIRENEGENSNVFRLSQKLEDIITGKKSVEGFH
cDNA [DQ349223]      TENGKQFIDRWSPVFDYELVQLEGSCSIRENEGENSNVFRLSQKLEDIITGKKSVEGFH
*****

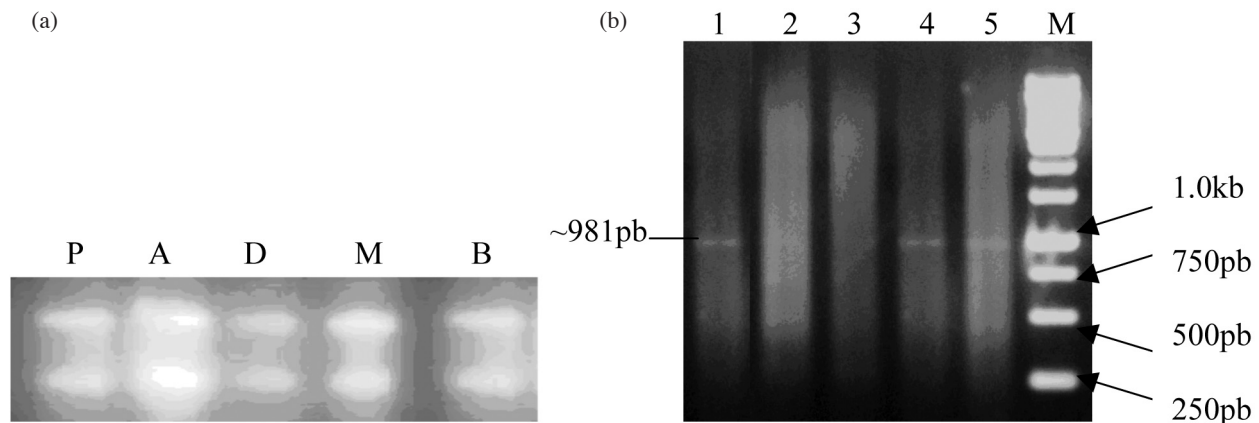
CUKMCS [C. frut]      SFAFVKFD
DNA [DQ349226]       SFAFVKFD
cDNA [DQ349224]      SFAFVKFD
cDNA [DQ349227]      SFAFVKFD
cDNA [DQ349223]      SFAFVKFD
*****
    
```

RAJAH 2. Hasil pensejajaran jujukan berganda dengan menggunakan program T-COFFEE pada pengkalan data EMBL-EBI menunjukkan kesemua asid amino yang terdapat pada kelima-lima jujukan adalah sangat terpelihara dan mempunyai persamaan yang sangat tinggi. Kawasan yang berkotak merupakan transmembran heliks (TMHMM 57-79) manakala jujukan yang digelapkan merupakan jujukan motif '2Fe-2S ferredoxin-type iron-sulfur binding region' (InterPro dan ScanProsite). Jujukan pertama adalah merupakan jujukan cDNA CUKMCS, (2) DQ349226 genom Cs (*Capsicum frutescens*), (3) DQ349224 cDNA (*Capsicum frutescens*), (4) DQ349227 cDNA (*Capsicum chacoense*), (5) DQ349223 cDNA (*Capsicum annum*)



RAJAH 3. Analisis pemblotan southern terhadap hasil pencernaan genomik *Capsicum frutescens* dengan menggunakan enzim penyekat XhoI menunjukkan hanya terdapat satu sahaja bilangan salinan gen ini di dalam genom

peptida isyarat diramalkan pada jujukan CSUKM secara bioinformatik dan ini meramalkan bahawa protein Cs tidak diangkut kepada mana-mana bahagian sasaran pada sel. Setakat ini, hanya kajian 'immunolocalization' sahaja yang telah dilakukan terhadap protein ini dan mengikut hasil kajian Prasad et al. (2006), mendapati bahawa protein Cs terdapat pada bahagian peripheral plasenta, namun begitu kajian lokasi pengekspresan protein ini di peringkat sel masih tiada. Analisis topologi terhadap transmembran heliks pada jujukan protein Cs menunjukkan kehadiran satu kawasan transmembran yang nyata iaitu pada jujukan ke 57-79. Ramalan jujukan transmembran penting dalam memberikan pelbagai andaian mengenai fungsi dan isyarat pengangkutan yang mana berkait rapat dengan struktur transmembran tersebut. Pemahaman mengenai isyarat peptida (SignalP) dan kawasan transmembran penting kerana kedua-duanya memberikan maklumat kepada kawasan pengangkutan protein. Manakala modifikasi pada bahagian tersebut

Corak pengekspresan Cs di dalam 5 tisu yang berbeza pada *Capsicum frutescens*

RAJAH 4. (a) Elektroforesis gel agaros 1.0% menunjukkan hasil pemencilan RNA jumlah daripada 5 tisu berbeza (P-plasenta, A-akar, D-daun, M- mesokarp dan B- biji) . RAJAH 5 (b) Elektroforesis gel agaros 1.0% menunjukkan kehadiran transkrip Cs selepas tindak balas RT-PCR dengan menggunakan pencetus yang telah direka spesifik terhadap jujukan Cs. Telaga 1, tisu plasenta, telaga 2; akar, telaga 3; daun, telaga 4; mesokarp dan telaga 5 merupakan biji. M merupakan penanda tetangga 1 Kb (Fermentas)

boleh menyebabkan fungsi serta kawasan pengangkutan destinasi protein turut terganggu dan terubahsuai (Cline et al. 2004).

Dalam usaha memahami tapak jalan biosintesis capsaicinoid ini, banyak kajian lepas telah dilakukan khusus melihat pengawalan gen-gen yang terlibat di hulu tapak jalan seperti *Kas*, *Acl*, *Fat*, *Pal*, *Ca4H*, *Comt* dan *pAmt* (Aluru et al. 2003; Curry et al. 1999). Kajian ke atas penyenyapan gen *Comt*, *pAmt* dan *Kas* telah dilakukan dengan menggunakan teknik VIGS dan terbukti menunjukkan bahawa penyenyapan gen tersebut memberi kesan kepada pengurangan terhadap pengumpulan sebatian kapsaisinoid pada buah cili (Abraham-Juarez et al. 2008). Dalam kajian ini, corak pengekspresan Cs telah dilihat pada lima tisu berbeza di mana hasil mendapati bahawa pengekspresan transkrip Cs telah dikesan pada tisu plasenta, biji dan mesokarp melalui hasil RT-PCR manakala pada tisu daun dan akar tiada pengekspresan Cs dapat dikesan. Analisis pembloatan southern pula menunjukkan bahawa gen Cs hanya mempunyai satu bilangan salinan gen dalam genom cili.

KESIMPULAN

Dalam kajian ini, pengklonan cDNA CUKMCS ke dalam vektor pGEM-T Easy telah berjaya dilakukan melalui kaedah transkripsi berbalik PCR (RT-PCR). Analisis bioinformatik ke atas jujukan CUKMCS telah dilakukan dengan menggunakan beberapa program bagi melihat kesepadanan jujukan serta ramalan kehadiran motif, transmembran heliks serta peptida isyarat. Bilangan salinan gen di dalam genom telah ditentukan melalui kaedah pembloatan Southern serta analisis corak pengekspresan Cs di dalam lima tisu cili yang berbeza berjaya memberikan hasil yang signifikan seperti sebelum ini.

PENGHARGAAN

Penyelidikan ini dibiayai oleh geran ScienFund 02-01-02-SF0146 MOSTI yang dianugerahkan kepada Dr. Zamri Zainal.

RUJUKAN

- Abraham-Juarez, M.D.R., Rocha-Granados, M.D.C., Lopez, M.G., Rivera-Bustamante, R.F. & Ochoa-Alejo, N. 2008. Virus-induced silencing of *Comt*, *pAmt* and *Kas* genes results in a reduction of capsaicinoid accumulation in chilli pepper fruits. *Planta* 227: 681-695.
- Aluru, M.R., Mazourek, M., Landry, L.G., Curry, J., Jahn, M. & O'connell, M.A. 2003. Differential expression of fatty acid synthase genes, *Acl*, *Fat* and *Kas*, in *Capsicum* fruit. *Journal of Experimental Botany* 54 (388): 1655-1664.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., Heijne, G.V. & Brunak, S. 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* 340: 783-795.
- Cerroni, A., Passerini, A., Vullo, A. & Frascioni, P. 2006. DISULFIND: a Disulfide Bonding State and Cysteine Connectivity Prediction Server, *Nucleic Acids Research*, 34(Web Server issue):W177-W181.
- Christopher, A.R. Dennis, J.C. Garold, S.Y. Alim, A.F. 2001. Determination of capsaicin, dihydrocapsaicin and nonivamide in self-defense weapons by liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr A.* 912: 259-267.
- Claver, A.G., Andres, M.S.A., Abadia, J., Ortega, R.G. & Fernandez, A.A. 2006. Determination of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum* fruits by liquid chromatography-electrospray/time-of-flight mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 54: 9303-9311.
- Cline, M.S., Shigeta, R., Wheeler, R.L., Siani-Rose, M.A., Kulp, D. & Loraine, A.E. 2004. The Effects of Alternative Splicing on Transmembrane Proteins in the Mouse Genome. *Pacific Symposium on Biocomputing* 9: 17-28.

- Curry, J., Aluru, M., Mendoza, M., Nevarez, J., Melendrez, M. & O'connell, M.A. 1999. Transcripts for possible capsaicinoid biosynthetic genes are differentially accumulated in pungent and non-pungent *Capsicum* spp. *Plant Science* 148: 47-57.
- Estrada, B., Pomar, F. Díaz, J. Merino, F. & Bernal, M.A. 1999. Pungency levels in fruits of the Padron pepper with different water supply. *Sci. Hort.* 81: 385-396.
- Hyder, K. 1996. Is CS the wrong solution? *New Sci.* 149: 12-13.
- Leena, T. & Jaindra, N.T. 2003. Role of biotechnology in medicinal plants. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 2(2): 243-253.
- Mori, A., Lehmann, S., O'Kelly, J., Kumagai, T., Desmond, J.C., Pervan, M., McBride, W.H., Kizaki, M. & Koeffler, H.P. 2006. Capsaicin, a component of red peppers, inhibits the growth of Androgen-independent, p53 mutant prostate cancer cells. *Cancer Res.* 66(6): 3222-3229.
- Prasad, B.C.N., Kumar, V., Gururaj, H.B., Parimalan, R., Giridhar, P. & Ravishankar, G.A. 2006. Characterization of capsaicin synthase and identification of its gene (*csy1*) for pungency factor capsaicin in pepper (*Capsicum* sp.). *Proceedings of the National Academy of Science* 103: 13315-13320.
- Ramachandra Rao, S. & G.A. Ravishankar. 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* 20: 101-153.
- Satyanarayana, M. 2006. Capsaicin and Gastric Ulcers. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46(4): 275-328.
- Stewart Jr, C., Kang, B.C., Liu, K., Mazourek, M., Moore, S.L., Yoo, E.Y., Kim, B.D., Paran, I. & Jahn, M.M. 2005. The *Pun1* gene for pungency in pepper encodes a putative acyltransferase. *The Plant Journal* 42: 675-688.
- Sung, Y., Chang, Y.Y. & Ting, N-L. 2005. Capsaicin biosynthesis in water-stressed hot pepper fruits. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 46: 35-42.
- Suzuki, T., Kawada, T. & Iwai, K. 1980. Effective separation of capsaicin and its analogues by reverse-phase high performance thin layer chromatography. *J. Chromatogr.* 198: 217-223.
- Vanisree, M., Chen-Yue, L., Shu-Fung, L., Nalawade, S.M., Lin, C.Y. & Hsin-Sheng, T. 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45: 1-22.

Nurulhikma Md. Isa
 Institut Biologi Sistem
 Universiti Kebangsaan Malaysia
 43650, UKM Bangi, Selangor D.E.
 Malaysia

Ismanizan Ismail & Zamri Zainal*
 Pusat Pengajian Biosains dan Bioteknologi
 Fakulti Sains dan Teknologi
 Universiti Kebangsaan Malaysia
 43650, UKM Bangi, Selangor D.E.
 Malaysia

*Pengarang untuk surat-menyurat; email: zz@ukm.my

Diserahkan: 3 Februari 2009
 Diterima: 21 April 2009