การสร้างผักบุ้ง *Ipomoea aquatica* ดัดแปลงพันธุ์ที่มียีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตส จาก *Arabidopsis thaliana*

นายนิรุตติ์ สกุลคู

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-0950-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONSTRUCTION OF A TRANSGENIC PAKBUNG *Ipomoea aquatica* HARBOURING APS REDUCTASE GENE FROM *Arabidopsis thaliana*

Mr. Nirut Sakulkoo

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology

Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University

Academic Year 2002

ISBN 974-17-0950-1

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การสร้างผักบุ้ง *Ipomoea aquatica* ดัดแปลงพันธุ์ที่มียีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสจาก *Arabidopsis thaliana*

โดย นายนิรุตติ์ สกุลคู

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา อัครจรัลญา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา อัครจรัลญา)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภจิตรา ชัชวาลย์)

.....กรรมการ

(อาจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นิรุตติ์ สกุลคู : การสร้างผักบุ้ง *Ipomoea aquatica* ดัดแปลงพันธุ์ที่มียีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสจาก *Arabidopsis thaliana* (CONSTRUCTION OF A TRANSGENIC PAKBUNG *Ipomoea aquatica* HARBOURING APS REDUCTASE GENE FROM *Arabidopsis thaliana*) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.อัญชริดา อัครจรัลญา, 79 หน้า, ISBN 974-17-0950-1

ถ่ายโอนยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสของ *Arabidopsis thaliana* (ยีน*APR1*) ไอโซฟอร์มที่พบในพลาสติดของ *Arabidopsis thaliana* เข้าสู่ผักบุ้งโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 ที่มีพลาสมิด pBIH1/APR1 ได้ต้นอ่อนผักบุ้ง 267 ต้น จาก cotyledon segment จำนวน 2,119 ชิ้น เพียง 8 ต้นสามารถทนต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเพียง 2 ต้นที่ให้ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCR ซึ่งแสดงว่ามียีน *APR1* ตรวจพบโปรโมเตอร์ชนิด CaMV 35s ถ่ายโอนร่วมไปกับยีน *APR1* โดยวิธี PCR การตรวจสอบโดยวิธี Southern hybridization ดีเอ็นเอของผักบุ้งทั้งสองพันธุ์ให้สัญญาณไฮบริไดเซชั่นกับดีเอ็นเอติดตาม (ดีเอ็นเอ APR1) เป็นการยืนยันว่าผักบุ้งทั้งสองพันธุ์มียีน *APR1* จาก *Arabidopsis thaliana* จริง เรียกผักบุ้งทั้งสองพันธุ์นี้ว่าผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2 และหมายเลข 8 กิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสของผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์พันธุ์หมายเลข 2 และหมายเลข 8 สูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม 4.95 และ 3.63 เท่าในราก 2.96 และ 2.77 เท่าในลำต้น และ 1.26 และ 1.69 เท่าในใบตามลำดับ ปริมาณกรดอะมิโนซีสเตอีนและกลูตาไธโอนของผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์พันธุ์หมายเลข 2 และหมายเลข 8 ในราก และลำต้นสูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม โดยกรดอะมิโนซีสเตอีนและกลูตาไธโอนที่เพิ่มขึ้นนี้ เพิ่มที่รากมากกว่าที่ลำต้น ผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์พันธุ์หมายเลข 2 มีกรดอะมิโนซีสเตอีนและกลูตาไธโอนสูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม 30.44 และ 1,048.67 เท่าตามลำดับ ลักษณะของผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์ทั้งสองพันธุ์นี้ไม่แตกต่างจากผักบุ้งพันธุ์เดิม เมื่อเจริญในสภาวะที่มีซัลเฟตความเข้มข้นสูง

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....นิรุตติ์ สกุลคู.....

สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา...2545..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4272325123 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: APS REDUCTASE / *Ipomoea aquatica* / *Arabidopsis thaliana*

NIRUT SAKULKOO : THESIS TITLE. (CONSTRUCTION OF A TRANSGENIC PAKBUNG *Ipomoea aquatica* HARBOURING APS REDUCTASE GENE FROM *Arabidopsis thaliana*) THESIS ADVISOR : ASST.PROF.ANCHARIDA AKARACHARANYA, 79 PP. ISBN 974-17-0950-1

Arabidopsis thaliana APS reductase gene (*APR1*) encoding plastid isoform was transformed into Pakbung (*Ipomoea aquatica*) using *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 harbouring plasmid pBIH1/APR1. Two hundred sixty seven regenerated shoots were obtained from 2,119 cotyledon segments and 8 shoots were tolerated to 25 mg/L hygromycin. Only 2 shoots (No. 2 and No. 8) gave expected PCR band when using oligonucleotide primers for amplifying *APR1*. By PCR analysis, CaMV 35s promotor was found to be transformed with *APR1*. Confirmation for the existance of *A. thaliana APR1* obtained by Southern hybridization, DNA extracted from both shoots, No. 2 and No. 8 gave positive signal with APR1 probe. APS reductase activity of transformant No. 2 and No. 8 was higher than those of wild type : 4.95 and 3.63 times in roots, 2.96 and 2.77 times in shoots, 1.26 and 1.69 times in leaves, respectively. Cysteine and glutathione content of transformant No. 2 and No. 8 in roots and shoots were higher than those of wild type. The increment of cysteine and glutathione contents was higher in roots than in shoots. Cysteine and glutathione content of transformant No. 2 was 30.44 and 1,048.67 times higher than those of wild type, respectively. No difference of phenotype between both transformants and wild type when grown in the presence of 1,000 mg SO_4^{2-}/L.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department.....Microbiology.....Student's signature.....

Field of study.....Microbiology for industrial.....Advisor's signature.....

Academic year..2002.....Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.อัญชริดา อัครจรัลญา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ให้คำแนะนำ คำปรึกษา ความช่วยเหลือ แนวคิด และข้อคิดเห็นต่างๆ ในการทำงานวิจัยตลอดมารวมทั้งตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ จนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ซึ่งกรุณาเป็นประธานกรรมการ ผศ.ดร. ศุภจิตรา ชัชวาลย์ และ อ.ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย ที่ให้การสนับสนุนทุนการวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณสุนันท์ รังษีกาญจน์ส่อง และคุณศิริชัย โฆษิตารัตน์ ที่ให้ความช่วยเหลือและความอนุเคราะห์ในการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือและความอนุเคราะห์ในการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ Dr. Tatsuo Nakamura และ Dr. Yube Yamaguchi ที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือต่างๆ

ท้ายที่สุดนี้ขอขอบคุณผู้วิจัยทุกคนในห้อง 405 และห้องอื่นๆ ที่ให้ความช่วยเหลือ และขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา พี่และน้อง ซึ่งเป็นกำลังใจ รวมถึงให้การสนับสนุนทุกสิ่งเสมอมาอย่างหาที่สุดมิได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ซ
สารบัญภาพ.....ฌ
บทที่
1. บทนำ.....1
2. วารสารปริทัศน์.....3
3. เครื่องมือ เคมีภัณฑ์และเชื้อจุลินทรีย์..... 14
4. วิธีการทดลอง..... 17
5. ผลการทดลอง..... 33
6. สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 50
รายการอ้างอิง..... 54
ภาคผนวก..... 59
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 79

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

5.1 กิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสในน้ำสกัดจากส่วนต่างๆ ของผักบุ้ง..... 44
5.2 ปริมาณกรดอะมิโนซีสเตอีนและกลูตาไธโอนในส่วนต่างๆ ของผักบุ้ง.....46
จ.1 การเจือจางดีเอ็นเอติดตาม.....74

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 วิถีการสังเคราะห์กรดอะมิโนซีสเตอีนจากซัลเฟตของพืชและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง.....3

4.1 การเตรียม cotyledon explant ของผักบุ้ง.....18

4.2 การทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินของผักบุ้งพันธุ์เดิม (wild type) ที่ความเข้มข้น 0 25 50 75 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร..... 21

5.1 ต้นใหม่ที่งอกจาก cotyledon explant ของผักบุ้ง..... 34

5.2 ต้นอ่อนผักบุ้งที่งอกจาก cotyledon explant เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MMS ที่มีสารละลายไธเดียซูรอนความเข้มข้นสุดท้าย 10 ไมโครโมลาร์ สารละลายเซฟโฟแทคซีมความเข้มข้นสุดท้าย 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 1 เดือน.....35

5.3 การตรวจหายีน *APR1* ในดีเอ็นเอที่สกัดจากผักบุ้งพันธุ์ที่สามารถทนต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินโดยวิธี PCR ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ prh1 และ prh2.....37

5.4 การตรวจหายีนส่วนโปรโมเตอร์ชนิด CaMV 35s บนดีเอ็นเอของผักบุ้งพันธุ์หมายเลข 2 และหมายเลข 8 โดยวิธี PCR ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ CaMV และ prh2.....39

5.5 a)

ก. ผลการตัดดีเอ็นเอที่สกัดจากผักบุ้งพันธุ์หมายเลข 2 ด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Xba*I ร่วมกับ *Xho*I.....41

ข. ผลการทำ Southern hybridization ที่มีดีเอ็นเอติดตามที่ได้จากกระบวนการ PCR เมื่อใช้พลาสมิด pBIH1/APR1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ prh1 และ prh2 41

5.5 b)

ก. ผลการตัดดีเอ็นเอที่สกัดจากผักบุ้งพันธุ์หมายเลข 8 ด้วยเรสทริกชั่นเอนไซม์ *Xba*I ร่วมกับ *Xho*I.....42

ข. ผลการทำ Southern hybridization ที่มีดีเอ็นเอติดตามที่ได้จากกระบวนการ PCR เมื่อใช้พลาสมิด pBIH1/APR1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ prh1 และ prh2 42

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

5.6 โครมาโตแกรมแสดงปริมาณ 5'-AMP ที่ได้จากการย่อยสลาย APS
โดยน้ำสกัดจากรากของผักบุ้ง.....45
5.7 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนซีสเตอีนและกลูตาไธโอนในรากของผักบุ้ง
โดยวิธี HPLC.....48
5.8 ลักษณะของผักบุ้งที่เจริญในภาวะที่มีกำมะถันซัลเฟตเริ่มต้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร.....49
ข.1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย BSA
และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร..... 68
ค.1 แผนที่เรสทริกชั่นของพลาสมิดพาหะ pBIH1-IG ขนาด 17 กิโลเบส แสดงตำแหน่ง
ยีน *gus* ยีนต้านสารปฏิชีวนะกานามัยซิน (ยีน *npt*II) ยีนต้านสารปฏิชีวนะ
ไฮโกรมัยซิน (ยีน *hpt*) และตำแหน่งจดจำของเรสทริกชั่นเอนไซม์.....70
ค.2 แผนที่เรสทริกชั่นของพลาสมิดพาหะ pBIH1-IG(SX).....70
ง.1 แสดงตำแหน่งโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ทั้ง 2 คู่ บนลำดับเบสของยีนประมวลรหัส
เอพีเอสรีดักเตส (ยีน *APR1*) ของ *A. thaliana*.....71
ง.2 แสดงบริเวณยีนส่วนโปรโมเตอร์ชนิด CaMV 35s ซึ่งเชื่อมต่อกับยีนประมวลรหัส
เอพีเอสรีดักเตส (*APR1*) โดยที่ยีน *APR1* สอดแทรกแทนที่ยีน *gus* บนพลาสมิด
พาหะ pBIH1-IG(SX).....72
ง.3 แสดงตำแหน่งโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ CaMV บนลำดับเบสของยีนโปรโมเตอร์
ชนิด Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) 35s.....73
ฉ.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานผสม
ระหว่างกรดอะมิโนซีสเตอีนและกลูตาไธโอน และพื้นที่ใต้กราฟ..... 77
ฉ.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน
อะดีโนซีน 5'-โมโนฟอสเฟต (5'-AMP) และพื้นที่ใต้กราฟ.....78