ภาวะเหมาะสมในการสร้างผักบุ้ง *Ipomoea aquatica* ดัดแปลงพันธุ์โดยวิธีการใช้ *Agrobacterium tumefaciens*

นางสาวกิตติมา คำหว่าน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-0922-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

OPIMAL CONDITIONS FOR THE CONSTRUCTION OF TRANSGENIC PAKBUNG

Ipomoea aquatica VIA *Agrobacterium tumefaciens*

Miss Kittima Khamwan

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 974-17-0922-6

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ภาวะเหมาะสมในการสร้างผักบุ้ง *Ipomoea aquatica* ดัดแปลงพันธุ์โดยวิธีการใช้ *Agrobacterium tumefaciens*
โดย	นางสาวกิตติมา คำหว่าน
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

กิตติมา คำหว่าน : ภาวะเหมาะสมในการสร้างผักบุ้ง *Ipomoea aquatica* ดัดแปลงพันธุ์โดยวิธีการใช้ *Agrobacterium tumefaciens*. (OPTIMAL CONDITIONS FOR THE CONSTRUCTION OF TRANSGENIC PAKBUNG *Ipomoea aquatica* VIA *Agrobacterium tumefaciens*.
อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.อัญชริดา อัครจรัลญา , 70 หน้า. ISBN 974-17-0922-6

ภาวะที่เหมาะสมในการสร้างผักบุ้ง *Ipomoea aquatica* ดัดแปลงพันธุ์โดยวิธีการใช้ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA101 ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX) ซึ่งมียีนประมวลรหัสบีตา-กลูคูโรนิเดสเป็นยีนรายงานผล ยีนต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินและยีนต้านต่อกานามัยซินเป็นยีนคัดเลือก เป็นดังนี้ ใช้เชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ EHA101 ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX) ซึ่งเจริญในระยะ late log phase (24 ชั่วโมง) ความเข้มข้นเซลล์ของ *A. tumefaciens* 9.0 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เติมอะซิโตไซริงโอนความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครโมลาร์ในขั้นตอน cocultivation และบ่มเชื้อ *A. tumefaciens* ร่วมกับ cotyledon explant ของผักบุ้งอายุ 7 วัน เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่ภาวะเหมาะสมประสิทธิภาพการถ่ายโอนยีนซึ่งตรวจสอบจากการแสดงออกของยีนประมวลรหัสบีตา-กลูคูโรนิเดสใน cotyledon explant หลังขั้นตอนการ cocultivation มีค่าเท่ากับ 75 เปอร์เซ็นต์ ต้นผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์มีการแสดงออกของยีนประมวลรหัสบีตา-กลูคูโรนิเดสที่ใบ ลำต้นและราก เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี histochemical GUS assay การตรวจสอบยืนยันการมีอยู่ของยีนประมวลรหัสบีตา-กลูคูโรนิเดส และยีนต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน โดยวิธี PCR พบว่ามียีนทั้งสองสอดแทรกในโครโมโซมของผักบุ้งพันธุ์ทรานสฟอร์แมนท์จริง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต กิตติมา คำหว่าน
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ปีการศึกษา 2545 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -

4272495123 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: *A. tumefaciens* / β-glucuronidase / *I. aquatica* / transformation

KITTIMA KHAMWAN : THESIS TITLE. (OPTIMAL CONDITIONS FOR THE CONSTRUCTION OF TRANSGENIC PAKBUNG *Ipomoea aquatica* VIA *Agrobacterium tumefaciens*)

THESIS ADVISOR : ASST.PROF. ANCHARIDA AKCHARACHARANYA, 70 pp.

ISBN 974-17-0922-6

Optimal conditions for the construction of transgenic Pakbung (*Ipomoea aquatica*) via *Agrobacterium tumefaciens* using *A. tumefaciens* EHA101 harbouring plasmid pBIH1-IG(SX) having β-glucuronidase gene as a reporter gene , hygromycin phosphotransferase gene (hygromycin resistance gene) and neomycin phosphotransferase II gene (kanamycin resistance gene) as selectable marker genes were as followed : late log phase cells (24 hours culture) of *A. tumefaciens* at 9.0×10^6 cells/ml. cocultivated with 7-days old *I. aquatica* cotyledon explants in the presence of 50 μM acetosyringone for 2 hours. At the optimal conditions , 75% of cotyledon explants exhibited β-glucuronidase activity. By histochemical GUS assay, expression of β-glucuronidase was detected in leave , shoot and root of transgenic *I. aquatica*. The existance of β-glucuronidase and hygromycin phosphotransferase genes in the chromosomal DNA of transgenic *I. aquatica* were confirmed by PCR method.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department Microbiology Student's signature K. KHAMWAN

Field of study Microbiology for industrial Advisor's signature Ancharida

Academic year 2002 Co-advisor's signature -

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.อัญชริดา อัครจรัลญา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ให้คำแนะนำ คำปรึกษา ความช่วยเหลือ แนวคิด และข้อคิดเห็นต่างๆในการทำงานวิจัยตลอดมา รวมทั้งตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ จนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

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

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือและความอนุเคราะห์ในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณ Dr.Yube Yamaguchi และ Dr.Tatsuo Nakamura สำหรับพลาสมิดพาหะ pBIH1-IG(SX) รวมทั้งคำแนะนำและความช่วยเหลือต่างๆ

ท้ายที่สุดนี้ขอขอบคุณผู้วิจัยทุกคนในห้องวิจัย 405 และห้องอื่นๆที่ให้ความช่วยเหลือ และขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา และสมาชิกในครอบครัว ซึ่งเป็นกำลังใจ รวมถึงให้การสนับสนุนทุกสิ่งเสมอมาอย่างหาที่สุดมิได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญภาพ.....ซ
คำย่อ.....ญ
บทที่
1. บทนำ.....1
2. เครื่องมือ เคมีภัณฑ์ เชื้อจุลินทรีย์และเมล็ดพันธุ์ผักบุ้ง.....16
3. วิธีทดลอง.....20
4. ผลการทดลอง.....30
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....49
รายการอ้างอิง.....53
ภาคผนวก.....57
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....70

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1.1 การถ่ายโอนยีนโดยเลี้ยง *Agrobacterium* ร่วมกับโปรโตพลาส.....2
1.2 การถ่ายโอนยีนโดยใช้ใบพืชที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ.....3
1.3 การถ่ายโอนยีนโดยใช้ *Agrobacterium* บุกรุกเข้าสู่เซลล์พืชทางบาดแผล.....4
1.4 การสร้างพลาสมิดพาหะ Ti ชนิดโคอินทิเกรต.....6
1.5 การสร้างพลาสมิดพาหะ Ti ชนิดไบนารี.....8
3.1 การเตรียม cotyledon explant ของผักบุ้ง.....21
3.2 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *gus* ที่cotyledon explant ของผักบุ้ง
โดยวิธี Histochemical GUS assay.....24
4.1 เปอร์เซ็นต์ cotyledon explant ของผักบุ้งที่ได้รับยีน *gus* เมื่อใช้ *A. tumefaciens*
EHA101 ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX) ระยะการเจริญต่างๆในกระบวนการ
ถ่ายโอนยีน.....30
4.2 เปอร์เซ็นต์ cotyledon explant ของผักบุ้งที่ได้รับยีน *gus* เมื่อใช้ *A. tumefaciens*
EHA101ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX) ความเข้มข้นของเซลล์ต่างๆ.....31
4.3 เปอร์เซ็นต์ cotyledon explant ของผักบุ้งที่ได้รับยีน *gus* เมื่อบ่มร่วมกับ
A. tumefaciens EHA101 ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX) เป็นเวลาต่างๆ.....32
4.4 เปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *gus* บน cotyledon explant ของผักบุ้ง
หลังทำการบ่มร่วมกับ *A. tumefaciens* EHA101 ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)
เป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง.....33
4.5 เปอร์เซ็นต์ cotyledon explant ของผักบุ้งที่ได้รับยีน *gus* จาก*A. tumefaciens*
EHA101 ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX) เมื่อเติมอะซิโตไซริงโอนความเข้มข้นต่างๆ
ในขั้นตอน cocultivation.....34
4.6 ต้นใหม่ที่งอกจาก cotyledon explant.....35
4.7 การทดสอบความต้านทานของผักบุ้งต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน.....36
4.8 การทดสอบความต้านทานของผักบุ้งต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน
และสารปฏิชีวนะกานามัยซิน.....38
4.9 การขยายพันธุ์ผักบุ้งโดยตัดลำต้นถึงส่วนข้อ นำไปแช่น้ำ.....40
4.10 ผลการตรวจหากิจกรรมของบีตา-กลูคูโรนิเดสในส่วนต่างๆของผักบุ้ง.....42

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.11 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR เมื่อใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ทิศทางไปและกลับเพื่อเพิ่มปริมาณยีน *gus*.....45
4.12 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR เมื่อใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ทิศทางไปและกลับเพื่อเพิ่มปริมาณยีน *hpt*.....47
4.13 ลักษณะของต้นผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์เมื่อทำการปลูกในดินเปรียบเทียบกับต้นผักบุ้งพันธุ์เดิม.....48
ค.1 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pBIH1-IG(SX).....64
ค.2 กราฟแสดงระยะเจริญ (growth phase) ของ *A. tumefaciens* เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร YEP ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินและสารปฏิชีวนะกานามัยซินความเข้มข้นสุดท้ายชนิดละ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร.....65
ค.3 แสดงตำแหน่งโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ทั้งสองสายบนลำดับเบสของโปรโมเตอร์ชนิด CaMV 35s และยีน *gus*.....66
ค.4 แสดงตำแหน่งโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ทั้งสองสายบนลำดับเบสของยีน *hpt*.....69

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

%	หมายถึง	เปอร์เซ็นต์
ml	หมายถึง	มิลลิลิตร
min	หมายถึง	นาที
μM	หมายถึง	ไมโครโมลาร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย