

การสร้างผักบุ้ง *Ipomoea aquatica* ดัดแปลงพันธุ์ที่มีอิน蟠มะลรหัสซิสเตอีนชินเตสจากข้าว

นางสาวอังคณา โพธิ์ไกร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา¹
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-1063-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONSTRUCTION OF A TRANSGENIC PAKBUNG *Ipomoea aquatica* HARBOURING
CYSTEINE SYNTHASE GENE FROM RICE

Miss Angkana Phokrai

ศูนย์วิทยาศาสตร์พัฒนาชุมชน

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

Department of Microbiology

Faculty of Science

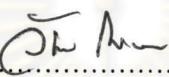
Chulalongkorn University

Academic Year 2002

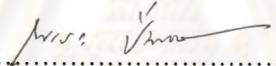
ISBN 974-17-1063-1

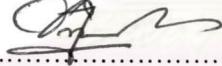
หัวข้อวิทยานิพนธ์ การสร้างผักบุ้ง *Ipomoea aquatica* ดัดแปลงพันธุ์ที่มีอิน蟠ะນวารหัสซิสเตอีน
ชินเตสาจากข้าว
โดย นางสาวอังคณา โพธิ์ไกร
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา อัครจรรลญา

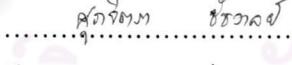
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต


..... คณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. วนิชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. พิราษร์ ปั่นพาณิชย์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา อัครจรรลญา)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภจิตร ชัชวาลย์)


..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. กอบชัย กัทรกุลวณิชย์)

อังคณา โพธิ์ไกร : การสร้างพักบูง *Ipomoea aquatica* ดัดแปลงพันธุ์ที่มียีนประมวลรหัส
ชีสเตรอินซินเตสจากข้าว (CONSTRUCTION OF A TRANSGENIC PAKBUNG
Ipomoea aquatica HARBOURING CYSTEINE SYNTHASE GENE FROM RICE)
อ.ที่ปรึกษา พศ.ดร. อัญชริตา อัครจรัลญา 61 หน้า ISBN 974-17-1063-1

ทำการถ่ายโอนยีนประมวลรหัสชีสเตรอินซินเตสของข้าว (*Oryza sativa* cv. Nipponbare) ไปโซโฟร์มที่พับในไซโตพลาสมีน (ยีน *rcs1*) เข้าสู่พักบูง โดยวิธีการใช้ *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101 ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG-RCS1 จาก cotyledon explant จำนวน 1,286 ชิ้น ได้ต้นอ่อนทั้งอกจากชินส่วนของใบเลี้ยง 340 ต้น เพียง 6 ต้นที่สามารถต้านต่อสารปฏิชีวนะ ไฮโกรมัยชินเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ตรวจหายีน *rcs1* ในดีเอ็นเอของพักบูงที่ทนต่อสารปฏิชีวนะ ไฮโกรมัยชินโดยวิธี PCR เพียง 4 ต้นที่ให้ผลิตภัณฑ์จากการกระบวนการ PCR ที่มีขนาดเท่ากับยีน *rcs1* พักบูงทราบสภาพร่วนทั้ง 4 พันธุ์ (หมายเลข 2, 4, 5 และ 6) มีกิจกรรมของชีสเตรอินซินเตสสูงกว่าพักบูงพันธุ์เดิม 4.30 - 8.04 เท่า การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนชีสเตรอินและกลูต้าไธโอน โดยวิธี HPLC พบว่าลำต้นของพักบูงทราบสภาพร่วนที่มีปริมาณกรดอะมิโนชีสเตรอินและกลูต้าไธโอนสูงกว่าลำต้นของพักบูงพันธุ์เดิม ลำต้นของพักบูงทราบสภาพร่วนที่หมายเลข 2 มีกรดอะมิโนชีสเตรอินสูงกว่าลำต้นของพักบูงพันธุ์เดิม 8.30 เท่า ลำต้นของพักบูงทราบสภาพร่วนที่หมายเลข 4 มีกลูต้าไธโอนสูงกว่าลำต้นของพักบูงพันธุ์เดิม 218.05 เท่า ลักษณะการเจริญของพักบูงทราบสภาพร่วนที่เจริญในสภาพที่มีชั้นเพดเดียมขั้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่แตกต่างจากพักบูงพันธุ์เดิม

ศูนย์วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต ๑๗๘๘๖ โพธิ์ไกร
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา 
ปีการศึกษา ๒๕๔๕ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

4272496823 : MAJOR MICROBIOLOGY FOR INDUSTRIAL

KEY WORD : *A. tumefaciens* EHA 101 / Pakbung / pBIH1-IG-RCS1

ANGKANA PHOKRAI : CONSTRUCTION OF A TRANSGENIC PAKBUNG

Ipomoea aquatica HARBOURING CYSTEINE SYNTHASE GENE FROM RICE

THESIS ADVISOR :ASSIST.PROF.ANCHARIDA AKARACHARANYA, 61 pp.

ISBN 974-17-1063-1

Cysteine synthase gene from rice (*Oryza sativa* cv. Nipponbare) encoding cytosolic isoform (*rcs1*) was transfomed into Pakbung (*Ipomoea aquatica*) using *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101 harbouring plasmid pBIH1-IG-RCS1. From 1,286 cotyledon explants, 340 regenerated shoots were obtained and 6 shoots were tolerated to 25 mg/l hygromycin. Confirmation for the existance of *rcs1* in the genome of hygromycin resistant shoot was done by polymerase chain reaction. Only 4 hygromycin resistant shoots gave a PCR product coinciding with the *rcs1*. Cysteine synthase activities of the 4 transformants (No.2, No.4, No.5 and No.6) was 4.3-8.04 times higher than those of the wild type. HPLC analysis of cysteine and glutathione content showed that shoot of transforms contained higher cysteine and glutathione than shoot of the wild type. Shoot of transformant No.2 contained cysteine 8.30 times higher than shoot of the wild type. Shoot of transformant No.4 contained glutathione 218.05 times higher than shoot of the wild type. There was no difference of phenotype and growth between transforms and the wild type grown in the presence of 1,000 mg/l sulfate.

DepartmentMicrobiology..... Student's signature.....*Angkana P.*.....

Field of studyMicrobiology for industrial.... Advisor's signature.....*Ancharida A.*.....

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

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าของกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. อัญชริตา อัครจรัสญา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ให้คำแนะนำ คำปรึกษา ความช่วยเหลือ แนวคิด และข้อคิดเห็นต่างๆ ในการทำวิจัยตลอดมา รวมทั้งตรวจสอบแก้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ จนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. ไพร Herae ปั่นพานิชการ ซึ่งกรุณารับเป็นประธานกรรมการ ผศ.ดร. ศุภจิตร ชชวาลย์ และ อ.ดร. กอบชัย กัทรกุลวณิชย์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบแก้วิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือและความอนุเคราะห์ในการทำงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ Nara Institute of Science and Technology สำหรับเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101 และพลาสมิด pBIH1-IG-RCS1

ท้ายที่สุดขอขอบพระคุณผู้วิจัยในห้อง 405 และห้องอื่นๆ ที่ให้ความช่วยเหลือ และขอกราบขอบพระคุณ บิดา – มารดา พี่และน้อง ซึ่งเป็นกำลังใจรวมทั้งให้การสนับสนุนทุกถิ่นเสมอมา

ศูนย์วิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	๙
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	๑
กิตติกรรมประกาศ.....	๒
สารบัญ.....	๓
สารบัญตาราง.....	๔
สารบัญภาพ.....	๘
คำย่อ.....	๑๔
บทที่	
1. บทนำ.....	๑
2. วารสารปริทัศน์.....	๓
3. เครื่องมือ เกมีกันท์ เชื่อจุลินทรีย์และพืชทดลอง.....	๑๒
4. วิธีการทดลอง.....	๑๕
5. ผลการทดลอง.....	๒๖
6. สรุปผลการทดลอง.....	๓๓
รายการอ้างอิง.....	๓๖
ภาคผนวก.....	๔๐
ภาคผนวก ก.....	๔๑
ภาคผนวก ข.....	๔๓
ภาคผนวก ค.....	๔๘
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	๖๑

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
5.1 เปรียบเทียบกิจกรรมของชีสเตอีนชินเตสในส่วนต่างๆ ของผักปูง.....	30
5.2 ปริมาณกรดอะมิโนชีสเตอีนและกลูต้าไพร์โอนในผักปูง.....	31

**ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**

สารบัญภาพ

ภาพที่

หน้า

2.1 วิธีการนำเซลล์เพคมาสั่งเคราะห์เป็นกรดอะมิโนซิสเตอีนและเอนไซม์ควบคุกการทำงานแต่ละขั้นตอนในพืช.....	3
2.2 ปฏิกริยาการสั่งเคราะห์กลูต้าไธโอน.....	10
4.1 ต้นอ่อนผักบุ้งอายุ 7 วัน.....	15
4.2 ลักษณะใบเดี่ยงส่วนโคนใบที่ใช้สำหรับการถ่ายโอนยืน.....	16
4.3 ผลของสารปฎิชีวนะไสโกรามัยซินที่ระดับความเข้มข้น 0, 25, 50, 75 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเจริญของผักบุ้งพันธุ์เดิม (wild type).....	18
5.1 การงอกต้นใหม่ของ cotyledon explant	26
5.2 ต้นอ่อนผักบุ้งที่สามารถต่อสารปฎิชีวนะไสโกรามัยซิน ความเข้มข้นสุดท้าย 25 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 1 เดือน.....	27
5.3 การตรวจหาเชิงประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสบันดีเจ็นของผักบุ้งโดยวิธี PCR ใช้อลิโแกนิวคลีโอไฮด์ไพร์เมอร์ rcs1-1 และ rcs1-2.....	28
5.4 การเบรียบเทียบกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสในใบของผักบุ้งทราบสฟอร์แมนท์กับของผักบุ้งพันธุ์เดิม.....	29
5.5 ลักษณะของต้นผักบุ้งที่เจริญในภาวะที่มีเซลล์เพตเริ่มต้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร.....	32
ข.1 กราฟมาตราฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Bovine Serum Albumin (BSA) และค่าการคูณลึ่นแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร.....	46
ค.1 (ก) แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pBIH1-IG ขนาด 17 กิโลเบส แสดงตำแหน่งยีน gus ยีนต้านสารปฎิชีวนะกานามัยซิน (<i>npt</i> II) และต้านสารปฎิชีวนะไสโกรามัยซิน (<i>npt</i> II)....	48
ค.1 (ข) แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pBIH1-IG-RCS1 ขนาด 16 กิโลเบส.....	48
ค.2 แสดงตำแหน่งยีนอลิโแกนิวคลีโอไฮด์ไพร์เมอร์ทั้ง 2 สายบนลำดับเบสของยีน rcs1 ขนาด 1,290 เบส ลำดับเบสที่ 74 – 1,039 เป็นบริเวณที่เปลี่ยนไป.....	49
ค.3 โครงมาโตแกรมของกรดอะมิโนซิสเตอีน (Cys) และกลูต้าไธโอน (GSH) ในส่วนละลายนามาตราฐานและสารสกัดจากส่วนใบ ลำต้น และรากของต้นผักบุ้งทราบสฟอร์แมนท์เบรียบกับผักบุ้งพันธุ์เดิม.....	50
ค.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายนามาตราฐานผสมระหว่างกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูต้าไธโอน และพื้นที่ไดกราฟ.....	60

คำย่อ

มก.	หมายถึง	มิลลิกรัม
ก.	หมายถึง	กรัม
ถ.	หมายถึง	ลิตร



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย