การสร้างผักบุ้งจีน *Ipomoea aquatica* Forsk แปลงพันธุ์ที่มียีนระบุรหัสเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรส จาก *Arabidopsis thaliana* และยีนระบุรหัสซิสเตอีนซินเทสจากข้าวจ้าว *Oryza sativa*

นางสาวจอมขวัญ มีรักษ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547
ISBN 974-53-1273-8
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4672221923

CONSTRUCTION OF A TRANSGENIC CHINESE PAKBUNG *Ipomoea aquatica* Forsk HARBOURING *Arabidopsis thaliana* SERINE ACETYLTRANSFERASE GENE AND RICE *Oryza sativa* CYSTEINE SYNTHASE GENE

Miss Jomkhwan Meerak

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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 2004

ISBN 974-53-1273-8

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การสร้างผักบุ้งจีน *Ipomoea aquatica* Forsk แปลงพันธุ์ที่มียีนระบุรหัสเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสจาก *Arabidopsis thaliana* และยีนระบุรหัสซิสเตอีนซินเตสจากข้าวจ้าว *Oryza sativa*
โดย	นางสาวจอมขวัญ มีรักษ์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา อัครจรัลญา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐชนัญ ลีพิพัฒน์ไพบูลย์
	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภจิตรา ชัชวาลย์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา อัครจรัลญา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐชนัญ ลีพิพัฒน์ไพบูลย์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภจิตรา ชัชวาลย์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จอมขวัญ มีรักษ์ : การสร้างผักบุ้งจีน *Ipomoea aquatica* Forsk แปลงพันธุ์ที่มียีนระบุรหัสเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสจาก *Arabidopsis thaliana* และยีนระบุรหัสซิสเตอีนซินเตสจากข้าวจ้าว *Oryza sativa* (CONSTRUCTION OF A TRANSGENIC CHINESE PAKBUNG *Ipomoea aquatica* Forsk HARBOURING *Arabidopsis thaliana* SERINE ACETYLTRANSFERASE GENE AND RICE *Oryza sativa* CYSTEINE SYNTHASE GENE) อ. ที่ปรึกษา ผศ.ดร. อัญชริดา อัครจรัลญา, อ.ที่ปรึกษาร่วม: ผศ.ดร. ณัฐชนัญ ลีพิพัฒน์ไพบูลย์, ผศ. ดร. ศุภจิตรา ชัชวาลย์ ; 111 หน้า. ISBN 974-53-1273-8

ถ่ายโอนยีนระบุรหัสเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสพลาสติดไอโซฟอร์ม (*SAT*1) จาก *Arabidopsis thaliana* และยีนระบุรหัสซิสเตอีนซินเตสไซโตโซลิกไอโซฟอร์ม (*rcs*1) จาก *Oryza sativa* เข้าสู่ผักบุ้งจีนโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 ได้ต้นอ่อนผักบุ้ง 85 ต้น จาก cotyledons explants จำนวน 1,853 ชิ้น มีเพียง 2 ต้น ที่ทนต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCR แสดงว่าผักบุ้งทั้ง 2 พันธุ์นี้มียีน *SAT*1 และ *rcs*1 เรียกผักบุ้งแปลงพันธุ์ SR3 และ SR10 กิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสของผักบุ้งแปลงพันธุ์ SR3 และ SR10 สูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม 4 และ 3.5 เท่า กิจกรรมของเซอรีนแอซิติลแทรนส์เฟอเรสของผักบุ้งแปลงพันธุ์ SR3 และ SR10 สูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม 2.5, 2 เท่า เมื่อวิเคราะห์โดยวัดการลดลงของแอซีทิล-โคเอ และ 2.3, 1.7 เท่า เมื่อวิเคราะห์โดยวัดปริมาณโคเอที่เกิดขึ้น ปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและปริมาณกลูตาไธโอนของผักบุ้งแปลงพันธุ์ SR3 และ SR10 สูงกว่าผักบุ้งพันธ์เดิม 7.6, 6.5 เท่า และ 1.4, 3 เท่า ตามลำดับ ประสิทธิภาพการดูดซัลเฟตของผักบุ้งแปลงพันธุ์ SR3 และ SR10 ในอาหารเหลว MS ที่มีซัลเฟตเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร สูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม 5 และ 4 เท่า ผักบุ้งแปลงพันธุ์ SR3 และ SR10 ดูดซัลเฟต 21.17 และ 15.28 มิลลิกรัมซัลเฟต/ กรัมน้ำหนักเปียกของผักบุ้ง ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา...จุลชีววิทยา... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา...จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม... ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา...2547... ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม...ณัฐชนัญ ลีพิพัฒน์ไพบูลย์...

ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม...ศุภจิตรา ชัชวาลย์...

4672221923 : **MAJOR** INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: *Ipomoea aquatica* / serine acetyltransferase / cystein synthase

JOMKHWAN MEERAK : CONSTRUCTION OF A TRANSGENIC CHINESE PAKBUNG *Ipomoea aquatica* Forsk HARBOURING *Arabidopsis thaliana* SERINE ACETYLTRANSFERASE GENE AND RICE *Oryza sativa* CYSTEINE SYNTHASE GENE. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. ANCHARIDA AKRACHARANYA, THESIS COADVISOR : ASST. PROF. NATCHANAN LEEPIPATPIBOON, ASST. PROF.SUPACHITRA CHADCHAWAN, 111 pp.

ISBN 974-53-1273-8

Arabidopsis thaliana serine acetyltransferase gene plastid isoform (*SAT*1) and *Oryza sativa* cysteine synthase gene cytosolic isoform (*rcs*1) were transformed into Chinese Pakbung (*Ipomoea aquatica* Forsk) using *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 harbouring plasmid pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1. From 1,853 cotyledon explants, 85 shoots were obtained and only 2 shoots were tolerated to 25 ug/ml hygromycin. Confirmation of the existence of *SAT*1 and *rcs*1 gene in the genome of the two hygromycin resistant shoots, SR3 and SR10, was done by polymerase chain reaction. Cysteine synthase activity of the two transformants, SR3 and SR10, was 4, 3.5 times higher than those of the wild type. Serine acetyltransferase activity of SR3 and SR10 was higher than those of the wild type; 2.5, 2 times when assayed by mornitoring the disappearance of acetyl-CoA and 2.3, 1.7 times when assayed by monitoring the appearance of CoA. SR3 and SR10 contain cysteine and glutathione 7.6, 6.5 and 1.4 and 3 times higher than wild type, respectively. Sulfate absorption efficiency of SR3 and SR10 was 5 and 4 times higher than those of the wild type when grown in MS liquid medium containing 1,000 mg/l sulfate. Transformants SR3 and SR10 absorped sulfate 21.17 and 15.28 mg/ g wet weight, respectively.

Department. **Microbiology** ..... Student's signature ..... Jomkhwan Meerak

Field of study **Industrial Microbiology** Advisor's signature ..... Ancharida A.

Academic year ... **2004** ..... Co-advisor's signature ..... Natchanan Leepipatpiboon

Co-advisor's signature ..... Supachitra Chadchawan

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา อัครจรัลญา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐชนัญ ลีพิพัฒน์ไพบูลย์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภจิตรา ชัชวาลย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษา ความช่วยเหลือ แนวคิด ความรู้ และข้อคิดเห็นต่าง ๆ ในการทำงานวิจัย ตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ซึ่งกรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ซึ่งเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่าง ๆ ในการทำงานวิจัย และแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มอบทุนการศึกษาเพื่อเฉลิมฉลองในวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา ประจำปีการศึกษา 2546

ขอขอบคุณการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย ที่ให้การสนับสนุนทุนการวิจัย

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่กรุณาให้ความรู้ ความช่วยเหลือและคำแนะนำต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกต่อการทำงานวิจัยตลอดมา

ขอขอบคุณ Dr. Yube Yamaguchi สำหรับการสอนวิธีการทดลอง คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่าง ๆในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณ คุณวีระศักดิ์ จงเฟื่องปริญญา เจ้าหน้าที่ทั่วไป ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา สำหรับความช่วยเหลือ คำปรึกษา และข้อคิดเห็นต่าง ๆ และรวมทั้ง พี่ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ทุกคน สำหรับความช่วยเหลือ และกำลังใจที่ดีตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และทุกคนในครอบครัว ที่เป็นกำลังใจ และสนับสนุนทุกสิ่งทุกอย่างตลอดมา

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 เคมีภัณฑ์ และเชื้อจุลินทรีย์..... 10
4. วิธีการทดลอง..... 17
5. ผลการทดลอง..... 47
6. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 82
รายการเอกสารอ้างอิง..... 88
ภาคผนวก..... 94
ภาคผนวก ก 95
ภาคผนวก ข 99
ภาคผนวก ค 106
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 113

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

3.1 แบคทีเรีย 13
3.2 พลาสมิด 14
3.3 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ 15
3.4 พืชทดลอง 16
4.1 ดีเอ็นเอไพร์เมอร์สำหรับเพิ่มจำนวน ยีน *SAT*1 จำนวน 4 สาย 18
5.1 การเปรียบเทียบกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสในใบผักบุ้ง 74
5.2 การเปรียบเทียบกิจกรรมของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสในใบผักบุ้ง 75
5.3 การเปรียบเทียบกิจกรรมของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสในใบผักบุ้ง 76
5.4 การปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนในน้ำสกัดจากใบผักบุ้ง 79
5.5 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับซัลเฟตของผักบุ้ง 80

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 กระบวนการ sulfate assimilation ของพืช และเอนไซม์ควบคุม 4
4.1 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pGEM-*SAT*1 23
4.2 ตำแหน่งของดีเอ็นเอไพร์เมอร์ในการหาลำดับเบสของยีน *SAT*1 24
4.3 แผนที่ของเรสทริกชันของพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 26
4.4 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pUC19 29
4.5 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pUC19-*rcs*1 30
4.6 การเตรียม cotlyledon explants ของผักบุ้ง 34
4.7 การทำทรานสฟอร์เมชันของผักบุ้ง 36
4.8 ลักษณะการเลี้ยงใบเลี้ยงส่วนโคนของผักบุ้งที่ผ่านการถ่ายโอนยีน 37
4.9 การทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินของผักบุ้งพันธุ์เดิม 38
4.10 ลักษณะการปลูกผักบุ้งเพื่อทดสอบการดูดซับซัลเฟต 45
5.1 ผลการทำโคโลนีพีซีอาร์ของโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์ *E. coli* DH5α / pGEM-*SAT*1 ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ JSAT3 และ JSAT4 49
5.2 ผลการตัดพลาสมิด pGEM-*SAT*1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Sma*I และ *Sac*I 50
5.3 แสดงผลการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส ที่แยกได้จากเจลอะกาโรส 51
5.4 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของดีเอ็นเอกับลำดับเบสของยีน *SAT*1 ของ *A thaliana* พันธุ์ Columbia 53
5.5 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการพีซีอาร์ เมื่อใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ rcs1-1 และ rcs1-2 55
5.6 ผลการตัดพลาสมิด pGEM-*SAT*1 และ pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Xba* I และ *Sac* I 57
5.7 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการพีซีอาร์ ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ JSAT1 และ JSAT2 58
5.8 การตัดพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Xba*I และ *Bam*HI 60
5.9 ผลการตัดพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 และพลาสมิด pUC19 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Xba*I และ *Bam*HI 61
5.10 การตัดพลาสมิด pUC19-*rcs*1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ *Sal*I และ *Bam*HI 62
5.11 ตำแหน่งของยีนต่าง ๆ บนพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 63

ภาพที่ หน้า

5.12 ผลการตรวจหายีน *rcs*1 (ก) และยีน *SAT*1 (ข) ในพลาสมิดที่สกัดจากโคโลนี ที่คาดว่าเป็นโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)- *SAT*1- *rcs*1 โดยวิธีพีซีอาร์ 64

5.13 ผลการตรวจหายีน *rcs*1 และยีน *SAT*1 ในพลาสมิดที่สกัดจากโคโลนี ที่คาดว่าเป็นโคโลนีทรานสฟอร์แมนท์ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)- *SAT*1- *rcs*1 โดยธีพีซีอาร์ 66

5.14การงอกต้นใหม่จาก cotyledon explants 68

5.15 แสดงลักษณะต้นอ่อนผักบุ้งที่เจริญในอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้นสุดท้าย 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร 69

5.16 ผลการตรวจหายีน *SAT*1 และยีน *rcs*1 ในดีเอ็นเอที่สกัดจากผักบุ้งพันธุ์ ที่สามารถทนต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินโดยวิธีพีซีอาร์ 71

5.17 การเปรียบเทียบสีของส่วนผสมปฏิกิริยาซึ่งเกิดจากกิจกรรม ของซิสเตอีนซินเตสในใบของผักบุ้ง 73

5.18 แสดงโครมาโตแกรมของกรดอะมิโนซิสเตอีน และกลูตาไธโอน 77

5.19 กราฟแท่งเปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับซัลเฟตของผักบุ้งแปลงพันธุ์ และผักบุ้งพันธุ์เดิม 80

5.20 ลักษณะที่ปรากฏ (phenotype) ของต้นผักบุ้งที่เจริญในดิน 81

6.1 การควบคุมกระบวนการ sulfate transport and assimilation (Saito,2000)..... 85

6.2 กระบวนการสังเคราะห์กลูตาไธโอน(Saito,2000) 86

ข.1กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร 101

ข.2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายแอซีทิล โคเอ และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 232 นาโนเมตร 104

ข.3 กราฟมาตราฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโคเอ และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร 104

ค.1 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pBIH1-IG(SX) (ก) และ pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 (ข) 106

ค.2 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pGEM 7Zf(+) 107

ค.3 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pUC19 108

ค.4 แผนที่ตำแหน่งโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ทั้ง 4 สาย บนลำดับเบสของยีน *SAT*1 (Gen Bank accession number L42212) ขนาด 1,079 เบส 109

ค.5 แผนที่ตำแหน่งโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ทั้ง 2 สาย บนลำดับเบสของยีน *rcs*1
(Gen Bank accession number AF073695) ขนาด 1,290 เบส 110
ค.6 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของโปรตีน SAT1 ที่ทำนายด้วยโปรแกรม
CLUSTAL W (1.82)..... 111

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย