การโคลนยีนเอพีเอสรีดักเตสจาก *Arabidopsis thaliana* เข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens* EHA101

นางสาวสินีนาฏ สายบาง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2543

ISBN 974-333-929-9

ลิขสิทธิ์ของ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CLONING OF APS REDUCTASE GENE FROM *Arabidopsis thaliana* IN *Agrobacterium tumefaciens* EHA101

Miss Sineenard Saibang

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 2000

ISBN 974-333-929-9

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การโคลนยีนเอพีเอสรีดักเตสจาก *Arabidopsis thaliana* เข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens* EHA101

โดย นางสาวสินีนาฏ สายบาง

ภาควิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา อัครจรัลญา

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์

อาจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา อัครจรัลญา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(อาจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

สินีนาฏ สายบาง : การโคลนยีนเอพีเอสรีดักเตสจาก *Arabidopsis thaliana* เข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 (CLONING OF APS REDUCTASE GENE FROM *Arabidopsis thaliana* IN *Agrobacterium tumefaciens* EHA101) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.อัญชริดา อัครจรัลญา, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์, อ.ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา, 91 หน้า : ISBN 974-333-929-9.

ได้เพิ่มยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสโดยกระบวนการ PCR โดยใช้คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอของ *Arabidopsis thaliana* เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ซึ่งออกแบบโดยใช้ข้อมูลลำดับเบสของยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตส (*prh19*) ได้ดีเอ็นเอขนาด 1,558 เบส เรียกดีเอ็นเอ SNN1 ผลการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ SNN1 พบว่าเหมือนกับลำดับเบสของยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตส (*APR1*) ทุกประการ การขจัดยีนประมวลรหัสเปปไทด์ขนส่งของดีเอ็นเอ SNN1 ออกโดยกระบวนการ PCR ได้ดีเอ็นเอขนาด 1,423 เบส เรียกดีเอ็นเอ SNN2 ผลการทรานสฟอร์มดีเอ็นเอ SNN2 เข้าสู่ *Escherichia coli* สายพันธุ์ที่ยีนประมวลรหัสพีเอพีเอสรีดักเตสผ่าเหล่า ไม่สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีน มีผลทำให้ *Escherichia coli* สายพันธุ์นี้สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีนได้ แสดงว่าการแสดงออกของดีเอ็นเอ SNN2 เป็นรหัสของเอพีเอสรีดักเตส จึงทำให้ *Escherichia coli* สายพันธุ์นี้สามารถสังเคราะห์ซัลไฟต์จากเอพีเอสได้ การแสดงออกของดีเอ็นเอ SNN2 ใน *Escherichia coli* ทำให้ประสิทธิภาพการดูดซับกำมะถันซัลเฟตเพิ่มขึ้น เพื่อที่จะถ่ายโอนยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสนี้เข้าสู่โครโมโซมของพืชโดยวิธีการใช้ *Agrobacterium* จึงได้นำดีเอ็นเอ SNN1 มาเชื่อมกับพลาสมิดพาหะ pBIH1-IG(SX) แล้วทรานสฟอร์มเข้าสู่ *Agrobacterim tumefaciens* EHA101 โดยวิธีอิเลคโตรโพเรชัน

ภาควิชา จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา 2543	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

4072422123 : MAJOR MICROBIOLOGY FOR INDUSTRIAL

KEY WORD: APS REDUCTASE / SULFATE ASSIMILATION / *Arabidopsis thaliana* / *Agrobacterium tumefaciens* EHA101

SINEENARD SAIBANG : CLONING OF APS REDUCTASE GENE FROM *Arabidopsis thaliana* IN *Agrobacterium tumefaciens* EHA101. THESIS ADVISOR : ASSIST.PROF. ANCHARIDA AKARACHARANYA, D.Eng. THESIS COADVISOR : ASSO.PROF.SIRIRAT RENGPIPAT, Ph.D., SUPAT CHAREONPORNWATTANA, Ph.D. 91 pp. ISBN 974-333-929-9.

APS reductase gene was amplified by PCR using cDNA of *Arabidopsis thaliana* as template and primers designed from APS reductase gene, *prh19*. The 1,558 bp-PCR product having 100% DNA sequence homology to APS reductase gene, *APR1*, was designated as SNN1. The transit peptide of SNN1 was deleted by PCR giving a 1,423 bp-PCR product designated as SNN2. The SNN2 was functionally complementation in *Escherichia coli* PAPS reductase mutant. Overexpression of SNN2 in *Escherichia coli* resulted in increasing sulfate uptake. To transform this APS reductase gene into plant genome via *Agrobacterium*, SNN1 was ligated into plasmid pBIH1-IG(SX) and transformed into *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 by electroporation.

Department Microbiology ..... Student's sigature Sineenard S.

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

Academic year 2000 ..... Co-advisor's signature .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผ.ศ.ดร.อัญชริดา อัครจรัลญา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ร.ศ.ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และอาจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือ และข้อคิดเห็นต่างๆ ในการทำงานวิจัย ตลอดจนตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ร.ศ.ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ซึ่งกรุณาเป็นประธานกรรมการสอบ และ อาจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบ อีกทั้งอาจารย์ทั้ง 2 ท่านยังกรุณาให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้มาโดยตลอด

ขอขอบคุณ Mr. Tatsuo Nakamura และ Ms. Yube Yamakuchi สำหรับ cDNA ของ *A. thaliana* เชื้อ *A. tumefaciens* EHA101 และพลาสมิด pBIH1-IG(SX) ซึ่ง Mr.Nakamura ดัดแปลงมาจาก pBIH1-IG เพื่องานวิจัยครั้งนี้โดยเฉพาะ รวมทั้งคำแนะนำและความช่วยเหลือต่างๆ

ท้ายสุดนี้ขอขอบคุณผู้วิจัยทุกคนในห้อง 405 และเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ซ
สารบัญภาพ.....ฌ
คำย่อ.....ฎ
บทที่
1.บทนำ.....1
2.เครื่องมือ เคมีภัณฑ์ และเชื้อจุลินทรีย์.....13
3.วิธีการทดลอง.....17
4.ผลการทดลอง.....36
5.สรุปผลการทดลอง.....68
รายการอ้างอิง.....75
ภาคผนวก.....79
ประวัติผู้เขียน.....91

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.1 ผลการออกแบบและสังเคราะห์ดีเอ็นเอไพร์เมอร์จำนวน 5 สาย.....37

4.2 ปริมาณกำมะถันซัลเฟตที่ถูกใช้ไป และน้ำหนักแห้งของเซลล์ *E. coli* JM109DE3 ทั้ง 3 ชนิด 62

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1.1 วิถีการสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีนจากกำมะถันซัลเฟต และยีนซึ่งประมวลรหัสเอนไซม์แต่ละชนิดในวิถีนี้ของ *Escherichia coli* 2

1.2 วิถีการสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีนจากกำมะถันซัลเฟตและเอนไซม์ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาในแต่ละขั้นตอนของพืช.....3

1.3 แสดงการสร้างพลาสมิด Ti ชนิดโคอินทิเกรต (Cointegrate vector).....10

1.4 แสดงการสร้างพลาสมิด Ti ชนิดไบนารี (Binary vector).....11

3.1 แสดงตำแหน่งดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทั้ง 3 คู่บนลำดับเบสของยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตส (*prh19*) ของพืช *A. thaliana* 18

4.1 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการPCR

ก. ใช้คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอสายเดี่ยวของ *A. thaliana* เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh3 และ Prh4 กำหนดอุณหภูมิในขั้นตอนที่ดีเอ็นเอไพร์เมอร์จับกับดีเอ็นแม่แบบต่างกัน

ข. ใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR (ข้อ ก ช่องที่ 3) หรือ SNN1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh1 และ Prh2 อุณหภูมิในขั้นตอนที่ดีเอ็นเอไพร์เมอร์จับกับดีเอ็นเอแม่แบบเท่ากับ 58 องศาเซลเซียส.....39

4.2 ผลการตรวจหารีคอมบิแนนท์พลาสมิดโดยการเปรียบเทียบกับขนาดของพลาสมิดพาหะ pUC18 ซึ่งไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน จากโคโลนีทรานสฟอร์แมนต์ 6 โคโลนี โดยวิธีโคโลนีแครกกิง (colony cracking).....41

4.3 ผลการตัดรีคอมบิแนนต์พลาสมิดของทรานสฟอร์แมนต์ (ผลจากข้อ 4.2.2) ด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Xba*I และ *Xho*I เปรียบเทียบกับขนาดของพลาสมิดพาหะ pUC18 ซึ่งตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Sma*I.....42

4.4 ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCR โดยใช้รีคอมบิแนนต์พลาสมิด ผลจากข้อ 4.2.2 จำนวน 2 พลาสมิดเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh3 และ Prh4.....44

4.5 การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอสอดแทรก (SNN1) ในรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUC/SNN1 และตำแหน่งของดีเอ็นเอไพร์เมอร์.....45

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.6 ผลการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอสอดแทรก SNN1 ในรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUC/SNN1 โดยแสดงถึงบริเวณของเอนไซม์เรสทริกชัน *Xba*I และ *Xho*I และบริเวณที่ขีดเส้นใต้จะเป็นลำดับเบสในบริเวณสอดแทรก บนพลาสมิดพาหะ pUC18 หลังตำแหน่งของ universal primer ทั้ง 2 ทิศทาง.....46

4.7 ลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากดีเอ็นเอสอดแทรก SNN1 ในรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUC/SNN1 เปรียบเทียบกับลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตส (ยีน *prh19*).....47

4.8 ลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากดีเอ็นเอสอดแทรก SNN1 ในรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUC/SNN1 เปรียบเทียบกับลำดับเบสและลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตส (ยีน *APR1*).....49

4.9 ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCR

ก. เมื่อใช้รีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUC/SNN1 (ผลจากข้อ 4.2.3) เป็นดีเอ็นแม่แบบ และใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh5 และ Prh4

ข. เมื่อใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR (ข้อ ก.) เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ และใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh1 และ Prh2.....53

4.10 - 4.10ก ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์เรสทริกชันบนดีเอ็นเอ SNN2 และบนพลาสมิดพาหะ pUC18

- 4.10ข ชิ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,400 เบส ที่ควรจะได้จากการตัดรีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่มีดีเอ็นเอSNN2 สอดแทรกอยู่ในทิศทางที่สามารถแสดงออกได้.....55

4.11 ผลการตรวจสอบว่าดีเอ็นเอ SNN2 สอดแทรกอยู่ในรีคอมบิแนนต์พลาสมิดในทิศทางที่ดีเอ็นเอ SNN2 สามารถแสดงออกได้.....56

4.12 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของดีเอ็นเอ SNN2 โดยวิธีคอมพลีเมนเตชัน โดยการทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUC/SNN2 เข้าสู่ *E. coli* JM96 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่สามารถสร้างกรดอะมิโนซิสเตอีนและกรดอะมิโนเมไธโอนีนได้ เปรียบเทียบความสามารถในการเจริญของเซลล์ทรานสฟอร์แมนต์กับ *E. coli* JM96, *E. coli* JM96 ที่มีพลาสมิดพาหะ pUC18 และ *E. coli* JM109 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างกรดอะมิโนซิสเตอีนและกรดอะมิโนเมไธโอนีนได้บนอาหาร เลี้ยงเชื้อที่เติมและไม่เติมกรด

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ หน้า

อะมิโนซิสเตอีนและกรดอะมิโนเมไธโอนีน.....58
4.13 ผลการตรวจสอบว่ารีคอมบิแนนต์พลาสมิด pET/SNN2 มีดีเอ็นเอ SNN2 สอดแทรกอยู่ โดยการตัดรีคอมบิแนนต์พลาสมิดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Nde*I และ *Bam*HI.....60
4.14 การเจริญของ *E. coli* JM109DE3 สายพันธุ์ที่มีพลาสมิด pET/SNN2, pET5b และไม่มีพลาสมิด ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร M9 ซึ่งเติมกรดอะมิโน 18 ชนิด ความเข้มข้นชนิดละ 25 ไมโครกรัม/มล. ไม่เติมกรดอะมิโนซิสเตอีน และกรดอะมิโนเมไธโอนีน.....61
4.15 ผลการตัดพลาสมิดพาหะ pBIHI-IG(SX) ด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Xba*I และ *Xho*I.....65
4.16 ผลการนำพลาสมิดที่สกัดได้จากทรานสฟอร์แมนต์ 9 โคโลนี (จากข้อ 4.6.1) มาตัดด้วยเอนไซม์เรสทริกชัน *Xba*I และ *Xho*I (1-9).....66
4.17 ผลการทำ โคโลนี PCR ของโคโลนีทรานสฟอร์แมนต์ ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ Prh1 และ Prh2 (1-7).....67
ข.2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกำมะถันซัลเฟตและค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 4720 นาโนเมตร (OD_{420}) 87
ค.1 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิดพาหะ pUC18.....88
ค.2 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิดพาหะ pET5b.....89
ค.3 แผนที่เรสทริกชัน ตำแหน่งยีน *Gus* และยีนต้านต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซินและไฮโกรมัยซิน บนพลาสมิดพาหะ pBIH1-IG 90

คำย่อ

มก.	หมายถึง	มิลลิกรัม
มก./ล.	หมายถึง	มิลลิกรัมต่อลิตร
ซม.	หมายถึง	เซนติเมตร
มม.	หมายถึง	มิลลิเมตร
มล.	หมายถึง	มิลลิลิตร
ชม.	หมายถึง	ชั่วโมง