การโคลนและการแสดงออกของยีนอะมอร์ฟา-4,11-ไดอีนซีนเทสในชิงเฮา

นายธงชัย กูบโคกกรวด

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเวชเคมี ภาควิชาชีวเคมี
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550

CLONING AND EXPRESSION OF *AMORPHA-4,11-DIENE SYNTHASE* GENE IN *ARTEMISIA ANNUA*

Mr. Thongchai Koobkokkruad

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Biomedicinal Chemistry
Department of Biochemistry
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2007

Thesis Title	CLONING AND EXPRESSION OF *AMORPHA-4,11-DIENE SYNTHASE* GENE IN *ARTEMISIA ANNUA*
By	Mr. Thongchai Koobkokkruad
Field of Studies	Biomedicinal Chemistry
Thesis Advisor	Associate Professor Wanchai De-Eknamkul, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Associate Professor Waraporn Putalun, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree

Pornpen Pramyothin ..... Dean of Faculty of Pharmaceutical Sciences
(Associate Professor Pornpen Pramyothin, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

D. Meksuriyen ..... Chairperson
(Associate Professor Duangdeun Meksuriyen, Ph.D.)

Wanchai De-Eknamkul ..... Thesis Advisor
(Associate Professor Wanchai De-Eknamkul, Ph.D.)

Waraporn Putalun ..... Thesis Co-advisor
(Associate Professor Waraporn Putalun, Ph.D.)

Chalermpol Kirdmanee ..... External member
(Chalermpol Kirdmanee, Ph.D.)

Suchada Sukrong ..... Member
(Assistant Professor Suchada Sukrong, Ph.D.)

Nongluksna Sriubolmas ..... Member
(Associate Professor Nongluksna Sriubolmas, Ph.D.)

ธงชัย กูบโคกกรวด : การโคลนและการแสดงออกของยีนอะมอร์ฟา-4,11-ไดอีนซีนเทส ในชิงเฮา. (CLONING AND EXPRESSION OF AMORPHA-4,11-DIENE SYNTHASE GENE IN *ARTEMISIA ANNUA*) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร. วันชัย ดีเอกนามกูล, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร. วราภรณ์ ภูตะลุน, 139 หน้า.

Artemisinin เป็นสารต้านโรคมาลาเรีย สกัดจากต้นชิงเฮา (*Artemisia annua* L.) ซึ่งสารนี้มีปริมาณน้อยมากในธรรมชาติ งานวิจัยนี้มีเป้าหมายที่จะเพิ่มปริมาณ artemisinin ในต้นชิงเฮาให้สูงขึ้นโดยวิธีการฉายรังสีแกมมา การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล โดยมุ่งเป้าที่เอนไซม์ amorpha-4,11-diene synthase (ADS) ซึ่งเกี่ยวข้องในขั้นตอนแรกของวิถีชีวสังเคราะห์ของ artemisinin จากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวในต้นชิงเฮาที่ได้รับการฉายรังสี พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์มีความสัมพันธ์กับปริมาณสาร artemisinin ที่พืชสร้างขึ้น ซึ่งบ่งชี้ว่าการฉายรังสีแกมมามีผลกระทบต่อยีนที่สร้างเอนไซม์ ADSในต้นชิงเฮาที่อยู่รอดจากการฉายรังสี ทำให้ทั้งเอนไซม์ ADS และ artemisinin มีปริมาณสูงขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า ต้นชิงเฮาที่อยู่รอดจำนวนหนึ่ง ซึ่งได้รับการปรับสภาวะจากหลอดทดลองไปสู่การปลูกในเรือนกระจก และในสภาพธรรมชาติ มีปริมาณ artemisinin ในระดับที่ใกล้เคียงกับปริมาณที่พบในแต่ละต้นที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเริ่มต้น ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความคงตัวของการสร้างสาร artemisinin ในต้นชิงเฮาที่ได้รับการฉายรังสี นอกเหนือจากการฉายรังสี งานวิจัยนี้ยังได้พยายามเพิ่มปริมาณ artemisininโดยการสร้างพืชดัดแปลงพันธุ์ของต้นชิงเฮาให้มีการสร้างเอนไซม์ ADS ในระดับที่สูงขึ้น ในส่วนนี้ได้ดำเนินการโดยการสังเคราะห์ และเพิ่มจำนวนยีน ADS ด้วยเทคนิค RT-PCR ตามด้วยการตัดต่อยีนให้อยู่ภายใต้ plant expression vector แล้วจึงส่งถ่ายยีนเข้าไปในต้นชิงเฮาด้วยเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* จากนั้นทำการเหนี่ยวนำให้เซลล์เพาะเลี้ยงเป็นส่วนยอดโดยใช้ฮอร์โมนพืชในสัดส่วนจำเพาะ จากต้นชิงเฮาที่ได้รับการถ่ายยีนโดยกระบวนการดังกล่าว เมื่อนำมาตรวจสอบการเข้าไปและการคงอยู่ของ ADS ยีน ควบคู่กับการทำงานของเอนไซม์ ADS และปริมาณ artemisinin ที่ผลิตขึ้นในต้นดัดแปลงพันธุ์ พบว่าสามารถตรวจพบ 35s promoter ซึ่งเป็น promoter ใน plant expression vector ในต้นชิงเฮาที่ได้รับการถ่ายยีน อีกทั้งมีการทำงานของเอนไซม์ ADS ในระดับที่สูงกว่าต้นชิงเฮาที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนถึง 2-3 เท่า นอกจากนี้ การวิเคราะห์ปริมาณสาร artemisinin ยังพบว่าในต้นชิงเฮาที่ได้รับการถ่ายยีนมีปริมาณ artemisinin เพิ่มขึ้นอยู่ที่ระดับที่สูงถึง 0.8 -1.0 % ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งสูงกว่าปริมาณในต้นที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนถึง 2-3 เท่าเช่นกัน การศึกษาดังกล่าวชี้ให้เห็นว่า ทั้งเทคนิคการฉายรังสีแกมมา และการดัดแปลงพันธุ์ต้นชิงเฮามีผลต่อการแสดงออกของยีน ADS ซึ่งทำให้สามารถผลิต artemisinin ในระดับสูงขึ้นในต้นชิงเฮาอันจะเป็นประโยชน์ต่อการใช้เป็นแหล่งของสารต้านมาลาเรียต่อไป

ภาควิชา.....ชีวเคมี..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....ชีวเวชเคมี..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2550..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##4676970033: MAJOR BIOMEDICINAL CHEMISTRY
KEY WORD: ARTEMISININ / *ARTEMISIA ANNUA* L. / *EX VITRO* PLANT / AMORPHA-4,11-DIENE SYNTHASE / GENE CLONING / EXPRESSION / ENZYME ASSAY

THONGCHAI KOOBKOKKRUAD : CLONING AND EXPRESSION OF AMORPHA-4,11-DIENE SYNTHASE GENE IN *ARTEMISIA ANNUA*. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. WANCHAI DE-EKNAMKUL, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. WARAPORN PUTALUN, Ph.D., 139 pp.

Artemisinin is a new effective antimalarial drug present in the medical plant *Artemisia annua* L. Its content is generally low in cultivated plants. We, therefore, aimed to increase the yield of artemisinin in this plant by using techniques of gamma irradiation, plant tissue culture and molecular biology. Amorpha-4,11-diene synthase (ADS), the enzyme catalyzing the first step of the artemisinin biosynthetic pathway, was the target of this study and its activity was assayed in various γ–ray treated *A. annua* plantlets. Many of these irradiated plantlets showed a strong correlation between the enzyme activity of ADS and the artemisinin content, suggesting that gamma irradiation had significant effects on the ADS gene (*ads*) which is likely to be related to the enhancement of artemisinin content in *A. annua*. Moreover, when some of these selected plantlets were transferred from the *in vitro* culture to greenhouse or open-field, the mature plants obtained also contained artemisinin essentially in a similar content pattern and, interestingly, with observed individual correlation among the selected plantlets. These results suggested that stable high artemisinin-yielding plants of *A. annua* can be obtained by the technique of gamma irradiation. In addition, an attempt to enhance artemisinin content was also performed by creating transgenic plants of *A. annua*. For this approach, the full-length open reading frame of *ads* gene was first amplified by RT-PCR using specific primer and was then inserted into the plant expression vector in *A. annua* via *Agrobacterium tumifaciens*-mediate transformation. By using the process of plant regeneration through transgenic callus to shoot, the transgenic plants of *A. annua* were obtained. These transgenic plants were subsequently detected for the presence of the recombinant *ads* gene, its functional enzyme activity and finally the possible effect on the increase of artemisinin content. The results showed that the shoots of *A. annua* transferred with the 35s promoter were PCR positive. The ADS specific activity assayed by radioisotope method showed its activity in the transgenic plants 2-3 times higher than the untransgenic plant. Interestingly, the production level of artemisinin in the transgenic plant also showed 2-3 times higher than the untransgenic plant. These results indicated that transgenic plant of *A. annua* did contain *ads* gene and could be expressed by the expression vector leading to the apparent high enzyme activity of ADS which, in turn, caused the increase in the overall yield of artemisinin in the transgenic *A. annua* plants.

Department.....Biochemistry..... Student's signature....T. Koobkokkruad....
Field of study....Biomedicinal Chemistry..... Advisor's signature. W. De-Eknamkul
Academic year.....2007..... Co-advisor's signature. Waraporn Putalun

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere appreciation and gratitude to my advisor, Associate Professor Dr. Wanchai De-Eknamkul of the Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for his kind, interest, helpful advices, guidance, excellent supervision and encouragement which enable me to carry out my thesis successfully.

I wish to express my grateful thank to my thesis co-advisor, Associate Professor Waraporn PutalunFaculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen, for her kindness, helpful guidance, and encouragement throughout this study.

I wish to express my grateful thank to my thesis commitee, Dr. Chalermpol Kirdmanee, Plant Biochemistry and Plant Physio-Biochemistry Laboratory, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), for his kindness, helpful guidance, and encouragement throughout this study.

I also would like to acknowledge the members of my thesis committee for their valuable times and suggestions.

I wish to express my grateful thank to BIOTEC and the Graduate School, Chulalongkorn University for providing a Graduate Scholarship in Biotechnology.I am indebted to the Graduated School of Chulalongkorn University, and the Ministry of University Affairs, for giving financial supports during the course of my study.

I wish to thank all staff members of the R&D Unit for Herbs and Spices, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for their kindness and helps.

I would like to thank all instructors of the Plant Biochemistry and Plant Physio-Biochemistry Laboratory, BIOTEC, NSTDA, for providing equipment, their kindness, and helpful suggestions.

I gratefully acknowledge to all instructors, classmates and personals in the Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, for their useful assistance.

Finally, I wish to express my infinite thanks and deepest gratitude to my parent for their endless love, care, understanding, supporting and encouragement.

CONTENTS

CHAPTER PAGE

CHAPTER PAGE

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES

FIGURE PAGE

FIGURE PAGE

FIGURE PAGE

ABBREVIATIONS

%	= percent (part per 100), percentage
δ	= chemical shift
λmax	= wavelength at maximuma absorption
μCi	= microcurie (s)
μg	= microgram (s)
μl	= microliter (s)
μmol	= micromole (s)
^{o}C	= degree Celsius
^{13}C-NMR	= Carbon-13 nuclear magnetic resonance
^{1}H-NMR	= Proton- nuclear magnetic resonance
ADS	= amorpha-4,11-diene synthase
bp	= base-pare
BSA	= bovine serum albumin
cDNA	= complementary deoxyribonucleic acid
Ci	= curie (s)
cm	= centimeter (s)
cpm	= count per minute
DTT	= dithiothrietol
dw	= dry weight (s)
EC	= electrochemical detection
ELISA	= enzyme-linked immunosorbent assay
et al	= et alii
FPP	= farnesyl pyrophosphate
g	= centrifugal force (relative to gravity)
g	= gram (s)
GC	= gas chromatography
h	= hour (s)
HPLC	= high performance liquid chromatography
IPP	= isopentenyl pyrophosphate
L	= liter (s)
m	= meter (s)

mCi	= millicurie (s)
mg	= milligram (s)
mg	= milligram (s)
$MgCl_2$	= magnesium chloride
min	= minute (s)
ml	= milliliter (s)
mm	= millimeter (s)
mM	= millimolar (concentration)
MoO_4	= sodium molipdate
Mops	= 3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid
MS medium	= Murashige and Skoog (1962) medium
MS	= mass spectrometry
$Na_2HPO_4.12H_2O$	= dihydrogen orthophosphate
NADPH	= β-nicotinamine dinucleotide phosphate (reduced form), tetrasodium salt
$NaH_2PO_4.H_2O$	= sodium dihydrogen ortophosphate
ng	= nanogram (s)
nm	= nanometer (s)
NMR	= nuclear magnetic resonance
pH	= The negative logarithm of the concentration of hydrogen ions
Rf	= distance spot moved/distance solvent moved (TLC)
TLC	= thin-layer chromatography
UV	= ultraviolet light
v/v	= volume/volume (concentration)
Vis	= visible light
w/v	= weight/volume (concentration)
w/w	= weigh/weigh (concentration)