การสร้างผักบุ้ง *Ipomoea aquatica* ดัดแปลงพันธุ์ที่มียีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสจากข้าว

นางสาวอังคณา โพธิ์ไกร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
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

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 2002

ISBN 974-17-1063-1

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การสร้างผักบุ้ง *Ipomoea aquatica* ดัดแปลงพันธุ์ที่มียีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสจากข้าว

โดย นางสาวอังคณา โพธิ์ไกร

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

อังคณา โพธิ์ไกร : การสร้างผักบุ้ง *Ipomoea aquatica* ดัดแปลงพันธุ์ที่มียีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสจากข้าว (CONSTRUCTION OF A TRANSGENIC PAKBUNG *Ipomoea aquatica* HARBOURING CYSTEINE SYNTHASE GENE FROM RICE) อ.ที่ปรึกษา ผศ.ดร. อัญชริดา อัครจรัลญา 61 หน้า ISBN 974-17-1063-1

ทำการถ่ายโอนยีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสของข้าว (*Oryza sativa* cv. Nipponbare) ไอโซฟอร์มที่พบในไซโตพลาสซึม (ยีน *rcs*1) เข้าสู่ผักบุ้งโดยวิธีการใช้ *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101 ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG-RCS1 จาก cotyledon explant จำนวน 1,286 ชิ้น ได้ต้นอ่อนที่งอกจากชิ้นส่วนของใบเลี้ยง 340 ต้น เพียง 6 ต้นที่สามารถต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร ตรวจหายีน *rcs*1 ในดีเอ็นเอของผักบุ้งที่ทนต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินโดยวิธี PCR เพียง 4 ต้นที่ให้ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCR ที่มีขนาดเท่ากับยีน *rcs*1 ผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์ทั้ง 4 พันธุ์ (หมายเลข 2, 4, 5 และ 6) มีกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสสูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม 4.30 - 8.04 เท่า การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอน โดยวิธี HPLC พบว่าลำต้นของผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์มีปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนสูงกว่าลำต้นของผักบุ้งพันธุ์เดิม ลำต้นของผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2 มีกรดอะมิโนซิสเตอีนสูงกว่าลำต้นของผักบุ้งพันธุ์เดิม 8.30 เท่า ลำต้นของผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์หมาย 4 มีกลูตาไธโอนสูงกว่าลำต้นของผักบุ้งพันธุ์เดิม 218.05 เท่า ลักษณะการเจริญของผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์ที่เจริญในสภาวะที่มีซัลเฟตเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรไม่แตกต่างจากผักบุ้งพันธุ์เดิม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต อังคณา โพธิ์ไกร
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ปีการศึกษา 2545 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 (*rcs*1) 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 *rcs*1 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 *rcs*1. 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 transformants 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 transformants and the wild type grown in the presence of 1,000 mg/l sulfate.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department Microbiology Student's signature Angkana P.

Field of study Microbiology for industrial Advisor's signature Ancharida A

Academic year 2002 Co-advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

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

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

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 ซึ่งเป็นกำลังใจรวมทั้งให้การสนับสนุนทุกสิ่งเสมอมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ซ
สารบัญภาพ.....ฌ
คำย่อ.....ญ
บทที่
1. บทนำ.....1
2. วารสารปริทัศน์.....3
3. เครื่องมือ เคมีภัณฑ์ เชื้อจุลินทรีย์และพืชทดลอง.....12
4. วิธีการทดลอง.....15
5. ผลการทดลอง.....26
6. สรุปผลการทดลอง.....33
รายการอ้างอิง.....36
ภาคผนวก.....40
ภาคผนวก ก.....41
ภาคผนวก ข.....43
ภาคผนวก ค.....48
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....61

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

5.1 เปรียบเทียบกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสในส่วนต่างๆ ของผักบุ้ง.....30
5.2 ปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนในผักบุ้ง.....31

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1วิถีการนำซัลเฟตมาสังเคราะห์เป็นกรดอะมิโนซิสเตอีนและเอนไซม์ควบคุมการทำงานแต่ละขั้นตอนในพืช.....3
2.2 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์กลูตาไธโอน.....10
4.1 ต้นอ่อนผักบุ้งอายุ 7 วัน.....15
4.2 ลักษณะใบเลี้ยงส่วนโคนใบที่ใช้สำหรับการถ่ายโอนยีน.....16
4.3 ผลของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ระดับความเข้มข้น 0, 25, 50, 75 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อการเจริญของผักบุ้งพันธุ์เดิม (wild type).....18
5.1 การงอกต้นใหม่ของ cotyledon explant 26
5.2 ต้นอ่อนผักบุ้งที่สามารถทนต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้นสุดท้าย 25 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 1 เดือน.....27
5.3 การตรวจหายีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสบนดีเอ็นเอของผักบุ้งโดยวิธี PCR ใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ *rcs*1-1 และ *rcs*1-2.....28
5.4 การเปรียบเทียบกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสในใบของผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์กับของผักบุ้งพันธุ์เดิม.....29
5.5 ลักษณะของต้นผักบุ้งที่เจริญในภาวะที่มีซัลเฟตเริ่มต้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร.....32
ข.1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Bovine Serum Albumin (BSA) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร.....46
ค.1 (ก) แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pBIH1-IG ขนาด 17 กิโลเบส แสดงตำแหน่งยีน *gus* ยีนต้านสารปฏิชีวนะกานามัยซิน (*npt* II) และต้านสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน (*npt* II).....48
ค.1 (ข) แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pBIH1-IG-RCS1 ขนาด 16 กิโลเบส.....48
ค.2 แสดงตำแหน่งโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอรทั้ง 2 สายบนลำดับเบสของยีน *rcs*1 ขนาด 1,290 เบส ลำดับเบสที่ 74 –1,039 เป็นบริเวณที่แปลรหัสโปรตีน.....49
ค.3 โครมาโตแกรมของกรดอะมิโนซิสเตอีน (Cys) และกลูตาไธโอน (GSH) ในสวรละลายมาตรฐานและสารสกัดจากส่วนใบ ลำต้น และรากของต้นผักบุ้งทรานสฟอร์แมนท์เปรียบกับผักบุ้งพันธุ์เดิม.....50
ค.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานผสมระหว่างกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอน และพื้นที่ใต้กราฟ.....60

คำย่อ

มก.	หมายถึง	มิลลิกรัม
ก.	หมายถึง	กรัม
ล.	หมายถึง	ลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย