

การสร้างผักน้ำจีน *Ipomoea aquatica* Forsk แปลงพันธุ์ที่มียีนระบุรหัสเซอรีนแอกซ์ทิลแกรนส์เพอเรส
จาก *Arabidopsis thaliana* และยีนระบุรหัสซีสเตอีนชีนเตสจากข้าวจ้าว *Oryza sativa*

นางสาวจอมขวัญ มีรักษ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-53-1273-8

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



**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

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

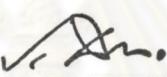
Chulalongkorn University

Academic Year 2004

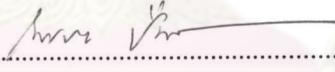
ISBN 974-53-1273-8

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การสร้างผักบุ้งจีน *Ipomoea aquatica* Forsk แปลงพันธุ์ที่มียืนระบุ
 รหัสเซอร์วินแอดวิซิลแทนส์เพอเรสจาก *Arabidopsis thaliana* และ¹
 ยืนระบุรหัสซิสเดอินชินเตสจากข้าวเจ้า *Oryza sativa*
 โดย นางสาวจอมขวัญ มีรักษ์
 สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
 อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัญชริตา อัครจรรลญา
 อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐชนันญ์ ลีพิพัฒน์ไพบูลย์
 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภจิตร ชัชวาลย์

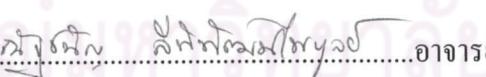
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
 ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

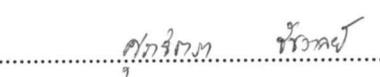

, คณะดีคณะวิทยาศาสตร์
 (ศาสตราจารย์ ดร. เปี๊ยมศักดิ์ เมนะເສດ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


, ประธานกรรมการ
 (รองศาสตราจารย์ ดร. ไพรاة ปันพานิชการ)


, อาจารย์ที่ปรึกษา
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัญชริตา อัครจรรลญา)


, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐชนันญ์ ลีพิพัฒน์ไพบูลย์)

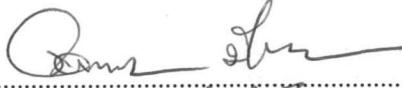
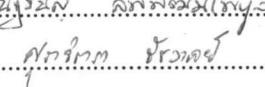

, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภจิตร ชัชวาลย์)


, กรรมการ
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย กัทรกุลวนิชย์)

ขอมูลนี้ มีรักษ์ : การสร้างพกบุ้งจีน *Ipomoea aquatica* Forsk แปลงพันธุ์ที่มียีนระบบรหัส เชอร์นแอชีทิลแทนส์เพื่อเรสจาก *Arabidopsis thaliana* และยีนระบบรหัสซิสเตอีนชินเตสจาก ข้าวขาว *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 พศ.ดร. อัญชริตา อัครจรัลญา, อ.ที่ปรึกษาร่วม: พศ.ดร. ณัฐชนัญ ลีพิพัฒน์ไพบูลย์, พศ. ดร. ศุภจิตร ชัชวาลย์; 111 หน้า. ISBN 974-53-1273-8

ถ่ายโอนยีนระบบรหัสเชอร์นแอชีทิลแทนส์เพื่อเรสพลาสติดไอโซฟอร์ม (*SAT1*) จาก *Arabidopsis thaliana* และยีนระบบรหัสซิสเตอีนชินเตสไซโคโลกิคไอโซฟอร์ม (*rcs1*) จาก *Oryza sativa* เข้าสู่พกบุ้งจีน โดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 ที่มีพลasmid pBIH1-IG(SX)-*SAT1-rcs1* ได้ต้นอ่อนพกบุ้ง 85 ต้น จาก cotyledons explants จำนวน 1,853 ชิ้น มีเพียง 2 ต้น ที่ทนต่อสารปฏิชีวนะ ไฮโกรมัยซึ่นความ เก็บขั้นสุดท้าย 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลิตภัณฑ์จากการกระบวนการ PCR แสดงว่าพกบุ้งทั้ง 2 พันธุ์นี้มียีน *SAT1* และ *rcs1* เรียกพกบุ้งแปลงพันธุ์ SR3 และ SR10 กิจกรรมของซิสเตอีนชินเตสของพกบุ้งแปลงพันธุ์ SR3 และ SR10 สูงกว่าพกบุ้งพันธุ์เดิม 4 และ 3.5 เท่า กิจกรรมของเชอร์นแอชีทิลแทนส์เพื่อเรสของพกบุ้ง แปลงพันธุ์ SR3 และ SR10 สูงกว่าพกบุ้งพันธุ์เดิม 2.5, 2 เท่า เมื่อวิเคราะห์โดยวัดการลดลงของแอชีทิล-โค เอ และ 2.3, 1.7 เท่า เมื่อวิเคราะห์โดยวัดปริมาณโคเอที่เกิดขึ้น ปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและปริมาณ กรูต้าไธโอนของพกบุ้งแปลงพันธุ์ SR3 และ SR10 สูงกว่าพกบุ้งพันธุ์เดิม 7.6, 6.5 เท่า และ 1.4, 3 เท่า ตามลำดับ ประสิทธิภาพการคุณชัลเฟตของพกบุ้งแปลงพันธุ์ SR3 และ SR10 ในอาหารเหลว MS ที่มี ชัลเฟตเพิ่มขึ้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร สูงกว่าพกบุ้งพันธุ์เดิม 5 และ 4 เท่า พกบุ้งแปลงพันธุ์ SR3 และ SR10 คุณชัลเฟต 21.17 และ 15.28 มิลลิกรัมชัลเฟต/กรัมน้ำหนักเปรียบของพกบุ้ง ตามลำดับ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา..... จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต..... 
 สาขาวิชา...จุลชีววิทยาทางภูมิศาสตร์ ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา..... 
 ปีการศึกษา.2547..... ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... 
 ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... 

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

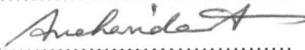
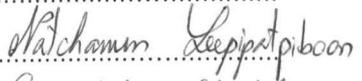
AKRACHARANYA, THESIS COADVISOR : ASST. PROF. NATCHANAN

LEEPATPIBOON, ASST. PROF. SUPACHITRA CHADCHAWAN, 111 pp.

ISBN 974-53-1273-8

Arabidopsis thaliana serine acetyltransferase gene plastid isoform (SAT1) and *Oryza sativa* cysteine synthase gene cytosolic isoform (rcs1) were transformed into Chinese Pakbung (*Ipomoea aquatica* Forsk) using *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 harbouring plasmid pBIH1-IG(SX)-SAT1-rcs1. 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 SAT1 and rcs1 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 monitoring 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 absorbed sulfate 21.17 and 15.28 mg/ g wet weight, respectively.

Department Micrabiology..... Student's signature.....

 Field of study Industrial Microbiology Advisor's signature.....

 Academic year ...2004..... Co-advisor's signature.....

 Co-advisor's signature.....


กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา อัครจรัสญา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐชนันลีพิพัฒน์ไพบูลย์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภจิตร ชัชวาลย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษา ความช่วยเหลือ แนวคิด ความรู้ และข้อคิดเห็นต่าง ๆ ในการทำงานวิจัย ตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพรاة ปั่นพานิชการ ซึ่งกรุณารับเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย กัทรกุลวัฒน์ ซึ่งเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่าง ๆ ในการทำงานวิจัย และแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มอบทุนการศึกษาเพื่อเฉลิมฉลองในโครงการที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา ประจำปีการศึกษา 2546

ขอขอบคุณการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย ที่ให้การสนับสนุนทุนการวิจัย

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่กรุณาให้ความรู้ ความช่วยเหลือ และคำแนะนำต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกต่อการทำงานวิจัยตลอดมา

ขอขอบคุณ Dr. Yube Yamaguchi สำหรับการสอนวิธีการทดลอง คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่าง ๆ ในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณ คุณวีระศักดิ์ ใจเพื่องปริญญา เจ้าหน้าที่ทั่วไป ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา สำหรับความช่วยเหลือ คำปรึกษา และข้อคิดเห็นต่าง ๆ และรวมทั้ง พี่ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ทุกคน สำหรับความช่วยเหลือ และกำลังใจที่คือตลอดมา

สุดท้ายขอขอบพระคุณบิดา มารดา และทุกคนในครอบครัว ที่เป็นกำลังใจ และสนับสนุนทุกสิ่งทุกอย่างตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	๔
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	๖
กิตติกรรมประกาศ.....	๙
สารบัญ.....	๙
สารบัญตาราง.....	๙
สารบัญภาพ.....	๑๘
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

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 แบบที่เรียบ.....	13
3.2 พลาสมิด.....	14
3.3 โอลิโภนิวคลีโอ ไทด์ไฟร์เมอร์.....	15
3.4 พีชทดลอง.....	16
4.1 ดีอี็นเอไฟร์เมอร์สำหรับเพิ่มจำนวน ยืน SAT1 จำนวน 4 สาย.....	18
5.1 การเปรียบเทียบกิจกรรมของชิสเตอินชินเตสในใบผักบุ้ง.....	74
5.2 การเปรียบเทียบกิจกรรมของเซอร์วินแอ็ซทิลแแทรนส์เพอเรสในใบผักบุ้ง.....	75
5.3 การเปรียบเทียบกิจกรรมของเซอร์วินแอ็ซทิลแแทรนส์เพอเรสในใบผักบุ้ง.....	76
5.4 การปริมาณกรดอะมิโนชิสเตอินและกลูต้าไธโอนในน้ำสกัดจากใบผักบุ้ง.....	79
5.5 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับซัลเฟตของผักบุ้ง.....	80

ศูนย์วิทยทรัพยากร
วุฒิศาสตร์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 กระบวนการ sulfate assimilation ของพืช และเอนไซม์ควบคุม	4
4.1 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pGEM-SAT1.....	23
4.2 ตำแหน่งของดีเอ็นเอ ไพร์เมอร์ในการหาลำดับเบสของยีน SAT1.....	24
4.3 แผนที่ของเรสทริกชันของพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-rcs1	26
4.4 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pUC19	29
4.5 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pUC19-rcs1.....	30
4.6 การเตรียม cotyledon explants ของผักบูร.....	34
4.7 การทำกรานสฟอร์เมชันของผักบูร.....	36
4.8 ลักษณะการเลี้ยงใบเลี้ยงส่วนโคนของผักบูรที่ผ่านการทำด้วยไอน้ำ.....	37
4.9 การทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ ไฮโกรมัยซินของผักบูรพันธุ์เดิม.....	38
4.10 ลักษณะการปลูกผักบูรเพื่อทดสอบการดูดซับชัลเพต.....	45
5.1 ผลการทำโคลีโคนิพิชีอาร์ของโคลีโคนิกรานสฟอร์เมท์ <i>E. coli</i> DH5 α / pGEM-SAT1 ใช้ดีเอ็นเอ ไพร์เมอร์ JSAT3 และ JSAT4.....	49
5.2 ผลการตัดพลาสมิด pGEM-SAT1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ <i>Sma</i> I และ <i>Sac</i> I.....	50
5.3 แสดงผลการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส ที่แยกได้จากเจลอะการอยส์.....	51
5.4 ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของดีเอ็นเอกับลำดับเบสของยีน SAT1 ของ <i>A thaliana</i> พันธุ์ Columbia.....	53
5.5 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการพิชีอาร์ เมื่อใช้ดีเอ็นเอ ไพร์เมอร์ rcs1-1 และ rcs1-2.....	55
5.6 ผลการตัดพลาสมิด pGEM-SAT1 และ pBIH1-IG(SX)-rcs1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ <i>Xba</i> I และ <i>Sac</i> I	57
5.7 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการพิชีอาร์ ใช้ดีเอ็นเอ ไพร์เมอร์ JSAT1 และ JSAT2.....	58
5.8 การตัดพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-rcs1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ <i>Xba</i> I และ <i>Bam</i> HI	60
5.9 ผลการตัดพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-rcs1 และพลาสมิด pUC19 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ <i>Xba</i> I และ <i>Bam</i> HI.....	61
5.10 การตัดพลาสมิด pUC19-rcs1 ด้วยเรสทริกชันเอนไซม์ <i>Sal</i> I และ <i>Bam</i> HI	62
5.11 ตำแหน่งของยีนต่าง ๆ บนพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-SAT1-rcs1.....	63

ภาคที่

หน้า

5.12 ผลการตรวจหายีน <i>rcs1</i> (ก) และยีน <i>SAT1</i> (ข) ในพลาสมิดที่สกัดจากโโคโลนี ที่คาดว่าเป็นโโคโลนีทรานส์ฟอร์เม้นท์ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)- <i>SAT1-rcs1</i> โดยวิธีพีซีอาร์.....	64
5.13 ผลการตรวจหายีน <i>rcs1</i> และยีน <i>SAT1</i> ในพลาสมิดที่สกัดจากโโคโลนี ที่คาดว่าเป็นโโคโลนีทรานส์ฟอร์เม้นท์ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)- <i>SAT1-rcs1</i> โดยวิธีพีซีอาร์.....	66
5.14 การงอกต้นใหม่จาก cotyledon explants.....	68
5.15 แสดงลักษณะต้นอ่อนผักบุ้งที่เจริญในอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะไ索โกร์มัยซิน ความเข้มข้นสุดท้าย 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร.....	69
5.16 ผลการตรวจหา yein <i>SAT1</i> และ yein <i>rcs1</i> ในดีเอ็นเอที่สกัดจากผักบุ้งพันธุ์ ที่สามารถทนต่อสารปฏิชีวนะไ索โกร์มัยซิน โดยวิธีพีซีอาร์.....	71
5.17 การเปรียบเทียบสีของส่วนผสมปูนกริยาซึ่งเกิดจากกิจกรรม ของซิสเตอีนเซตส์ในใบของผักบุ้ง.....	73
5.18 แสดงໂຄຣມາໂടແກຣມของกรดอะมิโนซิสເຕොීນ ແລະ ກ්ලුටාໄໂໂອນ.....	77
5.19 กราฟแท่งเปรียบเทียบประสิทธิภาพการคุณชับชั้ลเฟตของผักบุ้งเปล่งพันธุ์ และผักบุ้งพันธุ์เดิม.....	80
5.20 ลักษณะที่ปรากฏ (phenotype) ของต้นผักบุ้งที่เจริญในดิน.....	81
6.1 การควบคุมกระบวนการ sulfate transport and assimilation (Saito,2000).....	85
6.2 กระบวนการสังเคราะห์ก්ලුටාໄໂໂອນ(Saito,2000).....	86
خ.1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายน้ำ BSA และการคุณลีนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร.....	101
خ.2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายน้ำออเชิลิ โโคเอ และการคุณลีนแสงที่ความยาวคลื่น 232 นาโนเมตร.....	104
خ.3 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายน้ำโโคเอ และการคุณลีนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร.....	104
ค.1 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pBIH1-IG(SX) (ก) และ pBIH1-IG(SX)- <i>rcs1</i> (ข).....	106
ค.2 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pGEM 7zf(+).....	107
ค.3 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pUC19.....	108
ค.4 แผนที่ตำแหน่งของโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไฟร์เมอร์ทั้ง 4 สาย บนลำดับเบสของยีน <i>SAT1</i> (Gen Bank accession number L42212) ขนาด 1,079 เบส.....	109

ค.5 แผนที่ตำแหน่งโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ทั้ง 2 สาย บนลำดับเบสของยีน rcs1 (Gen Bank accession number AF073695) ขนาด 1,290 เบส	110
ค.6 ผลการเปรียบเทียบความเหมือนของโปรตีน SAT1 ที่ทำนายด้วยโปรแกรม CLUSTAL W (1.82).....	111

