การแสดงออกของยีนกลูโคซีรีโบรซิเดสของคนในกระสัง *Peperomia pellucida* (L.) Kunth ที่ได้รับการถ่ายยีน

นางสาวปาลิตา แปวไธสง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EXPRESSION OF HUMAN GLUCOCEREBROSIDASE GENE IN TRANSGENIC SHINY BUSH *Peperromin pellucida* (L.) Kunth

Miss Palita Paewthaisong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Genetics

Department of Botany

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

492098

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การแสดงออกของยีนกลูโคซีรีโบรซิเดสของคนในกระสัง *Peperomia pellucida* (L.) Kunth ที่ได้รับการถ่ายยีน
โดย	นางสาวปาลิตา แปวไธสง
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะศักดิ์ ขอุ่มพฤกษ์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปรีดา บุญ-หลง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะศักดิ์ ขอุ่มพฤกษ์)

..... กรรมการ

(ศาสตราจารย์ นพ.วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เตือนใจ โก้สกุล)

ปาลิตา แปวไธสง : การแสดงออกของยีนกลูโคซีรีโบรซิเดสของคนในกระสัง *Peperomia pellucida* (L.) Kunth ที่ได้รับการถ่ายยีน (EXPRESSION OF HUMAN GLUCOCEREBROSIDASE GENE IN TRANSGENIC SHINY BUSH *Peperomia pellucida* (L.) Kunth) อ. ที่ปรึกษา : ผศ. ดร.ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ . 66 หน้า.

กระสัง *Peperomia pellucida* (L.) Kunth เป็นวัชพืชขนาดเล็ก ต้นเขียวใส ใบอวบน้ำ สามารถเจริญได้ดีในที่ชุ่มชื้น เมื่อนำกระสังมาเพาะเลี้ยงในระบบปลอดเชื้อพบว่า ชิ้นส่วนของใบตอบสนองได้ดีในอาหารสูตรพื้นฐาน Murashike and Skoog โดยสามารถชักนำให้พัฒนาเป็นแคลลัสได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA 1 และ kinetin 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อเลี้ยงแคลลัสดังกล่าวในอาหารสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต kinetin 3 มิลลิกรัมต่อลิตรสามารถชักนำให้เกิดต้นจำนวนมาก การนำแคลลัสที่ได้ไปศึกษาระบบการถ่ายยีน โดยใช้ยีน *bar* ด้วยวิธีการนำเนื้อเยื่อผ่านสนามไฟฟ้าที่ใช้ไฟฟ้ากระแสตรงแรงเคลื่อน 50 โวลล์ พบว่าการใช้สนามไฟฟ้าเป็นเวลา 20 วินาที ร่วมกับ สารละลาย 1%PEG และ1 mM $CaCl_2$ ให้จำนวนแคลลัสต้านทานสูงสุด หลังจากคัดเลือกชิ้นเนื้อเยื่อแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนบนอาหารสูตร MS ที่เติมยาปราบวัชพืช bialaphos ความเข้มข้น 20 ppm. พบว่ามีชิ้นเนื้อเยื่อที่ต้านทานต่อยาปราบวัชพืช เมื่อนำไปตรวจสอบด้วยวิธีPCR(polymerase chain reaction) ให้ขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่สอดคล้องกับขนาดของยีน *bar* เมื่อนำข้อมูลที่ได้เพื่อใช้เป็นพื้นฐานในการถ่ายยีน กลูโคซีรีโบรซิเดสของคน โดยใช้กระสังเป็นระบบในการถ่ายยีน พบว่าได้เนื้อเยื่อที่ได้รับการถ่ายยีน สามารถตรวจสอบการแทรกตัวของยีนด้วยวิธีพีซีอาร์ และวิธี RT-PCR ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มีขนาดสอดคล้องกับขนาดของยีนกลูโคซีรีโบรซิเดสที่ใช้ไพรเมอร์ชนิดเดียวกัน ผลดังกล่าวสนับสนุนความเป็นไปได้ในการใช้กระสังเป็นพืชรูปแบบจำลองในการศึกษาการถ่ายยีนในอนาคต

ภาควิชา.....พฤกษศาสตร์.....ลายมือชื่อนิสิต.....ปาลิตา แปวไธสง.....

สาขาวิชา .....พันธุศาสตร์.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา .....2549.....

4672330623 : MAJOR GENETICS

KEY WORD: GLUCOCEREBROSIDASE /TRANSFORMATION / *Peperomia pellucida* (L.) Kunth

PALITA PAEWTHAISONG : EXPRESSION OF HUMAN GLUCOCEREBROSIDASE GENE IN TRANSGENIC SHINY BUSH *Peperomia pellucida* (L.) Kunth THESIS ADVISOR : ASSISTANT PROFESSOR PIYASAK CHAUMPLUK, Ph.D., 66 pp.

Peperomia pellucida (L.) Kunth is a small succulent weed which can grow in high moisture area. When *P. pellucida* was cultured in sterile condition using Murashike and Skoog medium, results revealed that callus could be induced from part of leaf caltured on media supplemented with 1 mg/L NAA and 2 mg/L kinetin and the induced calli were able to regenerated to shoots in MS medium supplemented with 3 mg/L kinetin. Further step in transformation of *bar* gene was investigated in *P. pellucida* callus using by electrical gene pulser with direct current. The results showed that a combination of direct current pulse at 50 volt for 20 seconds and 1% PEG and 1 mM $CaCl_2$ treatment was suitable for maximum the induction of bialaphos resistance in callus tissues. After selection, transgenic calli were maintained at 20 ppm bialaphos, and the resulting calli were evaluated via molecular analysis by PCR technique. Results revealed similar DNA bands to those of positive control. When the same conditions were applied to human glucocerebrosidase gene by using *P. pellucida* as a transformation system, molecular analysis by PCR and RT-PCR revealed the positive cDNA detection results, confirming that DNA had integrated into the genome of the transformants and RNA was expressed properly in corresponding with DNA size previously investigated. These results support a possibility in using *P. pellucida* as a plant model for the study on gene transformation system in future.

Department.....Botany..... Student' signature.....

Field of study.....Genetics.....Advisor's signature.....

Academic year.....2002.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะศักดิ์ ชอุ่มพฤกษ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและดูแลเป็นอย่างดีตลอดการทำวิทยานิพนธ์ กราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาพฤกษศาสตร์ทุกท่านที่กรุณาให้วิชาความรู้ กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ปรีดา บุญหลง ประธานคณะกรรมการ ศาสตราจารย์ นพ.วรศักดิ์ โชติเลอศักดิ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เตือนใจ โก้สกุล กรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย

ขอขอบคุณ เพื่อนๆ พี่ๆน้องๆ ในภาควิชา และโดยเฉพาะอย่างยิ่งสมาชิกห้องปฏิบัติการแพลนท์ทรานสเจนิกและไบโอเซนเซอร์เทคโนโลยี ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจมาโดยตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ คุณฉัตรเพชร ยศพล ที่คอยให้คำแนะนำและเป็นกำลังใจ

สุดท้าย กราบขอบพระคุณ คุณแม่นงคราญ แปวไธสง ที่คอยสนับสนุนและเป็นกำลังใจทุกๆด้าน ในการทำวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดียิ่ง ทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คุณความดีและประโยชน์อันพึงจะมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขออุทิศให้กับคุณพ่อบุญจันทร์ แปวไธสง ผู้เป็นแรงผลักดันให้ผู้วิจัยมีวันนี้

สารบัญ

บทที่ หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ

สารบัญ.....ช

สารบัญตาราง.....ฌ

สารบัญภาพ.....ญ

บทที่

1.บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....3

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....3

1.4 โยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 3

2.เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....4

3.วิธีการดำเนินการวิจัย.....14

3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย.....14

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย.....16

4.ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....21

4.1 การเตรียมเนื้อเยื่อกระสังเพื่อใช้ในการทดลอง.....21

4.2 การพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระสังเพื่อรองรับ
ระบบการถ่ายยีน.....24

4.3 ทดสอบความต้านทานของชิ้นเนื้อเยื่อต่อยาปราบวัชพืช
ไบอะลาฟอสเพื่อใช้ในการคัดเลือกเนื้อเยื่อกระสังที่ได้รับการถ่ายยีน.....31

4.4 ระบบการถ่ายยีน โดยใช้ยีน *bar* ที่ต้านทานยาปราบวัชพืช
ไบอะลาฟอส เป็นต้นแบบในการศึกษา.....34

4.5 การสังเคราะห์โครงสร้างของชุดของยีน Glucocerebrosidase
เพื่อใช้ในการถ่ายยีนเข้าสู่กระสัง.....39

ถ่ายยีน glucocerebrocidase เข้าสู่เนื้อเยื่อกระสัง.....41

บทที่ หน้า

5.สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ.....45
รายการอ้างอิง.....49
ภาคผนวก.....56
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....66

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน glucocerebrocidase *GBA*.....19

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ หน้า

1 ลักษณะทั่วไปของกระสัง.....10

2 อัตราการงอกของเมล็ดกระสังที่ผ่านการฟอกฆ่าเชื้อด้วย 0.25% เมอร์คิวริกคลอไรด์.....21

3 ต้นกระสังที่ได้จากการเพาะเมล็ดหลังจากย้ายลงในอาหารสูตร MS เป็นเวลา 2 สัปดาห์และต้นกระสังปลอดเชื้อที่สามารถนำไปใช้ในการทดลอง.....22

4 การชักนำให้เกิดแคลลัสในอาหารสูตรพื้นฐาน MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ kinetin.....24

5 แคลลัสในอาหารที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตเพื่อชักนำให้เกิดแคลลัส NAA และ Kinetin เมื่อเวลาผ่านไป 4 และ 5 สัปดาห์ ตามลำดับ.....26

6 การชักนำให้เกิดแคลลัสโดยที่เติมอาหารสูตรพื้นฐาน MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ kinetin.....27

7 จำนวนยอดของกระสังในอาหารพื้นฐานสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ kinetin.....28

8 ความสูงเฉลี่ยของยอดกระสังในอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต NAA และ kinetin.....28

9 ต้นกระสังที่ได้จากการชักนำโดยใช้อาการสูตรพื้นฐาน MS เติมสารเร่งการเจริญเติบโตที่ระดับความเข้มข้นต่างๆเพื่อชักนำให้เกิดต้น.....30

10 ทดสอบความต้านทานของเนื้อเยื่อกระสังต่อยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส.....31

11 อัตราการตายของเนื้อเยื่อกระสังที่ทดสอบความต้านทานต่อยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส.....33

12 ขนาดของพลาสมิดดีเอ็นเอ pBIC BAR และผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการใช้คู่ไพรเมอร์ของยีน *bar* 34

13 ศึกษาระบบการถ่ายยีนโดยใช้ยีน *bar* เป็นต้นแบบและคัดเลือกโดยใช้ยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส.....35

14 ชิ้นเนื้อเยื่อแคลลัสของกระสังที่ต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส.....36

15 ต้นกระสังที่ต้านทานยาปราบวัชพืชไบอะลาฟอส.....37

16 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการใช้ดีเอ็นเอของกระสังที่ได้รับการถ่ายยีนต้นแบบเทียบกับขนาดของดีเอ็นชุดควบคุม.....38

17 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณโดยวิธี RT-PCR เทียบกับดีเอ็นขนาดมาตรฐาน.....40

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ หน้า

18 เนื้อเยื่อแคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีน glucocerebrocidase.....41

19 ต้นกระสังได้รับการถ่ายยีน glucocerebrocidase.....42

20 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการใช้กระสังที่ได้รับการถ่ายยีน glucocerebrocidase เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเทียบกับผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน *bar* ที่มีขนาด 400 nt.....43

21 ตรวจสอบการแสดงออกของยีน glucocerebrocidaseโดยใช้เทคนิค RT-PCR 44