การบำบัดซัลเฟตโดยผักบุ้งจีน(*Ipomoea aquatica* Forsk.) ดัดแปลงพันธุ์

นางสาว นิภาภัทร สันป่าแก้ว

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม(สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-4598-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

REMOVAL OF SULFATE BY TRANSGENIC *Ipomoea aquatica* Forsk.

Miss Nipapat Sanpakeaw

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Environmental Science(Inter-department)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2003

ISBN 974-17-4598-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การบำบัดซัลเฟตโดยผักบุ้งจีน(*Ipomoea aquatica* Forsk.) ดัดแปลงพันธุ์

โดย นางสาวนิภาภัทร สันป่าแก้ว

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา อัครจรัลญา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา กีระนันทน์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา อัครจรัลญา)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภจิตรา ชัชวาลย์)

.....กรรมการ

(ดร. ศิราวุธ กลิ่นบุหงา)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นิภาภัทร สันป่าแก้ว : การบำบัดซัลเฟตโดยผักบุ้งจีน(*Ipomoea aquatica* Forsk.) ดัดแปลงพันธุ์ (REMOVAL OF SULFATE BY TRANSGENIC *Ipomoea aquatica* Forsk.)
อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. อัญชริดา อัครจรัลญา, 61 หน้า ISBN 974-17-4598-2

ทำการถ่ายโอนยีนระบุรหัสซิสเตอีนซินเตสของข้าว (*Oryza sativa* cv. Nipponbare) ไอโซฟอร์มที่พบในไซโตพลาสซึม (ยีน *rcs*1) และยีนระบุรหัสเซอรีนอะซิติลทรานสเฟอเรสของ *Arabidopsis thaliana* ไอโซฟอร์มที่พบในพลาสติด(ยีน *SAT*1) เข้าสู่ผักบุ้งโดยวิธีการใช้ *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 จาก cotyledon explant จำนวน 3,125 ชิ้น ได้ต้นอ่อนที่งอกจากชิ้นส่วนของใบเลี้ยง 523 ต้น เพียง 2 ต้นที่สามารถต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตรวจหายีน *rcs*1 และยีน *SAT*1 ในดีเอ็นเอของผักบุ้งที่ทนต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินโดยวิธี PCR ผักบุ้งทั้ง 2 ต้น ให้ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCR ที่มีขนาดเท่ากับยีน *rcs*1 และยีน *SAT*1 ผักบุ้งดัดแปลงพันธุ์ทั้ง 2 พันธุ์ (หมายเลข 1 และ 2) มีกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสสูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม 5.20, 5.03 เท่า ตามลำดับ กิจกรรมของเซอรีนอะซิติลทรานสเฟอเรสสูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม 2.17, 2.14 เท่า ตามลำดับ และประสิทธิภาพการดูดซับซัลเฟตสูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม 4.48, 3.45 เท่า ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สหสาขาวิชา วิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม ลายมือชื่อนิสิต.....นิภาภัทร สันป่าแก้ว.....
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา 2546

4589099520 : MAJOR IN ENVIRONMENTAL SCIENCE

KEY WORD : *A. tumefaciens* EHA 101 / Pakbung / pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1

NIPAPAT SANPAKEAW : REMOVAL OF SULFATE BY TRANSGENIC *Ipomoea aquatica* Forsk.

THESIS ADVISOR : ASSIST.PROF.ANCHARIDA AKARACHARANYA, Ph.D.,

61 pp. ISBN 974-17-4598-2

Cysteine synthase gene from rice (*Oryza sativa* cv. Nipponbare) encoding cytosolic isoform (*rcs*1) and serine acetyltransferase gene from *Arabidopsis thaliana* encoding plastid isoform (*SAT*1) were transformed into Pakbung (*Ipomoea aquatica* Forsk.) using *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101 harbouring plasmid pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1. From 3,125 cotyledon explants, 523 regenerated shoots were obtained and 2 shoots were tolerated to 25 μg/ml hygromycin. Confirmation for the existance of *rcs*1 and *SAT*1 in the genome of hygromycin resistant shoot was done by polymerase chain reaction. The 2 hygromycin resistant shoots gave a PCR product coinciding with the *rcs*1 and the *SAT*1. Cysteine synthase activity and serine acetyltransferase activity of the 2 transformants (No.1 and No.2) were 5.20, 5.03 times and 2.17, 2.14 times, respectively higher than those of the wild type. Sulfate absorption efficiency of the 2 transformants (No.1 and No.2) was 4.48, 3.45 times higher than those of the wild type.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Inter-department Environmental Science — Student's signature.....

Field of Study Environmental Science — Advisor's signature.....

Academic year 2003

กิตติกรรมประกาศ

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

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ ซึ่งกรุณาเป็นประธานกรรมการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภจิตรา ชัชวาลย์ และ ดร. ศิราวุธ กลิ่นบุหงา ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความช่วยเหลือและความอนุเคราะห์ในการทำงานวิจัย

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.....ฎ
บทที่
1. บทนำ.....1
2. วารสารปริทัศน์.....5
3. เครื่องมือ เคมีภัณฑ์ เชื้อจุลินทรีย์และพืชทดลอง.....9
4. วิธีการทดลอง.....13
5. ผลการทดลอง.....29
6. สรุปผลการทดลอง.....41
รายการอ้างอิง.....43
ภาคผนวก.....47
ภาคผนวก ก.....48
ภาคผนวก ข.....51
ภาคผนวก ค.....55
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....61

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

5.1 การเปรียบเทียบกิจกรรมของซิสเตอีนซิลเตสในใบของผักบุ้ง 38
5.2 การเปรียบเทียบกิจกรรมของเซอรีนอะซิติลทรานสเฟอเรสในใบของผักบุ้ง..... 39
5.3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับซัลเฟตของผักบุ้ง.....40

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

4.1 แผนที่เรสทริกชั่นของรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1.....14
4.2 แผนที่เรสทริกชั่นของรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUC19-*rcs*1.....17
4.3 ลูกศรแสดงลักษณะใบเลี้ยงส่วนโคนใบที่ใช้สำหรับการถ่ายโอนยีน..... ...22
5.1 การตัดรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ*Bam*HI จะได้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3 กิโลเบส ประกอบด้วยยีน *rcs*1และยีนต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน(ยีน*HPT*)..... 30
5.2 ผลการตัดรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*rcs*1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I และ*Bam*HI.....31
5.3 การตัดรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUC19- *rcs*1 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sal*I และ*Bam*HI จะได้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3 กิโลเบส ประกอบด้วยยีน *rcs*1และยีนต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน(ยีน*HPT*)..... 32
5.4 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1..... 32
5.5 การตรวจหายีน *rcs*1 และยีน *SAT*1ในรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pBIH1-IG(SX)- *SAT*1-*rcs*1โดยวิธีPCR.....33
5.6 การงอกต้นใหม่ของ cotyledon explant..... 34
5.7 ต้นอ่อนผักบุ้งที่สามารถทนต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้นสุดท้าย 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 เดือน.....35
5.8 การตรวจหายีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตส(*rcs*1) บนดีเอ็นเอของผักบุ้งโดยวิธี PCR ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ *rcs*1-1 และ *rcs*1-2 36
5.9 การตรวจหายีนประมวลรหัสเซอรีนอะซิติลทรานสเฟอเรส (ยีน *SAT*1) ในผักบุ้งโดยวิธี PCR ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ *JSAT*3 และ *JSAT*4 37
5.10 การเปรียบเทียบสีของส่วนผสมปฏิกิริยาซึ่งเกิดจากกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสในใบของผักบุ้ง.....38

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ หน้า

ข.1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร.....53

ค.1 แสดงตำแหน่งดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทั้ง 2 สายบนลำดับเบสของยีน *rcs*1 (GenBank accession number AF073695) ขนาด 1,290 เบส ลำดับเบสที่ 74 – 1,039 เป็นบริเวณซึ่งแปลรหัสโปรตีน.....55

ค.2 แสดงตำแหน่งดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทั้ง 2 สาย คือ *JSAT*3 และ *JSAT*4 บนลำดับเบสของยีน *SAT*1(GenBank accession number L42212) ขนาด 989 เบส ลำดับเบสที่ 10 – 954 เป็นบริเวณซึ่งแปลรหัสโปรตีน.....56

ค.3(ก) แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pBIH1-IG ขนาด 17 กิโลเบส (Kimura และคณะ, 1993)..... 57

(ข) แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pBIH1-IG-RCS1 ขนาด 16 กิโลเบส..... 57

ค.4 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pUC19 ขนาด 2.686 กิโลเบส..... 58

ค.5 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายอะซิติล-โคเอและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 232 นาโนเมตร..... 60

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

B หมายถึง เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI

E หมายถึง เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Eco*RI

H หมายถึง เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

P หมายถึง เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I

S หมายถึง เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sal*I

Sn หมายถึง เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sna*BI

Sp หมายถึง เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Spn*I

Ss หมายถึง เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac*I

X หมายถึง เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I

Xb หมายถึง กิโลเบส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย