

การบำบัดซัลเฟตโดยผักนึ่งจีน(*Ipomoea aquatica* Forsk.) ดัดแปลงพันธุ์



นางสาว นิภาภัทร สันป่าแก้ว

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม(สหสาขาวิชา)

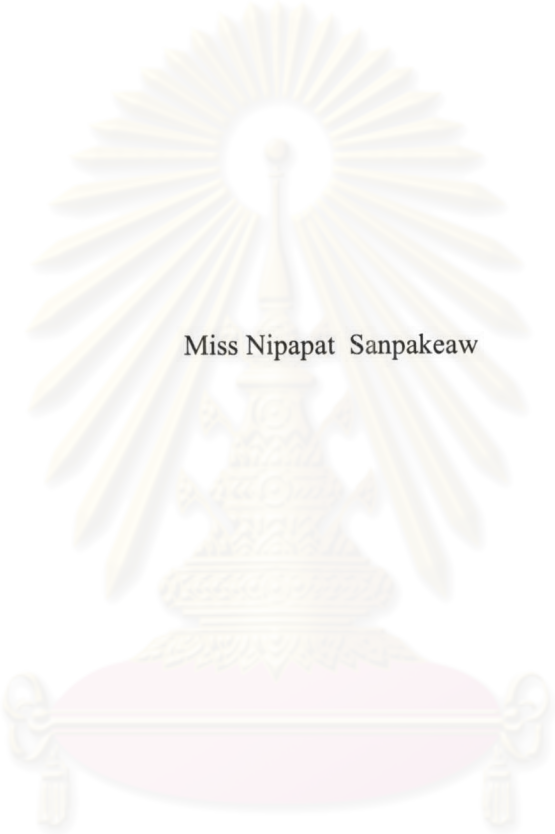
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

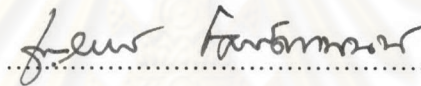
หัวข้อวิทยานิพนธ์ การบำบัดเซลล์เฟดโดยผักนึ่งจีน (*Ipomoea aquatica* Forsk.) คัดแปลงพันธุ์
โดย นางสาวนิภาภัทร สันป่าแก้ว
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัญชริดา อัครจรัสญา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

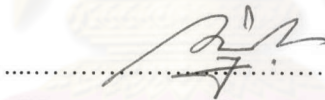


.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา กิระนันท์)

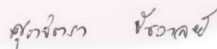
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โหมยิตานนท์)



.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา อัครจรัสญา)



.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภจิตรา ชัชวาลย์)



.....กรรมการ
(ดร. ศิราวุธ กลิ่นบุหงา)

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นิภากัณฑ์ สันป่าแก้ว : การบำบัดซัลเฟตโดยผักบุงจีน (*Ipomoea aquatica* Forsk.) คัดแปลงพันธุ์
(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) ไอโซ
ฟอร์มที่พบในไซโตพลาสซึม (ยีน *rsc1*) และยีนระบุรหัสเซอรินอะซิetyltransferase ของ
Arabidopsis thaliana ไอโซฟอร์มที่พบในพลาสติด (ยีน *SAT1*) เข้าสู่ผักบุงโดยวิธีการใช้
Agrobacterium tumefaciens EHA 101 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT1-rsc1* จาก
cotyledon explant จำนวน 3,125 ชิ้น ได้ต้นอ่อนที่งอกจากชิ้นส่วนของใบเลี้ยง 523 ต้น เพียง 2 ต้นที่
สามารถต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตรวจสอบยีน
rsc1 และยีน *SAT1* ในดีเอ็นเอของผักบุงที่ทนต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินโดยวิธี PCR ผักบุงทั้ง 2
ต้น ให้ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCR ที่มีขนาดเท่ากับยีน *rsc1* และยีน *SAT1* ผักบุงคัดแปลงพันธุ์
ทั้ง 2 พันธุ์ (หมายเลข 1 และ 2) มีกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสสูงกว่าผักบุงพันธุ์เดิม 5.20, 5.03 เท่า
ตามลำดับ กิจกรรมของเซอรินอะซิetyltransferase สูงกว่าผักบุงพันธุ์เดิม 2.17, 2.14 เท่า
ตามลำดับ และประสิทธิภาพการดูดซับซัลเฟตสูงกว่าผักบุงพันธุ์เดิม 4.48, 3.45 เท่า ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สหสาขาวิชา วิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม

ปีการศึกษา 2546

ลายมือชื่อนิติ.....*ในภกัณฑ์ สันป่าแก้ว*

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....*[Signature]*

4589099520 : MAJOR IN ENVIRONMENTAL SCIENCE

KEY WORD : *A. tumefaciens* EHA 101 / Pakbung / pBIH1-IG(SX)-SAT1-rcs1

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 (*rcs1*) and serine acetyltransferase gene from *Arabidopsis thaliana* encoding plastid isoform (*SAT1*) were transformed into Pakbung (*Ipomoea aquatica* Forsk.) using *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101 harbouring plasmid pBIH1-IG(SX)-SAT1-rcs1. From 3,125 cotyledon explants, 523 regenerated shoots were obtained and 2 shoots were tolerated to 25 µg/ml hygromycin. Confirmation for the existence of *rcs1* and *SAT1* 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 *rcs1* and the *SAT1*. 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.

Inter-department Environmental Science

Field of Study Environmental Science

Academic year 2003

Student's signature..... 

Advisor's signature..... 

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

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

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โมยมิตานนท์ 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.....	ฅ
คำย่อ.....	ฉ
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

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
5.1 การเปรียบเทียบกิจกรรมของซิสเตอีนซิลเตสในใบของผักนึ่ง	38
5.2 การเปรียบเทียบกิจกรรมของเซอร์ินอะซิติลทรานสเฟอเรสในใบของผักนึ่ง.....	39
5.3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการดูดซับซัลเฟตของผักนึ่ง.....	40



ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญญภาพ

ภาพที่	หน้า
4.1 แผนที่เรสทริกชันของรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pBIH1-IG(SX)- <i>rcs1</i>	14
4.2 แผนที่เรสทริกชันของรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUC19- <i>rcs1</i>	17
4.3 ลูกศรแสดงลักษณะไบเลียงส่วน โคนไบที่ใช้สำหรับการถ่ายโอนยีน.....	22
5.1 การตัดรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pBIH1-IG(SX)- <i>rcs1</i> ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>XbaI</i> และ <i>BamHI</i> จะได้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3 กิโลเบส ประกอบด้วยยีน <i>rcs1</i> และยีนต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน(ยีน <i>HPT</i>).....	30
5.2 ผลการตัดรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pBIH1-IG(SX)- <i>rcs1</i> ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>XbaI</i> และ <i>BamHI</i>	31
5.3 การตัดรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pUC19- <i>rcs1</i> ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>SaII</i> และ <i>BamHI</i> จะได้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 3 กิโลเบส ประกอบด้วยยีน <i>rcs1</i> และยีนต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน(ยีน <i>HPT</i>).....	32
5.4 รีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBIH1-IG(SX)- <i>SAT1-rcs1</i>	32
5.5 การตรวจหายีน <i>rcs1</i> และยีน <i>SAT1</i> ในรีคอมบิแนนต์พลาสมิด pBIH1-IG(SX)- <i>SAT1-rcs1</i> โดยวิธี PCR.....	33
5.6 การงอกต้นใหม่ของ cotyledon explant.....	34
5.7 ต้นอ่อนผักนึ่งที่สามารถทนต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้นสุดท้าย 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 เดือน.....	35
5.8 การตรวจหายีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตส(<i>rcs1</i>) บนดีเอ็นเอของผักนึ่งโดยวิธี PCR ใช้ดีเอ็นเอไพรเมอร์ <i>rcs1-1</i> และ <i>rcs1-2</i>	36
5.9 การตรวจหายีนประมวลรหัสเซอรินอะซิดิลทรานสเฟอเรส (ยีน <i>SAT1</i>) ในผักนึ่งโดยวิธี PCR ใช้ดีเอ็นเอไพรเมอร์ <i>JSAT3</i> และ <i>JSAT4</i>	37
5.10 การเปรียบเทียบสีของส่วนผสมปฏิกิริยาซึ่งเกิดจากกิจกรรมของซิสเตอีนซินเตสในใบของผักนึ่ง.....	38

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่	หน้า
ข.1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร.....	53
ค.1 แสดงตำแหน่งดีเอ็นเอไพรเมอร์ทั้ง 2 สายบนลำดับเบสของยีน <i>rsc1</i> (GenBank accession number AF073695) ขนาด 1,290 เบส ลำดับเบสที่ 74 – 1,039 เป็นบริเวณซึ่งแปลรหัสโปรตีน.....	55
ค.2 แสดงตำแหน่งดีเอ็นเอไพรเมอร์ทั้ง 2 สาย คือ JSAT3 และ JSAT4 บนลำดับเบสของยีน <i>SAT1</i> (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 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายอะซีติล-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 *Sa*II
S_n หมายถึง เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sna*BI
S_p หมายถึง เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Spn*I
S_s หมายถึง เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sac*I
X หมายถึง เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xba*I
Xb หมายถึง กิโลเบส



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย