ความทนต่อแคดเมียมของผักบุ้ง *Ipomoea aquatica* Forsk var. *aquatica* แปลงพันธุ์ที่มียีนเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสจาก *Arabidopsis thaliana* L. และยีนซิสเตอีนซินเตสจากข้าว *Oryza sativa* L.

นางสาวปาริชาติ มูลทองชุน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548
ISBN 974-14-1953-8
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CADMIUM TOLERANCE OF TRANSGENIC *Ipomoea aquatica* Forsk var. *aquatica* HARBOURING *Arabidopsis thaliana* L. SERINE ACETYLTRANSFERASE GENE AND RICE *Oryza sativa* L. CYSTEINE SYNTHASE GENE

Miss Parichart Moontongchoon

A thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology
Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2005
ISBN 974-14-1953-8

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความทนต่อแคดเมียมของผักบุ้ง *Ipomoea aquatica* Forsk var. *aquatica* แปลงพันธุ์ที่มียีนเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสจาก *Arabidopsis thaliana* L.และยีนซิสเตอีนซินเตสจากข้าว *Oryza sativa* L.
โดย	นางสาวปาริชาติ มูลทองชุน
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา อัครจรัลญา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐชนัญ ลีพิพัฒน์ไพบูลย์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภจิตรา ชัชวาลย์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

รองคณบดีฝ่ายบริหารรักษาราชการแทน

…………………….................คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. ธราพงศ์ วิทิตศานต์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

....อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา อัครจรัลญา)

....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐชนัญ ลีพิพัฒน์ไพบูลย์)

....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภจิตรา ชัชวาลย์)

....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

ปาริชาติ มูลทองชุน : ความทนต่อแคดเมียมของผักบุ้ง *Ipomoea aquatica* Forsk var. *aquatica* แปลงพันธุ์ที่มียีนเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสจาก *Arabidopsis thaliana* L. และยีนซิสเตอีนซินเตสจากข้าว *Oryza sativa* L. (CADMIUM TOLERANCE OF TRANSGENIC *Ipomoea aquatica* Forsk var. *aquatica* HARBOURING *Arabidopsis thaliana* L. SERINE ACETYLTRANSFERASE GENE AND RICE *Oryza sativa* L. CYSTEINE SYNTHASE GENE) อ.ที่ปรึกษา รศ.ดร. อัญชริดา อัครจรัลญา, ผศ. ดร. ณัฐชนัญ ลีพิพัฒน์ไพบูลย์, ผศ. ดร. ศุภจิตรา ชัชวาลย์; 80 หน้า. ISBN 974-14-1953-8

ถ่ายโอนยีนระบุรหัสเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสชนิดพลาสติดไอโซฟอร์ม (*SAT*1) จาก *Arabidopsis thaliana* L. และยีนระบุรหัสซิสเตอีนซินเตสชนิดไซโตโซลิกไอโซฟอร์ม (*rcs*1) จากข้าว *Oryza sativa* L. เข้าสู่ผักบุ้ง (*Ipomoea aquatica* Forsk var. *aqutica*) โดยการใช้ *Agrobacterium tumefaciens* EHA 101 ที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 จากใบเลี้ยงส่วนโคนพร้อมก้านใบ 4,175 ชิ้น ได้ต้นอ่อนที่งอกจากชิ้นส่วนของใบเลี้ยง 1,332 ต้น มีเพียง 2 ต้นที่สามารถทนต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร การตรวจสอบโดยวิธี PCR ยืนยันได้ว่า ผักบุ้งทั้ง 2 ต้นนี้มียีน *SAT*1 และ *rcs*1จริง เรียกผักบุ้ง 2 พันธุ์ที่ได้นี้ว่าผักบุ้งแปลงพันธุ์ Tr1 และ Tr2 แอกทิวิตีของเซอรีนแอซิทิลแทรนส์เฟอเรส และแอกทิวิตีของซิสเตอีนซินเตสในน้ำสกัดจากใบของผักบุ้งแปลงพันธุ์ Tr1 และ Tr2 สูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม 2.66, 2.89 เท่า และ 1.62, 1.79 เท่า ตามลำดับ ผักบุ้งแปลงพันธุ์ Tr1 และ Tr2 ทนต่อแคดเมียมได้มากกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม เมื่อเจริญ ในสภาวะที่มีแคดเมียมคลอไรด์เข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ผักบุ้งแปลงพันธุ์ Tr1 และ Tr2 มีปริมาณกรดอะมิโนซีสเตอีน และกลูตาไธโอน สูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม 1.50, 1.46 เท่า และ 1.68, 1.50 เท่า ตามลำดับ และมีความสูงของลำต้นและความยาวของรากเพิ่มขึ้นมากกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม ผักบุ้งทุกพันธุ์สะสมแคดเมียมในรากมากกว่าในลำต้นและใบ แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างปริมาณแคดเมียมที่สะสมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของผักบุ้งแปลงพันธุ์และผักบุ้งพันธุ์เดิม ดังนั้นกลไกการทนต่อแคดเมียมของผักบุ้งแปลงพันธุ์ที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *SAT*1และ *rcs*1 ที่เพิ่มขึ้นน่าจะเป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของการเติบโต

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา..... ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา.....2548..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4772371423 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD : *Ipomoea aquatica* / serine acetyltransferase / cysteine synthase

PARICHART MOONTONGCHOON: CADMIUM TOLERANCE OF TRANSGENIC *Ipomoea aquatica* Forsk var. *aquatica* HARBOURING *Arabidopsis thaliana* L. SERINE ACETYLTRANSFERASE GENE AND RICE *Oryza sativa* L. CYSTEINE SYNTHASE GENE. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF.ANCHARIDA AKRACHARANYA, THESIS COADVISOR: ASST. PROF. NATCHANAN LEEPIPATPIBOON, ASST. PROF.SUPACHITRA CHADCHAWAN, 80 pp.

ISBN 974-14-1953-8.

Arabidopsis thaliana L. serine acetyltransferase gene, plastid isoform (*SAT*1), and *Oryza sativa* L. cysteine synthase gene, cytosolic isoform (*rcs*1), were transformed into Pakbung (*Ipomoea aquatica* Forsk var. *aqutica*) using *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 harbouring recombinant plasmid pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1.From 4,137 cotyledon explants, 1,332 regenerated shoots were obtained and only 2 shoots were tolerated to 5 ug/ml hygromycin. Confirmation for the existence of *SAT*1 and *rcs*1 genes in the genome of the two hygromycin resistant shoots, Tr1 and Tr2, was done by polymerase chain reaction. Serine acetlytransferase activity and cysteine synthase activity in leaf extract of the transformants, Tr1 and Tr2 were 2.66, 2.89 and 1.62, 1.72 times higher than those of wild type, respectively. The transformants were more tolerant to cadmium than the wild type. When grown in medium containing 200 μM cadmium chloride, the transformants (Tr1, Tr2) contained cysteine and glutathione 1.50, 1.46 and 1.68, 1.50 times higher than those of the wild type, respectively and their shoot height and root length were more than the wild type. Cadmium was accumulated in roots more than in shoots, but there was no significant difference of cadmium content per dry weight of the transformants and wild type. This suggests that cadmium tolerance mechanism of the transgenic Pakbung containing *SAT*1 and *rcs*1 gene resulted from the increase in growth.

Department Microbiology Student's signature..

Field of study Industrial Microbiology Advisor's signature..

Academic year 2005 Co- advisor's signature..

Co- advisor's signature..

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา อัครจรัลญา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฐชนัญ ลีพิพัฒน์ไพบูลย์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภจิตรา ชัชวาลย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษา ความช่วยเหลือ แนวคิด ความรู้ และข้อคิดเห็นต่างๆในการทำงานวิจัยตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ซึ่งกรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์ ซึ่งเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆในการทำวิจัย และแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มอบทุนสนับสนุนกลุ่มวิทยานิพนธ์ ประจำปีการศึกษา 2548

ขอขอบคุณการไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย ที่ให้การสนับสนุนทุนการวิจัย

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่กรุณาให้ความรู้ ความช่วยเหลือและคำแนะนำต่างๆ ตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาตร์ ทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือคำปรึกษา และข้อคิดเห็นต่างๆ และรวมทั้ง พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนสำหรับความช่วยเหลือและกำลังใจที่ดีตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และทุกคนในครอบครัว ที่เป็นกำลังใจ และสนับสนุนทุกสิ่งทุกอย่างตลอดมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญภาพ	ฎ
บทที่	
1. บทนำ	1
2. วารสารปริทัศน์	5
3. เครื่องมือ เคมีภัณฑ์ เชื้อจุลินทรีย์ และพืชทดลอง	11
3.1 เครื่องมือ	11
3.2 สารเคมี	13
3.3 จุลินทรีย์ พลาสมิด และโอลิโกนิวคลีโอไทด์	13
3.4 พืชทดลอง	14
4. วิธีการทดลอง	15
4.1 การถ่ายโอน ยีน *SAT*1 ร่วมกับยีน *rcs*1 เข้าสู่ผักบุ้งไทย (*Ipomoea aquatica* Forsk var *aquatica*)	15
4.2 การสกัดดีเอ็นเอจากผักบุ้งตามวิธีของ Edward และคณะ (1991)	20
4.3 การเตรียมพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบของชุดควบคุมผลบวก (positive control) ในปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR ; polymerase chain reaction)	21
4.4 การตรวจหา ยีน *SAT*1 และยีน *rcs*1 โดยวิธี PCR	22
4.5 การหาขนาดของดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส	23
4.6 การหาแอกทิวิตีของซิสเตอีนซินเตสในผักบุ้ง (Youssifian และคณะ, 1993)	24
4.7 การหาแอกทิวิตีของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสในผักบุ้งตามวิธีของ Kredich และ Tomkins (1966)	25
4.8 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนในผักบุ้งโดยHPLC ตามวิธีของ Noctor และ Foyer (1998)	26

4.9 การเปรียบเทียบความทนต่อแคดเมียมของผักบุ้ง.. 28
4.10 การเปรียบเทียบปริมาณแคดเมียมที่สะสมในที่สะสมในเซลล์ของต้นผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์และผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์ที่มียีน *SAT*1 ร่วมยีน *rcs*1 กับผักบุ้งพันธุ์เดิม.. 32
4.11 การศึกษาลักษณะที่ปรากฏ (phenotype) ของผักบุ้ง.. 32
5. ผลการทดลอง.. 33
5.1 การถ่ายโอน ยีน *SAT*1 ร่วมกับยีน *rcs*1 เข้าสู่ผักบุ้งไทย (*Ipomoea aquatica* Forsk var. *aquatica*).. 33
5.2 ทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินของผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม (wild type) เพื่อใช้ในการคัดเลือกผักบุ้งไทยที่ได้รับการถ่ายโอนยีน.............. 33
5.3 คัดเลือกต้นอ่อนผักบุ้งไทยที่ต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน...................... 34
5.4 ตรวจหายีน *SAT*1 และยีน *rcs*1 ในดีเอ็นเอของผักบุ้งไทยที่สามารถต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินโดยวิธี PCR.. 35
5.5 วิเคราะห์แอกทิวิตีของซิสเตอีนซินเตสในผักบุ้งไทยตามวิธีของ Youssifian และคณะ (1993).. 37
5.6 วิเคราะห์แอกทิวิตีของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสในผักบุ้งไทยตามวิธีของ Kredich และTomkins (1966).. 39
5.7 วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนในผักบุ้งไทยโดยวิธี HPLC ตามวิธีของ Noctor และ Foyer (1998).. 39
5.8 ทดสอบความทนต่อแคดเมียมของผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม................................ 40
5.9 ทดสอบความทนต่อแคดเมี่ยมของผักบุ้งจีนพันธุ์เดิม................................... 41
5.10 เปรียบเทียบความทนต่อแคดเมียมของผักบุ้งไทย.................................... 41
5.11 วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนในผักบุ้งไทยที่เจริญในสภาวะที่มีแคดเมียมคลอไรด์โดยวิธีHPLC ตามวิธีของ Noctor และ Foyer (1998) 42
5.12 เปรียบเทียบความทนต่อแคดเมียมของผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ที่มียีน *SAT*1 และ ยีน *rcs*1 กับผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์ที่มียีน *SAT*1 และยีน *rcs*1 และผักบุ้งพันธุ์เดิม.. 43
5.13 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณแคดเมียมที่สะสมในผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ที่มียีน *SAT*1และยีน *rcs*1 กับผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์ที่มียีน *SAT*1 และยีน *rcs*1 และผักบุ้งพันธุ์เดิม.. 46
5.14 ผลการศึกษาลักษณะที่ปรากฏ (phenotype) ของผักบุ้ง........................... 46

6. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.. 48
รายการอ้างอิง.. 52
ภาคผนวก.. 58
ภาคผนวก ก.. 59
ภาคผนวก ข.. 63
ภาคผนวก ค.. 70
ภาคผนวก ง.. 75
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์... 80

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.3.2 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์	14
3.4 พืชทดลอง	14
5.1 การเปรียบเทียบแอกทิวิตีของซิสเตอีนซินเตสในใบผักบุ้งไทย	38
5.2 การเปรียบเทียบแอกทิวิตีของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสในใบผักบุ้งไทย	39
5.3 การเปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนในน้ำสกัดจากใบผักบุ้งไทย	40
5.4 การเปรียบเทียบการเจริญของต้นผักบุ้งไทยบนอาหารแข็ง MS ที่เติมแคดเมียมคลอไรด์ เข้มข้น 200 ไมโครโมล/ลิตร เป็นเวลา 14 วัน	42
5.5 การเปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนในน้ำสกัดจากใบผักบุ้งไทยเมื่อปลูกบนอาหารแข็ง MS ที่เติมแคดเมียมคลอไรด์ เข้มข้น 200 ไมโครโมล/ลิตร	43
5.6 เปรียบเทียบการเติบโตของต้นผักบุ้งบนอาหารแข็ง MS ที่เติมแคดเมียมคลอไรด์ เข้มข้น 200 ไมโครโมล/ลิตร	44
5.7 การเปรียบเทียบปริมาณแคดเมียมที่สะสมในผักบุ้ง	46
ง.1 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ T-test ของความสูงของลำต้นและความยาวของรากภายใน 14 วันของผักบุ้งจีนพันธุ์เดิมในสภาวะที่ไม่มีและมีแคดเมียมคลอไรด์ ($CdCl_2$) ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์	75
ง.2 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ T-test ของความสูงของลำต้นและความยาวของรากภายใน 14 วันของผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์ SR10 ในสภาวะที่ไม่มีและมีแคดเมียมคลอไรด์ ($CdCl_2$) ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์	76
ง.3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ T-testของความสูงของลำต้นและความยาวของรากภายใน 14 วันของผักบุ้งไทยพันธุ์เดิมในสภาวะที่ไม่มีและมีแคดเมียมคลอไรด์ ($CdCl_2$) ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์	77
ง.4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ T-test ของความสูงของลำต้นและความยาวของรากภายใน 14 วันของผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ Tr1ในสภาวะที่ไม่มีและมีแคดเมียมคลอไรด์ ($CdCl_2$) ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์	78
ง.5 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ T-test ของความสูงของลำต้นและความยาวของรากภายใน 14 วันของผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ Tr2 ในสภาวะที่ไม่มีและมีแคดเมียมคลอไรด์ ($CdCl_2$) ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์	79

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 กระบวนการ sulfate assimilation ของพืช...	5
2.2 โครงสร้างของไฟโตคีลาติน..	6
4.1 การเตรียมชิ้นส่วนใบเลี้ยงส่วนโคนพร้อมก้านใบของผักบุ้งไทย.................................	16
4.2 วิธีการทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินของผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม (wild type) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 2.5, 5 และ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร.......	17
4.3 การทำทรานสฟอร์เมชันของผักบุ้ง...	19
4.4 ลักษณะการเลี้ยงใบเลี้ยงส่วนโคนพร้อมก้านใบของผักบุ้งที่ผ่านการถ่ายโอนยีนภายใต้การควบคุมอุณหภูมิและแสง...	19
4.5 การทดสอบความทนต่อแคดเมียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 100, 200 และ 300 ไมโครโมลาร์ ของผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม (ก) ผักบุ้งจีนพันธุ์เดิม (ข)...................	29
4.6 การปลูกต้นผักบุ้งในอาหารแข็ง MS ที่มีแคดเมียมคลอไรด์ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 14 วัน..	31
5.1 ชิ้นส่วนใบเลี้ยงส่วนโคนพร้อมก้านใบซึ่งมีต้นอ่อนของผักบุ้งเจริญขึ้นมา....................	33
5.2 ผลการเจริญของผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม (wild type) บนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 2.5, 5 และ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร....................	34
5.3 ต้นอ่อนผักบุ้งไทยซึ่งทนต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรที่ได้..	35
5.4 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนยีน *SAT*1 จากดีเอ็นเอของผักบุ้งไทยที่สามารถต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินโดยวิธี PCR ด้วยไพร์เมอร์ JSAT5 และ JSAT6..	36
5.5 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนยีน *rcs*1 ในดีเอ็นเอของผักบุ้งไทยที่สามารถต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินโดยวิธี PCR ด้วยไพร์เมอร์ rcs1-1 และ rcs1-2.........	37
5.6 การเปรียบเทียบสีของปฏิกิริยาซึ่งเกิดจากแอกทิวิตีของซิสเตอีนซินเตสในผักบุ้งไทย....	38
5.7 เปรียบเทียบการเติบโตของผักบุ้งไทยพันธุ์เดิมบนอาหารแข็ง MS ที่มีแคดเมียมคลอไรด์ ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 100, 200 และ 300 ไมโครโมลาร์...............................	40
5.8 เปรียบเทียบการเติบโตของผักบุ้งจีนพันธุ์เดิมบนอาหารแข็ง MS ที่มีแคดเมียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0,100, 200 และ 300 ไมโครโมลาร์.......................................	41

5.9 เปรียบเทียบการเติบโตของผักบุ้งพันธุ์เดิมบนอาหารแข็ง MS ที่มีแคดเมียมคลอไรด์ เข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ และบนอาหารแข็ง MS ที่ไม่มีแคดเมียมคลอไรด์ เป็นเวลา 14 วัน........ 45

5.10 ลักษณะที่ปรากฏ (phenotype) ของต้นผักบุ้งไทยที่เจริญในอาหารเหลวสูตร Hoagland 47

ข.1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร........ 66

ข.2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธุ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโคเอนไซม์เอ และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร........ 67

ข.3 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นแคดเมียม และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 228.8 นาโนเมตร........ 69

ค.1 ตำแหน่งของยีนต่างๆบนพลาสมิด pBIHI-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 (17 kb)........ 70

ค.2 แผนที่ตำแหน่งโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ทั้ง 2 สาย บนลำดับเบสของยีน *rcs*1 (GenBank accession number AF073695) ขนาด 1,290 เบส ลำดับเบสที่ 74-1,039 เป็นบริเวณซึ่งแปลรหัสโปรตีน........ 71

ค.3 แผนที่ตำแหน่งโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ทั้ง 2 สาย บนลำดับเบสของยีน *SAT*1 (GenBank accession number L42212) ขนาด 1,079 เบส ลำดับเบสที่ 10-954 เป็นบริเวณซึ่งแปลรหัสโปรตีน........ 72

ค.4 โครมาโตแกรมของกรดอะมิโนซิสเตอีน (Cys) และกลูตาไธโอน (GSH) ในสารละลายมาตรฐาน น้ำสกัดจากใบของผักบุ้งไทยที่เจริญในอาหารเหลวสูตร Hoagland และน้ำสกัดจากใบผักบุ้งไทยที่เจริญบนอาหารแข็ง MS ที่มีแคดเมียมคลอไรด์เข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์........ 73

บทที่ 1

บทนำ

แคดเมียม (Cadmium) เป็นโลหะที่พบได้ในดิน เป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ความเป็นพิษสูงกว่าโลหะหนักชนิดอื่นๆ 2-20 เท่า (Vassilev และคณะ, 1998) หากร่างกายได้รับเข้าไปทีละน้อยจากการหายใจ กิน ดื่ม ก็จะเกิดพิษเรื้อรังทีละน้อย จนที่สุดอาจก่อให้เกิดอาการ ระบบหายใจผิดปกติ, ไตอักเสบ, ไตวาย, ข้อเสื่อม, ถุงลมโป่งพอง ความเข้มข้นเพียงเล็กน้อยสามารถทำให้เกิด มะเร็งในอวัยวะได้หลายชนิด (Vido, 2001) ความเข้มข้นที่ยอมให้มีได้ในดินบริเวณที่อยู่อาศัยคือ ไม่เกิน 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของดิน (Peterson และ Alloway, 1979) การปนเปื้อนของแคดเมียมในสิ่งแวดล้อมจึงเป็นปัญหามลพิษที่สำคัญยิ่ง ปัจจุบันพบพื้นดินที่มีการปนเปื้อนของแคดเมียมเพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้เป็นผลมาจากกิจกรรมทางอุตสาหกรรมบางชนิดเช่น การถลุงแร่, อุตสาหกรรมผลิตแบตเตอรี่ ตลอดจนการเพาะปลูก โดยเกิดจากการปนเปื้อนของแคดเมียมมากับปุ๋ยที่ใช้ นอกจากนี้ยังพบการแพร่กระจายของแคดเมียมจากดินลงสู่น้ำ (McGrath และคณะ, 2001) การบำบัดดินและน้ำที่ปนเปื้อนด้วยแคดเมียมทำได้หลายวิธี แต่วิธี phytoremediation หรือวิธีการใช้พืชที่มีความสามารถดูดซับแคดเมียมไปสะสมไว้ที่ลำต้นและใบในปริมาณที่สูงกว่าพืชโดยทั่วไปนั้นเป็นวิธีที่ง่าย ราคาถูกและไม่สูญเสียหน้าดิน (Raskin และ Ensley, 2000) พืชที่มีความเหมาะสมสำหรับ phytoremediation นั้นต้องสามารถดึงเอาโลหะหนักที่เกาะแน่นอยู่กับอนุภาคของดินออกมาได้ ต้องมีกลไลที่สามารถขนส่งโลหะหนักจากรากสู่ต้นและต้องสามารถสะสมโลหะหนักที่เป็นพิษไว้ในบริเวณซึ่งไม่มีผลรบกวนการทำงานของกระบวนการต่างๆของเซลล์พืชได้ ถึงแม้ว่าพืชที่มีการสะสมของแคดเมียมนั้นจะต้องนำมากำจัดแบบขยะอันตราย (hazardous waste) ภายหลัง แต่เป็นการลดจำนวนขยะพิษที่ต้องทำการกำจัดลงอย่างมาก (Raskin และ Ensley, 2000) พืชในธรรมชาติหลายชนิด พบว่าสามารถเจริญและสามารถสะสมแคดเมียมไว้ภายในเซลล์ได้สูงกว่าพืชทั่วไป พืชสามารถเจริญได้ในบริเวณที่มีแคดเมียมปนเปื้อนและสะสมแคดเมียมไว้ได้นั้น เนื่องจากพืชมีกระบวนการลดความเป็นพิษของแคดเมียมโดยการสร้างสารไฟโตคีลาติน (phytochelatin) ซึ่งสามารถจับกับแคดเมียมได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อน และสะสมสารประกอบเชิงซ้อนนี้ไว้ในแวคคิวโอล (vacuole)

เนื่องจากปริมาณของแคดเมียมที่พืชในธรรมชาติสามารถดูดมาจากดินหรือน้ำที่เจริญยังไม่สูงเท่าที่ต้องการ การนำมาใช้บำบัดแคดเมียมในสิ่งแวดล้อมโดยวิธีการ Phytoremediation จึงต้องปลูกจำนวนหลายรอบ (crop) มาก ทำให้ระยะเวลาการบำบัดโดยวิธีนี้นานเกินไป (Raskin และ Ensley, 2000) ไฟโตคีลาตินเป็นสารอินทรีย์ที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบ สังเคราะห์มาจากกลูตาไธโอน (glutathionone)(Rauser, 1995) ซึ่งมีกรดอะมิโนซิสเตอีน (cysteine) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญ

ดังนั้น การเพิ่มความสามารถของพืชในการสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีนน่าจะทำให้พืชสามารถทนและสะสมแคดเมียมไว้ในเซลล์ได้มากขึ้น เป็นการเพิ่มศักยภาพของพืชที่จะนำไปประยุกต์ใช้เพื่อการบำบัดแคดเมียมในสิ่งแวดล้อม เนื่องจากการสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีน เป็นการทำงานร่วมกันของเอมไซม์ 2 ชนิด คือ เซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสและซิสเตอีนซินเตส จอมขวัญ มีรักษ์ (2547) รายงานว่าผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์ที่มียีนเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสซึ่งไม่อยู่ภายใต้การยับยั้งแบบย้อนกลับโดยกรดอะมิโนซีสเตอีน จาก *Arabidopsis thaliana* L. (ยีน *SAT*1) และยีนซิสเตอีนซินเตสจากข้าว (*Oryza sativa* L.) (ยีน *rcs*1) สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนได้มากขึ้น ด้วยเหตุที่ว่าผักบุ้งไทย (*Ipomoea aqutica* Forsk var. *aquatica*) เป็นพืชน้ำหรือพืชที่ขึ้นบริเวณชายน้ำได้ดี เจริญเติบโตเร็วไม่ต้องการการดูแลเอาใจใส่มาก ทนโรคและแมลงได้ดีกว่าผักบุ้งจีน (*Ipomoea aqutica* Forsk var. *reptans*) (Palada และ Crossman, 1999) งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะสร้างผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์โดยการถ่ายโอนยีนเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสจาก *Arabidopsis thaliana* L. (ยีน *SAT*1) และยีนซิสเตอีนซินเตสจากข้าว (*Oryza sativa* L.) (ยีน *rcs*1) โดยวิธีการใช้ *Agrobacterium* แล้วเปรียบเทียบความทนต่อแคดเมียม และปริมาณแคดเมียมที่สะสมไว้ภายในเซลล์ กับผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เปรียบเทียบความทนต่อแคดเมียมและปริมาณแคดเมียมที่สะสมในต้นผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ที่มียีนเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสจาก *Arabidopsis thaliana* L. (ยีน *SAT*1) ร่วมกับยีนซิสเตอีนซินเตสจากข้าว (*Oryza sativa* L.) (ยีน *rcs*1) กับผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม

ขอบเขตของการวิจัย

1. ถ่ายโอนยีน *SAT*1 และยีน *rcs*1 เข้าสู่ใบเลี้ยงส่วนโคนพร้อมก้านใบของผักบุ้งไทย โดยใช้ *A. tumefaciens*
2. คัดเลือกต้นผักบุ้งไทยที่คาดว่ามียีน *SAT*1 และยีน *rcs*1
3. ตรวจหายีน *SAT*1 และ ยีน *rcs*1 ในผักบุ้งไทยที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 โดยวิธี PCR
4. เปรียบเทียบแอกทิวิตีของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสและซิสเตอีนซินเตสของผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ (ที่ได้จากข้อ 3) กับผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม (wild type)
5. เปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและปริมาณกลูตาไธโอนของผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ (ที่ได้จากข้อ 3) ผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม
6. เปรียบเทียบความทนต่อแคดเมียมของผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ (ที่ได้จากข้อ 3) ผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์ที่มียีน *SAT*1 และยีน *rcs*1 ผักบุ้งไทยและผักบุ้งจีนพันธุ์เดิม

7. เปรียบเทียบปริมาณแคดเมียมที่สะสมในผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ (ที่ได้จากข้อ 3) ผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์ที่มียีน *SAT*1 และยีน *rcs*1 ผักบุ้งไทยและผักบุ้งจีนพันธุ์เดิม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ที่มียีนเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสจาก *Arabidopsis thaliana* L. (ยีน *SAT*1) และยีนซิสเตอีนซินเตสจากข้าว (*Oryza sativa* L.) (ยีน *rcs*1) ซึ่งทนต่อแคดเมียมและสะสมแคดเมียมไว้ในเซลล์ได้สูง เพื่อใช้เป็นแนวทางในการสร้างพืชชนิดอื่นที่มนุษย์และสัตว์ไม่กินเจริญเร็ว ต้านทานโรคและแมลงได้ดี เพื่อนำไปใช้ในการบำบัดดินหรือน้ำที่ปนเปื้อนด้วยแคดเมียมต่อไป

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. ถ่ายโอนยีน *SAT*1 และยีน *rcs*1 เข้าสู่ใบเลี้ยงส่วนโคนพร้อมก้านใบของผักบุ้งไทย โดยใช้ *A. tumefaciens*

   1.1 แช่ชิ้นส่วนใบเลี้ยงส่วนโคนพร้อมก้านใบของผักบุ้งไทยในสารแขวนลอยเซลล์ *A. tumefaciens* EHA101ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 ซับให้แห้งโดยวิธีปราศจากเชื้อ วางบนอาหารแข็ง MS ที่เติมอะซิโตไซริงโอน บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืด 3 วัน

   1.2 ล้างเซลล์ *A. tumefaciens* EHA101 ออกจากใบเลี้ยงส่วนโคนพร้อมก้านใบด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่เติมสารละลายเซฟโฟแทคซีม (cefotaxime) แล้วเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงส่วนโคนพร้อมก้านใบบนอาหารแข็ง MMS ที่เติมสารละลายไธเดียซูรอน (thidiazuron) เพื่อกระตุ้นการสร้างต้น และเติมสารละลายเซฟโฟแทคซีม บ่มที่ 25 องศาเซลเซียสให้แสงสีขาว 16 ชั่วโมง/วัน เป็นเวลา 1 ถึง 2 เดือน

   1.3 นำต้นผักบุ้งที่ได้จากข้อ 1.2 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารละลายเซฟโฟแทคซีม บ่มที่ 25 องศาเซลเซียสให้แสงสีขาว 16 ชั่วโมง/วันจนได้ต้นอ่อนผักบุ้งที่สมบูรณ์

2. คัดเลือกต้นผักบุ้งไทยที่คาดว่ามียีน *SAT*1 และยีน rcs1

   นำต้นผักบุ้งที่ได้จากข้อ 1.3 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่เติมสารปฏิชีวนะเซพโฟเทคซีมและสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่ 25 องศาเซลเซียสให้แสงสีขาว 16 ชั่วโมง/วัน เป็นเวลา 1 เดือน ต้นที่ไม่ตายคาดว่ามียีน *SAT*1 และยีน *rcs*1

3. ตรวจหายีน *SAT*1 และ ยีน *rcs*1 ในผักบุ้งไทยที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 โดยวิธี PCR

   3.1 นำต้นผักบุ้งที่คาดว่ามียีน *SAT*1 และยีน *rcs*1 มาสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Edward และคณะ (1991)

3.2 ทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก ข้อ 3.1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์เพื่อเพิ่มยีน *SAT*1 และยีน *rcs*1

3.3 เปรียบเทียบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 3.2 กับดีเอ็นเอที่ได้เมื่อใช้ยีน *SAT*1 และยีน *rcs*1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส

4. เปรียบเทียบแอกทิวิตีของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสและซิสเตอีนซินเตสของผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ (ที่ได้จากข้อ 3) กับผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม (wild type)

   เตรียมน้ำสกัดจากใบผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ที่ได้จากข้อ 3 ผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม วิเคราะห์แอกทิวิตีของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสตามวิธีของ Kredich และคณะ (1980) และวิเคราะห์แอกทิวิตีของซิสเตอีนซินเตสตามวิธีของ Youssefian และคณะ (1993)

5. เปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและปริมาณกลูตาไธโอนในผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ (ที่ได้จากข้อ 3) ผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์ที่มียีน *SAT*1 และยีน *rcs*1 ผักบุ้งไทยและผักบุ้งจีนพันธุ์เดิม

   เตรียมน้ำสกัดจากใบผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ที่ได้จากข้อ 3 ผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและปริมาณกลูตาไธโอนตามวิธีของ Noctor และ Foyer (1998)

6. เปรียบเทียบความทนต่อแคดเมียมของผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ (ที่ได้จากข้อ 3) ผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์ที่มียีน *SAT*1 และยีน *rcs*1 ผักบุ้งไทยและผักบุ้งจีนพันธุ์เดิม

   ปลูกต้นผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ที่มียีน *SAT*1 และยีน *rcs*1 ผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์ที่มียีน *SAT*1 และยีน *rcs*1 ผักบุ้งไทยและผักบุ้งจีนพันธุ์เดิมบนอาหารแข็ง MS ที่เติมแคดเมียมความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เปรียบเทียบความทนต่อแคดเมียมของผักบุ้งไทยและจีนแปลงพันธุ์ ผักบุ้งไทยและผักบุ้งจีนพันธุ์เดิม โดยการเปรียบเทียบความสูงของลำต้น และความยาวของราก

7. เปรียบเทียบปริมาณแคดเมียมที่สะสมของผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ (ที่ได้จากข้อ 3) ผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์ที่มียีน *SAT*1 และยีน *rcs*1 ผักบุ้งไทยและผักบุ้งจีนพันธุ์เดิม

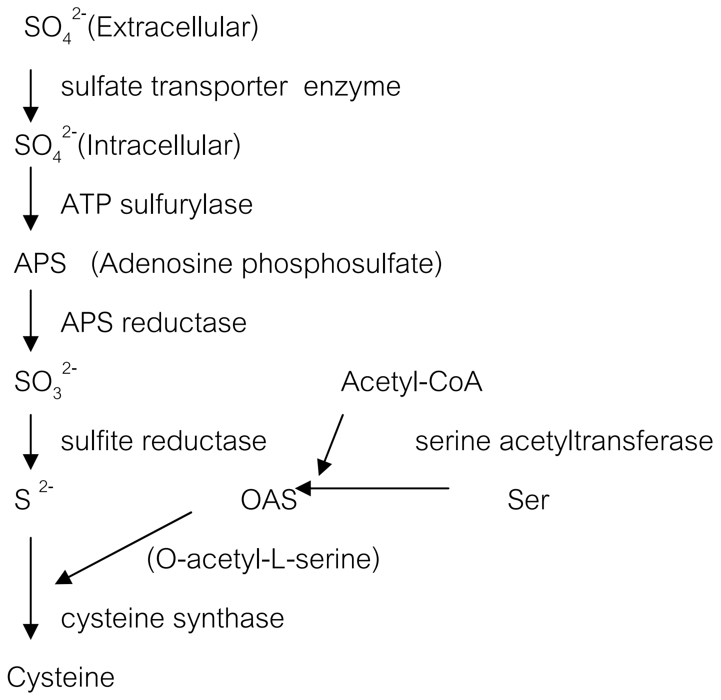
   แยกส่วนที่เป็นลำต้นและใบกับส่วนที่เป็นรากของต้นผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ (ที่ได้จากข้อ3) ผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์ที่มียีน *SAT*1 และยีน *rcs*1 ผักบุ้งไทยและผักบุ้งจีนพันธุ์เดิมที่เจริญบนอาหารแข็ง MS ที่เติมแคดเมียมที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ออกจากกัน ทำให้แห้งที่ 90 องศาเซลเซียสข้ามคืน ย่อยด้วยกรดไนตริกเข้มข้น แล้ววิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมในรากและในลำต้นและใบ ตามวิธีของ Lahner และคณะ 2003

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

แคดเมียมเป็นโลหะหนัก มีสีขาว ฟ้า วาว มีลักษณะเนื้ออ่อน มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น แบตเตอรี่อัลคาไลน์ โลหะผสมสี พลาสติก ยาฆ่าแมลง การหลอมโลหะ การนำแคดเมียมมาใช้ทำให้มีการปนเปื้อนของแคดเมียมในสิ่งแวดล้อม คือ อากาศ น้ำ ดิน และมีผลต่อเนื่องถึงอาหาร เมื่อมีการปนเปื้อนของแคดเมียมในสิ่งแวดล้อมมากๆจะเกิดการสะสมของแคดเมียมซึ่งเป็นพิษในร่างกายของมนุษย์และสัตว์ซึ่งเป็นอันตรายอย่างยิ่ง

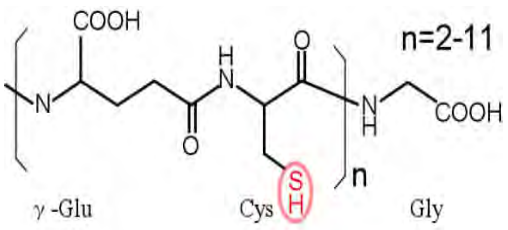
พืชในธรรมชาติหลายชนิดสามารถเจริญและสะสมแคดเมียมไว้ภายในต้นได้สูงกว่าพืชทั่วไป พบว่าการที่พืชสามารถเจริญในบริเวณที่มีแคดเมียมปนเปื้อนและสะสมแคดเมียมไว้ได้นั้นเนื่องจากพืชดูดซัลเฟตจากภายนอกเซลล์และนำมาสังเคราะห์เป็นกรดอะมิโนซิสเตอีนด้วยกระบวนการที่เรียกว่า sulfate assimilation (ภาพที่ 2.1) จากนั้นกรดอะมิโนซิสเตอีนจะถูกนำไปสังเคราะห์เป็นกรดอะมิโน และสารเมแทบอไลต์อื่นๆที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบ เช่น เมทไธโอนีน (methionine) กลูตาไธโอน (glutathione) เป็นต้น (Saito, 2000) หากในสภาวะที่พืชเจริญมีโลหะหนัก เช่น แคดเมียม (cadmium), ทองแดง (copper), เงิน (silver), สังกะสี (zinc) ปนเปื้อนพืชจะนำ



ภาพที่ 2.1 กระบวนการ sulfate assimilation ของพืช และเอนไซม์ควบคุม (Saito, 2000)

กลูตาไธโอนมาสังเคราะห์เป็นไฟโตคีลาติน (phytochelatin) (ภาพที่ 2.2) เพื่อมาจับกับโลหะหนักได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนแล้วสะสมสารประกอบเชิงซ้อนในแวคคิวโอล (vacuole) เป็นกลไกลดความเป็นพิษของโลหะหนัก ทำให้พืชสามารถทนพิษของโลหะหนักได้ (Cobbett, 2000)

เนื่องจากไฟโตคีลาตินเป็นสารอินทรีย์ที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบ สูตรโครงสร้างทั่วไปคือ (γ-Glu-Cys)$_n$-Gly (n = 2-11) ไฟโตคีลาตินสังเคราะห์มาจากกลูตาไธโอน (glutathione) ซึ่งมีสูตรโครงสร้างคือ (γ-Glu-Cys-Gly) (Rauser, 1995) และกลูตาไธโอนสังเคราะห์มาจากกรดอะมิโนซิสเตอีน (cysteine) ดังนั้นปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนภายในเซลล์จึงควบคุมกระบวนการสังเคราะห์กลูตาไธโอน (Strohm และคณะ, 1995) และเป็นปัจจัยจำกัด (limiting factor) ของปริมาณไฟโตคีลาติน ซึ่งส่งผลถึงความทนต่อโลหะหนักของพืชนั่นเอง (Kawashima และคณะ, 2004)



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของไฟโตคีลาติน

การสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีน เป็นการทำงานร่วมกันของเอมไซม์ 2 ชนิด คือ เซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสและซิสเตอีนซินเตส (Saito, 2000) ดังสมการ

$$\text{Serine + Acetyl-CoA} \xrightarrow{\text{Serine acetyltransferase (SAT1)}} \text{O-acetyl-L-serine (OAS)}$$

$$\text{OAS + Sulfide} \xrightarrow[\text{O-acetylserine (thiol) lyase (OASTL)}]{\text{Cysteine synthase (CS) /}} \text{Cysteine}$$

Ruffet และคณะ (1994) รายงานว่า เซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรส มีปริมาณและแอกทิวิตีต่ำกว่าซีสเตอีนซินเตสอย่างมาก ดังนั้น โออะซิติล-แอล-เซอรีน (O-acetyl-L-serine) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์

ของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรส จึงน่าจะเป็นปัจจัยจำกัด (limiting factor) ของการสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีน และเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสน่าจะเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีน

Noji และคณะ (1998) รายงานว่า *Arabidopsis thaliana* มีเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรส 3 ไอโซฟอร์มคือ plastid, mitochondrial และ cytosolic isoform แอกทิวิตีของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรส ชนิด mitochondrial และ cytosolic isoform ถูกยับยั้งด้วยกรดอะมิโนซิสเตอีนที่สร้างขึ้น ในขณะที่ชนิด plastid isoform ซึ่งแปลรหัสจาก ยีน *SAT*1 ไม่อยู่ภายใต้การควบคุมแบบย้อนกลับ (feedback inhibition) โดยกรดอะมิโนซิสเตอีน

Nakamura และคณะ (1999) โคลน cDNA ซึ่งระบุรหัสซิสเตอีนซินเตส 4 ไอโซฟอร์มจากข้าว *Oryza sativa* cv. Nipponbare คือ *rcs*1 *rcs*2 *rcs*3 *rcs*4 รายงานว่า ยีน *rcs*1 ซึ่งระบุรหัสซิสเตอีนซินเตสไอโซฟอร์มที่พบในไซโตพลาซึมที่โคลนได้ถอดรหัสได้ในทุกส่วนของข้าว

Howarth และคณะ (2003) ศึกษาการแสดงออกและการถูกควบคุมการแสดงออกโดยแคดเมียมของยีนในกลุ่มเซอรีนแอซิทิลแทรนส์เฟอเรสใน *A. thaliana* พบว่า ยีน SAT ทั้งหมด (*Sat*-5, Sat-1, *Sat*-52 และ *Sat*-106) มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในสภาวะที่มีแคดเมียมคลอไรด์ 50 ไมโครโมลาร์ *Sat*-5 ถูกชักนำให้มีการแสดงออกมากขึ้นบริเวณราก (root) คอร์เทกซ์ของลำต้น (stem cortex) แผ่นใบ (leaf lamella) และที่ขน trichome (trichome) ในภาวะที่ไม่มีโลหะหนักเมื่อตรวจสอบด้วย northern analysis พบการแสดงออกของ *Sat*-1 และ *Sat*-5 สูงมากในใบ พบการแสดงออก Sat-1 *Sat*-52 *Sat*-5 และ *Sat*-106 บริเวณเนื้อเยื่อลำต้น โดย *Sat*-52 มีการแสดงออกสูงที่สุด เมื่อพืชถูกเลี้ยงในสภาวะที่มีแคดเมียม *Sat*-1 *Sat*-52 และ Sat-5 ถูกชักนำให้มีการแสดงออกมากขึ้นในเนื้อเยื่อใบ ราก และลำต้น ส่วน *Sat*-106 นั้นการชักนำให้มีการเพิ่มการแสดงออกด้วยแคดเมียมยังไม่ชัดเจนนัก ในสภาวะที่มีแคดเมียมพบว่า SAT และ O-acetylserine มีส่วนเกี่ยวข้องในการควบคุมกระบวนการ sulphate reduction และการผลิตกรดอะมิโนซีสเตอีน (cysteine biosynthesis) ในพืช คาดว่า SAT แต่ละ isoforms ที่มีการแสดงออกจำเพาะในเนื้อเยื่อแต่ละชนิดมีหน้าที่เพิ่มการสร้างกรดอะมิโนซีสเตอีนภายใต้สภาวะที่มีโลหะหนัก เป็นผลให้มีการสร้างกลูตาไธโอนและไฟโตคีลาตินเพื่อลดความเป็นพิษของโลหะหนักในพืช (Dominguez-Solis และคณะ, 2001)

Harada (2001) ถ่ายโอนยีนระบุรหัสซิสเตอีนซินเตส (*rcs*1) ที่พบในไซโตซอลของข้าว (*Oryza sativa* L.) เข้าสู่ต้นยาสูบ (*Nicotiana tabacum* L.) และทดสอบความไวต่อแคดเมียมของ

ต้นยาสูบแปลงพันธุ์ที่ได้ พบว่าพืชแปลงพันธุ์มีแอกทิวิตีของซิสเตอีนซินเตสเพิ่มขึ้น 3 เท่าเมื่อเทียบกับพืชพันธุ์เดิม และพืชแปลงพันธุ์สามารถทนต่อแคดเมียมได้เนื่องจากมีการเติบโตที่ดีกว่าพืชพันธุ์เดิม พบมีปริมาณไฟโตคีลาตินมากกว่าพืชพันธุ์เดิมเมื่อเจริญในสภาวะที่มีแคดเมียม สันนิษฐานว่าแคดเมียมเป็นตัวชักนำให้พืชสร้างไฟโตคีลาตินและการที่พืชแปลงพันธุ์เจริญเร็วนั้นเป็นผลให้ความเข้มข้นของแคดเมียมต่อกรัมของน้ำหนักเปียกของต้นต่ำกว่าพืชพันธุ์เดิม 20% อีกด้วย

Dominguez-Solis และคณะ (2004) ศึกษาการทนและการสะสมแคดเมียมของ *Arabidopsis thaliana* แปลงพันธุ์ ที่มียีน *Atcys-3A* ซึ่งระบุรหัส cytosolic O-acetylserine (thiol) lyase (OASTL) หรือ ซิสเตอีนซินเตส และศึกษาการผลิตกรดอะมิโนซิสเตอีน ภายใต้สภาวะที่มีโลหะหนัก พบว่าในสภาวะที่ไม่มีโลหะหนัก (standard condition) พืชแปลงพันธุ์มีปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีน และกลูตาไธโอนเท่ากับพืชพันธุ์เดิม แต่ในสภาวะที่มีแคดเมียมพืชแปลงพันธุ์มีปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีน และกลูตาไธโอนมากกว่าพืชพันธุ์เดิม นอกจากนี้ยังพบว่าพืชแปลงพันธุ์สามารถอยู่รอดได้ในอาหารที่มีแคดเมียมเข้มข้น 400 ไมโครโมลาร์โดยมีการสะสมแคดเมียมในใบ เมื่อศึกษาผิวชั้นนอกของใบ (epidermal leaf surface) พบว่าแคดเมียมส่วนใหญ่ถูกสะสมไว้ที่ขน trichome ของใบดังนั้นการเพิ่มการสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีนให้มากขึ้นนั้นจำเป็นสำหรับการเพิ่มความสามารถในการทนต่อแคดเมียมและการสะสมแคดเมียมไว้ที่ขนของใบพืช

เมื่อศึกษาการทนต่อโลหะหนัก ได้แก่ แคดเมียม ซิลิเนียม นิกเกิล ฯลฯ ของต้นยาสูบ (tobacco) (*Nicotiana tabacum* L.) แปลงพันธุ์ซึ่งได้ทำให้กระบวนการถอดรหัสของยีนซีสเตอีนซินเตสเพิ่มขึ้นในไซโตซอล, คลอโรพลาสต์ และทั้งไซโตซอลและคลอโรพลาสต์ พบว่านอกจากมีผลทำให้ปริมาณกรดอะมิโนซีสเตอีนและกลูตาไธโอนเพิ่มขึ้นแล้ว (Noji และคณะ, 2001) ยังทำให้สามารถทนต่อแคดเมียมที่ความเข้มข้นซึ่งเป็นพิษและมีปริมาณแคดเมียมสะสมอยู่ในต้นสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับต้นยาสูบพันธุ์เดิม (Kawashima และคณะ, 2004) โดยคาดว่าปริมาณกลูตาไธโอนที่เพิ่มขึ้นเป็นผลให้พืชสร้างสารไฟโตคีลาตินซึ่งจับกับแคดเมียมได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนเพิ่มขึ้นและสะสมสารประกอบเชิงซ้อนนี้ไว้ในแวคคิวโอล (vacuole) ดังนั้นการเพิ่มการสังเคราะห์กรดอะมิโนซีสเตอีนจะทำให้พืชทนต่อแคดเมียมได้มากขึ้นและสามารถนำไปใช้บำบัดแคดเมียมจากดินที่ปนเปื้อนได้

Sun และคณะ (2005) รายงานว่า ต้นข้าวสาลี *(Triticum aestivum* L.) ที่เจริญในสภาวะที่มีแคดเมียมมีปริมาณกลูตาไธโอนและไฟโตคีลาตินเพิ่มสูงขึ้นเนื่องจากแคดเมียมกระตุ้นแอกทิวิตีของไฟโตคีลาตินซินเตสและแอกทิวิตีของไฟโตคีลาตินซินเตสในรากสูงกว่าในต้น ทำให้ไฟโตคีลาตินเพิ่ม

ในรากมากกว่าในต้น แคดเมียมกระตุ้นการแสดงออกของยีนซึ่งเป็นรหัสของเอมไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์กลูตาไธโอนทำให้ปริมาณของกลูตาไธโอนเพิ่มขึ้นอีกด้วย

Meerak และคณะ (2006) ถ่ายโอนยีนเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสซึ่งไม่อยู่ภายใต้การควบคุมแบบย้อนกลับโดยกรดอะมิโนซิสเตอีนจาก *Arabidopsis thaliana* L. (ยีน *SAT*1) และยีนซิสเตอีนซินเตสจากข้าว *Oryza sativa* L. (ยีน *rcs*1) เข้าสู่ผักบุ้งจีน ผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์ที่ได้มีแอกทิวิตีของซิสเตอีนซินเตสและเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสสูงกว่าผักบุ้งจีนพันธุ์เดิม 3 และ 2 เท่าตามลำดับ การสังเคราะห์กรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนสูงกว่าผักบุ้งจีนพันธุ์เดิม 6 และ 2 เท่าตามลำดับ และประสิทธิภาพการดูดซับซัลเฟตต่อกรัมน้ำหนักสดของผักบุ้งมากกว่าผักบุ้งจีนพันธุ์เดิม 5 เท่า และพบว่าผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์มีขนาดใบใหญ่กว่าผักบุ้งจีนพันธุ์เดิมและมีน้ำหนักสดเพิ่มขึ้น 20 เปอร์เซ็นต์มากกว่าผักบุ้งจีนพันธุ์เดิมเมื่อปลูกในอาหารเหลวสูตร Hoagland แอกทิวิตีของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสและซิสเตอีนซินเตสที่เพิ่มขึ้นไม่เพียงแต่ทำให้การดูดซับซัลเฟตของผักบุ้งแปลงพันธุ์เพิ่มมากขึ้นยังมีผลทำให้น้ำหนักมวลของผักบุ้งแปลงพันธุ์เพิ่มขึ้นด้วย

การปรับปรุงพันธุ์พืชโดยวิธีทางพันธุวิศวกรรมอาจทำได้โดยการถ่ายโอนยีนโดยตรง เช่น วิธีอิเล็กโทรพอเรชัน (electroporation) วิธีการใช้เข็มฉีด (microinjection) หรือวิธีการใช้เครื่องยิงอนุภาค (microprojectile bombardment) และทำการถ่ายโอนยีนโดยวิธีการใช้ *Agrobacterium* ซึ่งวิธีการใช้ *Agrobacterium* นี้ใช้ได้ดีกับพืชใบเลี้ยงคู่ (dicotyledon) และเป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุด *Agrobacterium tumefaciens* เป็นแบคทีเรียกรัมลบอาศัยอยู่ในดิน สามารถเข้าสู่เซลล์พืชได้ทางบาดแผลทำให้พืชมีลักษณะเป็นปุ่มปม เรียกว่า crown gall disease (Sahi และคณะ, 1994) ทั้งนี้เพราะ *A. tumefaciens* สามารถถ่ายโอนยีนส่วน T-DNA เข้าสู่โครโมโซมของพืช ยีนส่วน T-DNA มียีนซึ่งระบุรหัสโปรตีนในกระบวนการสังเคราะห์ฮอร์โมนพืชชนิดออกซิน (auxin) และไซโตไคนิน (cytokinins) จึงทำให้เซลล์พืชแบ่งตัวอย่างรวดเร็วและไม่จำกัดเกิดเป็นปุ่มปมหรือก้อนเนื้องอก หลักการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์พืชโดยวิธีการใช้ *Agrobacterium* ทำโดยการกำจัดยีนระบุรหัสโปรตีนในกระบวนการสังเคราะห์ฮอร์โมนพืชออกจากยีนส่วนT-DNAแล้วนำยีนที่ต้องการถ่ายโอนเข้ามาสอดแทรกแทน เมื่อยีนส่วน T-DNA สอดแทรกเข้าไปในโครโมโซมของพืช ยีนที่ต้องการถ่ายโอนก็จะถูกนำเข้าไปด้วย Jameและคณะ (1993) รายงานว่าอะซิโตไซริงโอน (acetosyringone) สามารถเร่งการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์พืชโดยวิธีการใช้ *A. tumefaciens*

Hood และคณะ (1986) ได้สร้างพลาสมิดชนิดไบนารีประกอบด้วยพลาสมิดสำหรับสร้างพลาสมิดรีคอมบิแนนท์ซึ่งมียีนส่วน T-DNA และในบริเวณยีนส่วน T-DNA มียีนต้านต่อสารปฏิชีวนะและพลาสมิดดัดแปลง Ti ซึ่งมีกลุ่มยีน *vir* เรียกพลาสมิดชนิดนี้ว่า pEHA101 และเรียก *A. tumefaciens* ที่มีพลาสมิด pEHA101 นี้ว่า *A. tumefaciens* EHA101 ต่อมา Kimura และคณะ (1993) ได้สร้างพลาสมิด pBIH1-IG ซึ่งเป็นพลาสมิดชนิดไบนารีชนิดที่มียีนต้านสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินและกานามัยซินอยู่ในบริเวณ T-DNA พลาสมิดรีคอมบิแนนท์ที่สร้างจาก pBIH1-IG เมื่อนำมาถ่ายโอนเข้าสู่ *A. tumefaciens* EHA101 พบว่าทรานสฟอร์แมนท์ *A. tumefaciens* EHA101 ที่ได้มีประสิทธิภาพสูงในการถ่ายโอนยีนสอดแทรกเข้าสู่โครโมโซมของ *Arabidopsis thaliana* L. และข้าว (Hiei และคณะ, 1994)

Akaracharanya และคณะ (2001) ศึกษาการเจริญเป็นต้นใหม่ (shoot regeneration) ของผักบุ้งจีน พบว่าชิ้นส่วนใบเลี้ยงส่วนโคนพร้อมก้านใบสามารถงอกเป็นต้นใหม่ได้ในปริมาณสูงถึง 75 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ต้นอ่อนอายุ 7 วัน และใช้ไธเดียซูรอน (thidiazuron) ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ในการเร่งการพัฒนาเป็นต้นอ่อน และต้นอ่อนของผักบุ้งจีนที่ได้สามารถงอกรากได้เองโดยไม่จำเป็นต้องใช้สารเร่งการงอกราก

Frame และคณะ (2002) รายงานว่าการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ข้าวโพดโดยใช้ *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 ที่มีพลาสมิดชนิดไบนารีเป็นวิธีการถ่ายโอนยีนที่ดีกว่าการใช้เครื่องยิงอนุภาค เนื่องจากมีความเสถียร (stable) ประสิทธิภาพสูงและสามารถถ่ายโอนดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ได้

บทที่ 3

เครื่องมือ เคมีภัณฑ์ จุลินทรีย์ และพืชทดลอง

3.1 เครื่องมือ

3.1.1 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (DNA thermal cycler) รุ่น 2400 ของบริษัท Perkin Elmer, USA.

3.1.2 ชุดเครื่องมืออะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (agarose gel electrophoresis equipment) ของบริษัทMupid, Japan.

3.1.3 เครื่องกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (UV transillumination) รุ่น Universal Hood ของบริษัท Bio-Rad Laboratories Ltd., USA.

3.1.4 อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ
กล้องระบบดิจิตอล รุ่น C-5060WZ ของบริษัท Olympus, Japan.
กล้องถ่ายภาพโพลารอยด์ ของบริษัท Polaroid, USA.
ฟิล์มโพลารอยด์ ความไวแสง 3000 (ISO 3000)
gel documentation รุ่น Universal Hood และโปรแกรม Quantity one version 4.4.1 ของบริษัท Bio-Rad, USA.

3.1.5 เครื่องเขย่า (shaker)
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ เขย่าแบบรีซิโปรคอล รุ่น Gyromax TM737 ของบริษัท Amerex Instrument, USA.
เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิด้วยน้ำ (water bath shaker) เขย่าแบบรีซิโปรคอล รุ่น 1068 ของบริษัท Gesellschaft fuer lobortechnik (GEL)., Germany; รุ่น SS40-D ของบริษัท Grant Instrument (Combridge) Ltd., England.

3.1.6 ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ (incubator) รุ่น BE600 ของบริษัท Memmert, Germany.

3.1.7 เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS325 ของบริษัท Tomy Seiko, Japan.

3.1.8 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น PP-50 ของบริษัท Mettler, Switzerland

3.1.9 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิได้ (refrigerated centrifuge) รุ่น 1920 ของบริษัท Kubota, Japan.

- หัวปั่นเหวี่ยง (roter) ขนาดเล็ก รุ่น RA 50J
- หัวปั่นเหวี่ยงขนาดใหญ่ รุ่น RA 228J

3.1.10 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV/VIS spectrophotometer) รุ่น UV 1604 ของบริษัท Shimadzu, Japan.

3.1.11 เครื่องชั่งรุ่น PB3002 และ AG204 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland.

3.1.12 ตู้เขี่ยเชื้อแบบ laminar flow รุ่น H2 ของบริษัท Lab service, Thailand.

3.1.13 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น MDF-U332 ของบริษัท Sunyo, Japan.

3.1.14 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส รุ่นULT 1786 ของบริษัท Forma Scientific, USA.

3.1.15 ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น Schutzart ของบริษัท Memmert , Germany.

3.1.16 ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสีขาวความเข้มแสง 3000 ลักซ์ ระยะเวลาการให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน

3.1.17 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ของบริษัท Kottermenn, Germany.

3.1.18 เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น G560E ของบริษัท Scientific Industries, USA.

3.1.19 ตู้บ่มควบคุมแสง และอุณหภูมิ (plant growth chamber) รุ่น EYELA FLI-301N ของบริษัทTokyo Rikakikai, Japan.

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารเคมี

สารเคมีทุกชนิดที่ใช้ในการวิจัยนี้เป็นระดับเพื่อการวิเคราะห์ (analytical grade)

3.2.2 ชุดทำปฏิกิริยา พีซีอาร์ (พีซีอาร์ reagent Kit) ของบริษัท Takara Bio Inc., Japan.

3.2.3 ชุดสกัดพลาสมิด (QIAprep spin miniprep kit) ของบริษัท QIAGEN Inc, USA. และของบริษัท Sigma-Aldrich Co, USA.

3.2.4 ชุดแยกแถบดีเอนเอออกจากเจล (QIAquick gel extraction kit) ของบริษัท QIAGEN Inc, USA.

3.3 จุลินทรีย์ พลาสมิด และโอลิโกนิวคลีโอไทด์

3.3.1 จุลินทรีย์

Agrobacterium tumefaciens สายพันธุ์ EHA101 ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 (จอมขวัญ มีรักษ์, 2547)

3. 3.2 โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์

โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์	**ลำดับนิวคลีโอไทด์** (T_m)	**รายการอ้างอิง**
rcs1-1	5’ TGTCAGATCGATTCCTGACG 3’ (60°C)	Nara Institute of Science and Technology, Japan.
rcs1-2	5’ TGATGGACTGGAAGAGCACC 3’ (62°C)	Nara Institute of Science and Technology, Japan.
JSAT5	5’-CTACGCTTCGATCACATCTCA-3’ (60°C)	Meerak และคณะ,2006
JSAT6	5’-ATCACATAATCAGACCACTCGG-3’ (64°C)	Meerak และคณะ,2006

3.4 **พืชทดลอง**

พืชทดลอง	**จีโนไทป์/ฟีโนไทป์**	**รายการอ้างอิง**
ผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม (*Ipomoea aquatica* Forsk var. *aquqtica*)	ผักบุ้งไทยพันธุ์เดิมที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน	อำเภอ พนมไพ จังหวัดร้อยเอ็ด, ประเทศไทย
Transgenic 1 (Tr1)	ผักบุ้งไทยที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *SAT*1 ร่วมกับยีน *rcs*1	สร้างในการทดลองนี้
Transgenic 2 (Tr2)	ผักบุ้งไทยที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *SAT*1 ร่วมกับยีน *rcs*1	สร้างในการทดลองนี้
ผักบุ้งจีนพันธุ์เดิม (*Ipomoea aquatica* Forsk var. *reptans*)	ผักบุ้งจีนพันธุ์เดิมที่ไม่ได้รับการถ่ายโอนยีน	บริษัทเจียไต๋ จำกัด, ประเทศไทย
SR10	ผักบุ้งจีนที่ได้รับการถ่ายโอนยีน *SAT*1 ร่วมกับยีน *rcs*1	จอมขวัญ มีรักษ์, 2547

บทที่ 5

ผลการทดลอง

5.1 ถ่ายโอนยีน *SAT*1 ร่วมกับยีน *rcs*1 เข้าสู่ผักบุ้งไทย (*Ipomoea aquatica* Forsk var. *aquatica*)

ผลการถ่ายโอนยีน *SAT*1 ร่วมกับยีน *rcs*1 เข้าสู่ผักบุ้งไทย โดยวิธีการใช้ *A. tumefaciens* EHA101 ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 พบว่าชิ้นส่วนใบเลี้ยงส่วนโคนพร้อมก้านใบ 4,175 ชิ้น สามารถงอกเป็นต้นใหม่ (regenerated shoot) (ภาพที่ 5.1) 1,332 ต้น คิดเป็น 31.90 เปอร์เซ็นต์

ภาพที่ 5.1 ชิ้นส่วนใบเลี้ยงส่วนโคนพร้อมก้านใบ ซึ่งมีต้นอ่อนของผักบุ้งเจริญขึ้นมา

5.2 ทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินของผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม (wild type) เพื่อใช้ในการคัดเลือกผักบุ้งไทยที่ได้รับการถ่ายโอนยีน

ผลการปลูกต้นอ่อนผักบุ้งไทยพันธุ์เดิมที่มีความสูง 1.5 เซนติเมตรลงบนอาหารแข็ง MS ที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 2.5, 5 และ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสีขาวความเข้ม 3,000 ลักซ์ ระยะเวลาการให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน 7 วัน พบว่าต้นผักบุ้งซึ่งเจริญในสภาวะที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินมีการเติบโต

ต่ำกว่าในสภาวะที่ไม่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินอย่างชัดเจนเมื่อความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินสูงขึ้น (ภาพที่ 5.2) เลือกใช้ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในการคัดเลือกต้นผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ที่คาดว่าน่าจะได้รับการถ่ายโอนยีน *SAT*1 และ *rcs*1

ภาพที่ 5.2 ผลการเจริญของผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม (wild type) บนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 2.5, 5 และ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

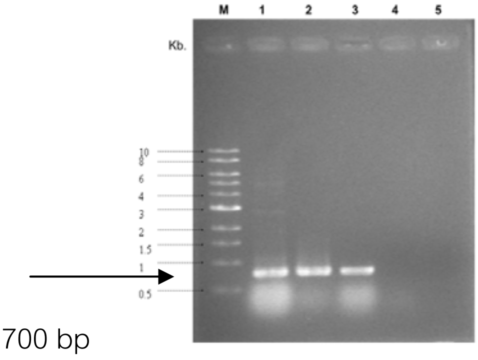
5.3 คัดเลือกต้นอ่อนผักบุ้งไทยที่ต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน

ผลการย้ายต้นอ่อนของผักบุ้งที่เจริญจากชิ้นส่วนใบเลี้ยงส่วนโคนพร้อมก้านใบ จำนวน 1,332 ต้น (ผลจากข้อ 5.1) มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ซึ่งเติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรและเติมสารปฏิชีวนะเซฟโฟแทคซิมความเข้มข้นสุดท้าย 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสีขาวความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ระยะเวลาการให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน เป็นเวลา 1 เดือน พบว่ามีต้นอ่อนผักบุ้งที่สามารถทนต่อสาร ปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรได้ 2 ต้น (ภาพที่ 5.3) คิดเป็น 0.15 เปอร์เซ็นต์ของต้นอ่อนทั้งหมดที่ทดสอบ

ภาพที่ 5.3 ต้นอ่อนผักบุ้งไทยซึ่งทนต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรที่ได้

5.4 ตรวจหายีน *SAT*1 และยีน *rcs*1 ในดีเอ็นเอของผักบุ้งไทยที่สามารถต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินโดยวิธี PCR

การตรวจหายีน *SAT*1 และยีน *rcs*1 ในดีเอ็นเอของผักบุ้งที่สามารถต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินโดยวิธี PCR ทำโดยนำดีเอ็นเอที่สกัดจากผักบุ้งไทยที่สามารถเจริญบนอาหารที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 เดือน มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการ PCR ใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ JSAT5 และ JSAT6 สำหรับการตรวจหายีน *SAT*1 วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส พบว่าได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดของดีเอ็นเอที่จะได้เมื่อใช้ยีน *SAT*1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (ภาพที่ 5.4) และใช้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ rcs1-1 และ rcs1-2 สำหรับการตรวจหายีน *rcs*1 วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส พบว่าได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส ซึ่งเป็นขนาดของดีเอ็นเอที่จะได้เมื่อใช้ยีน *rcs* 1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (ภาพที่ 5.5) แสดงว่าต้นผักบุ้งทั้ง 2 พันธุ์ที่ทดสอบได้รับการถ่ายโอนยีน *SAT*1 และ *rcs*1 จากพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 เรียกต้นผักบุ้งทั้ง 2 พันธุ์นี้ว่าผักบุ้งแปลงพันธุ์ Tr1 และ Tr2 เมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม (wild type) เป็นดีเอ็นเอแม่แบบไม่ได้แถบดีเอ็นเอใดๆ



ภาพที่ 5.4 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนยีน *SAT*1 จากดีเอ็นเอของผักบุ้งไทยที่สามารถต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินโดยวิธี PCR ด้วยไพร์เมอร์ JSAT5 และ JSAT6

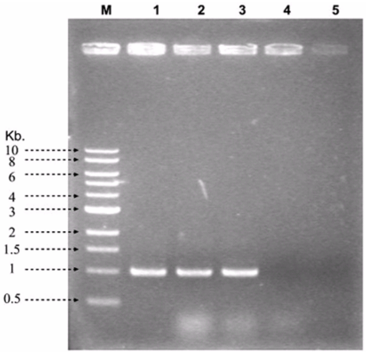
M หมายถึง ดีเอ็นเอแลดเดอร์ขนาดตั้งแต่ 0.5-10 กิโลเบส

ช่องวิ่งที่ 1 หมายถึง ใช้พลาสมิด pGEM-*SAT*1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (ชุดควบคุมบวก)

ช่องวิ่งที่ 2 และ 3 ใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ Tr1 และ Tr2 ตามลำดับ เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

ช่องวิ่งที่ 4 หมายถึง ใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม (wild type) เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

ช่องวิ่งที่ 5 หมายถึง ชุดควบคุมไม่ใส่ดีเอ็นเอแม่แบบ (ชุดควบคุมลบ)



ภาพที่ 5.5 ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนยีน *rcs*1 ในดีเอ็นเอของผักบุ้งไทยที่สามารถต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินโดยวิธี PCR ด้วยไพร์เมอร์ rcs1-1 และ rcs1-2

M หมายถึง ดีเอ็นเอแลดเดอร์ขนาดตั้งแต่ 0.5 -10 กิโลเบส

ช่องวิ่งที่ 1 หมายถึง ใช้ *rcs*1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (ชุดควบคุมบวก)

ช่องวิ่งที่ 2 และ 3 ใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ Tr1 และ Tr2 ตามลำดับ เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

ช่องวิ่งที่ 4 หมายถึง ใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม (wild type) เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ

ช่องวิ่งที่ 5 หมายถึง ชุดควบคุมไม่ใส่ดีเอ็นเอแม่แบบ (ชุดควบคุมลบ)

5.5 วิเคราะห์แอกทิวิตีของซิสเตอีนซินเตสในผักบุ้งไทยตามวิธีของ Youssifian **และคณะ** (1993)

ผลการวิเคราะห์แอกทิวิตีของซิสเตอีนซินเตสในน้ำสกัดจากใบผักบุ้งไทยซึ่งเจริญในอาหารเหลว Hoagland พบว่าผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ที่มียีน *SAT*1 ร่วมกับยีน *rcs*1 (ผักบุ้งแปลงพันธุ์ Tr1และ Tr2) มีแอกทิวิตีของซิสเตอีนซินเตสสูงกว่าผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม (ภาพที่ 5.6 และตารางที่ 5.1) ผักบุ้งแปลงพันธุ์ Tr1 มีแอกทิวิตีจำเพาะของซิสเตอีนซินเตส 1.18 หน่วยเอนไซม์/มิลลิกรัมโปรตีน และTr2 มีแอกทิวิตีจำเพาะของซิสเตอีนซินเตส 1.31 หน่วยเอนไซม์/มิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งสูงกว่าผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม 1.62 และ 1.79 เท่าตามลำดับ

ภาพที่ 5.6 การเปรียบเทียบสีของปฏิกิริยาซึ่งเกิดจากแอกทิวิตีของซิสเตอีนซินเตสในผักบุ้งไทย
แถวบน หมายถึงหลอดซึ่งเติมน้ำสกัดจากใบผักบุ้งแต่หยุดปฏิกิริยาทันทีที่เวลา 0 นาที
แถวล่าง หมายถึงหลอดซึ่งเติมน้ำสกัดจากใบผักบุ้งแต่หยุดปฏิกิริยาหลังเวลา 15 นาที
หลอดที่ 1 คือ ชุดควบคุมเติมเอ็กแทรกชั่นบัฟเฟอร์แทนน้ำสกัดจากใบผักบุ้ง
หลอดที่ 2 คือ น้ำสกัดจากใบผักบุ้งพันธุ์เดิม
หลอดที่ 3 คือ น้ำสกัดจากใบผักบุ้งแปลงพันธุ์ที่มียีน *SAT*1 ร่วมกับยีน *rcs*1 (Tr1)
หลอดที่ 4 คือ น้ำสกัดจากใบผักบุ้งแปลงพันธุ์ที่มียีน *SAT*1 ร่วมกับยีน *rcs*1 (Tr2)

ตารางที่ 5.1 การเปรียบเทียบแอกทิวิตีจำเพาะของซิสเตอีนซินเตสในใบผักบุ้งไทย

ผักบุ้ง	แอกทิวิตีจำเพาะของซิสเตอีนซินเตส (หน่วยเอนไซม์/มิลลิกรัมโปรตีน)	ปริมาณที่เพิ่มขึ้น (เท่า)
พันธุ์เดิม	0.73 ±0.047	1
แปลงพันธุ์ Tr1	1.18±0.084	1.62
แปลงพันธุ์ Tr2	1.31±0.046	1.79

5.6 วิเคราะห์แอกทิวิตีของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสในผักบุ้งไทยตามวิธีของ Kredich และTomkins (1966)

ผลการวิเคราะห์แอกทิวิตีของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสในน้ำสกัดจากใบของผักบุ้งไทยเจริญในอาหารเหลว Hoagland โดยการวัดปริมาณโคเอนไซม์เอ (Co-A SH) ที่เกิดขึ้น พบว่าผักบุ้งแปลงพันธุ์ Tr1 และ Tr2 มีแอกทิวิตีจำเพาะของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสสูงกว่าผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม (ตารางที่ 5.2) ผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ Tr1 และTr 2 มีแอกทิวิตีจำเพาะของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรส 3.09 และ 3.36 หน่วยเอนไซม์/มิลลิกรัมโปรตีนซึ่งสูงกว่าผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม 2.66 และ 2.89 เท่า ตามลำดับ

ตารางที่ 5.2 การเปรียบเทียบแอกทิวิตีจำเพาะของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสในใบผักบุ้งไทย

ผักบุ้ง	แอกทิวิตีจำเพาะของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรส (หน่วยเอนไซม์/มิลลิกรัมโปรตีน)	ปริมาณที่เพิ่มขึ้น (เท่า)
พันธุ์เดิม	1.16 ±0.015	1
แปลงพันธุ์ Tr1	3.09 ± 0.062	2.66
แปลงพันธุ์ Tr2	3.36 ±0.018	2.89

5.7 วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนในผักบุ้งไทยโดยวิธี HPLC ตามวิธีของ Noctor และ Foyer (1998)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนในน้ำสกัดจากใบผักบุ้งไทยเจริญในอาหารเหลว Hoagland พบว่าในน้ำสกัดที่ได้จากใบ 1 กรัม ผักบุ้งแปลงพันธุ์ Tr1 และ Tr2 มีกรดอะมิโนซิสเตอีน 0.81 ไมโครโมลและ 0.71 ไมโครโมล ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับปริมาณที่พบในน้ำสกัดจากใบของผักบุ้งพันธุ์เดิม ซึ่งมีปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีน 0.74 ไมโครโมล ในน้ำสกัดจากใบของผักบุ้งแปลงพันธุ์ Tr1 และ Tr2 1 กรัม พบว่าปริมาณกลูตาไธโอนของผักบุ้งแปลงพันธุ์ Tr1 และ Tr2 เท่ากับ 29.50 ไมโครโมลและ 23.34 ไมโครโมล ตามลำดับ สูงกว่าปริมาณที่พบในน้ำสกัดจากใบของผักบุ้งพันธุ์เดิม 1.48 เท่าและ 1.17 เท่า ตามลำดับ (ตารางที่ 5.3)

ตารางที่ 5.3 การเปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนในน้ำสกัดจากใบผักบุ้งไทย

ผักบุ้งไทย	ปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีน (ไมโครโมล/ใบ 1 กรัม)	เท่า	ปริมาณกลูตาไธโอน (ไมโครโมล/ใบ 1กรัม)	เท่า
พันธุ์เดิม	0.74	1	19.97	1
แปลงพันธุ์ Tr1	0.81	1.09	29.50	1.48
แปลงพันธุ์ Tr2	0.71	0.95	23.34	1.17

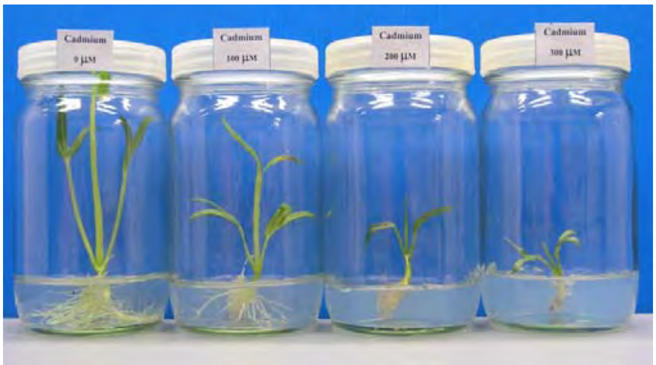
5.8 ทดสอบความทนต่อแคดเมียมของผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม

ผลการปลูกต้นอ่อนผักบุ้งไทยพันธุ์เดิมที่มีความสูง 1.5 เซ็นติเมตรบนอาหารแข็ง MS ที่มีแคดเมียมคลอไรด์ พบว่าการเติบโตของผักบุ้งที่เจริญในสภาวะที่มีแคดเมียมคลอไรด์ต่ำกว่าในสภาวะที่ไม่มีแคดเมียมคลอไรด์ โดยพบว่าในอาหารที่มีความเข้มข้นของแคดเมียมคลอไรด์ 200 ไมโครโมลาร์ ความสูงของต้นและจำนวนรากลดลงอย่างชัดเจน (ภาพที่5.7) จึงเลือกความเข้มข้นของแคดเมียมคลอไรด์ที่ 200 ไมโครโมลาร์ ในการเปรียบเทียบความทนต่อแคดเมียมของผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์และผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม

ภาพที่ 5.7 เปรียบเทียบการเติบโตของผักบุ้งไทยพันธุ์เดิมบนอาหารแข็ง MS ที่มีแคดเมียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 100, 200 และ 300 ไมโครโมลาร์

5.9 ทดสอบความทนต่อแคดเมี่ยมของผักบุ้งจีนพันธุ์เดิม

ผลการปลูกต้นอ่อนผักบุ้งจีนพันธุ์เดิมที่มีความสูง 1.5 เซ็นติเมตรลงบนอาหารแข็ง MS ที่มีแคดเมียมคลอไรด์ พบว่าการเติบโตของผักบุ้งในสภาวะที่มีแคดเมียมคลอไรด์ต่ำกว่าในสภาวะที่ไม่มีแคดเมียมคลอไรด์ ในอาหารที่มีความเข้มข้นของแคดเมียมคลอไรด์สูงขึ้น ความสูงของลำต้นต้น (ภาพที่5.8) เลือกความเข้มข้นของแคดเมียมคลอไรด์ที่ 200 ไมโครโมลาร์ ในการเปรียบเทียบความทนต่อแคดเมียมของผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์และผักบุ้งจีนพันธุ์เดิม



ภาพที่ 5.8 เปรียบเทียบการเติบโตของผักบุ้งจีนพันธุ์เดิมบนอาหารแข็ง MS ที่มีแคดเมียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0,100, 200 และ 300 ไมโครโมลาร์

5.10 เปรียบเทียบความทนต่อแคดเมียมของผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์และผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม

ผลการเปรียบเทียบความทนต่อแคดเมียมของผักบุ้งไทยโดยวัดจากความสูงของลำต้น และความยาวของรากที่เพิ่มขึ้นเมื่อเจริญบนอาหารแข็ง MS ที่มีและไม่มีแคดเมียมคลอไรด์เข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ พบว่าในสภาวะที่ไม่มีแคดเมียมคลอไรด์ ความสูงของลำต้นและความยาวของรากผักบุ้งแปลงพันธุ์ (Tr1, Tr2) และผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม คือ ลำต้นผักบุ้งแปลงพันธุ์ Tr1และ Tr2 สูงขึ้น 4.6 และ 5.4 เซนติเมตร ลำต้นผักบุ้งไทยพันธุ์เดิมสูงขึ้น 4.5 เซนติเมตร รากผักบุ้งแปลงพันธุ์ Tr1 และ Tr2 ยาวขึ้น 2.4 และ 3.3 เซนติเมตร รากของผักบุ้งไทยพันธุ์เดิมยาวขึ้น 2.1 เซนติเมตร แต่ ในสภาวะที่มีแคดเมียมคลอไรด์ 200 ไมโครลาร์ที่ทดสอบ ผักบุ้งไทยพันธุ์เดิมลำต้นจะเตี้ยและรากจะสั้นกว่าผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์อย่างมาก ผักบุ้งไทยพันธุ์เดิมลำต้นสูงขึ้นเพียง 1.4 เซนติเมตร และราก

ยาวขึ้นเพียง 1.6 เซนติเมตรเท่านั้นในขณะที่ลำต้นผักบุ้งแปลงพันธุ์ Tr1 และTr2 สูงขึ้น 4.6 และ 5.1 เซนติเมตร รากผักบุ้งแปลงพันธุ์ Tr1 และ Tr2 ยาวขึ้น 2.3 และ 2.7 เซนติเมตร ซึ่งถือผักบุ้งแปลงพันธุ์ (Tr1, Tr2) และผักบุ้งไทยพันธุ์เดิมมีการเติบโตของต้นภายใน 14 วันมีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P<0.05) (ตารางที่ 5.4 และภาพที่ 5.9) และพบว่าผักบุ้งแปลงพันธุ์ Tr1 มีการเติบโตของทั้งลำต้นและรากในสภาวะที่มีแคดเมียมคลอไรด์ดีที่สุด เนื่องจากการเติบโตของทั้งลำต้นและรากในสภาวะที่มีแคดเมียมคลอไรด์ไม่แตกต่างกับในสภาวะที่ไม่มีแคดเมียมคลอไรด์เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแบบ T-test (ภาคผนวก ง)

ตารางที่ 5.4 การเปรียบเทียบการเจริญของต้นผักบุ้งไทยบนอาหารแข็ง MS ที่เติมแคดเมียมคลอไรด์เข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 14 วัน

สายพันธุ์	การเติบโตของต้นภายใน 14 วัน (ซม)			
	ไม่มีแคดเมียมคลอไรด์		มีแคดเมียมคลอไรด์	
	ลำต้น	ราก	ลำต้น	ราก
พันธุ์เดิม	4.5PP[a]	2.1[a]	1.4[a]	1.6[a]
แปลงพันธุ์ Tr 1	4.6[a]	2.4[a]	4.6[b]	2.3[b]
แปลงพันธุ์ Tr 2	5.4[b]	3.3[b]	5.1[b]	2.7[c]

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันตามแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (P<0.05)

5.11 วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนในผักบุ้งไทยที่เจริญในสภาวะที่มีแคดเมียมคลอไรด์โดยวิธี HPLC ตามวิธีของ Noctor และ Foyer (1998)

ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีน และกลูตาไธโอนในน้ำสกัดจากใบของผักบุ้งแปลงพันธุ์ Tr1 และ Tr2 และผักบุ้งไทยพันธุ์เดิมที่เจริญบนอาหารแข็ง MS ที่เติมแคดเมียมคลอไรด์เข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 14 วัน โดยวิธี HPLC พบว่าผักบุ้งแปลงพันธุ์ Tr1 และ Tr2 มีปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนในใบสูงกว่าผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม โดยน้ำสกัดจากใบ 1 กรัมของผักบุ้งไทยพันธุ์เดิมมีกรดอะมิโนซิสเตอีน 1.29 ไมโครโมลและ กลูตาไธโอน 27.87 ไมโครโมลในขณะที่น้ำสกัดจากใบ 1 กรัมของผักบุ้งแปลงพันธุ์ Tr1 และ Tr2 มีปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีน 1.93 ไมโครโมลและ 1.88 ไมโครโมล ซึ่งสูงกว่าผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม 1.50 เท่า และ1.46 เท่า

ตามลำดับ และมีปริมาณกลูตาไธโอน 46.84 ไมโครโมลและ 41.75 ไมโครโมล ซึ่งสูงกว่าผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม 1.68 เท่า และ1.50 เท่า ตามลำดับ (ตารางที่ 5.5)

ตารางที่ 5.5 การเปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนในน้ำสกัดจากใบผักบุ้งไทยเมื่อปลูกบนอาหารแข็ง MS ที่เติมแคดเมียมคลอไรด์ เข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์

ผักบุ้งไทย	ปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีน (ไมโครโมล/ใบ 1กรัม)	เท่า	ปริมาณกลูตาไธโอน (ไมโครโมล/ใบ 1กรัม)	เท่า
พันธุ์เดิม	1.29	1	27.87	1
แปลงพันธุ์ Tr 1	1.93	1.50	46.84	1.68
แปลงพันธุ์ Tr 2	1.88	1.45	41.75	1.50

5.12 เปรียบเทียบความทนต่อแคดเมียมของผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ที่มียีน *SAT*1 และยีน *rcs*1 กับผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์ที่มียีน *SAT*1 และยีน *rcs*1 และผักบุ้งพันธุ์เดิม

จอมขวัญ มีรักษ์, 2547 ได้สร้างผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์ที่มียีน *SAT*1 และ *rcs*1 (SR10) ไว้ แต่ยังไม่ได้ศึกษาความทนต่อแคดเมียมของผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์ที่สร้างขึ้น จึงถูกนำมาเปรียบเทียบความทนต่อแคดเมียมและปริมาณแคดเมียมที่สะสมกับผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ที่ได้รับการถ่ายโอนยีนชุดเดียวกัน

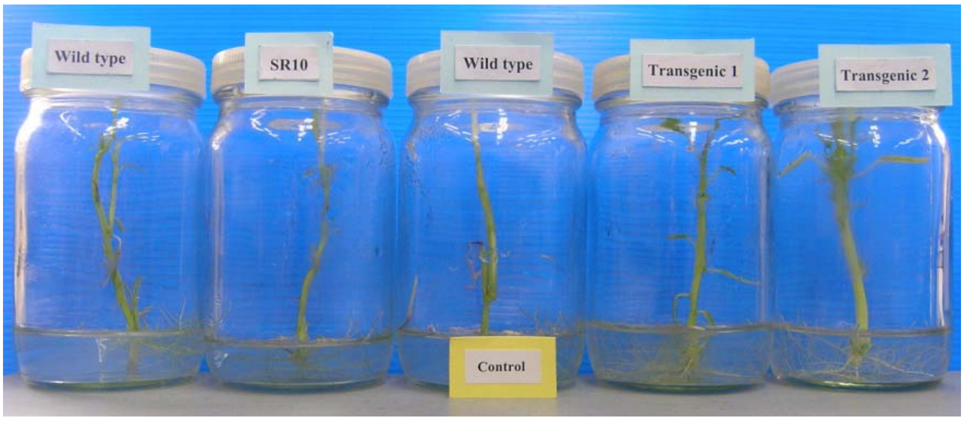
ผลการปลูกผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ที่มียีน *SAT*1 และยีน *rcs*1 (Tr1 และ Tr2) ผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์ที่มียีน *SAT*1 และยีน *rcs*1 (SR 10) และผักบุ้งพันธุ์เดิม (wild type)บนอาหารแข็ง MS ที่มีแคดเมียมคลอไรด์ 200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 14 วัน ดังแสดงในตารางที่ 5.6 ในสภาวะที่มีแคดเมียมคลอไรด์เข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ลำต้นผักบุ้งไทยพันธุ์เดิมสูงขึ้น 1.4 เซนติเมตร รากยาวขึ้น 1.6 เซนติเมตร และผักบุ้งจีนพันธุ์เดิมลำต้นสูงขึ้น 0.9 เซนติเมตร และรากยาวขึ้น 1.7 เซนติเมตร ในขณะที่ผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ Tr1 และ Tr2 มีความสูงของลำต้นเพิ่มขึ้น 4.6 เซนติเมตร และ 5.1 เซนติเมตร ตามลำดับ และมีความยาวของรากเพิ่มขึ้น 2.2 และ 2.7 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์ SR 10 มีความสูงของลำต้นเพิ่มขึ้น 4.7 เซนติเมตร และมีความยาวของรากเพิ่มขึ้น 2.5 เซนติเมตร (ตารางที่ 5.6 และภาพที่ 5.9)

ตารางที่ 5.6 เปรียบเทียบการเติบโตของต้นผักบุ้งไทยและผักบุ้งจีนบนอาหารแข็ง MS ที่เติมแคดเมียมคลอไรด์ เข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์

สายพันธุ์	การเติบโตของต้นภายใน 14 วัน (ซม)			
	ไม่มีแคดเมียมคลอไรด์		มีแคดเมียมคลอไรด์	
	ลำต้น	ราก	ลำต้น	ราก
ผักบุ้งจีนพันธุ์เดิม	4.5 [a]	2.3 [a]	0.9 [a]	1.7 [a]
ผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์SR10	4.7 [a]	3.0 [b]	4.7 [b]	2.5 [c]
ผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม	4.5 [a]	2.1 [a]	1.4 [a]	1.6 [a]
ผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ Tr 1	4.6 [a]	2.4 [a]	4.6 [b]	2.3 [b]
ผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ Tr 2	5.4 [b]	3.3 [b]	5.1 [b]	2.7 [c]

ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เหมือนกันตามแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบโดยวิธี DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P<0.05$)

ก



ข

ภาพที่ 5.9 เปรียบเทียบการเติบโตของผักบุ้งพันธุ์ต่างๆบนอาหารแข็ง MS ที่มีแคดเมียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ (ก) และ บนอาหารแข็ง MS ที่ไม่มีแคดเมียมคลอไรด์ (ชุดควบคุม) (ข) เป็นเวลา 14 วัน

5.13 การวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณแคดเมียมที่สะสมในผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ที่มียีน *SAT*1และยีน *rcs*1 กับผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์ที่มียีน *SAT*1 และยีน *rcs*1 และผักบุ้งพันธุ์เดิม

ผลการปลูกต้นผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ที่มียีน *SAT*1 และยีน *rcs*1 ผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์ที่มียีน *SAT*1 และยีน *rcs*1 และผักบุ้งพันธุ์เดิมบนอาหารแข็ง MS ที่มีแคดเมียมคลอไรด์ 200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 14 วัน พบว่า ผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ Tr1 และ Tr2 ผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์ SR10 ผักบุ้งไทยและผักบุ้งจีนพันธุ์เดิมมีปริมาณแคดเมียมสะสม/กรัมน้ำหนักแห้งของต้น (whole plant คือ ลำต้น ใบและราก) ไม่มีความแตกต่างกัน ทั้งผักบุ้งไทยและผักบุ้งจีนมีปริมาณแคดเมียมที่สะสมในรากมากกว่าในลำต้นและใบ ผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ Tr1 และ Tr2 และผักบุ้งไทยพันธุ์เดิมมีแคดเมียมสะสมในราก 1.48, 1.58 และ 1.38 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ มีแคดเมียมสะสมในลำต้นและใบ 0.37, 0.47 และ 0.56 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์และผักบุ้งจีนพันธุ์เดิมมีแคดเมียมสะสมในราก 1.55 และ 1.49 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง และมีแคดเมียมสะสมในลำต้นและใบ 0.47 และ 0.49 มิลลิกรัม/กรัมน้ำหนักแห้ง

ตารางที่ 5.7 การเปรียบเทียบปริมาณแคดเมียมที่สะสมในผักบุ้ง

ตัวอย่าง	ปริมาณแคดเมียมที่สะสมในผักบุ้ง (มิลลิกรัมแคดเมียม/กรัมน้ำหนักแห้งของผักบุ้ง)				
	ผักบุ้งจีน พันธุ์เดิม	ผักบุ้งจีนแปลง พันธุ์ SR 10	ผักบุ้งไทย พันธุ์เดิม	ผักบุ้งไทย แปลงพันธุ์ Tr 1	ผักบุ้งไทย แปลงพันธุ์ Tr 2
ราก	1.49±0.00139	1.55±0.00057	1.38±0.00089	1.48±0.00135	1.58±0.00148
ลำต้นและใบ	0.49±0.00086	0.47±0.00073	0.56±0.00104	0.37±0.00053	0.47±0.00039

5.14 การศึกษาลักษณะที่ปรากฏ (phenotype) ของผักบุ้ง

ผลการปลูกผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ Tr1 และ Tr2 และผักบุ้งไทยพันธุ์เดิมในอาหารเหลวสูตร Hoagland พบว่าผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ Tr2 มีขนาดของใบที่ใหญ่กว่าใบของผักบุ้งไทยพันธุ์เดิมอย่างชัดเจน

WT Tr1 Tr2

ภาพที่ 5.10 ลักษณะที่ปรากฏ (phenotype) ของต้นผักบุ้งไทยที่เจริญในอาหารเหลวสูตร Hoagland

WT หมายถึง ผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม

Tr1 หมายถึง ผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ Tr1

Tr2 หมายถึง ผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ Tr2

บทที่ 6

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการถ่ายโอนยีน *SAT*1 ร่วมกับยีน *rcs*1 ซึ่งระบุรหัสเซอรีนแอซิทิลแทรนส์เฟอเรสชนิดพลาสติกไอโซฟอร์ม จาก *Arabidopsis thaliana* L. และซิสเตอีนซินเตสไอโซฟอร์มที่พบในไซโตพลาสซึมจากข้าวเข้าสู่ผักบุ้งไทยโดยวิธีการใช้ *Agrobacterium tumefaciens* โดยแช่ชิ้นส่วนใบเลี้ยงส่วนโคนพร้อมก้านใบ ของผักบุ้งอายุ 7 วัน ในอาหารเหลว MS ที่มีเซลล์ *A. tumefaciens* EHA101 ซึ่งมีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 มีอะซิโตไซริงโอน (aectosyringone) เข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ เพื่อเป็นการชักนำให้เกิดการถ่ายโอนยีนจาก *A. tumefaciens* EHA101 เข้าสู่ผักบุ้ง บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสบนเครื่องเขย่าความเร็ว 80 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำชิ้นส่วนใบเลี้ยงส่วนโคนพร้อมก้านใบมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มีอะซิโตไซริงโอนความเข้มข้นเดิม บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสในที่มืด เป็นเวลา 3 วัน ล้างชิ้นส่วนใบเลี้ยงส่วนโคนพร้อมก้านใบด้วยสารปฏิชีวนะเซฟโฟแทคซีม (cefotaxime) ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรเพื่อกำจัด *A. tumefaciens* EHA101 ออก ซับให้แห้งแล้วนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MMS ที่มีไธเดียซูรอน (thidiazuron) เข้มข้น10 ไมโครโมลาร์เป็นสารเร่งการงอกเป็นต้นใหม่และสารปฏิชีวนะเซฟโฟแทคซีมความเข้มข้นเดิม บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิและควบคุมแสงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แสงสีขาวความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ระยะเวลาการให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ผลการถ่ายโอนยีนเข้าสู่ผักบุ้งไทย พบว่าชิ้นส่วนใบเลี้ยงส่วนโคนพร้อมก้านใบ 4,175 ชิ้น มีการงอกเป็นต้นใหม่ 1,332 ต้น คิดเป็น 31.90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าที่ Meerak และคณะ (2006) ได้เคยรายงานไว้ว่าผลการงอกเป็นต้นใหม่ของผักบุ้งจีนจากชิ้นส่วนใบเลี้ยงส่วนโคนพร้อมก้านใบ เท่ากับ 10.01 เปอร์เซ็นต์ แต่น้อยกว่าที่ Akaracharanya และคณะ (2001) ได้เคยรายงานไว้ว่าผล การงอกเป็นต้นใหม่ของผักบุ้งจีนจากชิ้นส่วนใบเลี้ยงส่วนโคนพร้อมก้านใบ มีค่าเท่ากับ 75 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เนื่องจากผักบุ้งที่ Akaracharanya และคณะ (2001)ใช้ต่างสายพันธุ์กับการทดลองนี้ และชิ้นส่วนใบเลี้ยงส่วนโคนพร้อมก้านใบไม่ได้รับการเลี้ยงร่วมกันกับ *A. tumefaciens* EHA101

เมื่อย้ายต้นอ่อนผักบุ้งไทยที่ได้มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ซึ่งเติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรและเติมสารปฏิชีวนะเซฟโฟแทคซิมความเข้มข้นสุดท้าย 300 ไมโครกรัม/มิลลิลัตร บ่มเป็นเวลา 1 เดือน พบว่ามีต้นอ่อนผักบุ้งไทยที่สามารถทนต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินได้เพียง 2 ต้น คิดเป็น 0.15 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งต่ำกว่าที่ Meerak และคณะ (2006) เคยรายงานไว้ว่า ต้นอ่อนของผักบุ้งจีนที่ได้รับการถ่ายโอนพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 เช่นเดียวกับในการทดลองนี้ สามารถทนต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินคิดเป็น 0.61 เปอร์เซ็นต์ เมื่อ

ย้ายต้นผักบุ้งดังกล่าวมาปลูกบนอาหารแข็ง MS ที่ปราศจากสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน เพื่อให้สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วและเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ แล้วนำต้นผักบุ้งที่ได้มาสกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการ PCR ตรวจสอบยีน *SAT*1 และ ยีน *rcs* 1 ในผักบุ้งแปลงพันธุ์ด้วยวิธี PCR พบว่าผักบุ้งแปลงพันธุ์มียีน *SAT*1 และ ยีน *rcs* 1 สอดแทรกอยู่บนโครโมโซมจริง เรียกต้นผักบุ้งทั้งสองต้นนี้ว่าผักบุ้งแปลงพันธุ์ Tr1 และ Tr2

การวิเคราะห์แอกทิวิตีของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสในน้ำสกัดจากใบของผักบุ้งแปลงพันธุ์ Tr1 และTr2 โดยวิธีการวัดปริมาณโคเอนไซม์เอ (CoA-SH) ที่เกิดขึ้นพบว่าผักบุ้งแปลงพันธุ์ Tr1 และTr2 มีแอกทิวิตีของเซอรีนแอซีติลแทรนส์เฟอเรสสูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม ผักบุ้งแปลงพันธุ์ Tr1 และ Tr2 มีแอกทิวิตีของเซอรีนแอซีติลแทรนส์เฟอเรส 3.09 และ 3.36 หน่วยเอนไซม์/มิลลิกรัมโปรตีน สูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม 2.66 และ 2.89 เท่า ผลการวิเคราะห์แอกทิวิตีของซิสเตอีนซินเตสในน้ำสกัดจากใบของผักบุ้งแปลงพันธุ์ Tr1 และ Tr2 เทียบกับผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม พบว่าผักบุ้งแปลงพันธุ์ Tr1 และ Tr2 มีแอกทิวิตีของซิสเตอีนซินเตส 1.18 และ 1.31 หน่วยเอนไซม์/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม 1.62 เท่า และ 1.79 เท่าตามลำดับ Meerak และคณะ (2006) ได้ถ่ายโอนยีน *SAT*1 และ *rcs*1 เข้าสู่ผักบุ้งจีน และรายงานว่า ผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์ SR3 และ SR10 ที่ได้มีแอกทิวิตีของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรส 4.99 และ 3.69 หน่วยเอนไซม์/มิลลิกรัมโปรตีน และมีแอกทิวิตีของซิสเตอีนซินเตส 3.47 และ 2.89 หน่วยเอนไซม์/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าในการทดลองนี้ ทั้งนี้ตำแหน่งการสอดแทรกของยีน *SAT*1 และ *rcs*1 บนโครโมโซมที่ตำแหน่งต่างกันมีผลต่อการแสดงออกของยีนที่ต่างกัน

ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนในน้ำสกัดจากใบของผักบุ้งแปลงพันธุ์ Tr1 และ Tr2 น้ำหนัก 1 กรัมซึ่งเจริญในอาหาร Hoagland เป็นเวลา 14 วัน โดยวิธี HPLC พบว่าผักบุ้งแปลงพันธุ์ Tr1 และ Tr2 มีปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีน 0.81 และ 0.71 ไมโครโมล ผักบุ้งไทยพันธุ์เดิมมีปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีน 0.74 ไมโครโมล และผักบุ้งแปลงพันธุ์ Tr1 และ Tr2 มีกลูตาไธโอน 29.50 และ 23.34 ไมโครโมล คิดเป็น 1.48 และ 1.17 เท่า ของปริมาณที่พบในผักบุ้งพันธุ์เดิม ตามลำดับ ผลการถ่ายโอนยีน *SAT*1 และ *rcs*1 เข้าสู่ผักบุ้งไทย พบว่าปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนของผักบุ้งแปลงพันธุ์ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับผักบุ้งพันธุ์เดิม แม้ว่าแอกทิวิตีของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสและแอกทิวิตีของซิสเตอีนซินเตสจะสูงขึ้น ซึ่งต่างจากงานวิจัยของ จอมขวัญ มีรักษ์ (2547) ซึ่งถ่ายโอนยีน *SAT*1 และ *rcs*1 เข้าสู่ผักบุ้งจีน และรายงานว่าผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์ SR3 และ SR10 มีปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนมากกว่าผักบุ้งจีนพันธุ์เดิม 8 และ 7 เท่า และมีกลูตาไธโอนมากกว่าผักบุ้งจีนพันธุ์เดิม 1.4 และ 3 เท่า ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสภาวะการปลูกที่แตกต่างกัน จอมขวัญ มีรักษ์ (2547) ปลูกผักบุ้งจีนที่ทดลองในดิน ซึ่งอาจเป็นสภาวะที่มีโลหะหนักปนเปื้อนอยู่

ผลการเปรียบเทียบความทนต่อแคดเมียมของผักบุ้งไทยพันธุ์เดิมและผักบุ้งจีนพันธุ์เดิม พบว่าเท่ากัน คือความสูงของลำต้นและความยาวของรากลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเจริญในอาหารที่มีแคดเมียมคลอไรด์ 200 ไมโครโมลาร์ ผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ Tr1 และ Tr2 ทนต่อแคดเมียมได้มากกว่าผักบุ้งไทยพันธุ์เดิมอย่างมีนัยสำคัญเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิธี DMRT เมื่อเจริญในสภาวะที่มีแคดเมียมคลอไรด์เข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ลำต้นผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ Tr1 และ Tr2 สูงขึ้น 4.6 และ 5.1 เซนติเมต ตามลำดับ ในขณะที่ลำต้นผักบุ้งไทยพันธุ์เดิมสูงขึ้นเพียง 1.4 เซนติเมตร รากของผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ Tr1 และ Tr2 ยาวขึ้น 2.3 และ 2.7 เซนติเมตร ตามลำดับ รากของผักบุ้งไทยพันธุ์เดิมยาวขึ้นเพียง 1.6 เซนติเมตร พบว่าผักบุ้งไทยและผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์ที่มียีน *SAT*1 และ *rcs*1 ทนต่อแคดเมียมได้ใกล้เคียงกัน ลำต้นผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์ SR10 สูงขึ้น 4.7 เซนติเมตร และรากของผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์ยาวขึ้น 2.5 เซนติเมตร เมื่อเจริญในสภาวะที่มีแคดเมียมคลอไรด์เข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์

ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนในน้ำสกัดจากใบน้ำหนัก 1 กรัม พบว่าน้ำสกัดจากใบของผักบุ้งแปลงพันธุ์ Tr1 และ Tr2 ที่เจริญบนอาหาร MS ที่เติมแคดเมียมคลอไรด์เข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ มีปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีน 1.93 และ 1.88 ไมโครโมล สูงกว่าปริมาณที่พบในน้ำสกัดจากใบของผักบุ้งพันธุ์เดิม 1.50 เท่า และ1.46 เท่า ตามลำดับ และมีปริมาณกลูตาไธโอน 46.84 และ 41.75 ไมโครโมล สูงกว่าปริมาณที่พบในน้ำสกัดจากใบของผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม 1.68 เท่า และ1.50 เท่า ตามลำดับ

ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Dominguez-Solis และคณะ (2004) ซึ่งรายงานว่า *Arabidopsis thaliana* แปลงพันธุ์ที่มีการแสดงออกของ *Atcys-3A* cDNA ซึ่งระบุรหัส cytosolic O-acetylserine (thiol) lyase (OASTL) เมื่อเจริญในสภาวะที่มีโลหะหนักมีปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนเท่ากับพืชพันธุ์เดิม แต่เมื่อเจริญในสภาวะที่มีแคดเมียม 400 ไมโคโมลาร์มีปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนมากกว่าพืชพันธุ์เดิม และสอดคล้องกับผลการทดลองของ Harada และคณะ (2001) ซึ่งรายงานว่า ต้นยาสูบ (*Nicotiana tabaccum*) แปลงพันธุ์ TRCS2 และ TRCS3 ที่มีการแสดงออกของยีนซิสเตอีนซินเตสจากข้าว (*Oryza sativa* L.) มีปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีน 10 และ 20 นาโนโมล และกลูตาไธโอน 60 และ 100 นาโนโมล เมื่อเจริญในสภาวะที่เติมแคดเมียมคลอไรด์เข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ 3 สัปดาห์ และสอดคล้องกับผลการทดลอง Howarth และคณะ (2003) ซึ่งรายงานว่า *Arabidopsis thaliana* ซึ่งเจริญภายใต้สภาวะที่มีแคดเมียมคลอไรด์เข้มข้น 50 ไมโครโมล/ลิตร สร้างกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนเพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้ปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนที่เพิ่มขึ้นนั้นส่งผลให้พืชทนต่อแคดเมียมได้มากขึ้น เพราะกลไกการลดความเป็นพิษของแคดเมียมและโลหะหนักบางชนิดของพืชเกิดจากพืชสังเคราะห์

กลูตาไธโอนจากกรดอะมิโนซีสเตอีน และนำกลูตาไธโอนไปสังเคราะห์เป็นไฟโตคีลาติน (phytochelatin) ซึ่งสามารถจับกับโลหะหนักเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนแล้วสะสมสารประกอบเชิงซ้อนในแวคคิวโอล (vacuole) (Saito, 2000) นอกจากนี้ยังพบว่าแคดเมียมสามารถชักนำให้พืชสร้างกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนเพิ่มมากขึ้น (Peterson และคณะ,1979) Sun และคณะ (2005) รายงานว่าต้นข้าวสาลี *(Triticum aestivum* L.) ที่เจริญในสภาวะที่มีแคดเมียมมีปริมาณกลูตาไธโอน และไฟโตคีลาตินเพิ่มสูงขึ้น โดยไฟโตคีลาตินจะเพิ่มในรากมากกว่าในต้น นอกจากนี้ยังรายงานว่าแคดเมียมกระตุ้นการแสดงออกของยีนซึ่งระบุรหัสในกระบวนการสังเคราะห์กลูตาไธโอนจึงทำให้ปริมาณของกลูตาไธโอนเพิ่มขึ้น

เมื่อนำผักบุ้งแปลงพันธุ์ Tr1 และ Tr2 ที่เจริญในสภาวะที่มีแคดเมียมคลอไรด์ มาวิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมที่สะสมไว้ในต้น (whole plant คือ ลำต้น ใบและราก) พบว่ามีแคดเมียมสะสมในรากมากกว่าในลำต้นและใบ แต่ปริมาณแคดเมียมที่ถูกสะสมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของทั้งรากและลำต้นและใบผักบุ้งแปลงพันธุ์ไม่แตกต่างกับของผักบุ้งพันธุ์เดิม ดังนั้นความทนต่อแคดเมียมของผักบุ้งแปลงพันธุ์ที่มากกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม จึงเป็นผลมาจากการที่ผักบุ้งแปลงพันธุ์มีการเติบโตที่สูงกว่าผักบุ้งพันธุ์เดิม เมื่อเปรียบเทียบปริมาณแคดเมียมที่สะสมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของทั้งรากและลำต้นและใบของผักบุ้งแปลงพันธุ์ Tr1 และ Tr2 ผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์ SR 10 และผักบุ้งพันธุ์เดิมพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน

ผลการปลูกผักบุ้งแปลงพันธุ์ Tr1 และ Tr2 และผักบุ้งไทยพันธุ์เดิมในอาหารเหลวสูตร Hoagland พบว่า ผักบุ้งแปลงพันธุ์ Tr2 มีขนาดใบใหญ่กว่าผักบุ้งไทยพันธุ์เดิมอย่างชัดเจน

จากผลการทดลองทั้งหมดสรุปได้ว่า การถ่ายโอนยีน *SAT*1 และยีน *rcs*1 เข้าสู่ผักบุ้งทำให้ผักบุ้งทนต่อแคดเมียมได้มากขึ้น พบปริมาณแคดเมียมสะสมในรากมากกว่าในลำต้นและใบ แต่ไม่พบความแตกต่างของปริมาณแคดเมียมที่สะสมต่อกรัมน้ำหนักแห้งของผักบุ้งแปลงพันธุ์และผักบุ้งพันธุ์เดิม ดังนั้นความสามารถในการทนต่อแคดเมียมได้มากกว่าของผักบุ้งแปลงพันธุ์น่าจะเกิดจากความสามารถในการเพิ่มการเติบโตเพื่อควบคุมให้ปริมาณแคดเมียมสะสมต่อกรัมน้ำหนักแห้งมีค่าคงที่ที่ความเข้มข้นซึ่งผักบุ้งสามารถทนได้

บทที่ 4

วิธีการทดลอง

4.1 **การถ่ายโอนยีน *SAT*1 ร่วมกับยีน *rcs*1 เข้าสู่ผักบุ้งไทย** (*Ipomoea aquatica* Forsk var. *aquatica*)

4.1.1 การเตรียมชิ้นส่วนใบเลี้ยง (cotyledon explant) ของผักบุ้งไทย

นำเมล็ดผักบุ้งไทยประมาณ 300 เมล็ดหรือประมาณ 20 กรัมมาคัดเลือกเอาเฉพาะเมล็ดที่เปลือกไม่มีรอยแตกร้าว ล้างด้วยน้ำสบู่ให้สะอาดแล้วใส่ในหลอดพลาสติกฝาเกลียวความจุ 50 มิลลิลิตร ล้างด้วยสารละลายเอทิลแอลกอฮอลล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) 40 มิลลิลิตร เขย่าโดยการเอียงหลอดไปมา 5 นาที เทสารละลายเอทิลแอลกอฮอลล์ทิ้ง จากนั้นล้างด้วยสารละลายเอทิลแอลกอฮอลล์เข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ตามวิธีเดิม ทำซ้ำ 2 ครั้ง หลังจากนั้นล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) 20 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 15 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง แช่เมล็ดผักบุ้งที่ได้ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 16–18 ชั่วโมง หรือจนเมล็ดผักบุ้งพองตัวขึ้น นำเมล็ดผักบุ้งที่พองตัวดีแล้ว 7 เมล็ด วางบนอาหารแข็ง MS (ภาคผนวก ก ข้อ 2) 20 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุอยู่ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชขนาดความจุ 240 มิลลิลิตรโดยวิธีปราศจากเชื้อ บ่มในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสีขาวความเข้ม 3,000 ลักซ์ ระยะเวลาการให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน 7 วัน นำต้นอ่อนที่ได้มาตัดเอาใบเลี้ยงส่วนโคนพร้อมก้านใบ (ภาพที่ 4.1) โดยวิธีปราศจากเชื้อ

ก

ข

ค

ภาพที่ 4.1 การเตรียมชิ้นส่วนใบเลี้ยงส่วนโคนพร้อมก้านใบของผักบุ้งไทย

ก. ลักษณะต้นอ่อนของผักบุ้งไทย

ข. ลักษณะต้นผักบุ้งไทยที่อายุ 7 วัน

ค. วิธีการตัดใบเลี้ยงเพื่อให้ได้ชิ้นส่วนใบเลี้ยงส่วนโคนพร้อมก้านใบ ซึ่งใช้ในกระบวนการถ่ายโอนยีน

4.1.2 การทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินของผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม (wild type) เพื่อใช้ในการคัดเลือกผักบุ้งไทยที่ได้รับการถ่ายโอนยีน

นำต้นอ่อนของผักบุ้งไทยที่มีความยาว 1.5 เซ็นติเมตร ปลูกลงบนอาหารแข็ง MS (ภาพที่ 4.2) ที่มีสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 2.5, 5 และ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสีขาวความเข้ม 3,000 ลักซ์ ระยะเวลาการให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน 7 วัน ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ

ภาพที่ 4.2 วิธีการทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินของผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม (wild type) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 2.5, 5 และ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

4.1.3 การเตรียมสารแขวนลอยเซลล์ *A. tumefaciens* EHA101 ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1

พลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 (จอมขวัญ มีรักษ์, 2547) (ภาคผนวก ค ข้อ1) เป็นพลาสมิดที่มียีนระบุรหัสซิสเตอีนซินเตสของข้าว (*Oryza sativa* L.) (ยีน *rcs*1) ยีนระบุรหัสเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสของ *Arabidopsis thaliana* L. (ยีน *SAT*1) ยีนต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินและยีนต้านต่อกานามัยซินในบริเวณ T-DNA

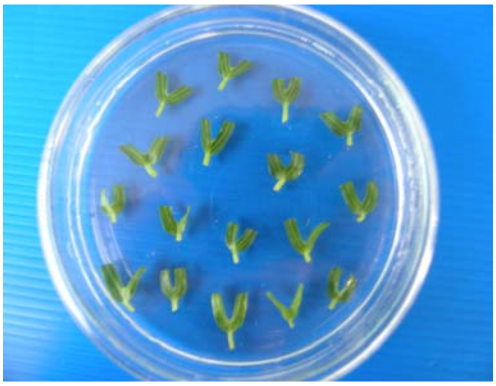
ปลูกโคโลนีเดี่ยวของ *A. tumefaciens* EHA101 ซึ่งมีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 ซึ่งเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YEP (ภาคผนวก ก ข้อ 1) ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน

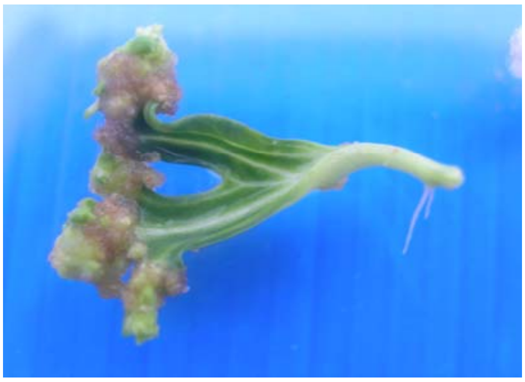
(ภาคผนวก ข ข้อ 1) ความเข้มข้นสุดท้าย 50 มิลลิกรัม/ลิตร บ่มในที่มืดที่ 28 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวชนิดเดิมที่เติมสารปฏิชีวนะชนิดและความเข้มข้นเดิม 10 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที ในที่มืด 18 ชั่วโมง จะได้สารแขวนลอยเซลล์ *A. tumefaciens* EHA101 ซึ่งมีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 จำนวน 2.7×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร (Khamwan และคณะ, 2003) นำมาทำให้เจือจาง 20 เท่าในอาหารเหลว MS ที่เติมอะซิโตไซริงโอน (acetosyringone; 3’,5’-Dimethoxy-4-hydroxy-acetophenone) ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครโมลาร์ (ภาคผนวก ข ข้อ 2)

4.1.4 วิธีการทำทรานสฟอร์เมชันของผักบุ้ง

นำชิ้นส่วนใบเลี้ยงส่วนโคนพร้อมก้านใบของผักบุ้งประมาณ 200 ชิ้น (ที่ได้จากข้อ 4.1.1) มาแช่ในสารแขวนลอยเซลล์ *A. tumefaciens* EHA101 ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 20 มิลลิลิตร (ที่ได้จากข้อ 4.1.3) ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดพลาสติกฝาเกลียวขนาด 50 มิลลิลิตร (ภาพที่ 4.3) บ่มที่ 28 องศาเซลเซียสบนเครื่องเขย่าความเร็ว 80 รอบ/นาที 2 ชั่วโมงในที่มืด ซับชิ้นส่วนใบเลี้ยงส่วนโคนพร้อมก้านใบให้แห้งด้วยกระดาษกรองโดยวิธีปราศจากเชื้อ นำไปวางบนอาหารแข็ง MS ที่เติมอะซิโตไซริงโอนความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครโมลาร์ 25 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุอยู่ในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร ความหนา 2 เซนติเมตร จำนวน 20 ชิ้นต่อ 1 จานเพาะเชื้อ บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืด 3 วัน แล้วนำ ชิ้นส่วนใบเลี้ยงส่วนโคนพร้อมก้านใบมาล้างโดยการแช่ในสารละลายเซฟโฟแทคซีม (cefotaxime) เข้มข้น 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข ข้อ 3) 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าไปมา 15 นาที แล้วเทสารละลายเซฟโฟแทคซีมทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง ล้างในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อโดยวิธีเดียวกัน 5 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง ซับชิ้นส่วนใบเลี้ยงส่วนโคนพร้อมก้านใบให้แห้งด้วยกระดาษกรองโดยวิธีปราศจากเชื้อ แล้ววางบนอาหารแข็ง MMS (ภาคผนวก ก ข้อ 3) จำนวน 25 มิลลิลิตรที่เติมสารละลายไธเดียซูรอน (thidiazuron) ความเข้มข้นสุดท้าย 10 ไมโครโมลาร์ (ภาคผนวก ข ข้อ 4) และสารละลายเซฟโฟแทคซีมความเข้มข้นสุดท้าย 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรซึ่งบรรจุในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร ความหนา 2 เซนติเมตร จำนวน 15 ชิ้นต่อ 1 จานเพาะเชื้อ บ่มในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสีขาวความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ (ภาพที่ 4.4) ระยะเวลาการให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน เป็นเวลา 1 ถึง 2 เดือน โดยย้ายชิ้นส่วนใบเลี้ยงส่วนโคนพร้อมก้านใบไปยังอาหารแข็งชนิดเดิมจานใหม่ทุก 2 สัปดาห์

ภาพที่ 4.3 การทำทรานสฟอร์เมชันของผักบุ้ง





ภาพที่ 4.4 ลักษณะการเลี้ยงชิ้นส่วนใบเลี้ยงส่วนโคนพร้อมก้านใบของผักบุ้งที่ผ่านการถ่ายโอนยีน ภายใต้การควบคุมอุณหภูมิและแสง

4.1.5 วิธีการคัดเลือกผักบุ้งแปลงพันธุ์

ย้ายต้นอ่อนผักบุ้งความสูงประมาณ 2 เซนติเมตรซึ่งเจริญมาจากใบเลี้ยงส่วนโคนพร้อมก้านใบ (ที่ได้จากข้อ 4.1.4) มาวางบนอาหารแข็ง MS 25 มิลลิลิตรที่เติมสารละลายเซฟโฟแทคซีมความเข้มข้นสุดท้าย 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรและสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม (wild type) ไม่สามารถเจริญบนอาหารที่มีสารปฏิชีวนะ

ไฮโกรมัยซินที่ความเข็มข้นนี้ (ที่ได้จากผลการทดลองข้อ 5.2) อาหารบรรจุในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชความจุ 240 มิลลิลิตร 1 ชิ้นต่อ 1 ขวด บ่มในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสีขาวความเข้มแสง 3,000 ลักซ์ ระยะเวลาการให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน เป็น เวลา 1 เดือน โดยย้ายต้นอ่อนผักบุ้งไปยังอาหารแข็งชนิดเดิมขวดใหม่ทุก 2 สัปดาห์ ต้นอ่อนผักบุ้งที่ไม่ตายสามารถทนต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรได้คาดว่าเป็นผักบุ้งแปลงพันธุ์

4.2 การสกัดดีเอ็นเอจากผักบุ้งตามวิธีของ Edward และคณะ (1991)

ใส่ใบผักบุ้งประมาณ 1 กรัม ลงในหลอดไมโครฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ทำให้เย็นโดยการแช่ไว้ในไนโตรเจนเหลว เติมไนโตรเจนเหลวลงไปจนเกือบเต็มหลอด บดใบผักบุ้งด้วยแท่งพลาสติกจนละเอียด เติมสารละลายเอ็กแทรกชันบัฟเฟอร์ (extraction buffer) (ภาคผนวก ข ข้อ 5) 700 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนผักบุ้งที่บดแล้วละลายในเอ็กแทรกชันบัฟเฟอร์ ปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที (15,500 X g) 2 นาที เก็บสารละลายส่วนน้ำ 600 ไมโครลิตร มาสกัดด้วยสารละลายฟีนอล คลอโรฟอร์ม ไอโซเอมิลแอลกอฮอลล์ (25:24:1) (ภาคผนวก ข ข้อ 9) ในปริมาตรที่เท่ากัน ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิและความเร็วรอบเดิมเป็นเวลา 5 นาที เก็บสารละลายส่วนบนมาสกัดซ้ำด้วยสารละลายฟีนอล คลอโรฟอร์ม ไอโซเอมิลแอลกอฮอลล์ (25:24:1) ในปริมาตรที่เท่ากัน ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยนำสารละลายส่วนบนมาเติมไอโซโพรพานอล (isopropanol) อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิและความเร็วรอบเดิม 5 นาที เก็บตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไปทำแห้งในเครื่องดูดความชื้นภายใต้สุญญากาศเป็นเวลา 15 นาที ละลายดีเอ็นเอในสารละลายทีอีบัฟเฟอร์ (TE buffer) ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0 (ภาคผนวก ข ข้อ 6) 30 ไมโครลิตร กำจัดอาร์เอ็นเอออกจากดีเอ็นเอโดยการนำมาย่อยด้วยอาร์เอ็นเอส (RNase) (ภาคผนวก ข ข้อ 7) ความเข้มข้นสุดท้าย 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง กำจัดเอนไซม์อาร์เอ็นเอสโดยการสกัดด้วยสารละลายฟีนอล คลอโรฟอร์ม ไอโซเอมิลแอลกอฮอลล์ (25:24:1) ตกตะกอนดีเอ็นเอแล้วทำดีเอ็นเอให้แห้งเช่นเดียวกับข้างต้น ละลายดีเอ็นเอที่ได้ในสารละลายทีอีบัฟเฟอร์ (TE buffer) ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เก็บดีเอ็นเอที่ได้ที่ –20 องศาเซลเซียส

4.3 การเตรียมพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 **เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบของชุดควบคุมผลบวก** (positive control) **ในปฏิกิริยาลูกโซ่** (PCR ; polymerase chain reaction)

ปลูกโคโลนีเดี่ยวของ *A. tumefaciens* EHA101 ที่มีพลาสมิด pBIH1-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 ซึ่งเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YEP ที่เติมสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินความเข้มข้นสุดท้าย 50 มิลลิกรัม/ลิตร บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตรเดิมที่เติมสารปฏิชีวนะชนิดและความเข้มข้นเดิม 10 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส ความเร็ว 160 รอบ/นาที 16-18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อที่ได้ 1.5 มิลลิลิตรลงในหลอดไมโครฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 7,000 รอบ/นาที (4,500 X g) 2 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง เติมเชื้อ 1.5 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดไมโครฟิวส์เดิม ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิและความเร็วรอบเดิม 2 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ทำซ้ำรวม 3 ครั้ง รวมเชื้อที่นำมาปั่นเหวี่ยง 4.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย I (ภาคผนวก ข ข้อ 8.1) 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เซลล์กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 10 นาที เติมสารละลาย II (ภาคผนวก ข ข้อ 8.2) 200 ไมโครลิตรผสมเบาๆโดยการเอียงหลอดไปมา ตั้งทิ้งไว้ในน้ำผสมน้ำแข็ง 5 นาที เติมสารละลาย III (ภาคผนวก ข ข้อ 8.3) ผสมตามวิธีการข้างต้น ตั้งทิ้งไว้ในน้ำผสมน้ำแข็ง 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 15,000 รอบ/นาที (20,600 X g) 5 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนมากำจัดโปรตีนออกด้วยสารละลายฟีนอล คลอโรฟอร์ม ไอโซเอมิลแอลกอฮอลล์ (25:24:1) ในปริมาตรที่เท่ากัน ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง ความเร็ว 15,000 รอบ/นาที (20,600 X g) 5 นาที ดูดส่วนน้ำใสชั้นบนมาตกตะกอนดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอโดยการเติมเอทานอลสัมบูรณ์ที่เย็นในอัตราส่วน 2 เท่าของปริมาตรที่ได้ ตั้งทิ้งไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 15,000 รอบ/นาที (20,600 X g) 15 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) 700 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิและความเร็วรอบเดิม 5 นาที เทส่วนน้ำใสทิ้ง นำตะกอนที่ได้ไปทำให้แห้งในเครื่องดูดความชื้นภายใต้สุญญากาศ 15 นาที ละลายตะกอนในสารละลายทีอีบัฟเฟอร์ (TE buffer) ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0 กำจัดอาร์เอ็นเอออกจากดีเอ็นเอโดยการนำมาย่อยด้วยอาร์เอ็นเอส (RNase) ความเข้มข้นสุดท้าย 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง กำจัดเอนไซม์อาร์เอ็นเอสด้วยสารละลายฟีนอล คลอโรฟอร์ม ไอโซเอมิลแอลกอฮอลล์ (25:24:1) ตกตะกอนดีเอ็นเอ ทำให้ดีเอ็นเอแห้งเช่นเดียวกับข้างต้น ละลายตะกอนดีเอ็นเอในสารละลายทีอีบัฟเฟอร์ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0 วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายดีเอ็นเอเจือจาง 1/50 เท่า ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร เพื่อหาปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้ เก็บพลาสมิดที่ได้ที่ –20 องศาเซลเซียส

4.4 การตรวจหา ยีน *SAT*1 และยีน *rcs*1 ในผักบุ้งโดยวิธี PCR

4.4.1 การตรวจหา ยีน *SAT*1 ในผักบุ้ง

นำดีเอ็นเอที่สกัดจากผักบุ้งตามวิธีข้อ 4.2 มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการ PCR ใช้ดีเอ็นเอ JSAT5 และ JSAT6 เป็นดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางไป (forward primer) และดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางกลับ (reverse primer) ตามลำดับ (ภาคผนวก ค ข้อ 3) เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วย

	ความเข้มข้นสุดท้าย	
1. ดีเอ็นเอแม่แบบ 50 นาโนกรัมในปริมาตร	1.0	ไมโครลิตร
2. ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ JSAT5		
เข้มข้น 2.0 ไมโครไมลาร์	1.0	”
3. ดีเอ็นเอไพร์เมอร์ JSAT6		
เข้มข้น 2.0 ไมโครโมลาร์	1.0	”
4. นิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 ชนิด คือ dATP , dTTP , dCTP, dGTP		
เข้มข้นชนิดละ 2.5 มิลลิโมลาร์	0.8	”
5. สารละลายบัฟเฟอร์สำหรับปฏิกิริยาพีซีอาร์		
เข้มข้น 10 เท่า	1.0	”
6. อีเอกซ์แทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรส (Ex *Taq* DNA polymerase)		
เข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร	0.05	”
7. น้ำกลั่นปลอดเชื้อสำหรับปรับปริมาตรสุดท้าย	5.15	”
รวมปริมาตรปฏิกิริยา	10.0	”

บรรจุส่วนผสมของปฏิกิริยาดังกล่าวทั้งหมด ยกเว้นอีเอกซ์แทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรสในหลอดไมโครฟิวส์ขนาด 200 ไมโครลิตร ใส่หลอดลงไปในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมอัตโนมัติ ขั้นแรกกำหนดอุณหภูมิของปฏิกิริยาเป็น 94 องศาเซลเซียส เติมอีเอกซ์แทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรสหลังจากที่อุณหภูมิของปฏิกิริยาเท่ากับ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที แล้วกำหนดให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในรอบปฏิกริยาจำนวน 25 รอบปฏิกิริยา อุณหภูมิในแต่ละรอบปฏิกิริยาเป็นดังนี้ 94 องศาเซลเซียสเพื่อให้ดีเอ็นเอแม่แบบแยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (denaturation) 30 วินาที 55 องศาเซลเซียสเพื่อให้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์จับกับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) โดยการจับคู่ของเบสคู่สม 30 วินาทีและ 72 องศาเซลเซียสเพื่อให้อีเอ็กซ์แทคพอลิเมอเรสสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยการนำ

นิวคลีโอไทด์มาต่อที่ปลายของดีเอ็นเอไพร์เมอร์ (extention) ทิศทาง 5' ไปยัง 3' 60 วินาที เมื่อครบ 25 รอบปฏิกิริยา กำหนดให้อุณหภูมิเป็น 4 องศาเซลเซียส 7 นาทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส หากดีเอ็นเอที่สกัดจากผักบุ้งมียีน *SAT*1 เมื่อนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการ PCR จะได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 เบส

4.4.2 การตรวจหายีน *rcs*1 ในผักบุ้ง

บรรจุส่วนผสมของปฏิกิริยาดังกล่าวทั้งหมด ทำเช่นเดียวกับข้อ 4.4.1 แต่ใช้ดีเอ็นเอ rcs1-1 และ rcs1-2 เป็นดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางไปและดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทิศทางกลับ (ภาคผนวก ค ข้อ 2) ขั้นแรกกำหนดอุณหภูมิของปฏิกิริยาเป็น 96 องศาเซลเซียส เติมอีเอกซ์แทคดีเอ็นเอพอลิเมอเรส หลังจากที่อุณหภูมิของปฏิกิริยาเท่ากับ 96 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที แล้วกำหนดให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในรอบปฏิกริยาจำนวน 30 รอบปฏิกิริยา อุณหภูมิในแต่ละรอบปฏิกิริยาเป็นดังนี้ 96 องศาเซลเซียสเพื่อให้ดีเอ็นเอแม่แบบแยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (denaturation) 20 วินาที 55 องศาเซลเซียสเพื่อให้ดีเอ็นเอไพร์เมอร์จับกับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) โดยการจับคู่ของเบสคู่สม 30 วินาทีและ 72 องศาเซลเซียสเพื่อให้อีเอ็กซ์แทคพอลิเมอเรสสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยการนำนิวคลีโอไทด์มาต่อที่ปลายของดีเอ็นเอไพร์เมอร์ (extention) ทิศทาง 5' ไปยัง 3' 90 วินาที เมื่อครบ 30 รอบปฏิกิริยากำหนดให้อุณหภูมิเป็น 4 องศาเซลเซียส 7 นาทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการ PCR โดยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส หากดีเอ็นเอที่สกัดจากผักบุ้งมียีน *rcs*1 เมื่อนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในกระบวนการ PCR จะได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1 กิโลเบส

4.5 การหาขนาดของดีเอ็นเอโดยวิธีอะกาโรสเจลอิเลคโตรโฟริซิส

เทอะกาโรสเจลเข้มข้น 0.8% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE สภาพหลอมเหลวที่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียสลงในแบบพิมพ์ที่มีหวีเสียบอยู่ ปล่อยให้เจลแข็งตัว ผสมสารละลายดีเอ็นเอกับสารละลาย loading buffer ความเข้มข้น 6 เท่า (ภาคผนวก ข ข้อ 18) หยอดลงในหลุมซึ่งเกิดจากการดึงหวีออกจากเจลอะกาโรสที่แข็งตัวหลุมละประมาณ 10 ไมโครลิตร ใช้ดีเอ็นเอแลดเดอร์ (DNA ladder, New England Biolabs, Inc., USA) ซึ่งเป็นสารละลายดีเอ็นเอขนาดความยาวต่าง ๆ ตั้งแต่ 500 เบส ถึง 10 กิโลเบส เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อใช้เปรียบเทียบขนาดความยาวของดีเอ็นเอ ทำอิเล็กโทรโฟริซิสในเจลแชมเบอร์ (gel chamber) ซึ่งบรรจุสารละลาย

บัฟเฟอร์ TAE (ภาคผนวก ข ข้อ 19) ใช้ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ หยุดปฏิกิริยาเมื่อแถบสีน้ำเงินของสารละลาย loading buffer เคลื่อนที่มาเกือบสุดขอบเจลอีกด้านหนึ่ง ย้อมสีดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์โดยแช่แผ่นเจลอะกาโรสที่ได้ในสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข ข้อ 20) เป็นเวลา 5 นาที ล้างแผ่นเจลอะกาโรสโดยแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE เป็นเวลา 20-30 นาที ตรวจดูการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร หาขนาดของแถบดีเอ็นเอโดยการเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน บันทึกผลการทดลองโดยการถ่ายภาพด้วยฟิล์มโพรารอยด์ขาวดำ ความไวแสง 3,000 (ISO3000)

4.6 การหาแอกทิวิตีของซิสเตอีนซินเตสในผักบุ้ง (Youssifian **และคณะ**, 1993)

4.6.1 การเตรียมสารสกัดจากผักบุ้ง

นำใบผักบุ้ง 10 มิลลิกรัม มาทำให้เย็นจนแข็งโดยการแช่ในไนโตรเจนเหลว บดด้วยแท่งพลาสติกจนละเอียด เติมสารละลายเอ็กแทรกชันบัฟเฟอร์ (extraction buffer) 600 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข ข้อ 21) ปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที (9,200 X g) 30 นาที ดูดสารละลายใสส่วนบนใส่ในหลอดไมโครฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บในน้ำผสมน้ำแข็ง ผักบุ้งแต่ละพันธุ์ทำ 3 ซ้ำ

4.6.2 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของแบรดฟอร์ด (Bradford, 1976)

ดูดน้ำสกัดจากผักบุ้ง (ที่ได้จาก ข้อ 4.6.1) 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร ที่มีสารละลายแบรดฟอร์ด (Bradford reagent) (ภาคผนวก ข ข้อ 10) 5 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มอล 250 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA (bovine serum albumin) ความเข้มข้น 0-180 ไมโครกรัม/100ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข ข้อ 10 ภาพที่ ข .1)

4.6.3 การหาแอกทิวิตีของซิสเตอีนซินเตสในผักบุ้งตามวิธีของ Youssifian และคณะ (1993)

หาแอกทิวิตีของซิสเตอีนซินเตสจากปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนที่เกิดขึ้นเมื่อใช้โซเดียมซัลไฟด์และโอ-แอซีทิล-แอล-เซอรีน (O-acetyl-L-serine) เป็นสับสเตรท และใช้ไพริดอกซอล 5' ฟอสเฟต (Pyridoxal-5-phosphate) เป็นโคแฟกเตอร์ในปฏิกิริยา วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนที่เกิดขึ้นโดยทำปฏิกิริยากับสารละลายนินไฮดรินในสภาพที่เป็นกรด กรดอะมิโนซิสเตอีนจะให้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีชมพูซึ่งดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (Gaitonde, 1967) โดยนำสารสกัดจากผักบุ้ง (ที่ได้จาก ข้อ 4.6.1) ที่มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 1 ไมโครกรัม (ผลการคำนวณจาก ข้อ 4.6.2) มาเติมลงในส่วนผสมของปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วยสารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ความเป็นกรดด่าง 8.0 ความเข้มข้นสุดท้าย 50 มิลลิโมลาร์ สารละลายไดไธโอทรีอิทอล (Dithiothreitol) ความเข้มข้นสุดท้าย 5 มิลลิโมลาร์ สารละลายไพริดอกซอล-5'-ฟอตเฟตความเข้มข้นสุดท้าย 5 ไมโครโมลาร์ สารละลายโอ-แอซีทิล-แอล-เซอรีน ความเข้มข้นสุดท้าย 10 มิลลิโมลาร์ และสารละลายโซเดียมซัลไฟด์ความเข้มข้นสุดท้าย 2 มิลลิโมลาร์ ในปริมาตรสุดท้าย 100 ไมโครลิตรซึ่งบรรจุในหลอดไมโครฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acid) เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก / ปริมาตร) (ภาคผนวก ข ข้อ 11) 20 ไมโครลิตร กรดอะซิติกเข้มข้น 100 ไมโครลิตรแล้วเติมสารละลายนินไฮดริน (Ninhydrin solution) (ภาคผนวก ข ข้อ 12) 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันนำไปต้มในน้ำเดือด 10 นาที ทำให้เย็นทันทีโดยการนำไปแช่ในน้ำผสมน้ำแข็ง เติมเอทานอลสมบูรณ์ที่เย็น 550 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ใช้หลอดที่หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ทันทีที่เวลาศูนย์เป็นตัวเทียบค่าในการวัดค่าการดูดกลืนแสงของทุกการทดลอง คำนวณแอกทิวิตีของซิสเตอีนซินเตสโดยกำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ คือจำนวนของเอนไซม์ที่ทำให้เกิดกรดอะมิโนซิสเตอีน 1 ไมโครโมล ที่ภาวะที่ทดสอบภายในเวลา 1 นาที และกำหนดให้ค่า extinction coefficient ของกรดอะมิโนซิสเตอีนเท่ากับ 25000 $M^{-1}cm^{-1}$ โดยทำซ้ำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

4.7 การหาแอกทิวิตีของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสในผักบุ้งตามวิธีของ Kredich และ Tomkins (1966)

หาแอกทิวิตีของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสจากปริมาณโคเอนไซม์เอ (CoA-SH) ที่เกิดขึ้นเมื่อใช้ แอซีทิล-โคเอนไซม์-เอ (acetyl Coenzyme A) และแอล-เซอรีน (L-serine) เป็นสับสเตรทในปฏิกิริยาการสังเคราะห์โอ-แอซีทิล-แอล-เซอรีน (O-acetyl-L-serine) โคเอนไซม์เอที่ปล่อยออกมา

จากแอซีทิล-โคเอนไซม์-เอจะทำปฏิกิริยากับ 5,5'- ไดไธโอ-บิส-(2-ไนโตรเบนโซอิก แอซิด) (5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) ได้ผลิตภัณฑ์คือ กรดไธโอไนโตรเบนโซอิก (thionitrobenzoic acid) ซึ่งวิเคราะห์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร ส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วยสารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 7.6 ความเข้มข้นสุดท้าย 50 มิลลิโมลาร์ สารละลายแอซีทิล-โคเอนไซม์-เอ ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 มิลลิโมลาร์ สารละลายอีดีทีเอความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิโมลาร์ และสารละลายแอล-เซอรีนความเข้มข้นสุดท้าย 20 มิลลิโมลาร์ ซึ่งบรรจุในหลอดไมโครฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร บ่มส่วนผสมของปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เริ่มปฏิกิริยาโดยเติมน้ำสกัดจากผักบุ้ง (ที่ได้จาก ข้อ 4.6.1) ที่มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 15 ไมโครกรัม (ผลการคำนวณจาก ข้อ 4.6.2) ลงในส่วนผสมของปฏิกิริยาในปริมาตรสุดท้าย 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (trichloroacetic acid) เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก / ปริมาตร) 100 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร ใช้หลอดที่หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ทันทีที่เวลาศูนย์ เป็นตัวเทียบค่าในการวัดค่าการดูดกลืนแสง คำนวณแอกทิวิตีของเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายโคเอนไซม์เอที่ความเข้มข้นต่างๆ (ภาคผนวก ข ข้อ 13 ภาพที่ ข.2) กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ คือ จำนวนของเอนไซม์ที่ทำให้เกิดโคเอนไซม์เอ 1 มิลลิโมลาร์ ที่ภาวะทดสอบในเวลา 1 นาที

4.8 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนในผักบุ้งโดย HPLC ตามวิธีของ Noctor และ Foyer (1998)

4.8.1 การเตรียมน้ำสกัดจากผักบุ้ง

นำใบของผักบุ้ง 100 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรมาทำให้เย็นจนแข็งโดยการแช่ในไนโตรเจนเหลว บดให้ละเอียดด้วยแท่งพลาสติก เติมสารละลายเอ็กแทรคชันบัฟเฟอร์ 600 ไมโครลิตร (ภาคผนวก ข ข้อ 14) รอให้ผักบุ้งที่บดละเอียดละลายจนหมด ปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที (15,500 X g) 30 นาที นำส่วนน้ำใสมาทำการวิเคราะห์ต่อไป

4.8.2 การติดฉลากน้ำสกัดจากผักบุ้งด้วยสารโมโนโบรโมบิเมน (monobromobimane)

นำน้ำสกัดจากใบผักบุ้งที่ได้ (ผลจากข้อ 4.8.1) 200 ไมโครลิตร มาติดฉลากกลุ่มอะมิโนกลูตามิล (glutamyl amino group) โดยใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายไดไธโอทรีอิทอล (Dithiothreitol; DTT) เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (ภาคผนวก ข ข้อ 15) 20 ไมโครลิตร สารละลายเอ็น – ไซโคลเฮ็กซิล – 2 – อะมิโนอีเทนซัลโฟนิคแอซิด (N - cyclohexyl – 2 - aminoethanesulfonic acid; CHES) เข้มข้น 0.5 โมลาร์ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 9.3 (ภาคผนวก ข ข้อ 16) 100 ไมโครลิตร สารละลายโมโนโบรโมบิเมน (monobromobimane) ซึ่งละลายในอะซิโตไนไทร์ล (acetonitrile) (ภาคผนวก ข ข้อ 17) เข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็วทันที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที แล้วเติมสารละลายกรดอะซิติก เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) 0.8 มิลลิลิตร แช่หลอดไมโครฟิวจ์ในอ่างน้ำผสมน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที ย้ายส่วนผสมทั้งหมดมาใส่ในหลอดไมโครฟิวส์ที่มีหัวกรองขนาด 0.22 ไมครอน (Ultrafree-MC Centrifugal Filter Devices) (Millipore Corporation; Bedford USA) ปั่นเหวี่ยงที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที (5,000 X g) 2 นาที นำส่วนใสที่ได้ 20 ไมโครลิตรไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนโดยวิธี HPLC

4.8.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนซีสเตอีนและกลูตาไธโอนโดยวิธี HPLC

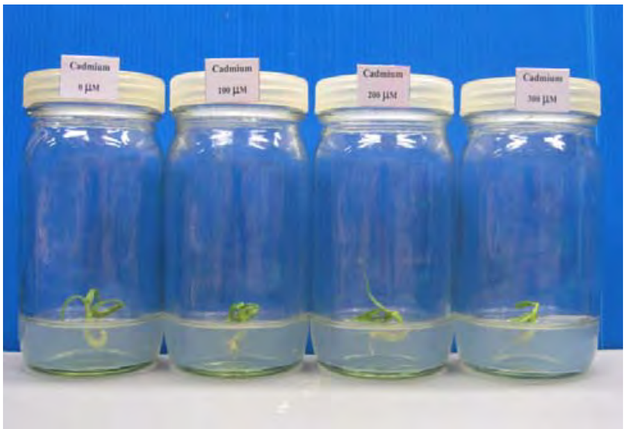
วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนซีสเตอีนและกลูตาไธโอนโดยวิธี HPLC ที่ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ใช้เครื่อง HPLC (HP 1100, Hewlett Packard, USA) คอลัมน์ชนิด Hypersil ODS ขนาด 4.0 มิลลิเมตร X 250 มิลลิเมตร (Agilent Technologies, USA) และใช้ detector ชนิด fluorometer ที่มี filter detector (excitation 384 nm และ emission ที่ 462 nm) (Hewlett Packard, USA) สภาวะที่ใช้แยกสารตัวอย่างเป็นดังนี้ ใช้สารละลายตัวชะ (mobile phase) 2 ชนิด คือ สารละลาย A (สารละลายเมธานอล 10 เปอร์เซ็นต์ ที่มีกรดอะซิติก 0.25 เปอร์เซ็นต์ค่าความเป็นกรดด่าง 4.3 โดยการปรับด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์) และสารละลาย B (สารละลายเมธานอล 90 เปอร์เซ็นต์ที่มีกรดอะซิติก 0.25 เปอร์เซ็นต์ค่าความเป็นกรดด่าง4.3 อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาณสารตัวอย่างที่ฉีดคือ 20 ไมโครลิตร Retention time ของกรดอะมิโนซิสเตอีน และกลูตาไธโอนคือ 5.696 นาที และ 6.008 นาที ตามลำดับ สารละลายมาตรฐานประกอบด้วยกรดอะมิโนซีสเตอีนเข้มข้นตั้งแต่ 0.2-1 ไมโครโมลาร์และกลูตาไธโอนเข้มข้นตั้งแต่ 2-10 ไมโครโมลาร์ ในสารละลายเอกแทรคชันบัฟเฟอร์ เปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโนซีสเตอีนและกลูตาไธโอนในน้ำสกัดจากใบของผักบุ้งแปลงพันธุ์และผักบุ้งพันธุ์เดิม

4.9 การเปรียบเทียบความทนต่อแคดเมียมของผักบุ้ง

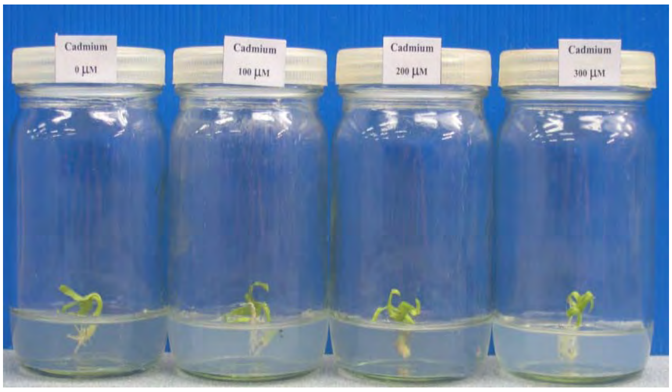
4.9.1 เปรียบเทียบความทนต่อแคดเมียมของผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์และผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์ที่มียีน *SAT*1 ร่วมกับยีน *rcs*1 กับผักบุ้งไทยและผักบุ้งจีนพันธุ์เดิม

4.9.1.1 ความทนต่อแคดเมียมของผักบุ้งไทยและผักบุ้งจีนพันธุ์เดิม

ปลูกต้นผักบุ้งไทยหรือผักบุ้งจีนพันธุ์เดิมขนาดความสูงประมาณ 1.5 เซนติเมตรลงบนอาหารแข็ง MS ที่มีแคดเมียมคลอไรด์ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 100, 200 และ 300 ไมโครโมล/ลิตร (ภาพที่ 4.5) บ่มในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสีขาวความเข้ม 3,000 ลักซ์ ระยะเวลาการให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน 7 วัน เปรียบเทียบความทนต่อแคดเมียมจากขนาดความสูงที่เพิ่มขึ้น ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ



ก



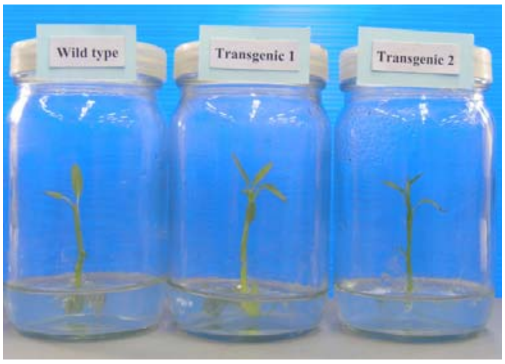
ข

ภาพที่ 4.5 การทดสอบความทนต่อแคดเมียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 100, 200 และ 300 ไมโครโมลาร์ ของผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม (ก) ผักบุ้งจีนพันธุ์เดิม (ข)

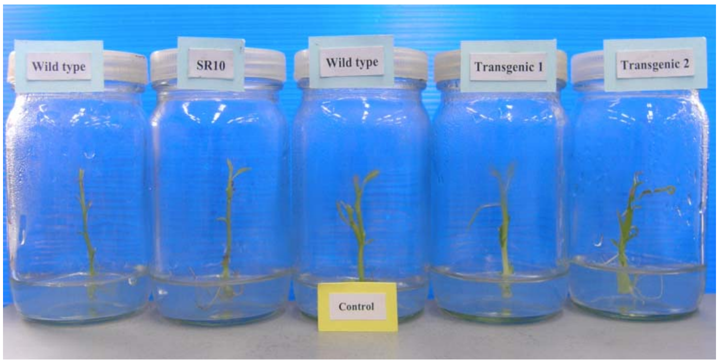
4.9.1.2 เปรียบเทียบความทนต่อแคดเมียมของผักบุ้งแปลงพันธุ์และผักบุ้งพันธุ์เดิม

ปลูกต้นผักบุ้งแปลงพันธุ์และผักบุ้งพันธุ์เดิมขนาดความสูงประมาณ 5 เซนติเมตรลงบนอาหารแข็ง MS ที่มีแคดเมียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ (ภาพที่ 4.6) บ่มในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสีขาวความเข้ม 3,000 ลักซ์ ระยะเวลาการให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน เป็นเวลา 14 วัน วัดความสูงของลำต้นและความยาวของรากด้วยไม้บรรทัด โดยวัดจากโคนต้นจนถึงปลายยอดอ่อนของลำต้นและวัดรากเส้นที่ยาวที่สุด เปรียบเทียบความทนต่อแคดเมียมจากขนาดความสูงของลำต้นและความยาวของรากที่เพิ่มขึ้น ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ

ก



ข



ค

ภาพที่ 4.6 การปลูกต้นผักบุ้งในอาหารแข็ง MS ที่มีแคดเมียมคลอไรด์ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 14 วัน

ก. ต้นผักบุ้งจีนพันธุ์เดิม (wild type) และ ต้นผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์ SR 10 (จอมขวัญ มีรักษ์, 2547)

ข. ต้นผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม (wild type) และ ต้นผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ Tr1 และ Tr 2

ค. ต้นผักบุ้งจีนพันธุ์เดิม ต้นผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์ SR 10 ต้นผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม และ ต้นผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ Tr1 และ Tr 2 ปลูกในสภาวะไม่มีแคดเมียมคลอไรด์เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม

4.10 การเปรียบเทียบปริมาณแคดเมียมที่สะสมในเซลล์ของต้นผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์และผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์ที่มียีน *SAT*1 ร่วมยีน *rcs*1 กับผักบุ้งพันธุ์เดิม

ปลูกต้นผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์และผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์ที่มียีน *SAT*1 ร่วมกับ *rcs*1 และผักบุ้งพันธุ์เดิมขนาดความสูงของต้น 5 เซนติเมตร บนอาหารแข็ง MS ที่เติมแคดเมียมคลอไรด์เข้มข้น 200 ไมโครโมล/ลิตร บ่มในห้องควบคุมอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ให้แสงสีขาวความเข้ม 3,000 ลักซ์ ระยะเวลาการให้แสง 16 ชั่วโมง/วัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ แยกส่วนที่เป็นต้นกับส่วนรากออกจากกัน ทำให้แห้งที่ 90 องศาเซลเซียสข้ามคืน บดให้ละเอียดด้วยครกบดยา ชั่งผักบุ้งที่บดละเอียด 40 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดพลาสติกที่มีความจุ 12 มิลลิลิตร ย่อยผักบุ้งโดยเติมกรดไนตริกเข้มข้น 65 เปอร์เซ็นต์ 1 มิลลิลิตร ต้มที่ 100 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 10 มิลลิลิตร (Lahner และคณะ, 2003) แล้ววิเคราะห์ปริมาณแคดเมียมในต้นและรากโดยเครื่อง Flame Atomic Absorption Spectrophotometer รุ่น AAS ZEEnit 700 Analytik Jena AG, Germany หาปริมาณแคดเมียมโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ข ข้อ 22) เปรียบเทียบปริมาณแคดเมียมที่สะสมในเซลล์ของต้นและของรากของผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์และผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์ที่มียีน *SAT*1 ร่วมกับ *rcs*1 กับผักบุ้งพันธุ์เดิม

4.11 การศึกษาลักษณะที่ปรากฏ (phenotype) ของผักบุ้ง

ปลูกต้นผักบุ้งแปลงพันธ์ที่มียีน *SAT*1 ร่วมกับยีน *rcs*1 และผักบุ้งพันธุ์เดิมในอาหารเหลวสูตร Hoagland (ภาคผนวก ก ข้อ 5) เป็นเวลา 3-4 สัปดาห์ ศึกษาลักษณะภายนอก ลักษณะลำต้น ใบของต้นผักบุ้งแปลงพันธุ์เปรียบเทียบกับผักบุ้งพันธุ์เดิม

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

จอมขวัญ มีรักษ์. 2547. "การสร้างผักบุ้งจีน *Ipomoea aquatica* Forsk แปลงพันธุ์ที่มียีนระบุเซอรีนแอซีทิลแทรนส์เฟอเรสจาก *Arabidopsis thaliana* และยีนระบุรหัสซิสเตอีนซินเตสจากข้าวจ้าว *Oryza sativa*" วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Akaracharanya, A., Young-Eui, C., Kusano, T., Shinmyo, A., and Sano, H. 2001. Efficient plant regeneation of *Ipomoea aquatica* by direct shoot formation from cotyledon segments. Plant Biotech 18(1): 77-79.

Baecker, P.A., and Wedding, R.T. 1980. Purification of serine acetyltransferase , a component of multienzyme complex. Anal Biochem 102:16-21.

Cobbett, C.S. 2000. Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Curr. Opin.* Plant Biol 3: 211–216.

Dominguez-Solis, J.R., Guti'errez-Alcala', G., Vega, J.M.,Romero, L.C., and Gotor, C. 2001. The cytosolic *O*-acetylserine (thiol) lyase gene is regulated by heavy metals and can function in cadmium tolerance. J. Plant Biotechnology 276 : 9297-9302.

Dominguez-Solis, J.R., Lopez-Martin, M.C., Agar, F.J., Ynsa, D.M., Romero, L.C., and Gotor, C. 2004. Increased cysteine availability is essential for cadmium tolerance and accumulation in *Arabidopsis thaliana*. J. Plant Biotechnology 2 : 469-476.

Edward, K., Johnstone, C., and Thompson ,C. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucl.Acids Res 19(6):1349.

Frame, B.R., Shou, H., Chikwamba, R.K., Zhang, Z., Xiang, C., Fonget, T.M., Pegg, S.E. K., Li, B., Nettleton, D.S., Pei, D., and Wang, K. 2002. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. Plant Physiol 129: 13-22.

Gaitonde, M.K. 1967. A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acid. Biochem J. 104: 627-633.

Harada, E., Choi, Y-E., Tsuchisaka, A., Oata, H., and Sano, H. 2001. Transgenic tobacco plants expressing a rice cysteine synthase gene are tolerant to toxic levels of cadmium. Plant Physiol 158: 655-661.

Heie, Y., Ohta, S., Lomari, K., and Kumashiro, T. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of bounavies of T-DNA. Plant 6: 271-282.

Hood, E.E., Helmer, G.L., Fraley, R.T., and Chilton, M. 1986. The hypervirulende of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. J. Bacteriol 168: 1291-1301.

Howarth, J.R., Dominguez-Solis, J.R., Gutierrez-Alcala, G., Wray, J.L., Romero, L.C., and Gotor, C. 2003. The serine acetytrausferase gene family in *Arabidopsis thaliana* and the regulation of its expression by cadmium. Plant Molecular Biology 51: 589-598.

Jame, D.J., Uratsu, S., Cheng, J., Negri, P., and Dandekar , A.M. 1993. Acetosyringone and osmoprotectant like betin of proline synergistically enchance *Agrobacterium*-mediater transformation of apple. Plant . Cell. Report 12: 559-563.

Kawashima, C.G., Noji, M., Nakamura, M., Ogra, Y., Suzuki, T.K., and Saito, K. 2004. Heavy metal tolerance of transgenic tobacco plants over-expressing cysteine synthase. Biotechnology Letters 26:153-157.

Kimura, T., Takeda, S., Kyozuka, J., Asahi, T., Shimamoto, K., and Nakamura, K. 1993. The presequence of a precursor to the δ-subunit of sweet potato mitochondrial F_1 ATPase is not sufficient for the transport of ß-glucuronidase (GUS) into mitochrondrial of tobacco, rice and yeast cells. Plant Cell Physiol 34(2) : 345-355.

Khamwan K., Akaracharanya A., Chareonporwattana S., Choi YE., Nakamura T, Yamaguchi Y., Sano H., Shinmyo A. 2003. Genetic transformation of water spinach (*Ipomea aquatica*). Plant Biotech 20: 335-338

Kredich, N.M., and Tomkins, G.M. 1980. The enzymic synthesis of L-cysteine in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimirium*. J. Biol. Chem 241(21):4955-4965.

Lahner, B., Gong, J., Mahmoudian, M., Smith, E.L., Abid, K.B., Rogers, E.E., Guerinot, M.L., Harper, J.F., Ward, J.M., McIntyre, L., Schroeder, J.I., and Salt, D. 2003. Genomic scale profiling of nutrient and trace elements in *Arabidopsis thaliana*. Nature Biotechnology 21: 1215-1221.

Meerak, J., Akaracharanya, A., Leepipatpiboon, N., Chadchawan, S., Kaothien-Nakayama, P., Shinmyo, A., and Sano, H. 2006. Simultaneous expression of serine acetyltransferase and cysteine synthase results in enhanced sulfate uptake and increased biomass in *Ipomoea aquatica*. Plant Biotech 23: 185-189.

McGrath, S.P., Zhao, F.J., and Lombi, E. 2001. Plant and rhizosphere processes involved in phytoremediation of metal-contaminated soils. Plant Soil 232: 207–214.

Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assay with tobacco tissue cultures. Physiol Pl 15: 473.

Nakamura, T., Yamaguchi, Y., and Sano, H. 1999. Four rice genes encoding cysteine synthase : isolation and differential responses to sulfur, nitrogen and light. Gene 229: 155-161.

Noctor, G., and Foyer, C.H. 1998. Simultaneous measurement of foliar glutathione, γ -glutamylcysteine, and amino acids by high-performance liquid chromatography : comparison with two other assay methods for glutathione. Annal.Biochem 264: 98-110.

Noji, M., Inoue, K., Kimura, N., Gouda, A., and Saito, K. 1998. Isoform–dependent differences in feedback regulation and subcellular localization of serine acetyltransferase involved in cysteine biosynthesis from *Arabidopsis thaliana* . J. Biol. Chem 273(49): 32739-32745.

Noji M., Saito, M., nakamura, M., Aono, M., Saji, H., and Saito, K. 2001. Cysteine synthase overexpression in tobacco confers tolerance to sulfur-containing environmental pollutans. Plant Phyiol 126: 973-980.

Palada, M. C. And Crossman, S. M.A. 1999. Evaluation of Tropical Leaf Vegetables in the Virgin Islands. In: J. Janick(ed.) Perspectives on new crops and new uses, p. 391. Verginia: ASHS Press, Inc.

Peterson, P. J., and Alloway, B. J. 1979. The Chemistry, Biochemistry and Biology of cadmium. M. Webb (ed.) pp.45-62. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.

Raskin, I., and Ensley, B.D. 2000. Phytoremediation of Toxic Metals. Using Plants to Clean Up the Environment pp 191-287. John Wiley & Sons, Inc., London.

Rauser, W. E. 1995. Phytochelatins and related peptides. Plant Physiol 109: 1141–1149.

Ruffet, M.L., Droux, M., and Douce, R. 1994. Purification and kinetic properties of serine acetyltransferase free of O-acetylserine(thiol)lyase from *Spinach* chloroplasts . Plant Physiol 104: 597-604.

Sahi, S.V., Ronald, W.G., Mary-Dell, C., and Willium, S.C. 1994. A thni layer chromatographic technique for deterting inducers of *Agrobacterium* virulence genes in corn, wheat and rice. Plant Cell Reports 13 : 489-492.

Saito, K. 2000. Regulation of sulfate transport and synthesis of sulfur-containing amino acids. Curr Opin Plant Biol 3(3): 188-195.

Strohm, M., Jouanin, L., Kunert, KJ., Pruvost, C., Polle, A., Foyer, CH., and Rennenberg, H. 1995. Regulation of glutathione synthesis in leaves of transgenic poplar (*Populus tremula x Pl alba*) overexpressing glutathione synthetase. Plant J 7: 141–145.

Sun, Q., Wang, X.R., Ding, S.M., and Yuan, X.F. 2005. Effects of interaction between cadmium and plumbum on phytochelatins and glutathione production in wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Biology 47 : 435-442.

Vassilev, A., Tsonev, T., and Yordanov, I. 1998. Physiological response of barley plants (*Hordeum vulgare*) to cadmium contamination in soil during ontogenisis. Environmental Pollution 103: 287-293.

Vido, K.A. 2001. Proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem 276: 8496-8474.

Yamaguchi, K.I., Song, G.Q., and Honda, H. 2004. Efficient *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) from stem explants using a two-step kanamycin-hygromycin selection method. *In Vitro Cellular and Development Biology-Plant* 40: 359-365.

Youssefian, S., Nakamura, M., and Sano, H. 1993. Tobacco plants transformed with the O-acetylserine(thiol)lyase genes of wheat are resistant toxic levels of hydrogen sulfide gas. Plant J 4(5): 459-469.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ YEP

แบคโต-เปปโตน(Bacto Peptone)	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์(Yeast Extract)	10	กรัม
โซเดียมคลอไรด์(Sodium Chloride)	5	กรัม
วุ้นผง(Agar)	15	กรัม

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 7.5 นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962)

ธาตุอาหารหลัก :

แอมโมเนียมไนเตรท(Ammonium Nitrate)	0.825	กรัม
โปแตสเซียมไนเตรท(Potassium Nitrate)	0.950	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท(Magnesium sulfate haptahydrate)	0.185	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรท(Calcium chloride dihydrate)	0.220	กรัม
โปแตสเซียมฟอสเฟส(Potassium phosphate)	0.085	กรัม
ไอออน II ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท(Iron (II)sulfate haptahydrate)	0.0139	กรัม

ธาตุอาหารรอง :	เตรียมเป็นสารละลาย (มิลลิกรัม / มิลลิลิตร)
โซเดียมอีดีทีเอ(Sodium ethylenediamine tetraacetic acid)	18.65
แมงกานีสซัลเฟตเพนตะไฮเดรท(Manganese sulphate pentahydrate)	11.15
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท(Zing sulphate haptahydrate)	4.3
โซเดียมโมลิบเดท(Sodium Molybdate)	0.125

กรดบอริก(Boric acid)	3.1
โปแทสเซียมไอโอไดด์(Potassium Iodide)	0.415
โคบอลท์คลอไรด์เฮกสะไฮเดรท(Cobaltchloride hexahydrate)	0.0125
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรท(Coppersulphate pentahydrate)	0.0125

ใช้ 1 มิลลิลิตร ของสารละลายธาตุอาหารรองต่ออาหาร 1 ลิตร

องค์ประกอบวิตามิน:	เตรียมเป็นสารละลาย (มิลลิกรัม)
อินโนซิทอล(Inositol)	1000
ไกลซีน(Glycine)	20
ไพริดอกซินไฮโดรคลอไรด์(Pyridoxine hydrochloride)	5.0
กรดนิโคตินิก(Nicotinic acid)	5.0
ไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์(Thiamine hydrochloride)	4.0

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกันปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ใช้ 10 มิลลิลิตร ต่อ อาหาร 1 ลิตร

น้ำตาลซูโครส(Sucrose)	30	กรัม
วุ้นผง(Phytagel : Sigma., USA)	3.5	กรัม

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกันปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 5.8 นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหาร MMS (Murashige and Skoog, 1962)

ธาตุอาหารหลัก :

แอมโมเนียมไนเตรท(Ammonium Nitrate)	0.825	กรัม
โปแตสเซียมไนเตรท(Potassium Nitrate)	0.950	กรัม

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท(Magnesium sulfate haptahydrate)	0.185 กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรท(Calcium chloride dihydrate)	0.220 กรัม
โปแตสเซียมฟอสเฟส(Potassium phosphate)	0.085 กรัม
ไอออน II ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท(Iron (II)sulfate haptahydrate)	0.0139 กรัม

ธาตุอาหารรอง :	เตรียมเป็นสารละลาย (มิลลิกรัม / มิลลิลิตร)
โซเดียมอีดีทีเอ(Sodium ethylenediamine tetraacetic acid)	18.65
แมงกานีสซัลเฟตเพนตะไฮเดรท(Manganese sulphate pentahydrate)	11.15
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท(Zing sulphate haptahydrate)	4.3
โซเดียมโมลิบเดท(Sodium Molybdate)	0.125
กรดบอริก(Boric acid)	3.1
โปแทสเซียมไอโอไดด์(Potassium Iodide)	0.415
โคบอลท์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรท(Cobaltchloride hexahydrate)	0.0125
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรท(Coppersulphate pentahydrate)	0.0125

ใช้ 1 มิลลิลิตร ของสารละลายธาตุอาหารรองต่ออาหาร 1 ลิตร

องค์ประกอบวิตามิน:	เตรียมเป็นสารละลาย (มิลลิกรัม)
อินโนซิทอล(Inositol)	1,000
กรดนิโคตินิก(Nicotinic acid)	5.0
ไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์(Thiamine hydrochloride)	1.0
กรดโฟลิก(Folic acid)	5.0

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดโดยค่อยๆเติมโซเดียมไฮดรกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มอล

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ใช้ 10 มิลลิลิตรต่ออาหาร 1 ลิตร

น้ำตาลซูโครส(Sucrose)	30	กรัม
วุ้นผง(Phytagel : Sigma., USA)	3.5	กรัม

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกันปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 5.8 นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5 สารละลายธาตุอาหารสูตร Hoagland complete

	ปริมาตรที่ใช้
แคลเซียมไนเตรต (calcium nitrate)เข้มข้น 1 โมลาร์	10 มิลลิลิตร
โปแตสเซียมไนเตรต (potassium nitrate) เข้มข้น 1 โมลาร์	10 มิลลิลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟต (magnesium sulfate) เข้มข้น 1 โมลาร์	4 มิลลิลิตร
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอตเฟต (potassium dihydrogen phosphate) เข้มข้น 1 โมลาร์	2 มิลลิลิตร
อีดีทีเอ ไดโซเดียม (EDTA disodium salt) 2.5 มิลลิกรัม/ลิตร	4 มิลลิลิตร

ธาตุอาหารรอง (micronutrient)

ประกอบด้วย	ปริมาณ
กรดบอริก (boric acid)	2.86 กรัม
คอปเปอร์ II ซัลเฟต (copper II chloride)	0.05 กรัม
แมงกานีส II ซัลเฟต (manganes II sulfate)	1.81 กรัม
ซิงค์คลอไรด์ (zine chloride)	0.11 กรัม
โซเดียมโมลิบเดท (sodium molybdate)	0.025 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรจนเป็น 1 ลิตร ปริมาตรที่ใช้ 2 มิลิลิตร

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกันปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 2,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 5.8

ภาคผนวก ข

1. สารละลายไฮโกรมัยซิน (Hygromycin) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

   ละลายไฮโกรมัยซินบี 250 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

2. สารละลายอะซิโตไซริงโอน (Acetosyringone) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

   ละลาย3’ ,5’-ไดเมทอกซี-4’-ไฮดรอกซีอะซิโตฟีโนน (3’ ,5’-Dimethoxy-4’-hydroxy-aectophenone) 250 มิลลิกรัมในไดเมทิลซัลฟอกไซด์(Dimethy sulfoxid) 5 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

3. สารละลายเซฟโฟแทคซีม (Cefotaxim) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

   ละลายเซฟโฟแทคซีม (Cefotaxim Sodium Salt) 250 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

4. สารละลายไธเดียซูรอน (Thidiazuron) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

   ละลายไธเดียซูรอน 22 มิลลิกรัม ในไดเมทิลฟอร์มามีด (Dimethylformamid) 200 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตรโดยน้ำกลั่นปลอดเชื้อโดยวิธีปราศจากเชื้อ เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

5. สารละลายสำหรับสกัดดีเอนเอจากผักบุ้ง; สารละลายเอ็กแทรกชันบัฟเฟอร์

	ความเข้มข้นสุดท้าย	
สารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 7.5	200	มิลลิโมลาร์
สารละลายอีดีทีเอ ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0	25	มิลลิโมลาร์
เอสดีเอส (SDS)	0.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร)	

   ละลายองค์ประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกันโดยวิธีปราศจากเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิห้อง

6. สารละลายทีอีบัฟเฟอร์ (TE buffer) ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0

	ความเข้มข้นสุดท้าย	
สารละลายทริส-เบส	10	มิลลิโมลาร์
สารละลายอีดีทีเอ ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0	1	มิลลิโมลาร์

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วยไฮโดรคลอริกเข้มข้น จนได้ค่าความเป็นกรดด่างเป็น 8.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

7. เอนไซม์อาร์เอ็นเอส (RNase) ความเข้มข้นสุดท้าย 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

ละลายอาร์เอ็นเอสในสารละลายทริส-คลอไรด์ความเข้มข้นสุดท้าย 10 มิลลิโมลาร์ ที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นสุดท้าย 15 มิลลิโมลาร์ จนได้ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรให้ความร้อน100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แบ่งใส่หลอดไมโครฟิวส์ หลอดละ 0.2 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

8. สารละลายสำหรับสกัดพลาสมิด

8.1 สารละลาย I

	ความเข้มข้นสุดท้าย	
สารละลายกลูโคส	50	มิลลิโมลาร์
สารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0	5	มิลลิโมลาร์
สารละลายอีดีทีเอ ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0	10	มิลลิโมลาร์

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8.2 สารละลาย II

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 นอร์มอล	0.2	มิลลิลิตร
สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้น 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร)	1.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	8.8	มิลลิลิตร

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8.3 สารละลาย III

สารละลายโปแตสเซียมอะซิเตตเข้มข้น 5 โมลาร์	50	มิลลิลิตร
กรดอะซิติกเข้มข้น	11.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	8.5	มิลลิลิตร

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

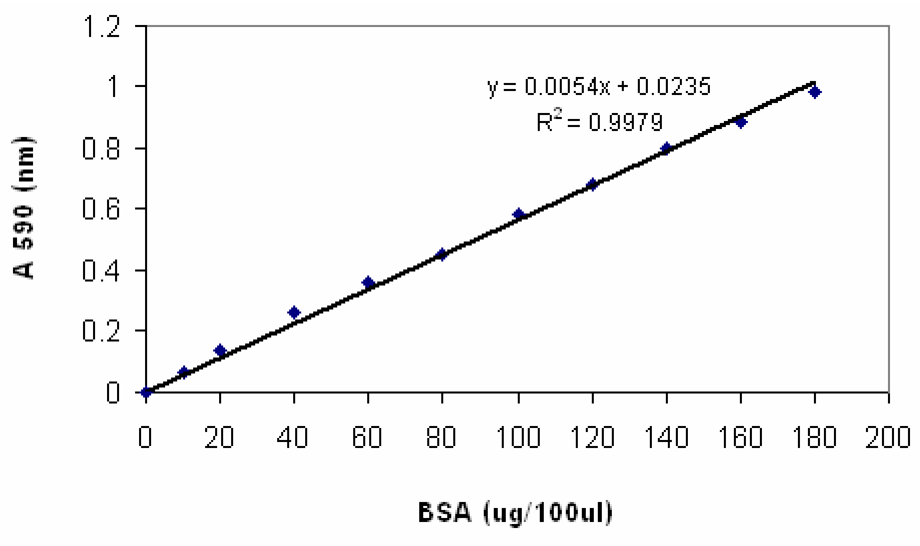
9. สารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์มไอโซเอมิลแอลกอฮอลล์
(phenol chloroform isoamyl alcohol)

นำฟีนอลที่เติมไฮดรอกซีควิโนลิน (8-Hydroxyquinoline) ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) มาทำให้สมดุล (equilibrate) ด้วยสารละลายทริสคลอไรด์บัฟเฟอร์ เข้มข้น 1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดเบส 8.0 จนค่าความเป็นกรดเบสมากกว่า 7.5 แล้วนำมาผสมกับคลอโรฟอร์ม และไอโซเอมิลแอลกอฮอลล์ในอัตตราส่วน 25 : 24 :1

10. สารละลายแบรด์ฟอร์ด (Bradford reagent)

เอทานอลเข้มข้น 95% (ปริมาตร/ปริมาตร)	5	มิลลิลิตร
กรดฟอสโฟริกเข้มข้น 85% (ปริมาตร/ปริมาตร)	10	มิลลิลิตร
สีคูแมสวีบริลเลียนท์บลูจี (Coomassie Brillant blue G)	10	มิลลิกรัม

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร กรองสารละลายผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง



ภาพที่ ข.1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

11. สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (TCA) ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์

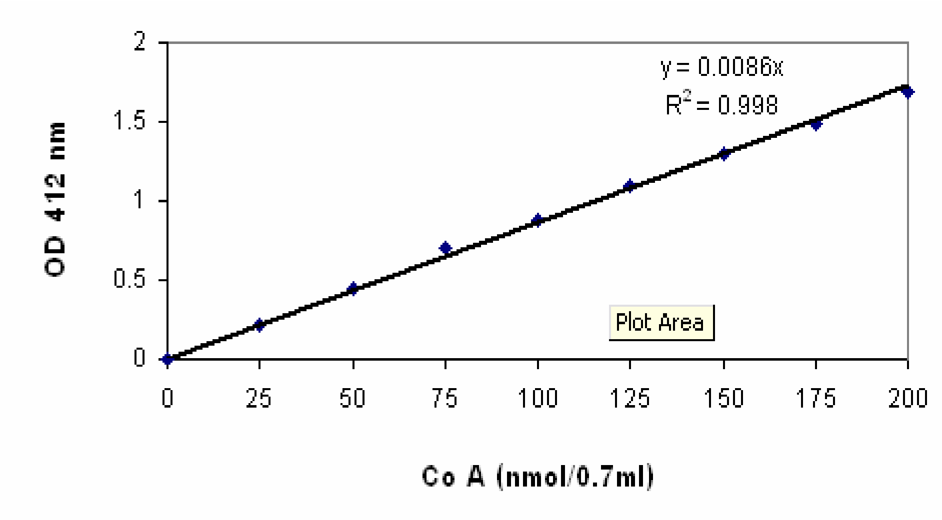
เจือจางสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก ด้วยน้ำกลั่น 5 เท่า ในปริมาตรสุดท้าย 100 มิลลิลิตร

12. สารละลายนินไอดริน (Ninhydrin solution)

นินไฮดริน	250	มิลลิกรัม
กรดอะซิติกเข้มข้น	6	มิลลิลิตร
กรดไอโดรคลอริกเข้มข้ม	4	มิลลิลิตร

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกันแล้วเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

13.



ภาพที่ ข.2 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโคเอนไซม์เอและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร

14. สารละลายเอ็กแทรกชั่นบัฟเฟอร์สำหรับสกัดกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไธโอนที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อพืช

	ความเข้มข้นสุดท้าย	
กรดไฮโดรคลอริก	0.1	นอร์มอล
สารละลายอีดีทีเอ ค่าความเป็นกรดเบส 8.0	1	มิลลิโมลาร์

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น เก็บที่อุณหภูมิห้อง

15. สารละลายไดไธโอทรีอิทอล

ละลายไดไธโอทรีอิทอล 3.09 กรัม ในสารละลายโซเดียมอะซิเตรตเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดเบส 5.2 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน แบ่งใส่หลอดไมโครฟิวส์ หลอดละ 0.2 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

16. สารละลายเอ็น-ไซโคลเอกซิล-2-อีเธนซัลฟิวริกแอซิด (N-cyclohexyl-2-amino ethanesulforic acid)ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดเบส 9.3 ละลายเอ็น-ไซโคลเอกซิล-2-อีเธนซัลโฟริกแอซิด 10.365 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับค่าความเป็นกรดเบสเป็น 9.3 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

17. สารละลายโมโนโบรโมไบเมน (Monobromobimane) ความเข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ ละลายโมโนโบรโมไบเมน 0.0081 กรัม ในอะซิโตไนไตด์ 1 มิลลิลิตร เก็บในที่มืดอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

18. สารละลาย loading buffer ความเข้มข้น 6 เท่า

สีโบรโมฟีนอลบลู (bromophenol blue)	0.25 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)
ไซลีนไซยานอล เอฟ เอฟ (xylene cyanol FF)	0.25 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)
สารละลายกลีเซอรอลเข้มข้น	30 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

19. สารละลายทีเออีบัฟเฟอร์ (TAE buffer) (ความเข้มข้น 50 เท่า)

ทริส-เบส (Tris-base)	202	กรัม
กรดอะซิติกเข้มข้น	57.1	มิลลิลิตร
สารละลายอีดีทีเอ เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรดด่าง 8.0	100	มิลลิลิตร

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

20. สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เจือจางสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์เข้มข้น 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (stock solution) 1,000 เท่า ด้วยสารละลาย TAEบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 1 เท่า (1X TAE)

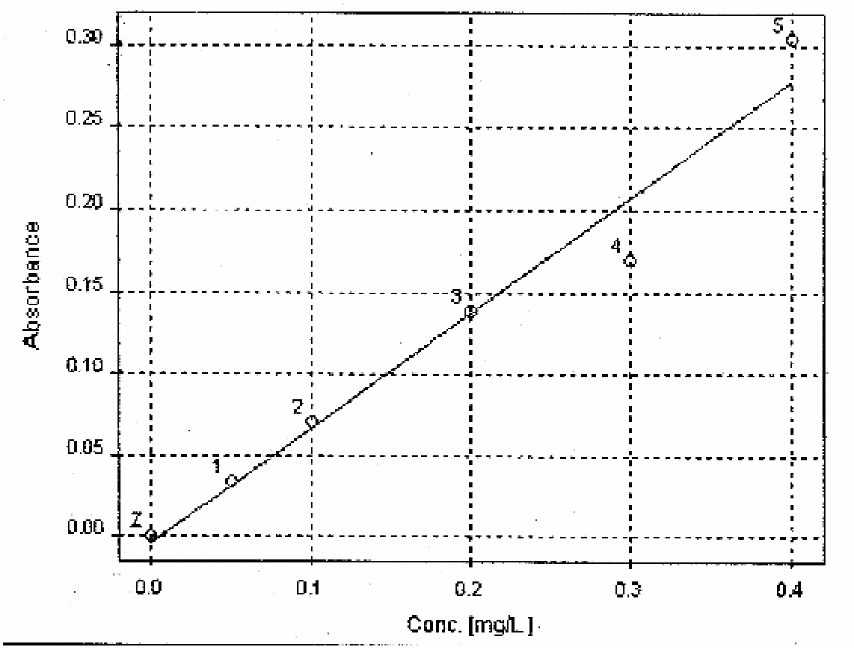
21. สารละลายสำหรับสกัดโปรตีนจากผักบุ้ง : สารละลายเอ็กแทรคชันบัฟเฟอร์

	ความเข้มข้นสุดท้าย	
สารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์		
ความเป็นกรดด่าง 7.5	50	มิลลิโมลาร์
สารละลายอีดีทีเอ ความเป็นกรดด่าง 8.0	1	มิลลิโมลาร์

สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์	5	มิลลิโมลาร์
สารละลายไดไธโอทรีอิทอล	2	มิลลิโมลาร์
ไตรตอนเอ็ก-100 (Triton X-100) (น้ำหนัก/ปริมาตร)	0.1	เปอร์เซ็นต์

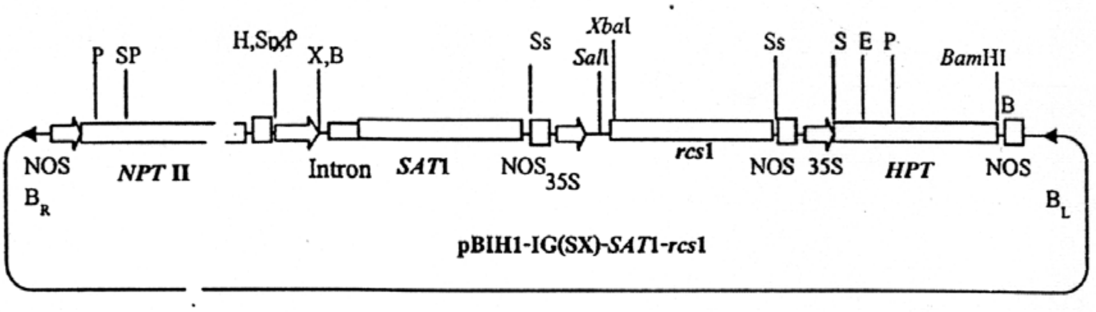
ผสมองค์ประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกันด้วยน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง ยกเว้นสารละลายไดไธโอทรีอิทอลแยกใส่ก่อนสกัด

22.



ภาพที่ ข.3 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นแคดเมียม และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 228.8 นาโนเมตร

ภาคผนวก ค



ภาพที่ ค.1 ตำแหน่งของยีนต่างๆบนพลาสมิด pBIHI-IG(SX)-*SAT*1-*rcs*1 (17 kb)

อักษรย่อของเรสทริกชันเอนไซม์ : P แทน *Pst*I, Sp แทน *Spn*I, H แทน *Hind* III, B แทน *BamH* I, Sแทน *Sal* I, Sn แทน *SnaB*I, X แทน *Xba* I, Ss แทน *Sac* I, E แทน *EcoR* I

```
1 gtcgacccac gcgtccgcaa ggaggagcaa ggattgttgt tgtttcgctg tcagatcgat
                                                            rcs1-1
61 tcctgacggg ataatgggtg agaccatcgc caaggatgtc accgagttga ttgggaacac
                Start codon
121 gccgttggtg tacctcaacc gggtgacgga tgggtgcgtc gggcgcgtcg cggccaagct
181 cgagtccatg gagccatgct ccagcgtcaa ggataggatt ggatacagta tgatcactga
241 tgcagaggag aaggggctga tcactccagg caagagtgtg ctgattgagc caactagtgg
301 caacacaggc attggactgg ccttcatggc tgctgcaaag ggttacaggc ttgtactcac
361 gatgccggcc tccatgagca tggagaggag aatcatattg aaggcttttg gtgctgaatt
421 gatacttact gacccactct tgggaatgaa aggagctgtc caaaaggcag aagaactggc
481 agcgaagaca aacaactcat ttatcctcca acaattcgag aaccctgcta acccaaagat
541 ccattacgag accactggac ctgaaatctg gaaaggaaca ggaggtaaag ttgatggttt
601 agtttctggt attgggacag gtggcactat tactggaact ggacgatacc tcagagagca
661 aaatcctgat atcaagatct atggtgtgga gccagtcgag agcgctgtct tatctggtgg
721 aaagcctggg ccacacaaga ttcaaggaat tggagctggt tttgttcctg ggtcctgga
781 tgttgacctc atcaatgaaa ctgtacaagt ttcaagtgat gaagctatcg agatggcaaa
841 ggctcttgca ttgaaagaag ggttgctggt tggaatatct tcaggtgcag ctgcagcagc
901 agctgttagg ctcgctcaga ggccggaaaa tgaaggaaaa ctttttgttg ttgtcttccc
961 aagctttggt gagcggtacc tttcgtcggt gctcttccag tccatcaaga aggaagctga
                                              rcs1-2
1021aaacatggtg gttgaatgaa atgcacaata tccgggaatc cacaggaata aaagtttggt
                stop codon
1081atctctgctt gtgtgattaa acatacattg tcctgccatt ttcaagttgt tctgcttgtg
1141tagcaatggg gaacacagtg tgttagcctt gtagtgttaa acagtttaca ttttatcttc
1201cctgtatatc agaacccttt acatgggcat ttgtcagcca gtgtgaatga aataaagcat
1261catatgattt gtctcaaaaa aaaaaaaaaa
```

ภาพที่ ค.2 แผนที่ตำแหน่งโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ทั้ง 2 สาย บนลำดับเบสของยีน *rcs*1 (GenBank accession number AF073695) ขนาด 1,290 เบส ลำดับเบสที่ 74-1,039 เป็นบริเวณซึ่งแปลรหัสโปรตีน

atg (start codon) หมายถึง จุดเริ่มต้นของการแปลรหัสโปรตีน

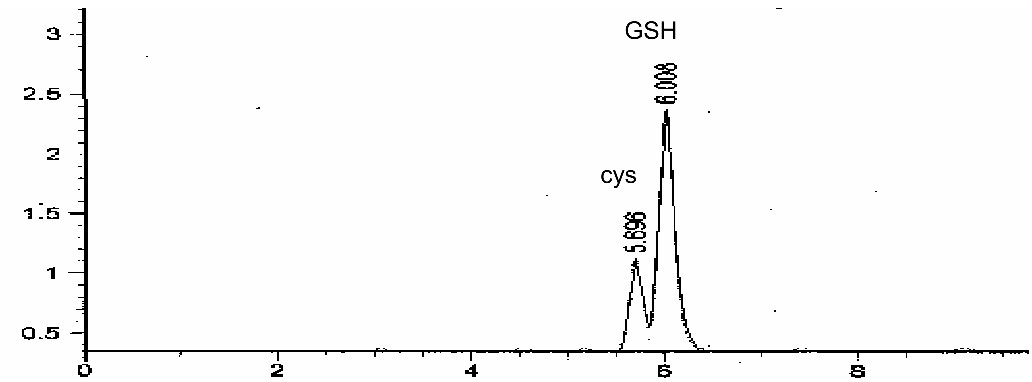
tga (stop codon) หมายถึง จุดสิ้นสุดของการแปลรหัสโปรตีน

```
   1 gcataaacca_tggcaacatg catccacaca tgccgaaccg gtaataccca agacgatgat
         *start codon
  61 tcccggttct gttgcatcaa taaattcttc cgacccggtt tctctgtcaa ccggaagatc
 121 caccacaccc aaatcgaaga tgacgatgat gtctggatca agatgctcaa agaagccgaa
 181 tccgatgtta aacaagaacc cattttgtca aactactact acgcttcgat cacatctcat
 241 cgatctttag agtctgcttt aggtcacatc ctctccgtaa agctcagcaa tttaaaccta
 301 ccaagcaaca cactcttcga actgttcata agcgttttag aagaaagccc tgagatcatc
 361 gaatccacga agcaagatct tatagcagtc aaagaaagag acccagcttg tataagctac
 421 gttcattgct tcttgggctt caaaggcttc ctcgcttgtc aagctcatcg aatagctcat
 481 accctctgga aacagaacag aaaaatcgta gctttattga tccaaaacag agtatcagaa
 541 tctttcgccg tcgatattca tcccggagcg aagatcggaa aagggattct tttagaccat
 601 gcgacgggcg tggttatcgg agagacggcg gtggttggag acaatgtttc gattctacac
 661 ggagtgacct tgggaggaac agggaaacag agtggtgatc ggcatccgaa gattggtgat
 721 ggtgtgttga ttggagctgg gagttgtata ttggggaata taacaatcgg tgagggagct
 781 aagattggat cagggtcggt ggtggttaag gatgtgccgg cgcgtacgac ggcggttgga
 841 aatccggcga ggttgattgg tgggaaagag aatccgagaa aacatgataa gattccttgt
 901 ctgactatgg accagacatc gtatttaacc gagtggtctg attatgtgat ttaacacaaa
                                                        *stop codon
 961 tgtgtatttc tttctttctt gtaactgatg atgatgaaac aagtcttgtc tatttcttaa
1021tattttacta tgtactaatc aaacaagtct tgaaatcaag ctcatcgatc tttaagaag
```

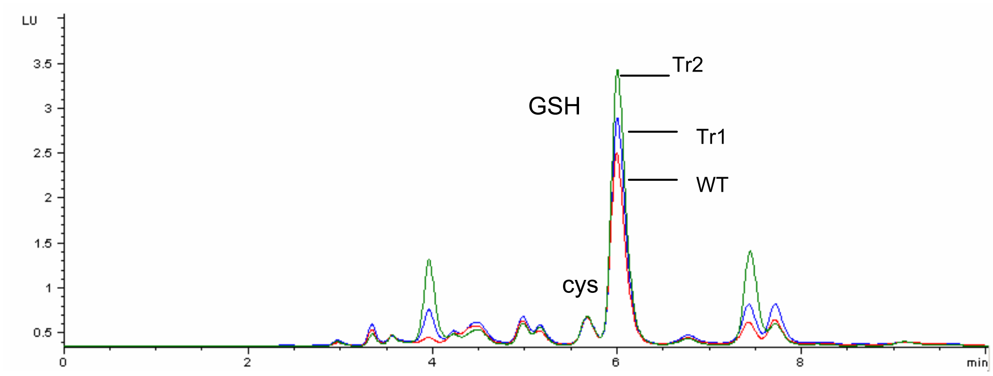
ภาพที่ ค.3 แผนที่ตำแหน่งโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ทั้ง 2 สาย บนลำดับเบสของยีน *SAT*1 (GenBank accession number L42212) ขนาด 1,079 เบส ลำดับเบสที่ 10-954 เป็นบริเวณซึ่งแปลรหัสโปรตีน

atg (start codon) หมายถึง จุดเริ่มต้นของการแปลรหัสโปรตีน

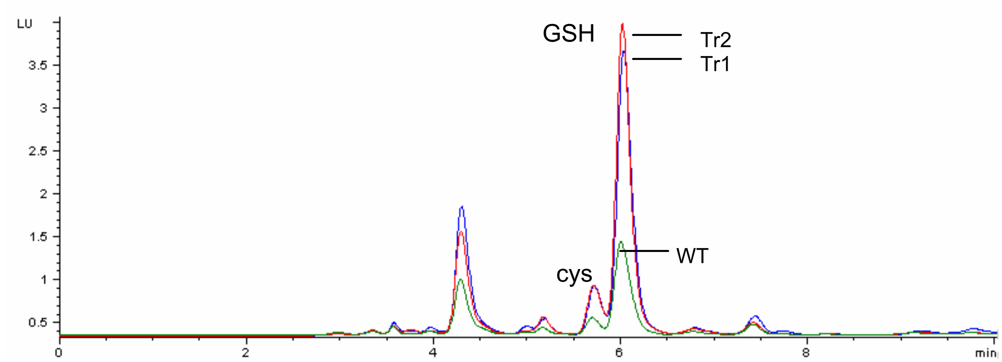
taa (stop codon) หมายถึง จุดสิ้นสุดของการแปลรหัสโปรตีน



ก



ข



ค

ภาพที่ ค.4 โครมาโตแกรมของกรดอะมิโนซิสเตอีน (Cys) และกลูตาไธโอน (GSH) ในสารละลายมาตรฐาน (ก) น้ำสกัดจากใบของผักบุ้งไทยที่เจริญในอาหารเหลวสูตร Hoagland (ข) และน้ำสกัดจากใบผักบุ้งไทยที่เจริญบนอาหารแข็ง MS ที่มีแคดเมียมคลอไรด์เข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ (ค)

WT : ผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม

Tr1 : ผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์

Tr2 : ผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์

1. การคำนวณกิจกรรมจำเพาะ (specific activity)ของซีสเตอีนซินเตส

กำหนด 1 หน่วยเอนไซม์ คือ จำนวนเอนไซม์ที่ทำให้เกิดกรดอะมิโนซิสเตอีน 1 ไมโครโมลที่ภาวะที่ทดสอบในเวลา 1 นาที

$$C = \frac{A}{\varepsilon l}$$

เมื่อ C = ความเข้มข้นของกรดอะมิโนซิสเตอีน (ไมโครโมลาร์)

A = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร

ε = extinction coefficient (กำหนดให้เท่ากับ 25,000 M^{-1} cm^{-1})

l = ระยะของช่องให้แสงผ่านของคิวเวตต์ (path length)(cm)

$$A = X$$

$$l = 1 \text{ ซม.}$$

$$C = \frac{X}{25{,}000}$$

$$C = X / 25{,}000 \text{ โมล(โมล/ลิตร)}$$

เนื่องจากปริมาณช่องแสงที่ใช้ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1 มิลลิลิตร

$$C = X / 25{,}000 \times 10^{-3} \text{ โมล(โมล/มิลลิลิตร)}$$

$$C = X / 25{,}000 \times 10^{-3} \times 10^{6} \text{ ไมโครโมลาร์}$$

2. การคำนวณกิจกรรมจำเพาะ (specific activity) ของเซอรีนแอซีทิลแทรนเฟอเรส (Kredich และ Tomkins, 1966)

กำหนด 1 หน่วยเอนไซม์ คือ จำนวนเอนไซม์ที่ทำให้เกิดโคเอนไซม์เอ 1 มิลลิโมลาร์ ที่ภาวะที่ทดสอบในเวลา 1 นาที

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ T-test

ตารางที่ ง.1 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ T-test ของความสูงของลำต้นและความยาวของรากภายใน 14 วันของผักบุ้งจีนพันธุ์เดิมในสภาวะที่ไม่มีและมีแคดเมียมคลอไรด์ ($CdCl_2$) ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์

สายพันธุ์	ความสูงของลำต้น (ซม)		ความยาวของราก (ซม)	
	ไม่มี $CdCl_2$	มี $CdCl_2$	ไม่มี $CdCl_2$	มี $CdCl_2$
ผักบุ้งจีนพันธุ์เดิม	4.5	0.9	2.3	1.9
ผักบุ้งจีนพันธุ์เดิม	4.6	1	2	1.9
ผักบุ้งจีนพันธุ์เดิม	4.5	1.1	2.5	1.5
ผักบุ้งจีนพันธุ์เดิม	4.7	0.4	1.9	1.6
ผักบุ้งจีนพันธุ์เดิม	4.2	1.2	2.7	1.7
mean	4.5	0.92	2.28	1.72
stdev	0.187083	0.311448	0.334664	0.178885
variance	0.035	0.097	0.112	0.032
t-test				

n1	n2	var1/n1	var2/n2	t-value	df	
ไม่มี $CdCl_2$ ลำต้น	มี $CdCl_2$ ลำต้น	0.007	0.0194	22.03338	8	*
ไม่มี $CdCl_2$ ราก	มี $CdCl_2$ ราก	0.0224	0.0064	3.299832	8	*

t-value ที่ 95% (df=8) = 2.306

* หมายถึง ข้อมูลในชุด n1 และ n2 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ ง.2 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ T-test ของความสูงของลำต้นและความยาวของรากภายใน 14 วันของผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์ SR10 ในสภาวะที่ไม่มีและมีแคดเมียมคลอไรด์ ($CdCl_2$) ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์

สายพันธุ์	ความสูงของลำต้น (ซม)		ความยาวของราก (ซม)			
	ไม่มี $CdCl_2$	มี $CdCl_2$	ไม่มี $CdCl_2$	มี $CdCl_2$		
ผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์ SR10	4.5	4.7	3.1	3		
ผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์ SR10	4.9	4.1	3.1	2.4		
ผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์ SR10	5	3.9	2.9	2.4		
ผักบุ้งจีนแปลงพันธุ์ SR10	4.7	5.9	2.9	2.5		
mean	4.7	4.66	3	2.52		
stdev	0.254951	0.779744	0.1	0.277489		
variance	0.065	0.608	0.01	0.077		
t-test						
n1	**n2**	**var1/n1**	**var2/n2**	**t-value**	**df**	
ไม่มี $CdCl_2$ ลำต้น	มี $CdCl_2$ ลำต้น	0.013	0.1216	0.109028	8	ns
ไม่มี $CdCl_2$ ราก	มี $CdCl_2$ ราก	0.002	0.0154	3.638871	8	*

t-value ที่ 95% (df=8) = 2.306

ns หมายถึง ข้อมูลในชุด n1 และ n2 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

*   หมายถึง ข้อมูลในชุด n1 และ n2 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ ง.3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ T-testของความสูงของลำต้นและความยาวของรากภายใน 14 วันของผักบุ้งไทยพันธุ์เดิมในสภาวะที่ไม่มีและมีแคดเมียมคลอไรด์ ($CdCl_2$) ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์

สายพันธุ์	ความสูงของลำต้น (ซม)		ความยาวของราก (ซม)	
	ไม่มี $CdCl_2$	มี $CdCl_2$	ไม่มี $CdCl_2$	มี $CdCl_2$
ผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม	4.7	1.1	2.1	1.7
ผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม	4.7	1.6	2.1	1.2
ผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม	4.5	1.4	2	1.4
ผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม	4.5	1.4	2.3	1.9
ผักบุ้งไทยพันธุ์เดิม				
mean	4.5	1.4	2.12	1.56
stdev	0.244949	0.187083	0.109545	0.270185
variance	0.06	0.035	0.012	0.073
t-test				

n1	n2	var1/n1	var2/n2	t-value	df	
ไม่มี $CdCl_2$ ลำต้น	มี $CdCl_2$ ลำต้น	0.012	0.007	22.48976	8	*
ไม่มี $CdCl_2$ ราก	มี $CdCl_2$ ราก	0.0024	0.0146	4.295004	8	*

t-value ที่ 95% (df=8) = 2.306

* หมายถึง ข้อมูลในชุด n1 และ n2 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ ง.4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ T-test ของความสูงของลำต้นและความยาวของรากภายใน 14 วันของผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ Tr1ในสภาวะที่ไม่มีและมีแคดเมียมคลอไรด์ ($CdCl_2$) ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์

สายพันธุ์	ความสูงของลำต้น (ซม)		ความยาวของราก (ซม)			
	ไม่มี $CdCl_2$	มี $CdCl_2$	ไม่มี $CdCl_2$	มี $CdCl_2$		
ผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ Tr1	4.8	4.7	2.4	2.4		
ผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ Tr1	4.9	4.7	2	2		
ผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ Tr1	4.6	4.5	2	2		
ผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ Tr1	4.2	4.6	2.7	2.5		
ผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ Tr1	4.3	4.4	2.9	2.1		
mean	4.56	4.58	2.4	2.2		
stdev	0.304959	0.130384	0.406202	0.234521		
variance	0.093	0.017	0.165	0.055		
t-test						
n1	n2	var1/n1	var2/n2	t-value	df	
ไม่มี $CdCl_2$ ลำต้น	มี $CdCl_2$ ลำต้น	0.0186	0.0034	0.13484	8	ns
ไม่มี $CdCl_2$ ราก	มี $CdCl_2$ ราก	0.033	0.011	0.953463	8	ns

t-value ที่ 95% (df=8) = 2.306

ns หมายถึง ข้อมูลในชุด n1 และ n2 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ ง.5 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ T-test ของความสูงของลำต้นและความยาวของรากภายใน 14 วันของผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ Tr2 ในสภาวะที่ไม่มีและมีแคดเมียมคลอไรด์ ($CdCl_2$) ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์

สายพันธุ์	ความสูงของลำต้น (ซม)		ความยาวของราก (ซม)			
	ไม่มี $CdCl_2$	มี $CdCl_2$	ไม่มี $CdCl_2$	มี $CdCl_2$		
ผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ Tr2	5.2	4.5	3	2.4		
ผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ Tr2	5.4	5.5	3.2	2.5		
ผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ Tr2	5.4	5.7	2.9	2.9		
ผักบุ้งไทยแปลงพันธุ์ Tr2	5.2	5.1	3.9	2.9		
mean	5.42	5.12	3.26	2.68		
stdev	0.286356	0.491935	0.391152	0.228035		
variance	0.082	0.242	0.153	0.052		
t-test						
n1	**n2**	**var1/n1**	**var2/n2**	**t-value**	**df**	
ไม่มี $CdCl_2$ ลำต้น	มี $CdCl_2$ ลำต้น	0.0164	0.0484	1.178511	8	ns
ไม่มี $CdCl_2$ ราก	มี $CdCl_2$ ราก	0.0306	0.0104	2.864416	8	*

t-value ที่ 95% (df=8) = 2.306

ns หมายถึง ข้อมูลในชุด n1 และ n2 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

* หมายถึง ข้อมูลในชุด n1 และ n2 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวปาริชาติ มูลทองชุน เกิดวันที่ 21 กรกฎาคม 2524 จ.นครปฐม สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ เมื่อปีการศึกษา 2546 และเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโท ภาควิชาจุลชีววิทยาสาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2547