

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

ปวิษฐดา ลิขผล. 2543. “การโคลนยีนซัลไฟด์รีดักเตสจาก *Arabidopsis thaliana*” วิทยานิพนธ์  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 32.

### ภาษาอังกฤษ

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

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. Anal Biochem. 72:248-254.

Creissen, G., John, F., Michael, F., Baldeep, K., Nicola, L., Helen, R., Gabriela, P., Florence, W., Neil, B., Alan, W., and Philip, M. 1999. Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplasts of transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress. The Plant Cell. 11:1277-1291.

Edwards, 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.

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

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 J. 6: 271-282.

- Hesse, H., Joachim, L., Thomas, A., and Rainer, H. 1997. Expression analysis and subcellular localization of cysteine synthase from *A.thaliana* .Sulfur Metabolism in Higher Plants. Leiden:Backhuys Publisher. p. 227-230.
- Hood, E. E., Helmer, G. L., Fraley, R. T., and Chilton, M. 1986. The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. J. Bacteriol. 168 : 1291 – 1301.
- Jame, D. J., Uratsu, S., Cheng, J., Negri, P., and Dandekar , A.M. 1993. Acetosyringone and osmoprotectant like betin of proline synergistically enhance *Agrobacterium* – mediated transformation of apple. Plant . Cell. Report. 12 : 559 – 563.
- Kimura, T., Takeda, S., Kyojuka, J., Asahi, T., Shimamoto, K., and Nakamura, K. 1993. The presence of a precursor to the  $\delta$ -subunit of sweet potato mitochondrial  $F_1ATPase$  is not sufficient for the transport of  $\beta$ -glucuronidase (GUS) into mitochondria of tobacco , rice and yeast cells. Plant Cell Physio. 34(2) : 345 –355.
- Lunn, J. E., Michael, D., Jacqueline, M. and Roland, D. 1990. Localization of ATP sulfurylase and O-acetylserine (thiol) lyase in spinach leaves. Plant. Physiol. 94:1345-1352.
- Murashige, T., and Skoog, F. 1961. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473.
- Nakamura, T., Yube, Y., and Hiroshi, S. 1999. Four rice genes encoding cysteine synthase : isolation and differential responses to sulfur, nitrogen and light. Gene 229:155-161.
- Noctor, G., Michael S., Lise, J., Karl-Josef, K., Christine H. F., and Heinz, R. 1996. Synthesis of glutathione in leaves of transgenic poplar overexpressing  $\gamma$ -glutamylcysteine synthase. Plant Physiol. 112 : 1071-1078.
- Noctor, G., and Christine, H. F. 1998. Simultaneous measurement of foliar glutathione,  $\gamma$ -glutamylcysteine, and amino acids by high-performance liquid chromatography :

comparison with two other assay method for glutathione. Analytical Biochemistry. 264 : 98-110.

Noji, M., Maiko, S., Michimi, N., Mitsuko, A., Hikaru, S., and Kazuki, S. 2001. Cysteine synthase overexpression in tobacco confers tolerance to sulfur-containing environmental pollutants. Plant Physiology. 126 : 973-980.

Reuveny, Z., Dougall, D. K., and Trinity, P. M. 1980. Regulatory coupling of nitrate and sulfate assimilation pathways in cultured tobacco cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77:6670-6672.

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

Saito, K., Naoko, M., Mami, Y., Hisashi, H., and Isamu, M. 1992. Molecular cloning and bacterial expression of cDNA encoding a plant cysteine synthase. Proc. Natl. Acad.Sci. USA. 89: 8078 – 8082.

Saito, K., Tatsugushi, K., Murakoshi, I., And Hirano, H. 1993. cDNA cloning and expression of cysteine synthase B localized in chloroplasts of *Spinacia oleracea*. FEBS Letter. 324 (3):247-252.

Saito, K., Tatsuguchi, K., Takagi, Y., and Murakoshi, I. 1994a. Isolation and characterization of cDNA that encodes a putative mitochondrial - localizing isoform of cysteine synthase (O-acetylserine (thiol)-lyase from *Spinacia oleracea*. J.Biol.Chem. 269(45): 28187-28192.

Saito, K.; Makoto, K., Kazuyo, T., Yoshiko, T., and Isamu, M. 1994b. Modulation of cysteine biosynthesis in chloroplasts of transgenic tobacco overexpressing cysteine synthase [O-acetylserine (thiol)-lyase]. Plant Physiol. 106 : 887 – 895.



- Saito, K., Hideki, T., Yoshiko, T., Kenji, I., and Masaaki, N. 1997. Molecular characterization and regulation of cysteine synthase and serine acetyltransferase from plants. Sulfur Metabolism in Higher Plants. Leiden: Backhuys Publisher. p. 235-238.
- Saito, K. 2000. Regulation of sulfate transport and synthesis of sulfur-containing amino acids. Curr Opin Plant Biol. 3 (3):188-195.
- Thompson, J. D., Desmond, G. H., and Toby, J. G. 1994. CLUSTAL W : improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Oxford University Press. 22 : 4673 –4680.
- Urano, Y., Tomofumi, M., Masaaki, N., and Kazuki, S. 2000. Molecular cloning and functional characterization of cDNAs encoding cysteine synthase and serine acetyltransferase that may be responsible for high cellular cysteine content in *Allium tuberosum*. Gene. 257 : 269 –277.
- Yamaguchi, Y., Tatsuo, N., Emiko, H., Nozomu, K., and Hiroshi, S. 1999. Differential accumulation of transcripts encoding sulfur assimilation enzymes upon sulfur and / or nitrogen deprivation in *A. thaliana* . Biosci. Biotechnol. Biochem. 63(4):762-766.
- Yamaguchi, Y., Tatsuo, N., Tomonobu, K., and Hiroshi, S. 2000. Three *Arabidopsis* genes encoding protein with differential activities for cysteine synthase and  $\beta$ -cyanoalanine synthase. Plant Cell Physio. 41(4) : 465 – 476.
- Youssefian, S., Nakamura, M., and Hiroshi, S. 1993. Tobacco plants transformed with the O-acetylserine(thiol) lyase genes of wheat are resistant to toxic levels of hydrogen sulphide gas. The Plant J. 4(5):759-769.
- Youssefian, S., Michimi, N., Emin, O., and Noriaki, K. 2001. Increased cysteine biosynthesis capacity of transgenic tobacco overexpressing an O-acetylserine(thiol)lyase modifies plant responses to oxidative stress. Plant Physiology. 126: 1001-1011.



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก

### สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 1. อาหารเลี้ยงเชื้อ YEP

แบค โท-เปปโตน	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	10	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัม
วุ้นผง (สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง)	15	กรัม

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดคือน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างเป็น 7.5 ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

#### 2. อาหาร MS , MMS (Murashige and Skoog , 1962)

ธาตุอาหารหลัก ;

แอม โมเนียมไนเตรท	0.825	กรัม
โปแตสเซียมไนเตรท	0.950	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท	0.185	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรท	0.220	กรัม
โปแตสเซียมฟอสเฟต	0.085	กรัม
ไอออน II ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท	0.0139	กรัม

ธาตุอาหารรอง ;

โซเดียมอีดีทีเอ	18.65	มิลลิกรัม
แมงกานีสซัลเฟตเพนตะไฮเดรท	11.15	มิลลิกรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท	4.3	มิลลิกรัม
โซเดียมโมลิบเดต	0.125	มิลลิกรัม
กรดบอริก	3.1	มิลลิกรัม
โพแทสเซียมไอโอไดด์	0.415	มิลลิกรัม
โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรท	0.0125	มิลลิกรัม
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรท	0.0125	มิลลิกรัม

องค์ประกอบวิตามินสำหรับ MS ;

อินโนซิทอล	100	มิลลิกรัม
ไกลซีน	2.0	มิลลิกรัม
ไพริดอกซินไฮโดรคลอไรด์	0.5	มิลลิกรัม
กรดนิโคตินิก	0.5	มิลลิกรัม
ไซอะมิลไฮโดรคลอไรด์	0.4	มิลลิกรัม

องค์ประกอบวิตามินสำหรับ MMS ;

อินโนซิทอล	100	มิลลิกรัม
กรดนิโคตินิก	0.5	มิลลิกรัม
ไซอะมิลไฮโดรคลอไรด์	0.4	มิลลิกรัม
กรดโฟลิก	5.0	มิลลิกรัม

น้ำตาลซูโครส 30 กรัม

วุ้นผง (ไฟตาเจล : Sigma., USA.) 3.4 กรัม

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างเป็น 5.8 นึ่งฆ่าเชื้อ  
ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ข

### สารเคมี

#### 1. สารละลายทีเออีบัฟเฟอร์ (TAE buffer) (ความเข้มข้น 50 เท่า)

ทริส-เบส	202	กรัม
กรดอะซิติกเข้มข้น	57.1	มิลลิลิตร
สารละลายอีดีทีเอความเข้มข้น 0.5 โมลาร์	100	มิลลิลิตร
ผสมองค์ประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกันปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น		

#### 2. สีดติดตาม (tracking dye)

กลีเซอรอล	10	มิลลิลิตร
2-เมอแคปโทเอทานอล	5	มิลลิลิตร
โซเดียม โดเดซิลซัลเฟตเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)	10	มิลลิลิตร
สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ค่าความ เป็นกรดต่าง 6.8 เข้มข้น 0.5 โมลาร์	12.5	มิลลิลิตร
บรอมฟีนอลบลูเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)	0.1	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	12.5	มิลลิลิตร

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น นิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

#### 3. สารละลายสำหรับสกัดพลาสมิด

##### 3.1 สารละลาย I ความเข้มข้นสุดท้าย

สารละลายกลูโคส	50	มิลลิโมลาร์
สารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ค่าความเป็นกรดต่าง 8.0	5	มิลลิโมลาร์
สารละลายอีดีทีเอ ค่าความเป็นกรดต่าง 8.0	10	มิลลิโมลาร์

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน นิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที



## 3.2 สารละลาย II

สารละลายโซเดียมไฮโดรอกไซด์เข้มข้น 10 นอร์มอล	0.2	มิลลิลิตร
สารละลายโซเดียมโคเดซิลซัลเฟตเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)	1.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	8.8	มิลลิลิตร

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน นิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## 3.3 สารละลาย III

สารละลายโปแตสเซียมอะซิเตดเข้มข้น 5 โมลาร์	50	มิลลิลิตร
กรดอะซิติกเข้มข้น	11.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	28.5	มิลลิลิตร

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน นิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## 4. สารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์มไอโซเอมิลอัลกอฮอล์

นำฟีนอลที่เติมไฮดรอกซีควิโนลีน (8-Hydroxyquinoline) ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) มาทำให้สมดุล (equilibrate) ด้วยสารละลายทริสคลอไรด์บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดต่าง 8.0 จนค่าความเป็นกรดต่าง  $\geq 7.5$  แล้วนำมาผสมกับคลอโรฟอร์ม และไอโซเอมิลอัลกอฮอล์ในอัตราส่วน 25:24:1

## 5. สารละลายทีอีบัฟเฟอร์ (TE buffer) ค่าความเป็นกรดต่าง 8

	ความเข้มข้นสุดท้าย	
สารละลายทริส-เบส	10	มิลลิโมลาร์
สารละลายอีดีทีเอ	1	มิลลิโมลาร์

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน แล้วปรับค่าความเป็นกรดต่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นจนได้ค่าความเป็นกรดต่างเป็น 8 นิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

## 6. สารละลายไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินปี 250 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

7. สารละลายอะซิโตไซริงโอน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลาย 3',5' ไดเมธอกซี-4'-ไฮดรอกซีอะซิโตฟีโนน 250 มิลลิกรัมในไคเมธิลซัลฟอกไซด์ 5 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

8. สารละลายเซฟโฟแทกซิม ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ละลายเซฟโฟแทกซิม (ในรูปเกลือ โซเดียม) 250 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

9. สารละลายไซเดยซุรอน ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

ละลายไซเดยซุรอน 22 มิลลิกรัมในไคเมธิลฟอร์มามิด 200 ไมโครลิตรปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น โดยวิธีปราศจากเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

10. สารละลายสำหรับสกัดดีเอ็นเอจากผักนึ่ง : สารละลายเอ็กแทรกชันบัฟเฟอร์

ความเข้มข้นสุดท้าย

สารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์

ความเป็นกรดต่าง 7.5 200 มิลลิโมลาร์

สารละลายอีดีทีเอ 25 มิลลิโมลาร์

สารละลายโซเดียมโคเดซิลซัลเฟต (น้ำหนัก/ปริมาตร) 0.5 เปอร์เซ็นต์

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดที่ปราศจากเชื้อให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ โดยวิธีปราศจากเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิห้อง

11. สารละลายสำหรับสกัดโปรตีนจากผักนึ่ง : สารละลายเอ็กแทรกชันบัฟเฟอร์

ความเข้มข้นสุดท้าย

สารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์

ความเป็นกรดต่าง 7.5 50 มิลลิโมลาร์

สารละลายอีดีทีเอ ค่าความเป็นกรดต่างเป็น 8.0 1 มิลลิโมลาร์

สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ 5 มิลลิโมลาร์

สารละลายไคโซอิทรีออล 2 มิลลิโมลาร์

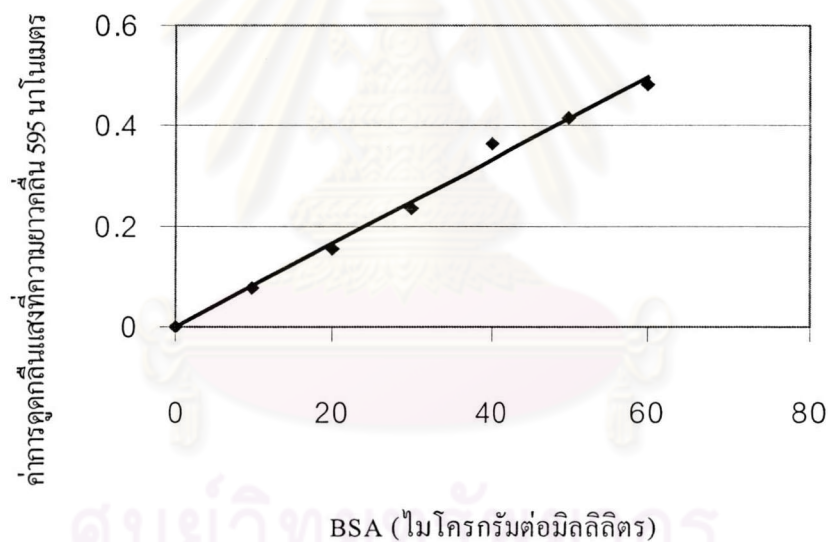
ไตรตอนเอ็ก-100 (TritonX-100) (น้ำหนัก/ปริมาตร) 0.1 เปอร์เซ็นต์

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกันด้วยน้ำกลั่น หนึ่งมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง ยกเว้นสารละลายไดโครโตรี อิทอลแยกใส่ก่อนสกัด

## 12. สารละลายเบรดฟอร์ด (Bradford reagent)

สีกูมาสซี บรินเลียน บลู จี 250	10	มิลลิกรัม
เอธานอล เข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร)	5	มิลลิลิตร
กรดฟอสโฟริก	10	มิลลิลิตร
ละลายองค์ประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น		

กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman 3MM หมายเลข 1 เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง



ภาพที่ ข 1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Bovine Serum Albumin (BSA) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร

## 13. สารละลายนินไฮดริน (Ninhydrin solution)

นินไฮดริน	250	มิลลิกรัม
กรดอะซิติกเข้มข้น	6	มิลลิลิตร
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น	4	มิลลิลิตร
ละลายองค์ประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง		

14. สารละลายเอ็กเทกซ์บัพเฟอร์สำหรับสกัดกรดอะมิโนซิสเตอีนและกลูตาไมโอแอตที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อพืช

	ความเข้มข้นสุดท้าย	
กรดไฮโดรคลอริก	0.1	นอร์มอล
สารละลายอีดีทีเอ ค่าความเป็นกรดต่างเป็น 8.0	1	มิลลิโมลาร์

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น โดยวิธีปราศจากเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิห้อง

15. สารละลายเอ็น-ไซโคลเฮกซิล-2-เอมีนซัลโฟนิคแอซิด (N-cyclohexyl-2-amino ethanesulfonic acid) เข้มข้น 0.5 โมลาร์

ละลายเอ็น-ไซโคลเฮกซิล-2-เอมีนซัลโฟนิคแอซิด 10.365 กรัม ในน้ำกลั่นปรับค่าความเป็นกรดต่างเป็น 9.3 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยวิธีปราศจากเชื้อ ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

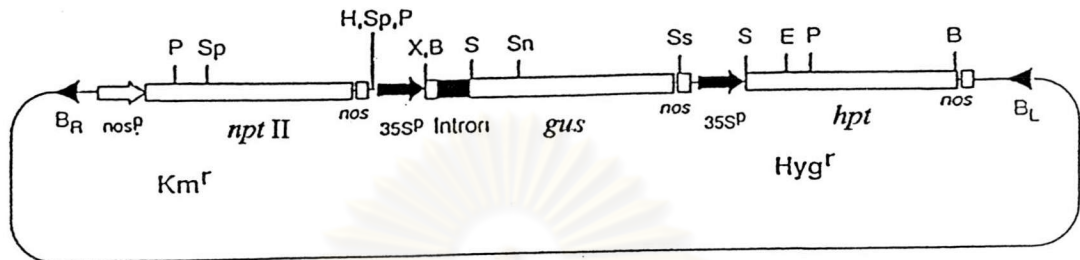
16. สารละลายโมนอโบรโมไบแมน (Monobromobimane) เข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์

ละลายโมนอโบรโมไบแมน 0.0081 กรัม ในอะซิโตนไครด์ 1 มิลลิลิตร โดยวิธีปราศจากเชื้อ เก็บในที่มืดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

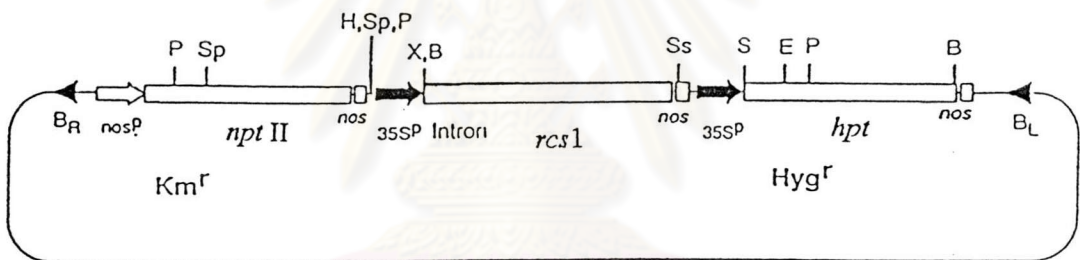


ภาคผนวก ค



pBIH1-IG

(ก)



pBIH1-IG-RCS1

(ข)

ภาพที่ ค.1 (ก) แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pBIH1-IG ขนาด 17 กิโลเบส (Kimura และคณะ, 1993) แสดงตำแหน่งยีน *gus* (ขนาด 2 กิโลเบส) ยีนต้านต่อสารปฏิชีวนะกานามัยซิน (*npt II*) และต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซิน (*hpt*)

(ข) แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pBIH1-IG-RCS1 ขนาด 16 กิโลเบส เป็นพลาสมิดที่มียีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสของข้าว (*rsc1*) ขนาด 1,290 เบส สอดแทรกอยู่ที่ตำแหน่งเรสทริกชัน *XbaI* และ *SacI* ของพลาสมิดพาหะ pBIH1-IG ซึ่งเป็นการสอดแทรกเข้าไปแทนที่ยีน *gus* ในพลาสมิดพาหะ pBIH1-IG

อักษรย่อของเรสทริกชันเอนไซม์ที่ใช้: P แทน *PstI*, Sp แทน *SphI*, H แทน *Hind III*, B แทน *BamHI*, S แทน *Sal I*, Sn แทน *SnaBI*, X แทน *Xba I*, Ss แทน *Sac I*, E แทน *EcoRI*

```

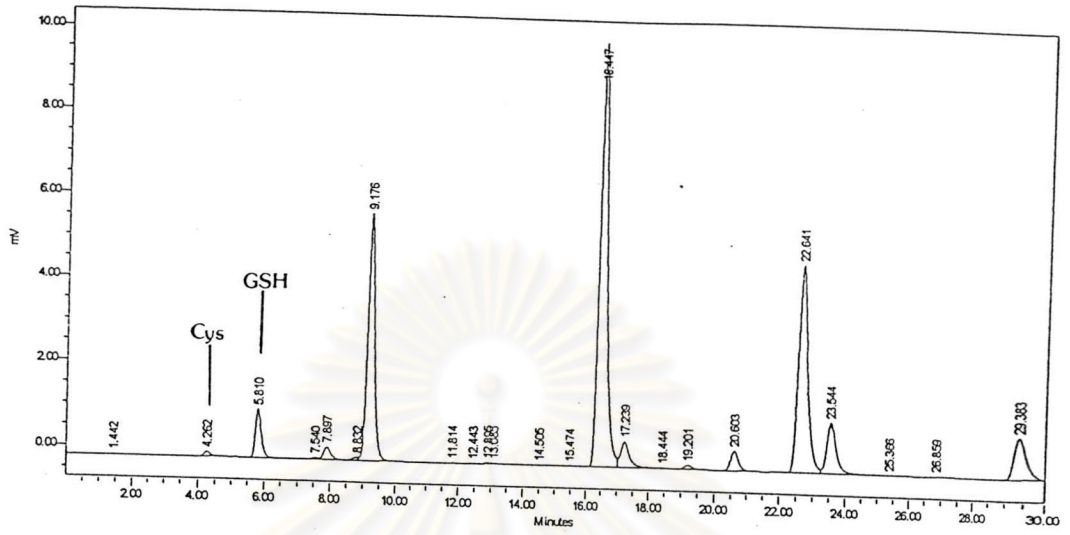
1  gtcgaccac gcgtccgcaa ggaggagcaa ggattgttgt tgtttcgtg tcagatcgat
61  tcctgacggg ataatgggtg agaccatcgc caaggatgtc accgagttga ttgggaacac
   rcl1-1
121 gccgttggtg tacctcaacc gggtgacgga tgggtgcgtc gggcgcgtcg cggccaagct
181 cgagtccatg gagccatgct ccagcgtcaa ggataggatt ggatacagta tgatcactga
241 tgcagaggag aaggggctga tcaactccagg caagagtgtg ctgattgagc caactagtgg
301 caacacaggc attggactgg cttcatggc tgctgcaaag ggttacaggc ttgtactcac
361 gatgccggcc tccatgagca tggagaggag aatcatattg aaggcttttg gtgctgaatt
421 gatacttact gaccactct tgggaatgaa aggagctgtc caaaggcag 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 agcgcgtgtct tatctgggtg
721 aaagcctggg ccacacaaga ttcaaggaat tggagctggt tttgttctcg gggcctgga
781 tgttgacctc atcaatgaaa ctgtacaagt ttcaagtgat gaagctatcg agatggcaaa
841 ggctcttgca ttgaaagaag ggttgcgtgtg tggaaatctc tcagggtgcag ctgcagcagc
901 agctgttagg ctgcctcaga ggccggaaaa tgaaggaaaa ctttttgttg ttgtcttccc
961 aagctttggt gagcgttacc tttcgtcggg gctttccag tccatcaaga
   rcl1-2
1021 aaacatggtg gttgaatga atgcacaata tccgggaatc cacaggaata aaagtttgg
1081 atctctgctt gtgtgattaa acatacattg tcttgccatt ttcaagttgt tctgcttgtg
1141 tagcaatggg gaacacagtg tgtagcctt gtagtgtaa acagtttaca ttttatcttc
1201 cctgtatatc agaaccctt acatgggcat ttgtcagcca gtgtgaatga aataaagcat
1261 catatgattt gtctcaaaaa aaaaaaaaaa

```

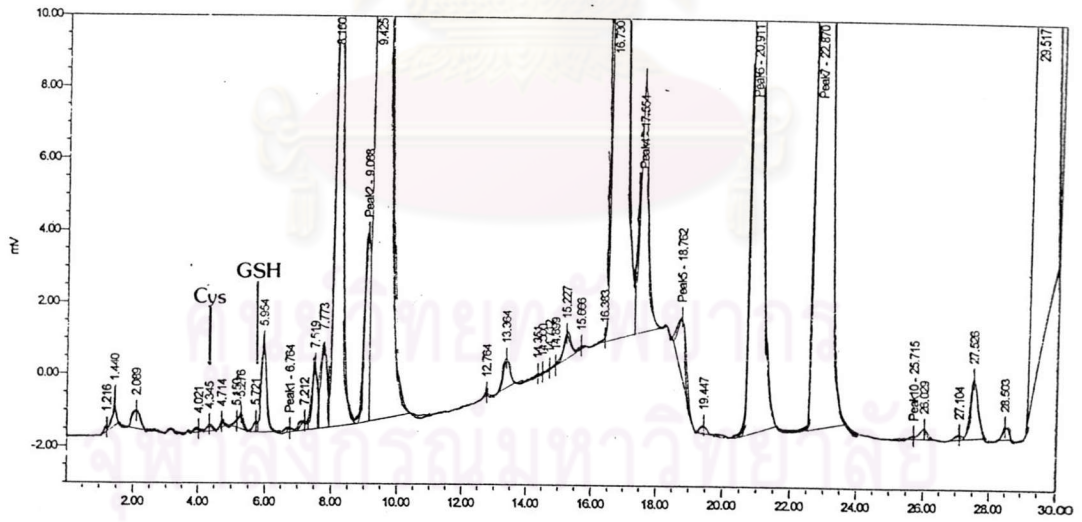
ภาพที่ ค.2 แสดงตำแหน่งโอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพรเมอร์ทั้ง 2 สายบนลำดับเบสของยีน *rcl1* (GenBank accession number AF073695) ขนาด 1,290 เบส ลำดับเบสที่ 74 – 1,039 เป็นบริเวณซึ่งแปลรหัสโปรตีน

atg (start codon) หมายถึง จุดเริ่มต้นของการแปลรหัสโปรตีน

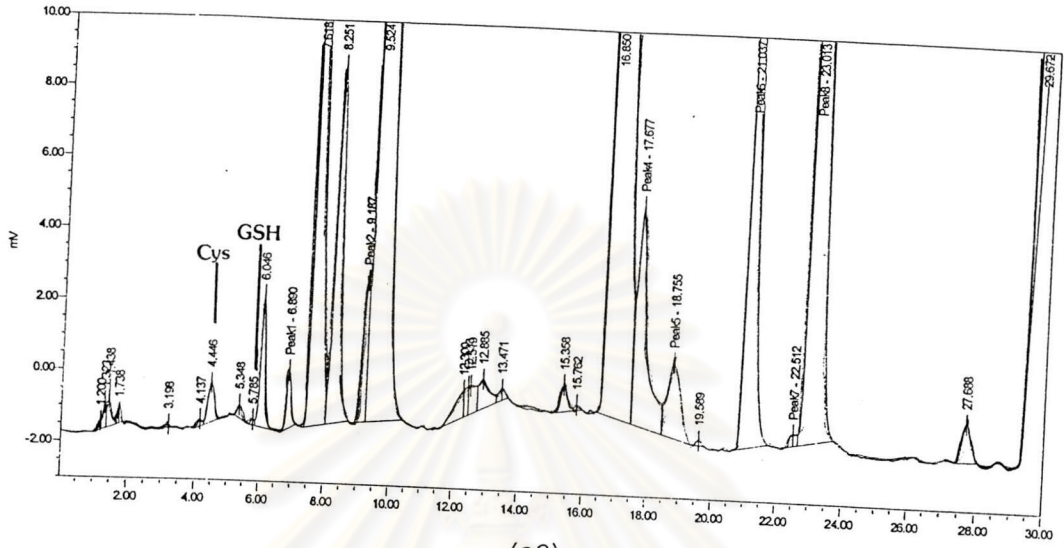
tga (stop codon) หมายถึง จุดสิ้นสุดของการแปลรหัสโปรตีน



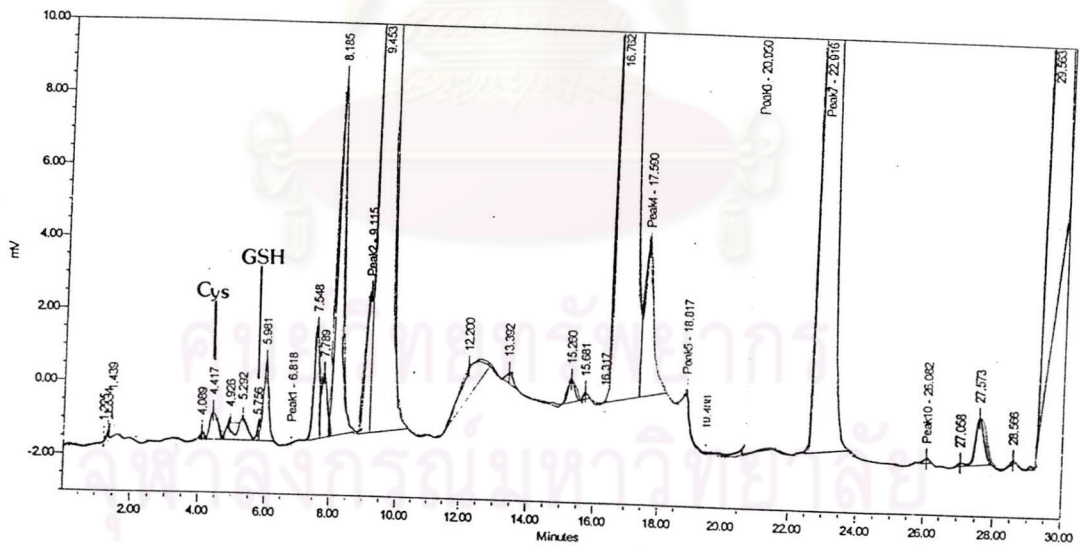
(n1)



(n2)

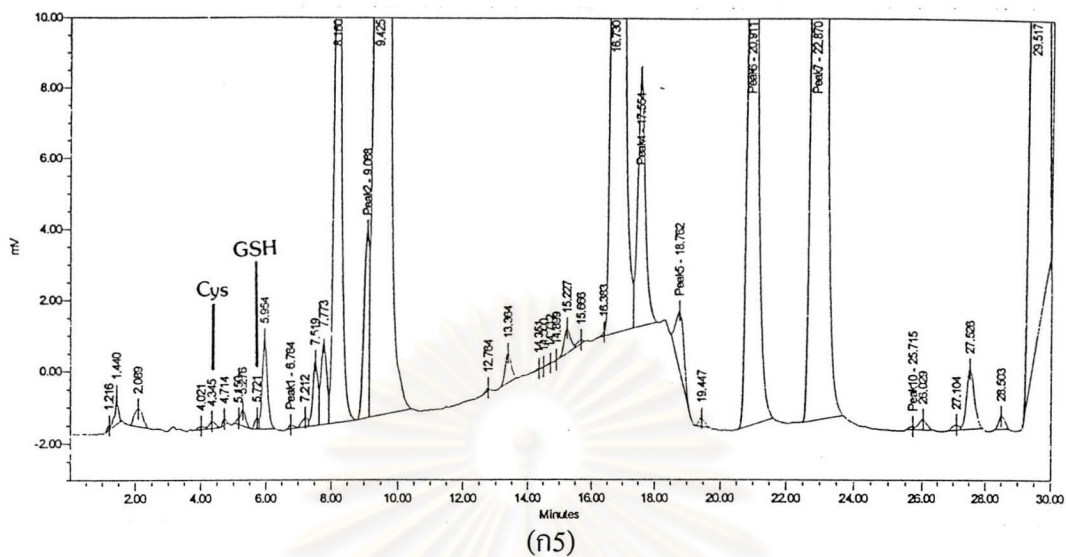


(n3)

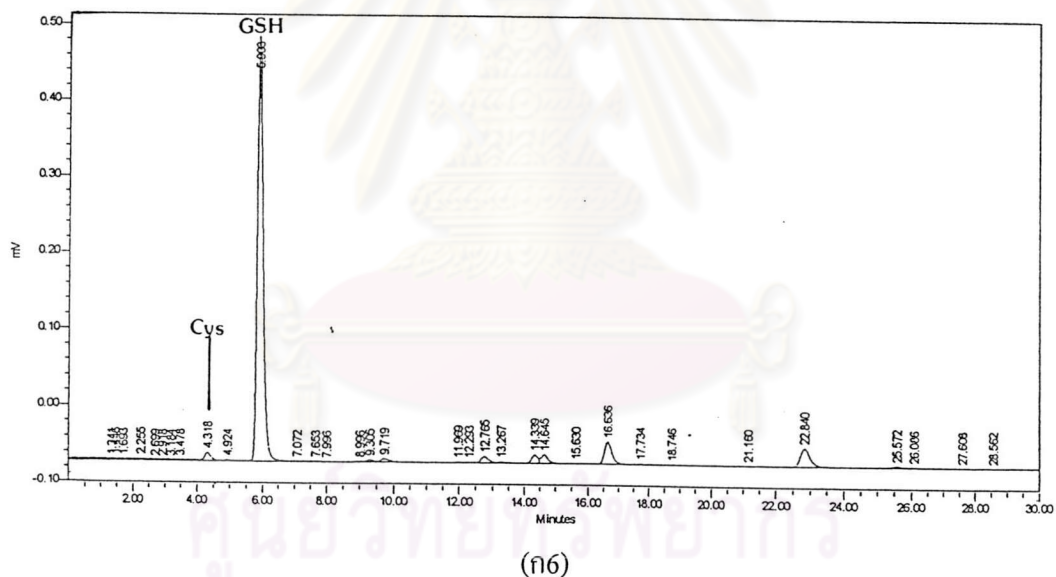


(n4)





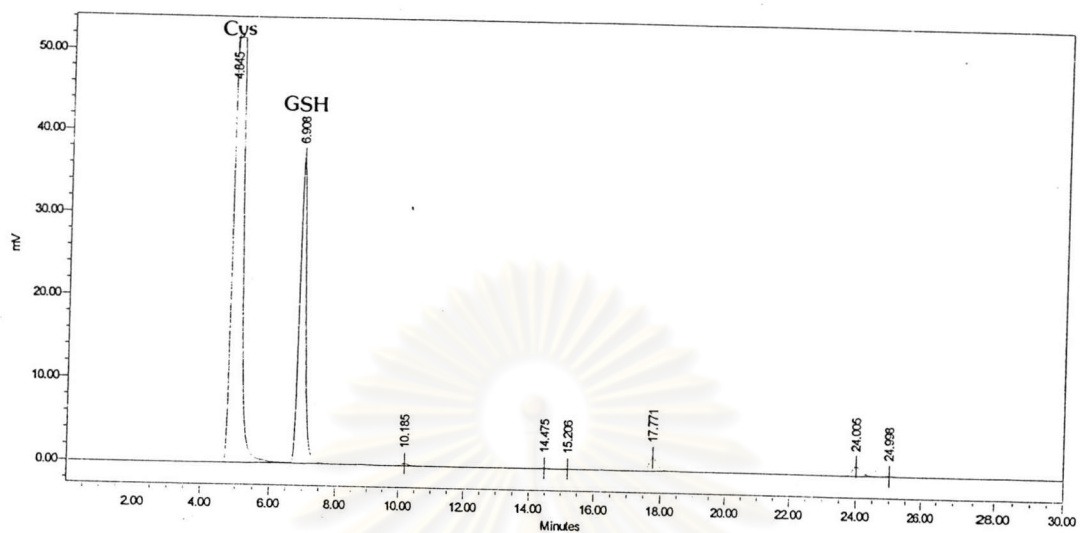
(ก5)



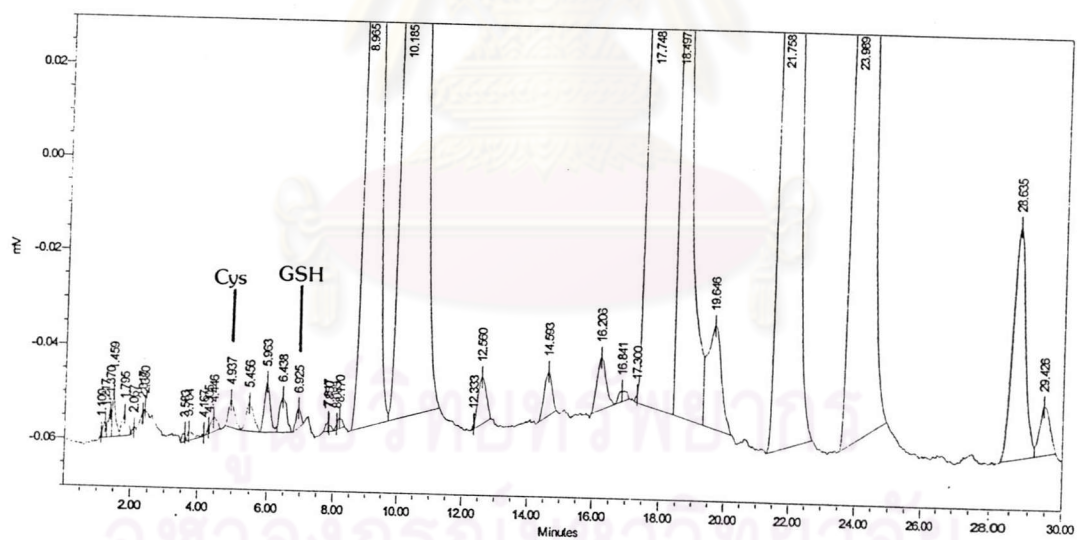
(ก6)

ภาพที่ ค.3 (ก) โครมาโตแกรมของกรดอะมิโนซิสเตอีน (Cys) และกลูตาไธโอน (GSH) ในสารละลายมาตรฐานและสารสกัดจากใบของผักนึ่งทรานสฟอร์แมนท์เปรียบเทียบกับผักนึ่งพันธุ์เดิม

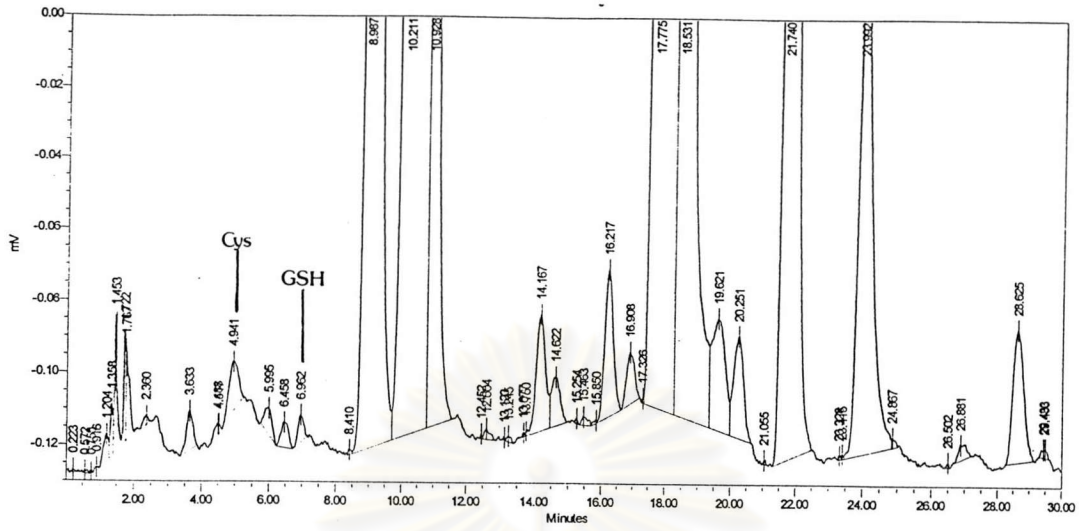
- ก1. สารละลายมาตรฐานที่มี Cys ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ GSH ความเข้มข้น 1.5 มิลลิโมลาร์ โดยพบ Cys ที่เวลา 4.262 นาที และ GSH ที่เวลา 5.810 นาที
- ก2. ผักนึ่งพันธุ์เดิม
- ก3. ผักนึ่งทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2
- ก4. ผักนึ่งทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 4
- ก4. ผักนึ่งทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 5
- ก6. ผักนึ่งทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 6



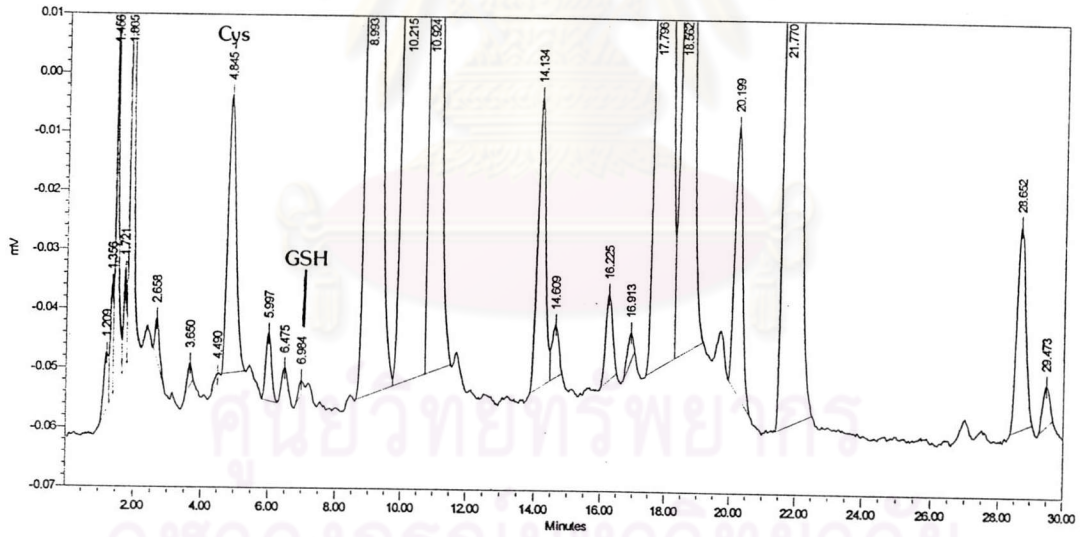
(๑1)



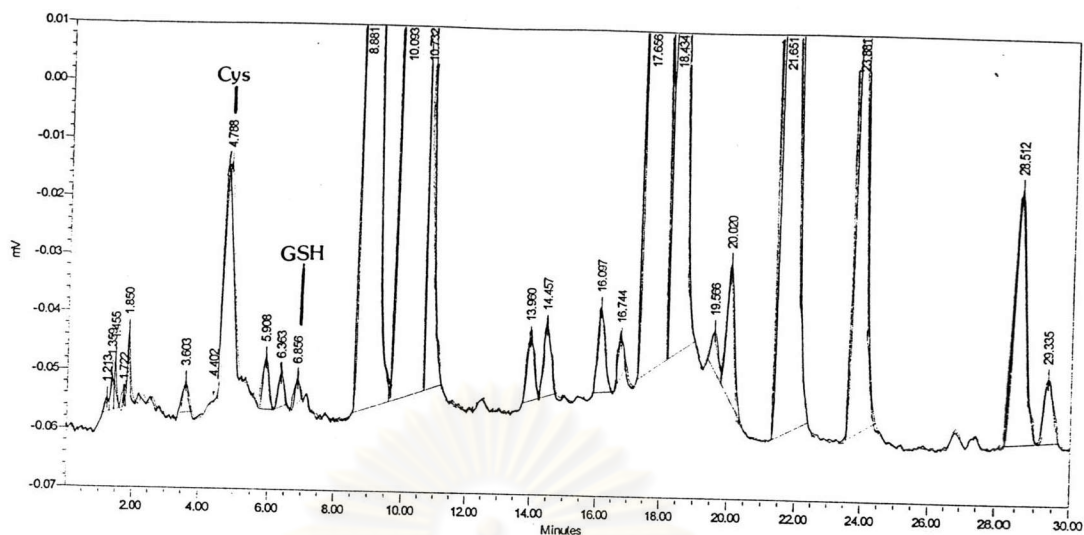
(๑2)



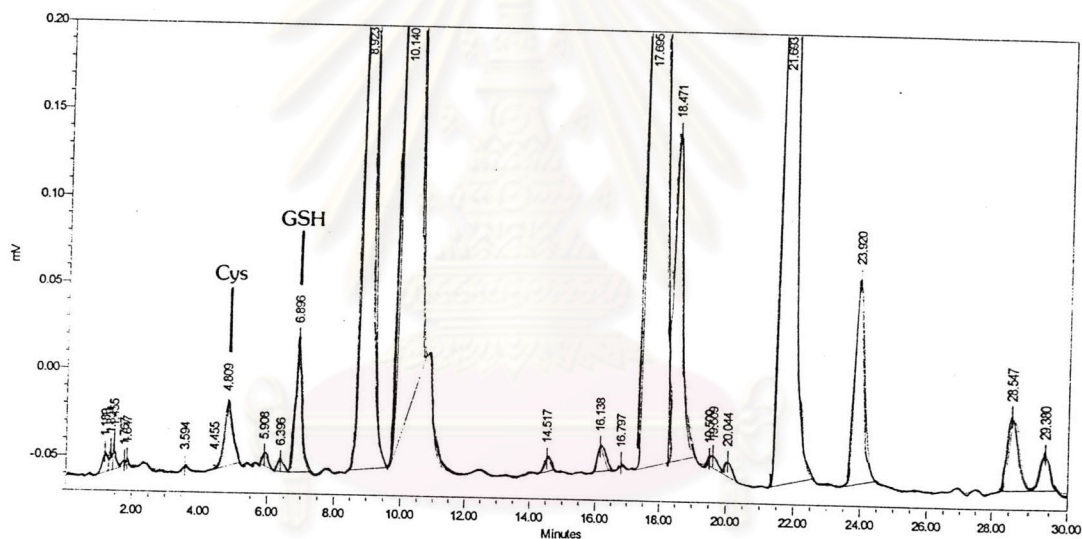
(๑3)



(๑4)



(ข5)

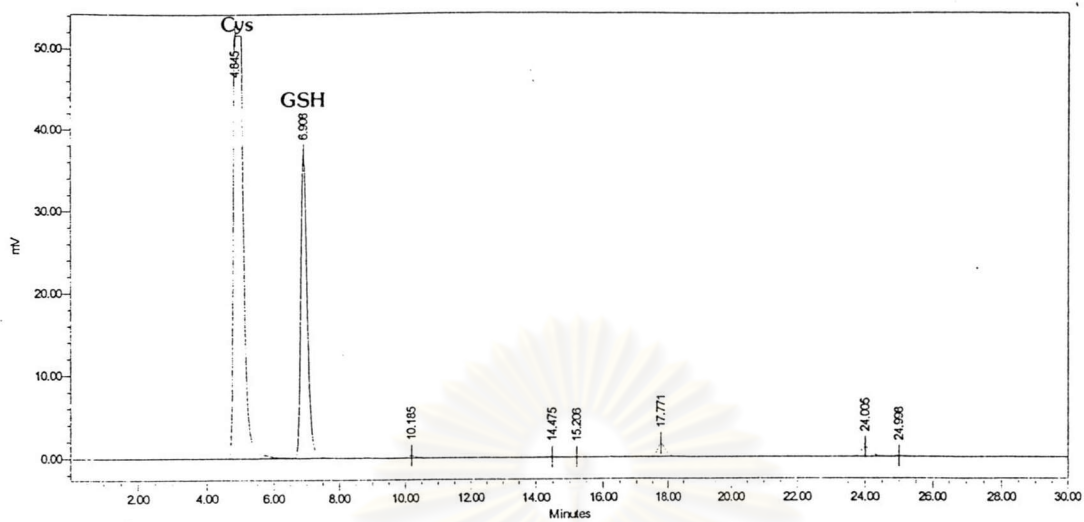


(ข6)

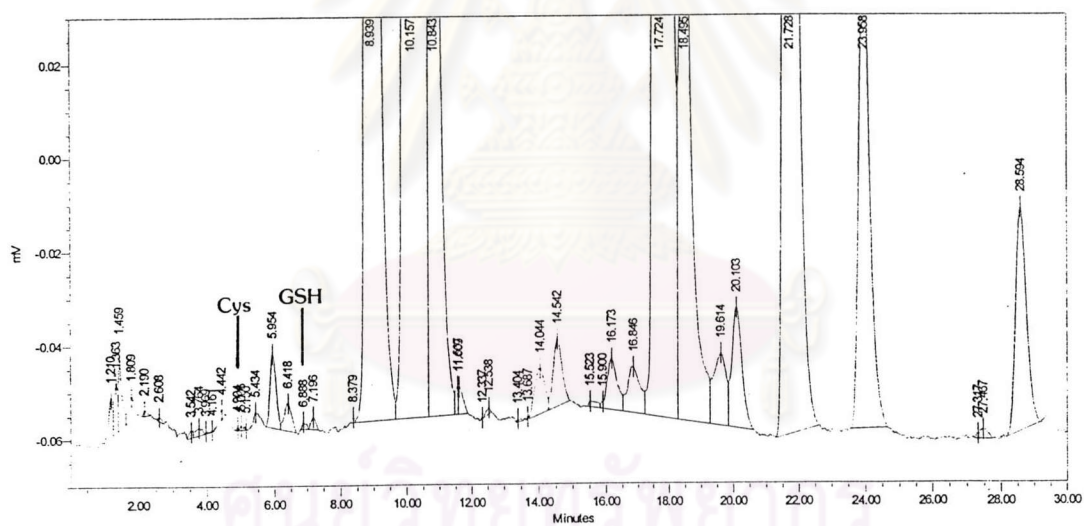
ภาพที่ ค.3 (ข) โครมาโตแกรมของกรดอะมิโนซิสเตอีน (Cys) และกลูตาไธโอน (GSH) ในสารละลายมาตรฐานและสารสกัดจากลำต้นของผักนึ่งทรานสฟอร์แมนท์เปรียบเทียบกับผักนึ่งพันธุ์เดิม

- ข1. สารละลายมาตรฐานที่มี Cys ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ และ GSH ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ โดยพบ Cys ที่เวลา 4.845 นาที และ GSH ที่เวลา 6.908 นาที
- ข2. ผักนึ่งพันธุ์เดิม
- ข3. ผักนึ่งทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2
- ข4. ผักนึ่งทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 4
- ข5. ผักนึ่งทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 5
- ข6. ผักนึ่งทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 6



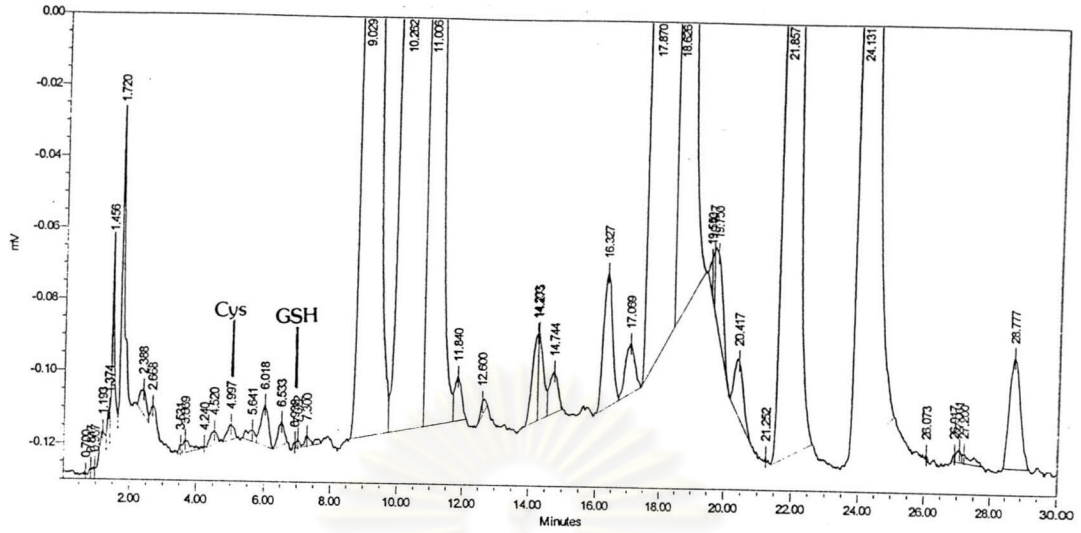


(ค1)

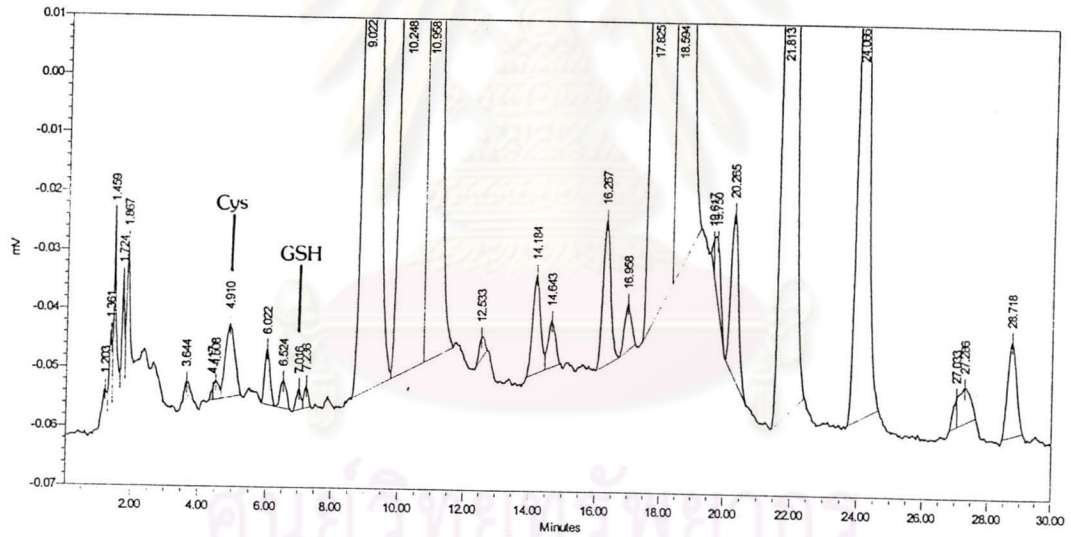


(ค2)

ศูนย์วิจัยพืชสวน  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

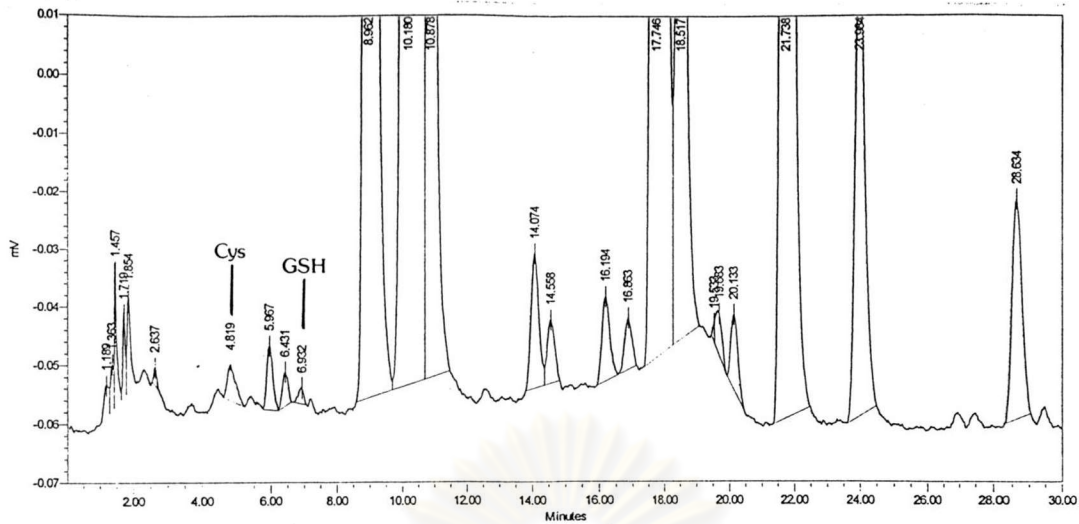


(ก3)

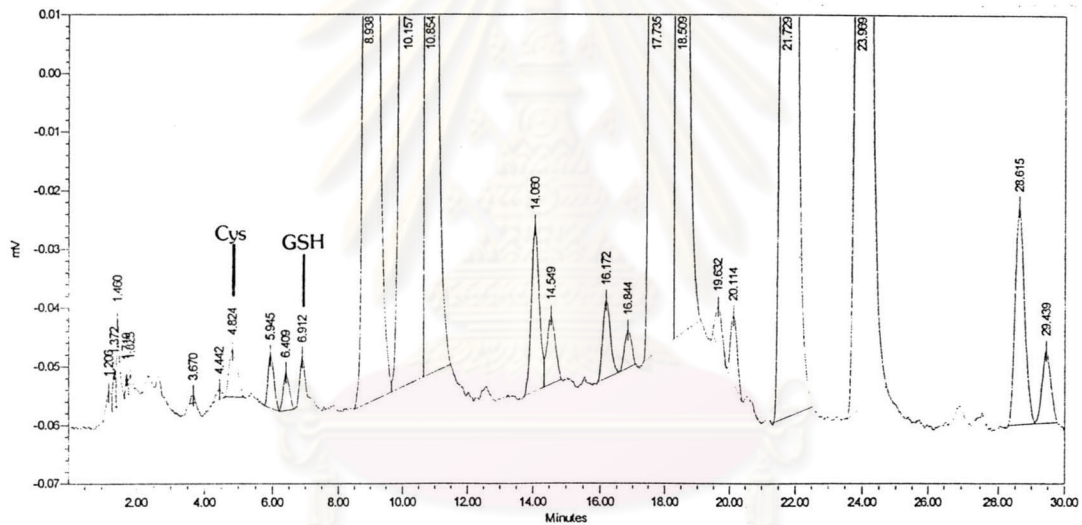


(ก4)

ศูนย์วิจัยสหศาสตร์  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



(ก5)



(ก6)

ภาพที่ ก.3 (ก) โครมาโตแกรมของกรดอะมิโนซิสเตอีน (Cys) และกลูตาไธโอน (GSH) ในสารละลายมาตรฐานและสารสกัดจากรากของผักนึ่งทรานสฟอร์แมนท์เปรียบเทียบกับผักนึ่งพันธุ์เดิม

ก1. สารละลายมาตรฐานที่มี Cys ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ และ GSH ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ โดยพบ Cys ที่เวลา 4.845 นาที และ GSH ที่เวลา 6.908 นาที

ก2. ผักนึ่งพันธุ์เดิม

ก3. ผักนึ่งทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 2

ก4. ผักนึ่งทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 4

ก4. ผักนึ่งทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 5

ก6. ผักนึ่งทรานสฟอร์แมนท์หมายเลข 6

1. การคำนวณกิจกรรมจำเพาะ (specific activity) ของซิสเตอินซินเตส

กำหนด 1 หน่วยเอนไซม์ คือ จำนวนของเอนไซม์ที่ทำให้เกิดกรดอะมิโนซิสเตอิน  
1 ไมโครโมลที่ภาวะที่ทดสอบในเวลา 1 นาที

$$C = \frac{A}{\epsilon I}$$

เมื่อ C = ความเข้มข้นของกรดอะมิโนซิสเตอิน (ไมโครโมลาร์)

A = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร

$\epsilon$  = extinction coefficient (กำหนดให้เท่ากับ  $25,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

I = ระยะห่างของช่องให้แสงผ่านของคิวเวตต์ (path length) (cm)

$$: A = \chi$$

$$I = 1 \text{ ซม.}$$

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

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

เนื่องจากปริมาตรที่ใช้ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1 มิลลิลิตร

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

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

2. ตัวอย่างการคำนวณหาปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอิน (ใบของผักบุ้งทรานสเฟอร์แมนท์หมายเลข 2)

นำพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายตัวอย่างไปเทียบหาปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอินจากกราฟ  
ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานผสมระหว่างกรดอะมิโนซิสเตอินและ  
กลูตาไรโอน และพื้นที่ใต้กราฟ (ภาคผนวก ก. 4) ได้ปริมาณกรดอะมิโนซิสเตอินเท่ากับ

$$= 0.348 \text{ ไมโครโมลาร์}$$

$$\text{ใน reaction mixture 20 ไมโครลิตรมีกรดอะมิโนซิสเตอิน} = 0.348 \text{ ไมโครโมลาร์}$$

$$\text{ใน reaction mixture 1,140 ไมโครลิตรมีกรดอะมิโนซิสเตอิน} = \frac{0.348 \times 1,140}{20}$$

$$= 19.84$$

$$= 19.84 \text{ ไมโครโมลาร์}$$

$$\text{ในน้ำสกัดจากใบ 200 ไมโครลิตรมีกรดอะมิโนซิสเตอิน} = 19.84 \text{ ไมโครโมลาร์}$$

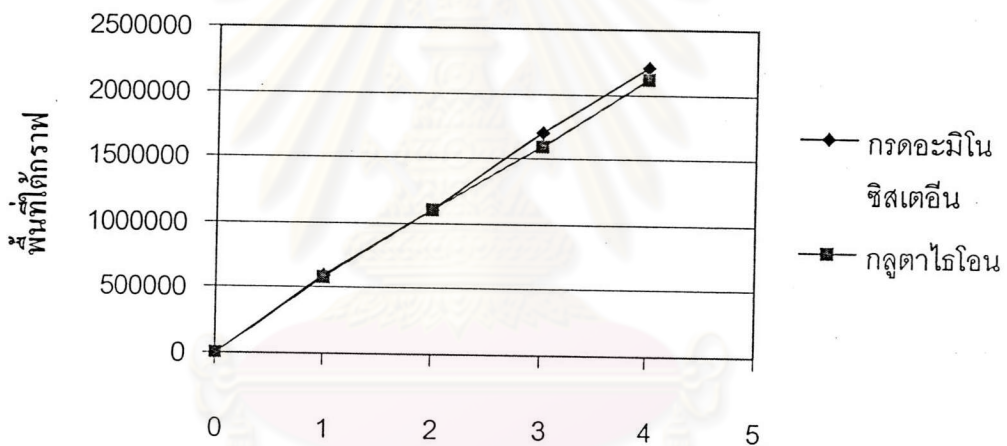


$$\begin{aligned} \text{ในน้ำสกัดทั้งหมด 600 ไมโครลิตรจะมีกรดอะมิโนซิสเตอีน} &= \frac{19.84 \times 600}{200} \\ &= 59.52 \text{ ไมโครโมลาร์} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{น้ำหนักแห้งของใบเท่ากับ 12.4 มิลลิกรัม มีกรดอะมิโนซิสเตอีน} &= 59.52 \text{ ไมโครโมลาร์} \\ \text{น้ำหนักแห้งของใบเท่ากับ 1 มิลลิกรัมจะมีกรดอะมิโนซิสเตอีน} &= \frac{59.52 \times 1}{124} \\ &= 4.8 \text{ ไมโครโมลาร์} \end{aligned}$$

น้ำหนักแห้งของใบ 1 มิลลิกรัมมีกรดอะมิโนซิสเตอีนเท่ากับ 4.8 ไมโครโมลาร์

\*\* การคำนวณหาปริมาณกรดกลูตาไรโอนมีหลักการเช่นเดียวกับกรดอะมิโนซิสเตอีน



สารละลายมาตรฐานผสมระหว่างกรด  
อะมิโนซิสเตอีนและกรดกลูตาไรโอน  
(มิลลิโมลาร์)

ภาพที่ ค.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานผสมระหว่างกรดอะมิโนซิสเตอีนและกรดกลูตาไรโอน และพื้นที่ใต้กราฟ

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวอังคณา โพธิ์ไกร เกิดวันที่ 18 พฤษภาคม 2519 จ. กำแพงเพชร สำเร็จการศึกษา  
ปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยบูรพา จ. ชลบุรี เมื่อปีการศึกษา 2541  
และเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโท หลักสูตรจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ในปีการศึกษา 2542



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย