รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

จอมขวัญ มีรักษ์. 2545. การโคลนยีนระบุรหัสเซอรีนอะซิติลทรานสเฟอเรส ชนิด plastid isoform จาก*Arabidopsis thaliana*. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อังคณา โพธิ์ไกร. 2545. การสร้างผักบุ้ง *Ipomoea aquatica* ดัดแปลงพันธุ์ที่มียีนประมวลรหัสซิสเตอีนซินเตสจากข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

American Public Health Association. 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th ed. Washington, DC. : Water Pullution Control federation.

Baecker, P., and Wedding, R.T. 1980. Monitoring of the decrease in A_{232} due to the thioester bond of acetyl-CoA. Anal. Biochem. 102:16-21.

Bech, J., Poschenrieder, C., Barcelo, J., and Lansac, A. 2002. Plents from Mine Spoils in the South American Area as Potential Sources of Germplasm for Phytoremediation Technologies. Acta-Biotechnologica. 22(1-2):5-11.

Delorme, T.A., Gagliardi, J.V., Angle, J.S., and Chaney, R.L. 2001. Influence of the zine hyperaccumulator *Thlaspi cawrulescens J.* and *C. Presl.* and the non metal accumulator *Trifolium pretense* L. on soil microbial populations. Cannadian-Journal-of-Microbiology-Revue- Canadienne-de-Microbiologie. 47(8):773-776.

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.

Feist, L.J., and Parker, D.R. 2001. Ecotypic variation in selenium accumulation among populations of *Stanleya pinnata*. New-Phytologist. 149(1):61-69.

Flocco, C.G., Lo-Balbo, A., Carranza, M.P., and Giulietti, A.M. 2002. Removal of Phenol by Alfalfa Plants (*Medicago sativa* L.) Grown in Hydroponics and its Effect on Some Physiological Palamiter. Acta-Biotechnologica. 22(1-2):43-54.

Hannink, N., Rosser, S.J., French, C.E., Basran, A., Murray, J.A.H., Nicklin, S., and Bruce, N.C. 2001. Phytodetoxification of TNT by Transgenic plants expressing a bacterial nitroreductase.Nature-Biotechnology. 19(12):1168-1172

.

Harms, K., Ballmoos, P., Brunold, C., Hofgen, R., and Hesse, H. 2000. Expression of a bacterial serine acetyltransferase in transgenic potato plants leads to increased levels of cysteine and glutathione. The Plant Journal. 22(4): 335-343.

Kawamura, Y., Fukunaga, K., Umehara, A, Takahashi, M., and Morikawa, H. 2002 Selection of *Rhododendron mucronatum* plants that have a High Capacity for Nitrogen Dioxide Uptake. Acta-Biotechnologica. 22(1-2):113-120.

Kirk. J.L., Klironomos, J.N., Lee, Hung., and Trevors, J.T. 2002. Phytotoxicity Assay to Assess Plant Species for Phytoremediation of Petroleum-Contaminated Soil. Bioremediation-Journal-of-microbiology-Revue-Canadienne-de-Microbiologie.47(8):773-776.

Macek, T., Mackova, M., Ravlikova, D., Szakova, J., and Truksa, M. 2002. Accumulationof Cadmium by Transgenic Tobacco. Acta-Biotechnologica. 22(1-2):101-106.

Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Plant Physilo. 15: 473.

Murillo, M., Foglia, R., Diller, A., Lee, S., and Leustek, T. 1995. Serine acetyltransferase from *Arabidopsis thaliana* can functionally complement the cysteine requirement of a cysE mutant strain of *Escherichia coli*. Cellular and Molecular Biology Research. 41(5): 425-433.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Noji, M., Inour, K., Kimura, N. Gouda, a., and Saito, K. 1998. Isofrom-dependent differences in feedback regulation and Subcellular Localization of Serine Acetyltransferase Involved in Cysteine Biosynthesis from *Arabidopsis thaliana*. The Journal of Biological Chemistry. 273(49):32739-32745.

Rossi, G., Figliolia, A., Socciarelli, S., and Pennelli, B. 2002. Capability of *Brassica napus* to Accumulate Cadmium, Zine and Copper from Soil. Acta-Biotechnologica. 22(1-2):133-140.

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

Ruffet, M.L., Lebrum, M., Droux, M., and Douce, R. 1995. Subcellulae distribution of serine acetyltransferase from *Pisum sativum* and characterization of and *Arabidopsis thaliana* putative cytosolic isoform. European Journal Biochemistry. 227: 500-509.

Rugh, C.L., Senecoff, J.F., Meagher, R.B., and Merkle, S.A. 1998. Development of Transgenic yellow poplar for mercury phytoremediation. Nat.-Biotechnol. 16(10):925-928.

Saito, K., Yokoyama, H., Noji, M. and Murakoshi, I. 1995. Molecular cloning and characterization of a plant serine acetyltransferase playing aregulatory role in cysteine biosynthesis from watermelon. The Journal of Biological Chemistry. 270: 16321-16326.

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

Sinha, S., Saxena, R., and Singh, S. 2000. Fluoride Removal from Water by *Hydrilla verticillata*(l.f) Royle and Its Toxic Effects. Bulletin-of-Environmental-Contamination-and-Toxicology.65(5):683-690.

Strycharz, S., and Shetty, K. 2002. Peroxidase activity and phenolic content in elite clonal lines of *Mentha pulegium* in response to polymeric dye R-478 and *Agrobacterium rhizogenes*. Process-Biochemistry. 37(8):805-812.

Wang, Q., Cui, Y., and Dong, Y. 2002. Phytoremediation of Polluted Waters Potentials and Prospects of Wetland Plants. Acta-Biotechnologica. 22(1-2):199-208.

Xiong, Zhi-Ting. 1997. Bioaccumulation and physiological effects of excess lead in a roadside. Environ.-Pollun. 97(3):275-279.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Luria-Bertani (LB)

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

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

2. อาหาร GYT

สารละลายกลีเซอรอล(Glycerol)เข้มข้น	10 %	(น้ำหนัก/ปริมาตร)
สารสกัดจากยีสต์(Yeast Extract)	0.125 %	(น้ำหนัก/ปริมาตร)
แบคโต-ทริปโตน(Bacto Peptone)	0.25 %	(น้ำหนัก/ปริมาตร)

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 7.5 นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. 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

4. 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

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรท(Calcium chloride dihydrate)	0.220	กรัม
โปแตสเซียมฟอสเฟส(Potassium phosphate)	0.085	กรัม
ไอออน II ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท(Iron(II) sufate heptahydrate)	0.0139	กรัม

ธาตุอาหารรอง :

โซเดียมอีดีทีเอ(Sodium ethylendinitrilo tetraacetic acid)	18.65	มิลลิกรัม
แมงกานีสซัลเฟตเพนตะไฮเดรท(Manganese sulphate pentahydrate)	11.15	มิลลิกรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท(Zing sulphate haptahydrate)	4.3	มิลลิกรัม
โซเดียมโมลิบเดท(Sodium Molybdate)	0.125	มิลลิกรัม
กรดบอริก(Boric acid)	3.1	มิลลิกรัม
โพแทสเซียมไอโอไดด์(Potassium Iodide)	0.415	มิลลิกรัม
โคบอลท์คลอไรด์เฮกสะไฮเดรท(Cobaltchloride hexahydrate)	0.0125	มิลลิกรัม
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรท(Kuppersulphate pentahydrate)	0.0125	มิลลิกรัม

องค์ประกอบวิตามิน :

อินโนซิทอล(Inositol)	100	มิลลิกรัม
ไกลซีน(Glycin)	2.0	มิลลิกรัม
ไพริดอกซินไฮโดรคลอไรด์(Pyridoxine monohydrochloride)	0.5	มิลลิกรัม
กรดนิโคตินิก(Nicotinic acid)	0.5	มิลลิกรัม
ไธอะมีนไฮโดรคลอไรด์(Thiamine hydrochloride)	0.4	มิลลิกรัม

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

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 5.8 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. อาหาร MMS (Modified 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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โปแตสเซียมฟอสเฟส(Potassium phosphate)	0.085	กรัม
ไอออน II ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท(Iron(II) sufate heptahydrate)	0.0139	กรัม

ธาตุอาหารรอง :

โซเดียมอีดีทีเอ(Sodium ethylendinitrilo tetraacetic acid)	18.65	มิลลิกรัม
แมงกานีสซัลเฟตเพนตะไฮเดรท (Manganese sulphate pentahydrate)	11.15	มิลลิกรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท(Zing sulphate haptahydrate)	4.3	มิลลิกรัม
โซเดียมโมลิบเดท(Sodium Molybdate)	0.125	มิลลิกรัม
กรดบอริก(Boric acid)	3.1	มิลลิกรัม
โพแทสเซียมไอโอไดด์(Potassium Iodide)	0.415	มิลลิกรัม
โคบอลท์คลอไรด์เฮกสะไฮเดรท(Cobaltchloride hexahydrate)	0.0125	มิลลิกรัม
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรท(Kuppersulphate pentahydrate)	0.0125	มิลลิกรัม

องค์ประกอบวิตามิน :

อินโนซิทอล(Inositol)	100	มิลลิกรัม
กรดนิโคตินิก(Nicotinic acid)	0.5	มิลลิกรัม
ไธอะมิลไฮโดรคลอไรด์(Thiamine hydrochloride)	0.4	มิลลิกรัม
กรดโฟลิก(Folic acid)	5.0	มิลลิกรัม

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

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 5.8 นึ่งฆ่า เชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

1. สารละลายไฮโกรมัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
   ละลายไฮโกรมัยซินบี 250 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน เก็บไว้ที่–20 องศาเซลเซียส

2. สารละลายกานามัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
   ละลายกานามัยซิน(ในรูปเกลือซัลเฟต) 250 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

3. สารละลายแอมพิซิลินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
   ละลายแอมพิซิลิน 250 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน เก็บไว้ที่-20 องศาเซลเซียส

4. สารละลายอะซิโตไซริงโอนความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
   ละลาย3’,5’-ไดเมทอกซี-4’-ไฮดรอกซีอะซิโตฟีโนน(3’,5’-Dimethoxy-4’-hydroxy-acetophenone) 250 มิลลิกรัมในไดเมทิลซัลฟอกไซด์(Dimethy sulfoxid) 5 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส

5. สารละลายเซฟโฟแทคซีมความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
   ละลายเซฟโฟแทคซีม (Cefotaxime Sodium Salt) 250 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน เก็บไว้ที่–20 องศาเซลเซียส

6. สารละลายไธเดียซูรอนความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์
   ละลายไธเดียซูรอน(Thidiazuron) 22 มิลลิกรัม ในไดเมทิลฟอร์มามีด(Dimethylformamid) 200 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร โดยน้ำกลั่นปลอดเชื้อโดยวิธีปราศจากเชื้อ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. สารละลายสำหรับสกัดพลาสมิด

7.1 สารละลาย I

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

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

7.2 สารละลาย II

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

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

7.3 สารละลาย III

สารละลายโปแตสเซียมอะซิเตตเข้มข้น 5 โมลาร์	50	มิลลิลิตร
กรดอะซิติกเข้มข้น	11.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	8.5	มิลลิลิตร

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

8. สารละลายทีอีบัฟเฟอร์ (TE buffer) ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0

	ความเข้มข้นสุดท้าย	
สารละลายทริส-เบส	10	มิลลิโมลาร์
สารละลายอีดีทีเอ ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0	1	มิลลิโมลาร์

ผสมองค์ประกอบทั้งสองเข้าด้วยกัน ปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น จนได้ค่าความเป็นกรดด่างเป็น 8.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9. สารละลายสำหรับสกัดโปรตีนจากผักบุ้ง : สารละลายเอ็กแทรคชันบัฟเฟอร์

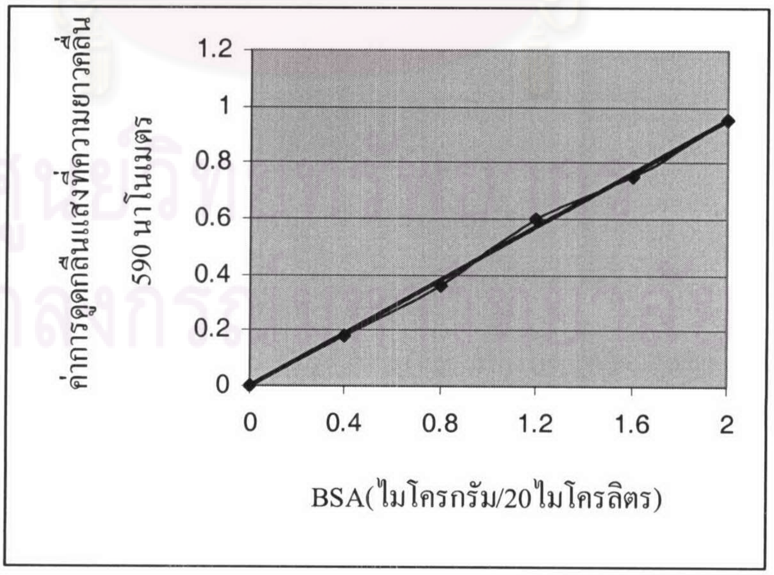
	ความเข้มข้นสุดท้าย	
สารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์		
ความเป็นกรดด่าง 7.5	50	มิลลิโมลาร์
สารละลายอีดีทีเอ ค่าความเป็นกรดด่างเป็น 8.0	1	มิลลิโมลาร์
สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์	5	มิลลิโมลาร์
สารละลายไดไธโอทรีอิทอล	2	มิลลิโมลาร์
ไตรตอนเอ็ก-100 (TritonX-100) (น้ำหนัก/ปริมาตร)	0.1	เปอร์เซ็นต์

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

10. สารละลายแบรดฟอร์ด

เอทานอล เข้มข้น 95%(ปริมาตร/ปริมาตร)	5	มิลลิลิตร
กรดฟอสโฟริกเข้มข้น 85% (ปริมาตร/ปริมาตร)	10	มิลลิลิตร
สีคูแมสซีบริลเลียนท์บลู	10	มิลลิกรัม

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร กรองสารละลายผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง



ภาพที่ ข.1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย BSA และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร

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

ทริส-เบส	202	กรัม
กรดอะซิติกเข้มข้น	57.1	มิลลิลิตร
สารละลายอีดีทีเอเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0	100	มิลลิลิตร

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

12. สารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์มไอโซเอมิลแอลกอฮอลล์

นำฟีนอลที่เติมไฮดรอกซีควิโนลิน (8-Hydroxyquinoline) ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) มาทำให้สมดุล (equilibrate) ด้วยสารละลายทริสคลอไรด์บัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0 จนค่าความเป็นกรดด่าง $\geq$ 7.5 แล้วนำมาผสมกับคลอโรฟอร์ม และไอโซเอมิลแอลกอฮอลล์ในอัตราส่วน 25:24:1

13. สารละลายนินไฮดริน (Ninhydrin solution)

นินไฮดริน	250	มิลลิกรัม
กรดอะซิติกเข้มข้น	6	มิลลิลิตร
กรดไอโดรคลอริกเข้มข้น	4	มิลลิลิตร

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกัน เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

14. สารละลายสำหรับสกัดดีเอ็นเอจากผักบุ้ง : สารละลายเอ็กแทรกชันบัฟเฟอร์

	ความเข้มข้นสุดท้าย	
สารละลายทริส- คลอไรด์บัฟเฟอร์		
ความเป็นกรดด่าง 7.5	200	มิลลิโมลาร์
สารละลายอีดีทีเอ	25	มิลลิโมลาร์
สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (น้ำหนัก/ปริมาตร)	0.5	เปอร์เซ็นต์

ละลายองค์ประกอบทั้งหมดที่ปราศจากเชื้อให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ โดยวิธีปราศจากเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิห้อง

ภาคผนวก ค

```
   1 gtcgacccac gcgtccgcaa ggaggagcaa ggattgttgt tgtttcgctg tcagatcgat
  61 tcctgacggg ataatgggtg agaccatcgc caaggatgtc accgagttga ttgggaacac
     rcs1-1
 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
1021 aaacatggtg gttgaatgaa atgcacaata tccgggaatc cacaggaata aaagtttggt
1081 atctctgctt gtgtgattaa acatacattg tcctgccatt ttcaagttgt tctgcttgtg
1141 tagcaatggg gaacacagtg tgttagcctt gtagtgttaa acagtttaca ttttatcttc
1201 cctgtatatc agaacccttt acatgggcat ttgtcagcca gtgtgaatga aataaagcat
1261 catatgattt gtctcaaaaa aaaaaaaaaa
```

ภาพที่ ค.1 แสดงตำแหน่งดีเอ็นเอไพร์เมอร์ทั้ง 2 สายบนลำดับเบสของยีน *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

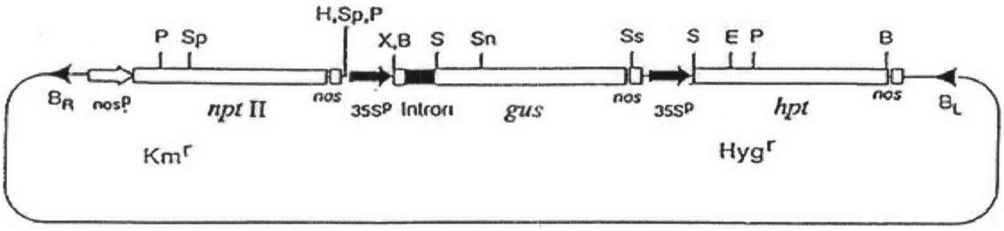
```
   1 gcataaacca tggcaacatg catccacaca tgccgaaccg gtaataccca agacgatgat
tctaga JSAT1   *start codon
  61 tcccggttct gttgcatcaa taaattcttc cgacccggtt tctctgtcaa ccggaagatc
 121 caccacaccc aaatcgaaga tgacgatgat gtctggatca agatgctcaa agaagccgaa
 181 tccgatgtta aacaagaacc cattttgtca aactactact acgcttcgat cacatctcat
                                                JSAT3
 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
                                             JSAT4
 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
                                JSAT2 ctcgag
1021tattttacta tgtactaatc aaacaagtct tgaaatcaag ctcatcgatc tttaagaag
```

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

atg (start codon) หมายถึง จุดเริ่มต้นของการแปลรหัสโปรตีน

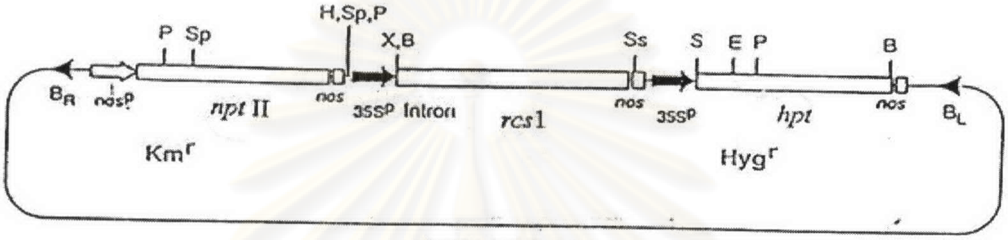
taa (stop codon) หมายถึง จุดสิ้นสุดของการแปลรหัสโปรตีน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



pBIH1-IG

(ก)

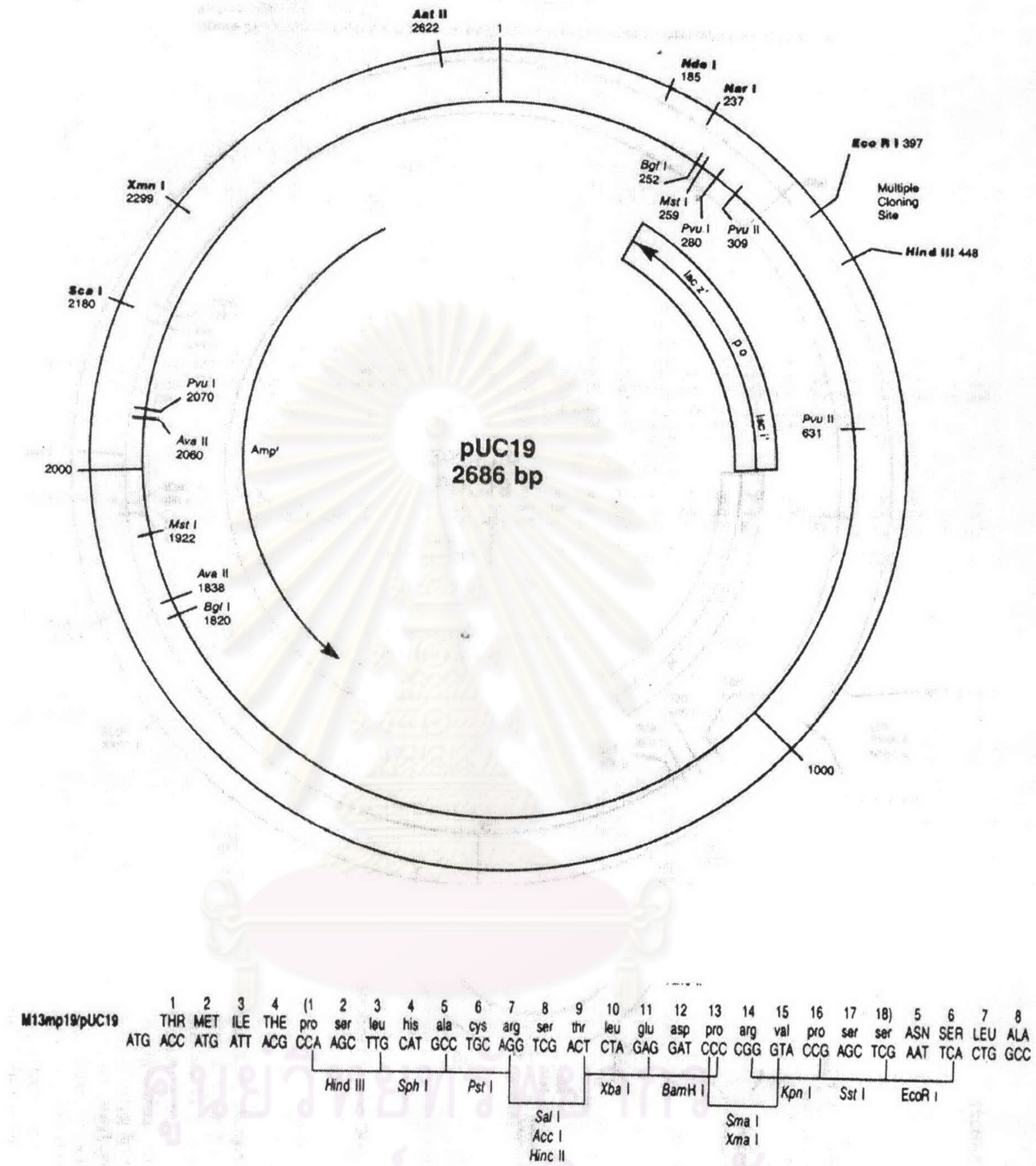


pBIH1-IG-RCS1

(ข)

ภาพที่ ค.3(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 (*rcs*1) ขนาด 1,290 เบส สอดแทรกอยู่ที่ตำแหน่งเรสทริกชัน *Xba*I และ *Sac*I ของพลาสมิดพาหะ pBIH1-IG ซึ่งเป็นการสอดแทรกเข้าไปแทนที่ยีน *gus* ในพลาสมิดพาหะ pBIH1-IG



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ ค.4 แผนที่เรสทริกชันของพลาสมิด pUC19 ขนาด 2.686 กิโลเบส

1. การคำนวณกิจกรรมจำเพาะ (specific activity) ของซิสเตอีนซินเตส

กำหนด 1 หน่วยเอนไซม์ คือ จำนวนของเอนไซม์ที่ทำให้เกิดกรดอะมิโนซิสเตอีน 1 ไมโครโมลาร์ ที่ภาวะที่ทดสอบในเวลา 1 นาที

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

เมื่อ C = ความเข้มข้นของกรดอะมิโนซิสเตอีน (ไมโครโมลาร์)

A = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร

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

I = ระยะห่างของช่องให้แสงผ่านของคิวเวตต์ (path length) (cm)

: $A = \chi$

$I = 1$ ซม.

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

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

เนื่องจากปริมาตรที่ใช้ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1 มิลลิลิตร

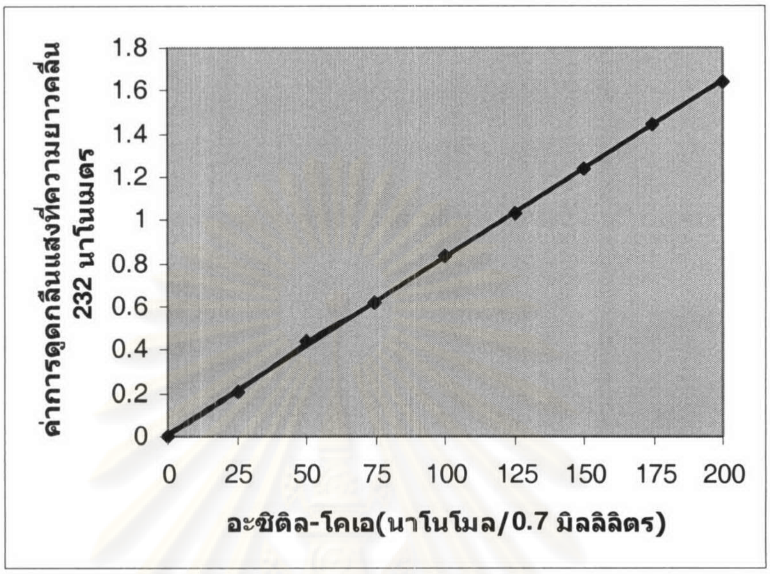
$C = \chi / 25{,}000 \times 10^{-3}$ โมล (โมล / มิลลิลิตร)

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

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การคำนวณกิจกรรมจำเพาะ (specific activity) ของเซอรีนอะซิติลทรานสเฟอเรส

กำหนด 1 หน่วยเอนไซม์ คือ จำนวนของเอนไซม์ที่ทำให้อะซิติล-โคเอ(acetyl-CoA) ลดลง 1 มิลลิโมลาร์ ที่ภาวะที่ทดสอบในเวลา 1 นาที



ภาพที่ ค.5 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายอะซิติล-โคเอ และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 232 นาโนเมตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวนิภาภัทร สันป่าแก้ว เกิดวันที่ 9 กุมภาพันธ์ 2521 จ. เชียงราย สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร เมื่อปีการศึกษา 2543 และเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโท หลักสูตรสหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม ในปีการศึกษา 2545

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย