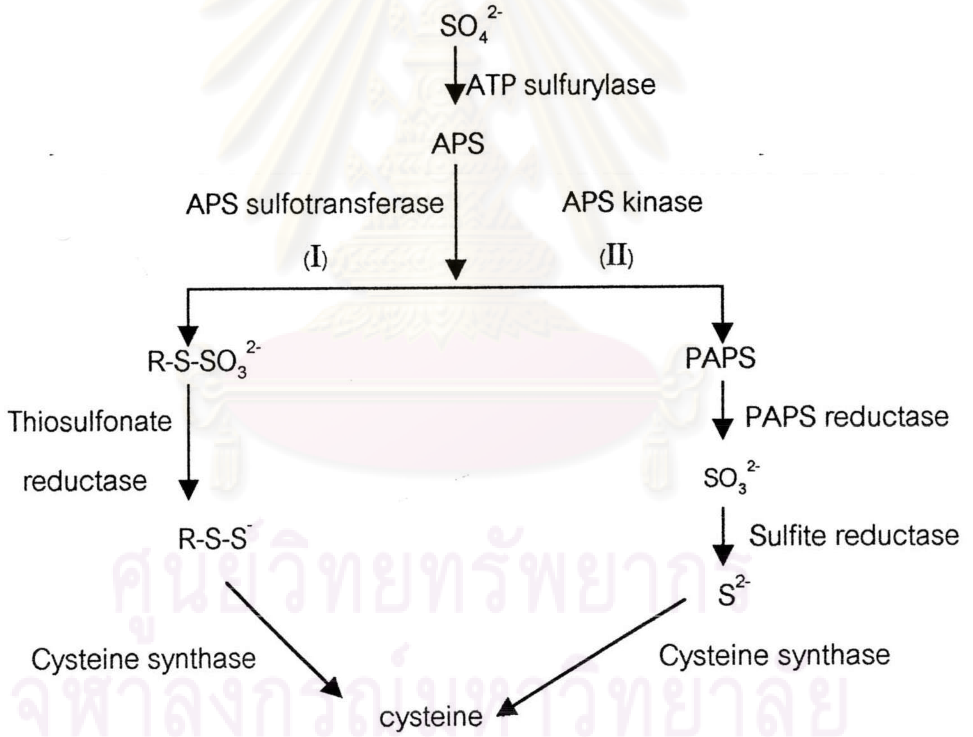
บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

พืชสามารถสังเคราะห์สารอินทรีย์ที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบจากซัลเฟตที่ดูดซับได้จากภายนอกเซลล์ โดยพืชนำซัลเฟตจากภายนอกเซลล์ที่ได้มาสังเคราะห์เป็นกรดอะมิโนซีสเตอีนโดยกระบวนการ sulfate assimilation จากนั้นกรดอะมิโนซีสเตอีนจะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดอะมิโนชนิดอื่นที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบและสารเมตาโบไลท์อื่นๆ ต่อไป

ก่อนปี ค.ศ. 1992 เข้าใจว่าพืชมีวิถีการสังเคราะห์กรดอะมิโนซีสเตอีนจากซัลเฟต 2 วิถี ดังแสดงในภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 วิถีการสังเคราะห์กรดอะมิโนซีสเตอีนจากซัลเฟตของพืชและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง (Schmidt และ Jager, 1992) (APS : adenosine 5'-phosphosulfate , PAPS : 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate)

Goldschmidt และคณะ (1975) รายงานว่าน้ำสกัดจากคลอโรพลาสต์ของพืชสามารถเปลี่ยนเอพีเอสไปเป็นซัลไฟต์ได้โดยตรง ไม่จำเป็นต้องถูกเปลี่ยนไปเป็นพีเอพีเอสก่อน Setya และ

คณะ (1996) และ Gutierrez-Marcos และคณะ (1996) รายงานว่าพบวิถีการสังเคราะห์กรดอะมิโนซีสเตอีนจากซัลเฟตของพืชวิถีที่ 3 คือ เอพีเอสสามารถเปลี่ยนไปเป็นซัลไฟต์ได้โดยตรงโดยเอพีเอสรีดักเตส (APS reductase หรืออะดีโนซีน-5'-ฟอสโฟซัลเฟตรีดักเตส (adenosine-5'-phosphosulfate reductase)) EC 1.8.99.4 ต่อจากนั้นซัลไฟต์จะถูกเปลี่ยนไปเป็นซัลไฟด์และกรดอะมิโนซีสเตอีน

$$SO_4^{2-} \xrightarrow[\text{ATP-sulfurylase}]{} APS \xrightarrow[\text{APS reductase}]{} SO_3^{2-} \xrightarrow[\text{Sulfite reductase}]{} S^{2-} \xrightarrow[\text{Cysteine synthase}]{} \text{cysteine}$$

Setya และคณะ (1996) โคลนยีนประมวลรหัสพีเอพีเอสรีดักเตสของ *A. thaliana* ด้วยวิธีตรวจหาความสามารถของยีนที่โคลนเข้าไป ในการทำให้เซลล์แบคทีเรียซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายเจริญได้ในสภาวะที่ทดสอบ (functional complementation test) โดยโคลนคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอของ *A. thaliana* สายพันธุ์ Columbia เข้าสู่ *Escherichia coli* JM96 ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายที่ไม่มีการแสดงออกของยีนประมวลรหัสพีเอพีเอสรีดักเตส (ยีน *cysH*) แล้วเพาะเลี้ยงทรานสฟอร์แมนท์บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากกรดอะมิโนซีสเตอีน ผลการโคลนได้ยีน 3 ยีน คือ ยีน *APR1* , *APR2* และ *APR3* สามารถทำให้ทรานสฟอร์แมนท์เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากกรดอะมิโนซีสเตอีนที่ทดสอบ แสดงว่ายีน *APR* ทั้งสามนี้เป็นรหัสของเอนไซม์ซึ่งสามารถทำหน้าที่แทนพีเอพีเอสรีดักเตสได้ ยีน *APR* ทั้งสามนี้พบว่าเป็นยีนที่มีความใกล้ชิดกัน (gene family) เพราะสามารถให้สัญญาณไฮบริไดเซชั่นซึ่งกันและกันได้ ผลการหาลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสจากยีนทั้งสามนี้พบว่ามีบริเวณอนุรักษ์ (conserved domain) เหมือนกับของพีเอพีเอสรีดักเตสและโปรตีนไธโอรีดอก ซินของแบคทีเรีย รา และยีสต์ ผลการทรานสฟอร์มยีน *APR1* เข้าสู่ *E. coli* JM81A ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายที่ไม่มีการแสดงออกของยีนประมวลรหัสเอพีเอสไคเนส , *E. coli* A522 ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายที่ไม่มีการแสดงออกของยีนประมวลรหัสโปรตีนไธโอซัลเฟต และ *E. coli* JM240 ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายที่ไม่มีการแสดงออกของยีนประมวลรหัสเอทีพีซัลฟูรีเลส ตามลำดับ พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงทรานสฟอร์แมนท์บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากกรดอะมิโนซีสเตอีน ยีน *APR1* สามารถทำให้เซลล์ทรานสฟอร์แมนท์ของ *E. coli* JM81A และ *E. coli* A522 ซึ่งเดิมเป็นสายพันธุ์ที่ไม่สามารถสังเคราะห์เอพีเอสไคเนส และไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนไธโอรีดอกซินตามลำดับเจริญได้ แต่ไม่สามารถทำให้เซลล์ทรานสฟอร์แมนท์ของ *E. coli* JM240 ซึ่งเดิมเป็นสายพันธุ์ที่ไม่สามารถสังเคราะห์เอทีพีซัลฟูรีเลสเจริญได้ ผลการทดลองที่ได้ แสดงว่าเอนไซม์ที่แปลรหัสจากยีน *APR1* นี้ไม่ต้องการพีเอพีเอส สามารถใช้เอพีเอสเป็นสับสเตรทได้เพราะ *E. coli* JM81A เป็นสายพันธุ์ที่ไม่สามารถสังเคราะห์เอพีเอสไคเนสจึงไม่สามารถเปลี่ยนเอพีเอสไปเป็น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พีเอพีเอส การทำงานของเอนไซม์นี้ไม่ต้องการไธโอรีดอกซินเพราะ *E. coli* A522 เป็นสายพันธุ์ที่ไม่มีโปรตีนไธโอรีดอกซิน แสดงว่าเอนไซม์นี้ไม่ใช่พีเอพีเอสรีดักเตส เพราะการทำงานของพีเอพีเอสรีดักเตสต้องการไธโอรีดอกซินเป็นตัวให้อิเลคตรอน และกิจกรรมของเอนไซม์ต้องการเอพีเอสเพราะ *E. coli* JM240 เป็นสายพันธุ์ที่ไม่สามารถสังเคราะห์เอทีพีซัลฟูรีเลส จึงไม่สามารถสังเคราะห์เอพีเอสจากกำมะถันซัลเฟตได้ ผลการทดสอบความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ที่แปลรหัสจากยีน *APR1* พบว่ามีความจำเพาะต่อเอพีเอสสูงกว่าพีเอพีเอส 50 เท่า ผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากการที่เอนไซม์กึ่งบริสุทธิ์ที่แปลรหัสจากยีน *APR1* ย่อยสลายเอพีเอสหรือพีเอพีเอสคือซัลไฟต์ ผลการทรานสฟอร์มยีน *APR1* เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ที่มีซัลไฟต์รีดักเตสแต่ไม่มีเอนไซม์ย่อยสลายไธโอซัลเฟต พบว่าทรานสฟอร์แมนท์สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากกรดอะมิโนซีสเตอีน แสดงว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกิจกรรมของเอนไซม์ที่แปลรหัสมาจากยีน *APR1* คือซัลไฟต์ไม่ใช่ไธโอซัลเฟต ผลการทดลองนี้สนับสนุนว่าเอนไซม์นี้ไม่ใช่เอพีเอสซัลโฟทรานสเฟอเรส เพราะผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกิจกรรมของเอพีเอสซัลโฟทรานสเฟอเรสคือไธโอซัลเฟตซึ่งต้องการเอนไซม์ย่อยสลายไธโอซัลเฟตในวิถีการสังเคราะห์กรดอะมิโนซีสเตอีน ผลการหาลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสมาจากยีน *APR1* และ *APR3* พบว่ามีบริเวณสายเปปไทด์ขนส่งไปสู่พลาสทิด และลำดับกรดอะมิโนที่แปลรหัสมาจากยีน *APR2* พบว่ามีบริเวณสายเปปไทด์ขนส่งไปสู่ไซโทพลาสซึม ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีการสังเคราะห์กรดอะมิโนซีสเตอีนภายในเซลล์

Gutierrez-Marcos และคณะ (1996) โคลนยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสของ *A. thaliana* สายพันธุ์ Columbia ด้วยวิธีเดียวกันกับ Setya และคณะ (1996) คือโคลนคอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอของ *A. thaliana* เข้าสู่ *E. coli* JM96 สายพันธุ์ที่ยีนประมวลรหัสพีเอพีเอสรีดักเตสผ่าเหล่า ผลการโคลนได้ยีน 3 ยีนคือ ยีน*prh19*, *prh26* และ *prh43* สามารถทำให้เซลล์ทรานสฟอร์แมนท์ของ *E. coli* JM96 ซึ่งเดิมเป็นสายพันธุ์ที่ไม่สามารถสังเคราะห์พีเอพีเอสรีดักเตสเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากกรดอะมิโนซีสเตอีน แสดงว่ายีน *prh* ทั้งสามนี้เป็นรหัสของเอนไซม์ซึ่งสามารถทำหน้าที่แทนพีเอพีเอสรีดักเตสได้ ผลการหาลำดับเบสของยีนทั้งสามนี้ พบว่าบริเวณแปลรหัสเป็นโปรตีน (open reading frame) ไม่มีส่วนอินตรอน (intron) ประมวลรหัสสายโพลีเปปไทด์ขนาด 465, 458 และ 453 กรดอะมิโน น้ำหนักโมเลกุลจากการคำนวณเท่ากับ 51.2, 50.5 และ 50.4 กิโลดาลตันตามลำดับ โปรตีนที่แปลรหัสจากยีน *prh* (โปรตีนพีอาร์เอช, PRH) ต่างจากพีเอพีเอสรีดักเตสเพราะปลายเอ็น (N-terminus) มีสายเปปไทด์ขนส่งไปยังคลอโรพลาสต์ และปลายซี (C-terminus) มีลำดับกรดอะมิโนและรูปร่างสามมิติที่คำนวณได้เหมือนโปรตีนไธโอรีดอกซิน โปรตีนพีอาร์เอชสามารถใช้เอพีเอสเป็นสับสเตรทได้ดีกว่าพีเอพีเอสในการสังเคราะห์ซัลไฟต์ นั่นคือสามารถใช้เอพีเอสเป็นสับสเตรทได้โดยตรง ไม่จำเป็นต้องเปลี่ยนเอพีเอสเป็นพีเอพีเอสโดย

เอพีเอสไคเนสก่อน ผลการหากิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสในน้ำสกัดจากเซลล์ทรานสฟอร์แมนท์ที่ได้จากการทรานสฟอร์มยีน *prh19* , ยีน *prh26* หรือยีน *prh43* เข้าสู่ *E. coli* JM96 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่สามารถสังเคราะห์พีเอพีเอสรีดักเตส เปรียบเทียบกับในน้ำสกัดจากสายพันธุ์เดิม (wild type) ของ *E. coli* JM96 พบว่ากิจกรรมของพีเอพีเอสรีดักเตสของเซลล์ทรานสฟอร์แมนท์ต่ำกว่าสายพันธุ์เดิมมาก กิจกรรมของเอนไซม์ไม่ต้องการไธโอรีดอกซิน การเพิ่มความเข้มข้นของไธโอรีดอกซินไม่มีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้น การทดสอบโดยใช้โปรตีนพีอาร์เอชบริสุทธิ์ซึ่งแปลรหัสจากยีน *prh* ทั้งสามชนิดให้ผลเช่นเดียวกัน แสดงว่าไม่มีไธโอรีดอกซินปนเปื้อนอยู่ในน้ำสกัดจากเซลล์หรือโปรตีนไธโอรีดอกซินไม่จำเป็นต่อกิจกรรมของเอนไซม์จริง แต่ผลการหากิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสของน้ำสกัดจากเซลล์ทรานสฟอร์แมนท์ทั้ง 3 ชนิด เปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิมในภาวะที่เติมและไม่เติมไธโอรีดอกซิน พบว่าน้ำสกัดจากเซลล์ทรานสฟอร์แมนท์มีกิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสสูงกว่าของสายพันธุ์เดิมมาก ไธโอรีดอกซินไม่จำเป็นต่อกิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสทั้งในน้ำสกัดจากเซลล์และโปรตีนพีอาร์เอชบริสุทธิ์ แต่จากการที่พบปลายซีของโปรตีนพีอาร์เอชมีลำดับกรดอะมิโนบริเวณอนุรักษ์เหมือนโปรตีนไธโอรีดอกซิน ทำให้สันนิษฐานว่าโปรตีนพีอาร์เอชอาจมีบริเวณเร่งปฏิกิริยา (catalytic site) ของโปรตีนไธโอรีดอกซิน จึงไม่ต้องการไธโอรีดอกซินจากภายนอกเหมือนพีเอพีเอสรีดักเตส โปรตีนพีอาร์เอชซึ่งแปลรหัสจากยีน *prh43* ซึ่งสายเปปไทด์ที่ปลายเอ็นบางส่วนถูกตัดออกยังคงมีกิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตส แสดงว่าโปรตีนพีอาร์เอชนี้ประกอบด้วย 2 ส่วนคือ สายเปปไทด์ขนส่งและส่วนของเอพีเอสรีดักเตส ผลการทำไฮบริไดเซชั่นโดยใช้ลำดับเบสบริเวณปลายด้านเอ็นของยีน *prh* แต่ละชนิด พบว่าในจีโนม (genome) ของ *A. thaliana* สายพันธุ์ Columbia นี้มียีน *prh19* และ *prh43* อย่างละ 1 ชุด แต่มียีน *prh26* หลายชุด ผลการหาลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนพีอาร์เอชยืนยันได้ว่าไม่ใช่เอพีเอสไคเนสและเอพีเอสซัลโฟทรานสเฟอเรสอย่างแน่นอน

ลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ที่แปลรหัสจากยีน *APR1* และยีน *prh19* เหมือนกัน 99% (สินีนาฏ สายบาง, 2543) จากการที่พบว่ากลุ่มยีน *APR* มีส่วนที่เป็นอินตรอน แต่กลุ่มยีน *prh* ไม่มีส่วนที่เป็นอินตรอน และจำนวนอินตรอนที่พบในยีน *APR* แต่ละชนิดไม่เหมือนกัน โดยพบว่า *APR1* จะมี 2 อินตรอน ส่วน *APR2* และ *APR3* จะมีชนิดละ 3 อินตรอน Bick และ Leustek (1998) ได้สันนิษฐานว่าน่าจะเป็นผลมาจากวิวัฒนาการของยีน

Schmidt (1975) รายงานวิธีสกัดเอพีเอสซัลโฟทรานสเฟอเรสจากใบผักขม (*Spinacea oleracea* L.) และวิธีการทำให้เอนไซม์ที่สกัดได้เสถียรดังนี้ สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดเอพีเอสซัลโฟทรานสเฟอเรสจะต้องมีสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ และเมอร์แคปโต

เอธานอลเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เป็นองค์ประกอบและต้องเก็บเอนไซม์ที่สกัดได้ในแอมโนเนียมซัลเฟตเข้มข้น 70% ที่มีเมอร์แคปโตเอธานอลเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เป็นองค์ประกอบ

Schmidt (1976) รายงานวิธีทำให้เอพีเอสซัลโฟทรานสเฟอเรสที่สกัดจากใบผักขม (*Spinacea oleracea* L.) บริสุทธิ์โดยการใช้เซฟฟาเด็ก-จี-200 เจลฟิวเตรชั่น (Sephadex-G-200 gel filtration)และดีอีเออี-เซลลูโลส โครมาโตกราฟฟี (DEAE-cellulose chromatography) ได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 25 เท่า และรายงานสมบัติบางประการของเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้ดังนี้ น้ำหนักโมเลกุลวิเคราะห์โดยวิธีเจลฟิวเตรชั่น (gel filtration) เท่ากับ 110,000 ดาลตัน เอนไซม์มีความจำเพาะต่อเอพีเอส ไม่สามารถใช้พีเอพีเอสเป็นสับสเตรท ค่า K_m ต่อเอพีเอสเท่ากับ 13 ไมโครโมลาร์ สามารถใช้ไดไธโออีริทริทอล (Dithioerythritol; DTE) เป็นตัวให้อิเลคตรอน ค่า K_m ต่อดีทีอีเท่ากับ 0.6 มิลลิโมลาร์ สามารถใช้กลูตาไธโอนเป็นตัวให้อิเลคตรอนแทนดีทีอี กิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งได้โดย 5'-AMP (adenosine 5'-monophosphate) และสันนิษฐานว่า 5'-AMP ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แบบแข่งขัน (competitive) ทั้งนี้เพราะทำให้ค่า K_m ของเอพีเอสเพิ่มขึ้นแต่ไม่ทำให้ V_{max} เปลี่ยนแปลง

Bick และ Leustek (1998) ศึกษารีคอมบิแนนท์เอพีเอสรีดักเตส (APR) ทั้ง 3 ไอโซฟอร์มของ *A. thaliana* และรายงานว่าเอพีเอสรีดักเตสและเอพีเอสซัลโฟทรานสเฟอเรสคือเอนไซม์เดียวกัน ทั้งนี้เพราะพบว่าเอพีเอสรีดักเตสมีสมบัติต่อไปนี้เหมือนกับเอพีเอสซัลโฟทรานสเฟอเรส ภาวะที่เหมาะสมที่สุดของกิจกรรมของเอนไซม์ Kinetic constant สารที่สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ และต้องการไดไธโอทรีอิทอล (dithiothreitol) และกลูตาไธโอนเป็นตัวให้อิเลคตรอน การศึกษา functional complementation test พบว่า *E. coli* สายพันธุ์ที่ยีนประมวลรหัสพีเอพีเอสรีดักเตส (*cys*H) ผ่าเหล่าแต่มียีน *APR* จะสามารถเจริญในอาหารที่ปราศจากกรดอะมิโนซีสเตอีนได้เฉพาะเมื่อ *E. coli* เป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างกลูตาไธโอน และรายงานว่าเอพีเอสรีดักเตสต่างจากพีเอพีเอสรีดักเตส เพราะเอพีเอสรีดักเตสใช้เอพีเอสเป็นสารตั้งต้น (substrate) ได้ดีกว่าใช้พีเอพีเอสเป็นสารตั้งต้น นอกจากนี้ปฏิกิริยายังไม่ต้องการไธโอรีดอกซินหรือกลูตารีดอกซิน เพื่อทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเลคตรอน

Bick และคณะ (1998) ทำให้ยีน *APR1* แสดงออกใน *E. coli* สายพันธุ์ที่ยีน *cys*H ซึ่งประมวลรหัสพีเอพีเอสรีดักเตสผ่าเหล่า และศึกษาสมบัติของรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ที่ได้พบว่าลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 93-327 (R-domain) มีความคล้ายคลึง (homology) กับลำดับกรดอะมิโนของพีเอพีเอสรีดักเตสของจุลินทรีย์ ลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 328-465 (C-domain) มี

ความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของไธโอรีดอกซิน บริเวณ C-domain มีกิจกรรมของกลูตารีดอกซินของ *E. coli* ไม่ใช่กิจกรรมของไธโอรีดอกซิน เนื่องจากรีคอมบิแนนท์เอพีเอสรีดักเตสสามารถก่อให้เกิด functional complementation ได้เฉพาะใน *E. coli* สายพันธุ์ที่ยีนประมวลรหัสพีเอพีเอสรีดักเตสผ่าเหล่าและเป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างกลูตาไธโอน จึงสรุปว่ากิจกรรมของ C-domain ต้องการกลูตาไธโอน

Suter และคณะ (2000) สกัดเอพีเอสซัลโฟทรานสเฟอเรสจาก *Lemna minor* ทำให้เอนไซม์ที่สกัดได้บริสุทธิ์และทำการเปรียบเทียบสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้กับเอพีเอสรีดักเตสของ *A. thaliana* พบว่าเอพีเอสซัลโฟทรานสเฟอเรสมีลักษณะเป็นโฮโมไดเมอร์ (homodimer) แต่ละโมโนเมอร์ (monomer) มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล (M_r) 43,000 ดาลตัน ลำดับกรดอะมิโนมีความคล้ายคลึง (homology) กับลำดับกรดอะมิโนของเอพีเอสรีดักเตสเท่ากับ 75 เปอร์เซ็นต์ ค่า K_m ต่อเอพีเอสเท่ากับ 6.5 ไมโครโมลาร์ เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายเอพีเอสเมื่อใช้กลูตาไธโอนเป็นตัวให้อิเลคตรอนคือซัลไฟต์จึงได้เสนอให้เรียกชื่อเอนไซม์ที่สกัดได้นี้ใหม่ว่าเอพีเอสรีดักเตส

มีผู้รายงานปัจจัยที่มีผลต่อการแสดงออกของยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสหรือกิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสดังนี้

Brunold และ Schmidt (1976) รายงานว่ากิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสในน้ำสกัดจากต้น *Lemna minor* ซึ่งปลูกในภาวะที่ได้รับก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์เข้มข้น 12 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 6 วัน ลดลง 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสในน้ำสกัดจากต้น *L. minor* ซึ่งปลูกในอาหารปกติ การทดสอบในหลอดทดลอง (*in vitro*) พบว่าไฮโดรเจนซัลไฟด์เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตส จึงได้ตั้งข้อสันนิษฐานว่าในสภาพ *in vivo* ที่มีก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่มากเกินพอ พืชจะเพิ่มการสังเคราะห์กรดอะมิโนซีสเตอีนจากซัลไฟด์และโอ-อะซิติล-แอล-เซอรีน (O-acetyl-L-serine) เพื่อลดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ นอกจากนั้นยังลดการสังเคราะห์ซัลไฟต์ในกระบวนการ sulfate assimilation โดยลดกิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตส

Jenni และคณะ (1980) ศึกษากระบวนการควบคุมเอพีเอสซัลโฟทรานสเฟอเรสที่สกัดจากเซลล์แขวนลอย (cell suspension) ของ *Nicotiana sylvestris* และรายงานว่าค่า K_m ต่อเอพีเอสเท่ากับ 11 ไมโครโมลาร์ เอพีเอสที่ความเข้มข้นมากกว่า 50 ไมโครโมลาร์ยับยั้งกิจกรรมของ เอพีเอสซัลโฟทรานสเฟอเรส การเติมกรดอะมิโนซีสเตอีนที่ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 มิลลิโมลาร์ลงไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้กิจกรรมของเอพีเอสซัลโฟทรานสเฟอเรสที่สกัดได้ลดลง และพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอพีเอสซัลโฟทรานสเฟอเรสก่อนที่กรดอะมิโนซีสเตอีนที่เติมลงไปจะถูกนำไปใช้หมดเพียงเล็กน้อย

Takahashi และคณะ (1997) รายงานว่าในสภาวะขาดแคลนซัลเฟอร์ ปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอของเอพีเอสรีดักเตสของ *A. thaliana* เพิ่มขึ้น 5.5 เท่าที่ราก และเพิ่มขึ้น 2 เท่าที่ใบ ปริมาณเอพีเอสรีดักเตสที่เพิ่มขึ้น มีผลทำให้ประสิทธิภาพการสังเคราะห์กรดอะมิโนซีสเตอีนจากซัลเฟตเพิ่มขึ้น

Kopriva และคณะ (1999) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของAPR ทั้ง 3 ไอโซฟอร์มของ *A. thaliana* โดยปลูก *A. thaliana* ในภาวะที่ได้รับแสง เป็นเวลา10 ชั่วโมงต่อวัน และรายงานว่ากิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสสูงที่สุดในลำต้นและราก เมื่อ *A. thaliana* ได้รับแสงสว่างเป็นเวลา 4 ชั่วโมง และกิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสต่ำที่สุดในช่วงต้นของระยะมืด การยืดระยะเวลาการให้แสงมีผลทำให้กิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสในลำต้นซึ่งมีค่าต่ำคงที่ แต่ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสในราก แต่การยืดระยะเวลามืดมีผลทำให้กิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสลดลงจนตรวจไม่พบทั้งในลำต้นและราก แต่เมื่อนำกลับมาให้แสง (re-illumination) อีกครั้ง กิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสในลำต้นและรากจะกลับคืนมา 50 และ 20 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ภายในเวลา 8 ชั่วโมง การศึกษาพบว่าแสงมีผลต่อปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ของ APR ทั้ง 3 ไอโซฟอร์ม โดยปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอสูงที่สุดเมื่อ *A. thaliana* ได้รับแสงเป็นเวลา 2 ชั่วโมง การศึกษาการดูดซับซัลเฟตในสภาพ *in vivo* โดยใช้ซัลเฟตที่ติดฉลากด้วย S^{35} พบว่าที่ภาวะที่ได้รับแสงซัลเฟตถูกเปลี่ยนเป็นกำมะถันรีดิวซ์ได้มากกว่าที่ภาวะที่ไม่ได้รับแสง แต่เนื่องจากพบว่าปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอและปริมาณเอพีเอสรีดักเตสเพิ่มขึ้นอย่างมากในช่วง 4 ชั่วโมงสุดท้ายของระยะมืด จึงสรุปว่ายังมีปัจจัยอื่นนอกจากแสงที่ควบคุมเอพีเอสรีดักเตส นอกจากนี้ยังพบว่าการให้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 เปอร์เซ็นต์แก่ *A. thaliana* ที่เจริญในที่มืดเป็นเวลานาน 38 ชั่วโมง มีผลทำให้กิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสในรากเพิ่มขึ้น 7 เท่าภายในเวลา 6 ชั่วโมง

Yamaguchi และคณะ (1999) ศึกษาผลของภาวะการขาดกำมะถันต่อปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอที่ถอดรหัสจากยีนประมวลรหัสเอนไซม์ในกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนซีสเตอีนจากซัลเฟตของ *A. thaliana* โดยปลูก *A. thaliana* อายุ 2 สัปดาห์ในภาวะขาดแคลนกำมะถัน โดยให้แสงตลอดเวลาหรือให้อยู่ในที่มืดตลอดเวลาเป็นเวลา 6 วัน แล้วนำมาสกัดเอ็มอาร์เอ็นเอ (สกัดจากพืชทั้งต้น (whole plant)) และรายงานว่า *A. thaliana* ที่เจริญในภาวะขาดแคลนกำมะถัน ปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอของเอทีพีซัลฟูรีเลสและเอพีเอสรีดักเตสจะเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน โดยปริมาณเอ็มอาร์

เอ็นเอของเอพีเอสรีดักเตสเพิ่มขึ้นถึง 5 เท่า เมื่อเจริญในภาวะทั้งที่ได้รับแสงและไม่ได้รับแสง ผลการทดลองนี้สนับสนุนผลการทดลองของ Gutierrez-Marcos และคณะ (1996) และของ Takahashi และคณะ (1997) ซึ่งรายงานว่าในภาวะขาดแคลนกำมะถัน ปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอของเอพีเอสรีดักเตสที่รากจะเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ Yamaguchi และคณะ (1999) ยังรายงานว่าภาวะการขาดแคลนกำมะถันจะสามารถทำให้ปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอของเอพีเอสรีดักเตสเพิ่มมากขึ้นได้ เฉพาะเมื่อเป็นภาวะที่มีไนโตรเจนเท่านั้น จึงสรุปว่าวิถีการนำซัลเฟตมาสร้างเป็นกรดอะมิโนซีสเตอีนในพืชถูกควบคุมในระดับการถอดรหัส (transcriptional level) โดยกำมะถันและไนโตรเจน

Lee และ Leustek (1999) ศึกษาผลของแคดเมียมต่อปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอและกิจกรรมของเอทีพีซัลฟูรีเลสและเอพีเอสรีดักเตสของต้น *Brassica juncea* ทั้งนี้เนื่องจากพบว่าพืชที่ได้รับสารโลหะหนัก จะสร้างเปปไทด์เรียก ไฟโตเคลาติน (phytochelatin) เพื่อทำหน้าที่จับสารโลหะหนักไว้ สารตั้งต้น (precursor) ของไฟโตเคลาตินคือกลูตาไธโอน ซึ่งมีกรดอะมิโนซีสเตอีนเป็นองค์ประกอบ และรายงานว่าเมื่อ *B. juncea* ได้รับแคดเมียมที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ พบว่าที่รากปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอของเอทีพีซัลฟูรีเลสเพิ่มขึ้น 3 เท่า แต่กิจกรรมของเอทีพีซัลฟูรีเลสไม่เปลี่ยนแปลง ที่ใบปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอของเอพีเอสรีดักเตสไม่เปลี่ยนแปลงแต่กิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสลดลง 7 เท่า ที่รากทั้งปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอและกิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสเพิ่มขึ้น ปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอเพิ่มขึ้น 5 เท่า ในเวลา 6 ชั่วโมง กิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสเพิ่มขึ้น 5 เท่า ในเวลา 24 ชั่วโมง การให้กรดอะมิโนซีสเตอีนหรือกลูตาไธโอนแก่ *B. juncea* มีผลทำให้ไม่พบการเพิ่มขึ้นของปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอ และกิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสเมื่อเจริญในภาวะที่มีแคดเมียม

Heiss และคณะ (1999) ศึกษาผลของแคดเมียมต่อปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอของรีคอมบิแนนท์ซัลเฟตทรานสปอร์เตอร์ (sulfate transporter) รีคอมบิแนนท์เอทีพีซัลฟูรีเลสและเอพีเอสรีดักเตสของ *B. juncea* และรายงานว่าปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอของเอทีพีซัลฟูรีเลสและเอพีเอสรีดักเตสที่ใบและที่รากของ *B. juncea* ที่เลี้ยงไว้ในอาหารที่มีแคดเมียม 25 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 6 สัปดาห์เพิ่มขึ้นอย่างมาก นอกจากนี้ยังพบว่าในภาวะเดียวกันนี้ทำให้ปริมาณกรดอะมิโนซีสเตอีนที่ใบและที่รากเพิ่มขึ้น 25 และ 81 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ปริมาณกลูตาไธโอนที่ใบและที่รากลดลง 48 และ 39 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จากผลการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าเมื่อพืชมีความต้องการกรดอะมิโนซีสเตอีนเพิ่มมากขึ้น เพื่อนำมาสังเคราะห์เป็นไฟโตเคลาติน กระบวนการถอดรหัสเพื่อให้ได้เอพีเอสรีดักเตสจะเพิ่มมากขึ้นด้วย

Saito และคณะ (2000) ได้ศึกษาปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอของเอพีเอสรีดักเตส (*APR1*) ในรากของต้น *A. thaliana* ที่เจริญในภาวะขาดแคลนซัลเฟอร์ และรายงานว่าพบปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอของเอพีเอสรีดักเตส (*APR1*) สูงกว่าในรากของต้นที่เจริญในภาวะปกติ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Takahashi และคณะ (1997) และ Yamaguchi และคณะ (1999)

Suter และคณะ (2000) ศึกษาผลของแอมโมเนียมต่อกิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสของ *L. minor* โดยเลี้ยง *L. minor* ในอาหารที่มีไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว แล้วทดลองให้แอมโมเนียมเพิ่มลงไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาสกัดเพื่อหาปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอและกิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตส พบว่าการให้แอมโมเนียมเพิ่มลงไปนี้ทำให้ปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอและกิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสเพิ่มขึ้น โดยกิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสเพิ่มขึ้น 50 เปอร์เซ็นต์ จึงได้ตั้งข้อสันนิษฐานว่าการที่กิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสเพิ่มมากขึ้นนี้ว่าจะเป็นผลมาจากการที่พืชมีความต้องการกรดอะมิโนที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบเพิ่มมากขึ้น เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนต่อไป

Rotte และ Leustek (2000) ได้สกัดเอพีเอสรีดักเตสจากใบของ *A. thaliana* และวิเคราะห์ปริมาณของเอพีเอสรีดักเตสในส่วนต่างๆ ของใบ พบว่ามีเอพีเอสรีดักเตสอยู่มากที่สุดในคลอโรพลาสต์ กิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสสูงที่สุดในใบอ่อน และเมื่อ *A. thaliana* อายุมากขึ้น กิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสที่ใบจะลดลงประมาณ 3 เท่า

Koprivova และคณะ (2000) ได้ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อกิจกรรมและปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอของเอพีเอสรีดักเตส พบว่า *A. thaliana* ที่เจริญในสภาวะขาดแคลนไนโตรเจนเป็นเวลา 72 ชั่วโมง กิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสที่ใบและที่รากจะลดลง 70 และ 50 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อเทียบกับ *A. thaliana* ที่เจริญในสภาวะปกติ ไม่พบความแตกต่างของปริมาณกรดอะมิโนซีสเตอีนและกลูตาไธโอน ผลการวิเคราะห์โดยวิธี Northern hybridization และ Southern hybridization พบว่ากิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสที่ลดลงนี้เป็นผลมาจากปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอและปริมาณเอนไซม์ที่ลดลง กิจกรรมของเอพีเอสรีดักเตสที่ลดลงที่รากเนื่องจากภาวะการขาดแคลนไนโตรเจนนี้อาจทำให้กลับคืนมาเป็นปกติได้ภายใน 24 ชั่วโมง หลังการเติมไนเตรทแอมโมเนียมหรือกลูตามีน เข้มข้น 4 มิลลิโมลาร์ หรือ โอ-อะซิติลเซอรีน (O-acetylserine; OAS) เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ การศึกษาการดูดซับซัลเฟตโดยการติดฉลากซัลเฟตด้วย S^{35} พบว่าหลังการเติมแอมโมเนียม กลูตามีนหรือโอ-อะซิติลเซอรีน ให้แก่ *A. thaliana* ที่เจริญในภาวะขาดแคลนไนโตรเจน ปริมาณโปรตีนที่ถูกติดฉลากด้วย S^{35} ที่รากจะเพิ่มขึ้น กรดอะมิโนซีสเตอีนและกลูตา

ไธโอนที่ถูกติดฉลากด้วย S^{35} จะเพิ่มขึ้นเฉพาะเมื่อเติมกลูตามีนและโอ-อะซิติลเซอรีน หรือโอ-อะซิติลเซอรีนอย่างเดียว เนื่องจากการเติมโอ-อะซิติลเซอรีนทำให้ปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอของเอพีเอสรีดักเตส ทั้ง 3 ไอโซฟอร์ม รวมทั้งปริมาณเอ็มอาร์เอ็นเอของซัลไฟต์รีดักเตส ซีสเตอีนซินเตสและเซอรีนอะซิติลทรานสเฟอเรสเพิ่มมากขึ้น จึงสรุปว่าการควบคุมกระบวนการ sulfate assimilation เป็นการควบคุมที่ระดับการถอดรหัส (transcriptional level) โดยมีโอ-อะซิติลเซอรีนทำหน้าที่เป็นตัวควบคุม

เทคนิคการถ่ายโอนยีนเพื่อใช้สร้างพันธุ์พืชให้มีสมบัติอย่างที่ต้องการมีหลายวิธีเช่น วิธีการใช้เครื่องยิงอนุภาค (microprojectile bombardment) วิธีอิเลคโทรพอเรชั่น (electroporation) และวิธีการใช้แบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุดโดยเฉพาะกับพืชใบเลี้ยงคู่ *A. tumefaciens* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นท่อน อาศัยอยู่ในดิน สามารถเข้าไปในเนื้อเยื่อที่มีบาดแผลของพืชใบเลี้ยงคู่ส่วนมากและของพืชใบเลี้ยงเดี่ยวบางชนิด (Koncz และคณะ, 1993) ทำให้พืชมีลักษณะเป็นปุ่มปม ความสามารถของ *A. tumefaciens* ในการเหนี่ยวนำให้เกิดลักษณะปุ่มปมในพืชนี้ถูกควบคุมโดยกลุ่มยีนบนพลาสมิดขนาดใหญ่ (ประมาณ 200 kbp) ที่เรียกว่าพลาสมิด Ti กลุ่มยีนสำคัญ 2 กลุ่มบนพลาสมิด Ti นี้คือ กลุ่มยีนส่วน *vir* และกลุ่มยีนส่วน T-DNA โดยกลุ่มยีนส่วน *vir* ประมวลรหัสของเอนไซม์ที่ใช้ในการตัดยีนส่วน T-DNA การถ่ายโอนยีนส่วน T-DNA และการสอดแทรกยีนส่วน T-DNA เข้าไปในโครโมโซมของพืช กลุ่มยีนส่วน T-DNA เป็นยีนบนพลาสมิดTi ที่จะถูกถ่ายโอนไปยังโครโมโซมของพืช กลุ่มยีนส่วน T-DNA นี้เป็นยีนประมวลรหัสของเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์ฮอร์โมนอ๊อกซินและไซโทไคนินทำหน้าที่เร่งการแบ่งเซลล์ของพืช จึงทำให้พืชที่รับยีนส่วน T-DNA นี้เข้าไปแสดงลักษณะเป็นปุ่มปม ดังนั้นหลักการถ่ายโอนยีนเข้าสู่เซลล์พืชโดยวิธีการใช้ *A. tumefaciens* จึงทำโดยสอดแทรกยีนที่ต้องการถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์พืชเข้าไปแทนที่ยีนซึ่งประมวลรหัสของฮอร์โมนเร่งการเจริญของเซลล์พืชในยีนส่วน T-DNA เมื่อยีนส่วน T-DNA สอดแทรกเข้าไปในโครโมโซมของพืช ยีนที่ต้องการถ่ายโอนจึงถูกสอดแทรกเข้าไปในโครโมโซมของเซลล์พืชด้วย (Koncz และคณะ,1993 ; Walden และคณะ, 1997)

Hood และคณะ (1986) ได้สร้าง *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ EHA101 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีพลาสมิด pEHA101 พลาสมิด pEHA101 นี้เป็นพลาสมิดที่ดัดแปลงมาจากพลาสมิด Ti คือมีกลุ่มยีน *vir* แต่ไม่มียีนส่วน T-DNA ต่อมา Kimura และคณะ (1993) ได้สร้างพลาสมิด pBIH1-IG ซึ่งเป็นพลาสมิดพาหะชนิดไบนารี สำหรับสร้างรีคอมบิแนนท์พลาสมิด พลาสมิด pBIH1-IG นี้มียีนส่วน T-DNA และยีนต้านต่อสารปฏิชีวนะไฮโกรมัยซินและกานามัยซิน อยู่ใน

บริเวณยีนส่วน T-DNA รีคอมบิแนนต์พลาสมิดที่สร้างจากพลาสมิด pBIH1-IG เมื่อนำมาทรานสฟอร์มเข้าสู่ *A. tumefaciens* EHA101 พบว่าทรานสฟอร์แมนท์ *A. tumefaciens* EHA101 ที่ได้มีประสิทธิภาพสูงในการถ่ายโอนยีนสอดแทรกในรีคอมบิแนนต์พลาสมิดเข้าสู่โครโมโซมของ *A. thaliana* และข้าว (Hiei และคณะ, 1994)

สินีนาฏ สายบาง (2543) ได้เพิ่มยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสโดยกระบวนการ PCR โดยใช้คอมพลีเมนทารีดีเอ็นเอของ *A. thaliana* เป็นเดีเอ็นเอแม่แบบ และใช้โอลิโกนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ซึ่งออกแบบโดยใช้ข้อมูลลำดับเบสของยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตส (*prh19*) ได้ดีเอ็นเอขนาด 1,558 เบส เรียกดีเอ็นเอ SNN1 นำดีเอ็นเอ SNN1 มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ pBIH1-IG(SX) แล้วทรานสฟอร์มเข้าสู่ *A. tumefaciens* EHA101 โดยวิธีอิเลคโตรโพเรชั่น เพื่อที่จะถ่ายโอนยีนประมวลรหัสเอพีเอสรีดักเตสนี้เข้าสู่โครโมโซมของพืชโดยวิธีการใช้ *Agrobacterium*

Akaracharanya และคณะ (2001) ได้ทำศึกษาการงอกใหม่ของต้นอ่อน (shoot regeneration) ของผักบุ้ง พบว่าใบเลี้ยงบริเวณส่วนโคนใบพร้อมก้านใบ สามารถงอกเป็นต้นใหม่ได้ เปอร์เซ็นต์การงอกต้นใหม่จากส่วนของใบเลี้ยงนี้มีค่าสูงถึง 75 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ใบเลี้ยงจากต้นอ่อนอายุ 7 วัน และใช้ไธเดียซูรอน (thidiazuron) ความเข้มข้นสุดท้าย 10 ไมโครโมลาร์ เร่งการพัฒนาไปเป็นต้นอ่อน ต้นอ่อนของผักบุ้งที่ได้สามารถงอกรากได้เองไม่จำเป็นต้องใช้ฮอร์โมนเพื่อเร่งการงอกของราก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย